



FACULTÉ  
DE MÉDECINE



UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES

# Analyse de la propagation de la pathologie tau dans le cerveau de modèles murins de la maladie d'Alzheimer après injections intravasculaires et intraoculaires de protéines tau pathologiques

**Thèse présentée par Marie-Ange de FISENNE**

en vue de l'obtention du grade académique de docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Année académique 2022 - 2023

Sous la direction du Dr Karelle LEROY (Promotrice)

et du Professeur Jean-Pierre BRION (Co-promoteur)

Laboratoire d'Histologie, de Neuroanatomie et de Neuropathologie (LHNN)

## Jury de thèse :

**Serge SCHIFFMANN, MD, PhD** (Université libre de Bruxelles, Président)

**Karelle LEROY, PhD** (Université libre de Bruxelles, Promotrice et Secrétaire)

**Jean-Pierre BRION, MD, PhD** (Université libre de Bruxelles, Co-Promoteur)

**Gilles NAEIJE, MD, PhD** (Université libre de Bruxelles)

**François WILLERMAIN, MD, PhD** (Université libre de Bruxelles)

**Valérie WITTAMER, PhD** (Université libre de Bruxelles)

## Experts extérieurs à l'Université libre de Bruxelles :

**Valérie BUÉE-SCHERRER, PhD** (Inserm Neuroscience & Cognition, Université de Lille, France)

**Laurence RIS, PhD** (Service de Neurosciences, UMon)



## Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative, incurable, composée de deux lésions neuropathologiques : les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF). Ces dernières sont composées de protéines tau hyperphosphorylées qui s'accumulent et s'agrègent dans le corps cellulaire des neurones en formant des filaments torsadés nommés « PHF » en anglais pour « Paired Helical Filaments ». Au cours de l'évolution de la maladie, la progression de la pathologie tau, mise en évidence par la présence des DNF dans le cerveau, semble être dépendante de voies neuroanatomiquement connectées. Cette observation a conduit à l'hypothèse que la protéine tau pourrait se comporter comme une protéine prion. Dans cette hypothèse, les protéines tau anormales doivent être internalisées par les cellules cibles pour opérer un changement physico-chimique des protéines tau endogènes (nucléation), qui, à leur tour acquièrent des caractéristiques pathologiques pouvant être transmises dans de nouvelles cellules (propagation). Néanmoins, contrairement aux prions, le caractère transmissible des protéines tau pathologiques n'a jamais été démontré.

Des contaminations iatrogènes de protéines prions ont été reportées ou suspectées à la suite de transfusions sanguines ou de greffes de cornées. Afin d'évaluer les similitudes possibles entre les prions et la protéine tau, nous avons analysé la transmission éventuelle de la pathologie tau par le sang ou à la suite d'une chirurgie oculaire en procédant à des injections intravasculaires ou intraoculaires de PHF-tau, isolés de cerveaux de patients décédés de la MA, dans des souris sauvages (WT) ou transgéniques exprimant une protéine tau et/ou amyloïde humaine sauvage ou mutée.

Les capacités de nucléation et de propagation des PHF-tau humains ont été validées *in vitro* à l'aide d'un modèle cellulaire de détection de l'activité de nucléation de la protéine tau et *in vivo* en utilisant des injections intracérébrales dans des souris sauvages (WT).

L'injection intravasculaire unique de PHF-tau humains a provoqué une exacerbation des pathologies amyloïde et tau ainsi qu'une neuroinflammation, mise en évidence par une activation des astrocytes et des cellules microgliales, dans des souris 5xFAD. Ces souris transgéniques développent des plaques amyloïdes dans le cerveau et possèdent une barrière hémato-encéphalique (BHE) perméable, deux caractéristiques rencontrées dans la MA et chez la personne âgée. Nous pensons que la perméabilité augmentée de la BHE a favorisé le passage des PHF-tau du sang vers le tissu cérébral et que la pathologie amyloïde pré-existante dans le cerveau a contribué aux effets des PHF-tau sur l'aggravation observée des pathologies tau et amyloïde.

L'injection intraoculaire unique de PHF-tau humains dans des souris sauvages (WT) et transgéniques qui surexpriment une protéine tau humaine normale (hTau) n'a pas montré une propagation de la pathologie tau vers les zones relais du système visuel : le corps genouillé latéral (CGL) et le colliculus supérieur (CS) malgré l'internalisation des PHF-tau par les cellules ganglionnaires de la rétine. La quantification des DNF dans les deux zones cérébrales (CGL et CS) dans les souris transgéniques qui expriment une protéine tau humaine mutée (ayant une capacité pro-agrégante) et une protéine tau murine (Tg22) n'a pas montré de différence entre les souris qui ont été injectées avec des PHF-tau ou avec une fraction contrôle. Par conséquent, nous attribuons les DNF observées dans ces zones cérébrales à l'expression du transgène. Etant donné que la neuroinflammation précède la neurodégénérescence dans la MA et les maladies à prions, nous avons investigué la présence d'une gliose réactive. Nous avons

## Résumé

observé que les PHF-tau injectés n'ont pas provoqué de neuroinflammation dans l'œil ou dans les aires cérébrales du système visuel.

L'absence de propagation de la pathologie tau dans le système visuel ne peut pas être expliquée par l'absence de protéines tau à recruter car des analyses comparatives de la rétine et du cerveau dans les différents modèles de souris étudiés ont montré une expression des protéines tau murines et humaines dans la rétine. Cependant, le niveau d'expression des protéines tau est plus faible dans la rétine comparé au cerveau, ce qui pourrait engendrer une capacité moindre de la rétine à propager la pathologie. En effet, il a été démontré qu'une augmentation de l'expression de la protéine tau, due à une duplication de son gène, chez un sujet humain, a conduit à la formation d'une pathologie tau, suggérant que le développement de cette dernière est dose-dépendante. Une plus faible expression de la protéine tau pourrait alors expliquer l'absence de propagation de la pathologie dans le système visuel. De plus, dans la rétine, nous avons observé que la protéine tau est très peu phosphorylée et n'a jamais été détectée sous une conformation anormale ou agrégée dans des modèles murins exprimant une protéine tau humaine sauvage ou mutée en présence ou non de plaques amyloïdes. Nous avons également observé que les kinases GSK3 $\beta$  et CDK5 sont exprimées dans la rétine avec un taux plus faible comparé au cerveau. Dans des modèles cellulaires, il a été démontré que la phosphorylation de la protéine tau est une étape clé pour sa sécrétion et son recrutement, deux mécanismes utilisés par la protéine tau pathologique pour sa propagation. Le faible niveau d'expression des kinases et de phosphorylation de la protéine tau dans la rétine pourrait également expliquer l'absence de propagation de la pathologie tau dans le système visuel.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats suggère que la possibilité d'une transmission de la protéine tau par le sang requiert davantage d'attention à l'égard de l'usage répandu des produits sanguins et particulièrement chez les personnes âgées qui pourraient posséder des facteurs aggravants telles que la présence d'agrégats de protéines amyloïdes dans le cerveau et une BHE compromise.

En revanche, le risque de contamination par des protéines tau pathologiques par des chirurgies oculaires semble faible, au vu de nos observations. Nous pensons que les neurones de la rétine sont résistants à l'induction d'une pathologie tau. Nous suggérons des études supplémentaires pour comprendre les mécanismes qui rendent la rétine peu susceptible de développer une pathologie tau et ainsi pouvoir moduler les mécanismes présents dans le cerveau pour contrer la propagation de la pathologie tau dans le cerveau de patients atteints de la MA.

### Summary

Alzheimer's disease (AD) is an incurable neurodegenerative disease composed of two neuropathological lesions : amyloid plaques and neurofibrillary tangles (NFT). The latter are composed of abnormally hyperphosphorylated tau proteins that accumulate and aggregate inside neurons to form twisted filaments called « PHF » for « Paired Helical Filaments ». The progression of tau pathology, as evidenced by the presence of NFTs in the brain, appears to follow neuroanatomically connected pathways. This observation has led to the hypothesis that tau protein may have « prion-like » properties. In this hypothesis, abnormal tau proteins must be internalised by target cells to induce a physicochemical change in endogenous normal tau proteins (nucleation), which in turn acquire pathological characteristics that can be transmitted into new cells (propagation). However, unlike prions, the transmissibility of pathological tau proteins has never been demonstrated in humans.

In this research project, we analysed the possible transmission of tau pathology through blood or following eye surgery by intravascular or intraocular injections of PHF-tau, isolated from brains of AD patients, into wild-type (WT) or transgenic mice expressing human WT or mutant tau or amyloid. Iatrogenic contamination by prions proteins has been reported or suspected following blood transfusions or corneal transplants.

The seeding and propagation abilities of human PHF-tau were validated *in vitro* using a cell-based model of tau nucleation activity and *in vivo* using intracerebral injections into wild-type mice (WT).

A single intravascular injection of human PHF-tau induced exacerbation of amyloid and tau pathologies and neuroinflammation, as evidenced by activation of astrocytes and microglial cells, in 5xFAD mice. These transgenic mice develop amyloid plaques in the brain and have a permeable blood-brain barrier (BBB), both of which are features of AD and the elderly. We think that the increased permeability of the BBB facilitated the passage of PHF-tau from the blood into brain tissue and that pre-existing amyloid pathology in the brain contributed to the effects of PHF-tau on the observed worsening of tau and amyloid pathologies.

Single intraocular injection of human PHF-tau into wild-type (WT) and transgenic mice overexpressing normal human tau protein (hTau) did not show propagation of tau pathology to the relay areas of the visual system : the lateral geniculate nucleus (LGN) and the superior colliculus (SC) despite internalisation of PHF-tau by retinal ganglion cells. Quantification of NFTs in both brain areas (LGN and SC) in transgenic mice expressing mutated human tau protein and murine tau protein (Tg22) showed no difference between mice injected with PHF-tau or with a control fraction. Therefore, the observed NFTs are due to the expression of the transgene. Since neuroinflammation precedes neurodegeneration in AD and prion diseases, we investigated the presence of reactive gliosis. We observed that the injected PHF-tau did not induce neuroinflammation in the eye or in the brain areas of the visual system.

The absence of tau pathology propagation in the visual pathway cannot be explained by the lack of tau proteins to recruit, as comparative analyses of the retina have shown that both murine and human tau proteins are expressed in the retina. However, the level of tau protein expression is lower in the retina than in the brain, which may result in a reduced ability of the retina to propagate pathology. Indeed, it has been shown that an increase in tau protein expression, due to MAPT gene duplication, in a human subject led to the formation of tau pathology, indicating a concentration-dependant kinetic of tau aggregation. A lower expression of the tau protein could then explain the absence of propagation of tau pathology in the visual pathway. Furthermore, in the retina, we observed that tau protein is very poorly phosphorylated

## Summary

and was never detected in an abnormal or aggregated conformation in mouse models expressing wild-type or mutated human tau protein in the presence or absence of amyloid plaques. We also observed that GSK3 $\beta$  and CDK5 kinases are expressed in the retina at a lower level compared to the brain. In cellular models, it has been shown that phosphorylation of tau protein is a key step for its secretion and recruitment, two mechanisms used by the pathological tau protein for its propagation. The low level of kinase expression and phosphorylation of tau in the retina could also explain the absence of propagation of tau pathology in the visual pathway.

Taken together, these findings suggest that the possibility of transmission of tau protein through blood requires further attention with regard to the widespread use of blood products and particularly in the elderly who may have aggravating factors such as the presence of amyloid protein aggregates in the brain and a compromised BBB.

On the other hand, the risk of contamination with pathological tau proteins through eye surgery seems low, based on our observations. Our results indicate that retinal neurons are resistant to the induction of tau pathology. We suggest that further studies should be aimed to understand the mechanisms that make the retina resistant to develop tau pathology, to be able to modulate these mechanisms to counteract the spread of tau pathology in the brain of AD patients.

### Remerciements

La réalisation de cette thèse a été possible grâce à la contribution de nombreuses personnes que je souhaite remercier chaleureusement.

Tout d'abord, je ne pouvais pas ne pas commencer ces remerciements en témoignant toute ma reconnaissance et mon estime à M. David Gall pour son soutien et ses conseils avisés. Sans vous, cette thèse aurait été bien différente et vous avez amplement participé à sa réussite, merci ! Vous avez été président de mon comité d'accompagnement au doctorat et celui-ci aura particulièrement bien porté son nom car vous m'avez réellement guidée et encouragée pendant ce long parcours doctoral qui ne fut pas toujours de tout repos. Merci.

Ensuite, j'aimerais remercier ma promotrice, Mme Karelle Leroy et mon co-promoteur, M. Brion de m'avoir permis d'aboutir à la finalisation de ce projet de recherche. Merci également pour la confiance que vous m'avez accordée pour les travaux pratiques d'histologie. Karelle, merci pour tes conseils et tes suggestions sur mon travail de recherche. Merci pour les articles qui ont pu être publiés. Merci aussi pour l'organisation (entre-autres) de ma fin de thèse, je peux compter sur toi pour prendre en charge ce qu'il faut rapidement. Parmi toutes ces années de doctorat, je retiendrais notamment notre congrès à Barcelone où nous avons pu profiter, entre les présentations scientifiques (évidemment), de la ville et de sa gastronomie ! Je garderai aussi en souvenir nos tee-shirts assortis lors du pique-nique du bâtiment G/E !

Je souhaite également remercier M. Serge Schiffmann qui fut membre de mon comité d'accompagnement au doctorat. Merci de la confiance que vous m'avez accordée dans la réalisation de cette thèse.

Merci Zehra pour ta bonne humeur et ta sympathie ainsi que pour tes connaissances techniques en histologie qui m'ont beaucoup aidée.

Merci Valérie pour soutien et nos discussions (sans oublier les panettones !). Je te remercie aussi pour ton expertise en laboratoire.

Merci Bob pour ta joie de vivre et tes récits de voyage. Merci aussi pour tes conseils en culture cellulaire et pour les souris. Merci également pour l'approvisionnement (fondamental !) en café du laboratoire.

Zehra, Valérie et Bob, simplement merci d'avoir été à mes côtés durant ces sept années dans le laboratoire.

Kunie, je te remercie pour ta gentillesse et ta bonne humeur. Merci d'être toujours disponible pour aider chacun d'entre-nous en laboratoire et de partager tes nombreuses connaissances scientifiques. Continue de garder ton sourire. Je te souhaite beaucoup de bonheur dans la suite de ton parcours professionnel et personnel. Et bien sûr, merci pour tes délicieux sushis fait maison et les petites attentions sucrées que tu apportais en salle café.

Thanks to Andreea, Emilie and Lidia for your kindness, support, contagious enthusiasm and our discussions (sometimes late, Andreea, you'll understand me). I am glad to have met you. Thanks to you, my last years of thesis were spent in a friendly atmosphere. I wish you every success in your research and fulfilment in this PhD and in your personal life. Andreea and Lidia, I hope you will keep good memories of your stay in Belgium. Emilie, je te souhaite

## Remerciements

autant de plaisir que j'en ai eu à encadrer les travaux pratiques et j'espère que cette expérience t'apportera beaucoup de satisfaction tant sur le plan professionnel que personnel.

Thank you Siran for your kindness. Good luck with your research and I hope you have a good time in Belgium.

Welcome to the lab Carolina. I wish you a lot of success !

Merci Manu pour ta gentillesse et pour ta passion communicative de l'anatomie comparée !

Merci Karim pour ta sympathie lors des travaux pratiques.

Merci Pascale pour ta sympathie et ton assistance dans les tâches administratives.

Merci Ievgenia et Jana pour votre amabilité et votre dynamisme. Merci pour votre chaleureuse arrivée au laboratoire. Ce fut un plaisir d'avoir pu vous aider pour les travaux pratiques. Jana, j'espère que ceux-ci t'apporteront, comme à moi, beaucoup de satisfaction. Je te souhaite d'innombrables réussites dans ta recherche. Merci pour ton amitié et les bons moments passés ensemble.

Merci à l'équipe (grandissante) de Ievgenia pour leur sympathie : Sylwia, Camille, Lisa et Antoine.

Merci aux mémorants et aux stagiaires pour leur bonne humeur et leur dynamisme. Merci notamment à Emmanuel, Yasmina, Eugenia et Marie. Un merci tout particulier à May pour sa gentillesse et nos agréables discussions.

Merci aux « anciens » du laboratoire, je pense notamment à Cristina, Salwa, Alain et Mégane. Merci Cristina d'avoir été à mon écoute et de m'avoir encouragée et réconfortée. Merci aussi de m'avoir fait profiter de ton expérience en laboratoire. Salwa, merci pour ta gentillesse et ton aide technique en laboratoire. Alain, merci d'avoir été là quand j'en ai eu le plus besoin. Merci de ton soutien et de ton écoute. Mégane, merci pour ton soutien et ton aide précieuse dans l'analyse de mes résultats.

Merci à ma famille et mes amis. Un merci tout particulier à ma Maman et mes deux frères, Luc-Henry et Yves-Eric ainsi qu'à mon amie de toujours, Dunja, qui ont sans cesse crû en moi et qui m'ont constamment encouragée et soutenue dans les moments heureux comme dans les moments plus difficiles. Merci de m'avoir toujours entourée de votre amour.

Merci à toi Gilles, mon amoureux qui m'a toujours épaulée et encouragée. Merci d'avoir été à l'écoute de mes doutes et de m'avoir prêté main forte quand j'en avais besoin. Merci de m'avoir aidé à franchir les obstacles.

Enfin, je remercie chaleureusement toutes les personnes qui n'ont pas été citées mais que j'ai pu rencontrer lors de mon parcours doctoral et qui ont contribué d'une manière ou d'une autre, sur le plan scientifique ou humain, à l'aboutissement de cette thèse.

**Table des matières**

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>3</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>5</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>13</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX</b> .....	<b>17</b>
<b>LEXIQUE</b> .....	<b>21</b>
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	<b>23</b>
<b>1.1. LA MALADIE D’ALZHEIMER</b> .....	<b>23</b>
<b>1.1.1. L’histoire de la maladie</b> .....	23
<b>1.1.2. Description clinique et épidémiologie</b> .....	24
<b>1.1.2.1. Description clinique</b> .....	24
<b>1.1.2.2. Epidémiologie</b> .....	25
<b>1.1.2.2.1. Contribution des facteurs génétiques dans la maladie</b> .....	25
<b>1.1.2.2.1.1. Facteurs de risques génétiques liés aux cas sporadiques</b> .....	25
<b>1.1.2.2.1.2. Mutations génétiques liées aux formes familiales</b> .....	26
<b>1.1.3. Etiologie</b> .....	29
<b>1.1.3.1. La pathologie tau</b> .....	29
<b>1.1.3.1.1. Physiologie de la protéine tau</b> .....	29
<b>1.1.3.1.2. La protéine tau pathologique</b> .....	33
<b>1.1.3.1.3. Tauopathies</b> .....	36
<b>1.1.3.2. La pathologie amyloïde</b> .....	38
<b>1.1.3.2.1. Physiopathologie de la protéine amyloïde</b> .....	38
<b>1.1.3.2.2. Théorie de la cascade amyloïde</b> .....	40
<b>1.1.3.3. Interactions des pathologies tau et amyloïde</b> .....	40
<b>1.1.3.4. Neuroinflammation</b> .....	41
<b>1.1.4. Diagnostic</b> .....	43
<b>1.1.5. Traitement</b> .....	44
<b>1.1.6. Contribution de l’immunohistochimie dans l’étude de la neuropathologie de la maladie d’Alzheimer</b> .....	45
<b>1.1.6.1. Evolution des dégénérescences neurofibrillaires</b> .....	45
<b>1.1.6.1.1. Stade « Pré-Tangles »</b> .....	45
<b>1.1.6.1.2. Stade « Tangles Matures »</b> .....	45
<b>1.1.6.1.3. Stade « Tangles Fantômes » (« Ghost Tangles »)</b> .....	46
<b>1.1.6.2. La pathologie tau dans les prolongements neuronaux</b> .....	46
<b>1.2. THÉORIE DE LA PROPAGATION DE TYPE « PRION-LIKE » DE LA PROTÉINE TAU</b> .....	<b>49</b>
<b>1.2.1. Séquence spatio-temporelle d’apparition de la pathologie tau</b> .....	49
<b>1.2.2. Propriétés « prion-like » des protéines tau pathologiques</b> .....	51

1.2.2.1. Similitudes avec les protéines à prions.....	51
1.2.2.2. Arguments en faveur des propriétés « prion-like » de la protéine tau <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	52
<b>1.3. TRANSMISSION IATROGÈNE DE MALADIES À PRIONS PAR DES VOIES</b>	
<b>EXTRACÉRÉBRALES.....</b>	<b>55</b>
1.3.1. Transmission par voie sanguine.....	55
1.3.1.1. Transmission de maladies à prions par voie sanguine.....	55
1.3.1.2. La protéine tau dans le sang.....	55
1.3.1.3. Transmission de la pathologie tau par voie sanguine.....	55
1.3.2. Transmission par le système visuel.....	56
1.3.2.1. Le système visuel chez l’homme et la souris.....	56
1.3.2.2. Transmission de maladies à prions par le système visuel.....	58
1.3.2.3. Propagation de la protéine prion <i>via</i> des connections neuronales.....	58
1.3.2.4. Expression des protéines tau et APP normales dans l’œil.....	59
1.3.2.5. La pathologie tau dans la rétine dans la maladie d’Alzheimer.....	59
1.3.2.6. La pathologie amyloïde dans la rétine dans la maladie d’Alzheimer..	61
1.3.3. Transmission de la pathologie tau par voie extracérébrale dans des modèles expérimentaux.....	62
<b>2. <u>OBJECTIFS</u>.....</b>	<b>63</b>
<b>3. <u>MATÉRIEL ET MÉTHODES</u>.....</b>	<b>65</b>
<b>3.1. <u>MATÉRIEL</u>.....</b>	<b>65</b>
3.1.1. Anticorps primaires.....	65
3.1.2. Anticorps secondaires.....	67
3.1.3. Cerveaux humains.....	67
3.1.4. Culture cellulaire.....	67
3.1.4.1. Culture de CHO.....	67
3.1.4.2. Culture primaire de neurones corticaux murins.....	67
3.1.4.3. Culture de cellules FRET.....	68
3.1.5. Souris transgéniques.....	69
3.1.5.1. Tg22 et Tg30 : Lignées de souris exprimant une isoforme de la protéine tau humaine mutée.....	69
3.1.5.2. TauKO : Lignée de souris n’exprimant aucune protéine tau.....	70
3.1.5.3. hTau : Lignée de souris exprimant les six isoformes de la protéine tau humaine sauvage.....	71
3.1.5.4. 5xFAD : Lignée de souris exprimant les protéines APP et PS1 humaines mutées.....	71
3.1.5.5. 5xFAD Tg30 : Lignée de souris exprimant les protéines APP, PS1 et tau humaines mutées.....	72
<b>3.2. <u>MÉTHODES</u>.....</b>	<b>73</b>
3.2.1. Préparation des fractions sarkosyl enrichies en PHF-tau humains insolubles.....	73
3.2.2. Coloration négative des PHF-tau par microscopie électronique.....	73
3.2.3. Tests de viabilité cellulaire/cytotoxicité sur des cellules traitées avec des PHF-tau humains.....	74
3.2.3.1. Test MTT sur cellules CHO.....	74

3.2.3.2. Test Calcéine-Propidium iodide sur neurones.....	74
3.2.4. Génotypage.....	75
3.2.4.1. Extraction de l'ADN.....	75
3.2.4.2. Amplification de l'ADN par PCR.....	75
3.2.4.3. Migration de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose.....	76
3.2.4.4. Révélation de l'ADN.....	76
3.2.5. Anesthésie préopératoire des souris.....	76
3.2.6. Injection intracérébrale (stéréotaxique).....	77
3.2.7. Injections périphériques.....	79
3.2.7.1. Injection intravasculaire (rétro-orbitaire).....	79
3.2.7.2. Injection intraoculaire (intravitréenne).....	80
3.2.8. Sacrifice et dissection des souris injectées.....	80
3.2.9. Immunohistochimie.....	81
3.2.10. Colorations de coupes histologiques.....	83
3.2.10.1. Hématoxyline.....	83
3.2.10.2. Gallyas.....	83
3.2.10.3. Rouge Congo.....	83
3.2.10.4. Thioflavine S.....	84
3.2.10.5. DAPI.....	84
3.2.11. Quantification de la pathologie tau sur coupes histologiques.....	84
3.2.11.1. Quantification des pathologies tau et amyloïde et de la neuroinflammation dans l'hippocampe des souris injectées en IV.....	84
3.2.11.2. Quantification de la pathologie tau dans les relais visuels des souris injectées en IO.....	85
3.2.12. Western blotting.....	86
3.2.12.1. Préparation des homogénats tissulaires.....	86
3.2.12.2. Dosage des protéines totales.....	87
3.2.12.3. Séparation des protéines par électrophorèse.....	87
3.2.12.4. Transfert sur membrane de nitrocellulose.....	87
3.2.12.5. Immunodétection.....	88
3.2.12.6. Révélation par chimioluminescence (ECL).....	88
3.2.12.7. Quantification des bandes protéiques par ImageJ.....	88
3.2.12.8. Normalisation des valeurs quantifiées.....	88
3.2.13. Analyses statistiques.....	89
<b>4. <u>RÉSULTATS</u>.....</b>	<b>91</b>
<b>4.1. <u>PARTIE 1 : CARACTÉRISATION DES FRACTIONS SARKOSYL</u>.....</b>	<b>91</b>
4.1.1. Analyses biochimiques.....	91
4.1.2. Etude de la cytotoxicité des PHF-tau humains <i>in vitro</i> .....	92
4.1.2.1. Sur des cellules CHO en culture.....	92
4.1.2.2. Sur des cultures primaires de neurones corticaux murins.....	93
4.1.3. Etude des capacités de nucléation des PHF-tau humains.....	93
4.1.3.1. <i>in vitro</i> : cellules FRET.....	93
4.1.3.2. <i>in vivo</i> : injection intracérébrale (stéréotaxique) dans des souris WT.....	94
<b>4.2. <u>PARTIE 2 : EFFETS DES INJECTIONS PÉRIPHÉRIQUES DE PHF-TAU HUMAINS                 DANS DES SOURIS TRANSGÉNIQUES</u>.....</b>	<b>96</b>
4.2.1. Injection intravasculaire de PHF-tau humains dans des souris 5xFAD et WT.....	96

4.2.1.1.	Analyse de la pathologie tau.....	96
4.2.1.2.	Analyse de la pathologie amyloïde.....	99
4.2.1.3.	Analyse de la neuroinflammation.....	101
4.2.1.4.	Analyse du sérum des souris injectées à la recherche d'anticorps anti-tau.....	103
4.2.1.5.	Analyse de la perméabilité de la BHE des souris 5xFAD.....	103
4.2.2.	Injection intraoculaire de PHF-tau humains dans des souris Tg22, WT, hTau et TauKO .....	105
4.2.2.1.	Expression et localisation de la protéine tau dans la rétine .....	105
4.2.2.2.	Validation de la méthode d'injection.....	108
4.2.2.3.	Analyse de l'internalisation des PHF-tau dans les neurones ganglionnaires de la rétine .....	110
4.2.2.4.	Analyse de la pathologie tau dans le système visuel .....	112
4.2.2.4.1.	Analyse de l'état d'agrégation de la protéine tau dans la rétine.	112
4.2.2.4.2.	Analyse du corps genouillé latéral .....	112
4.2.2.4.3.	Analyse du colliculus supérieur.....	114
4.2.2.5.	Analyse de la neuroinflammation.....	116
4.2.2.5.1.	Dans la rétine .....	116
4.2.2.5.2.	Dans le colliculus supérieur.....	118
<b>4.3.</b>	<b><u>PARTIE 3 : ANALYSES COMPARATIVES DE LA PROTÉINE TAU ET DES KINASES DANS L'ŒIL PAR RAPPORT AU CERVEAU DE SOURIS Tg22/30, WT, hTAU, TAUKO, 5xFAD ET 5xFAD Tg30</u></b> .....	<b>122</b>
4.3.1.	Analyses comparatives de la protéine tau et des kinases dans l'œil par rapport au cerveau dans les modèles murins Tg22/30, WT, hTau et TauKO.....	123
4.3.1.1.	Localisation de la protéine tau murine .....	123
4.3.1.2.	Expression et localisation de la protéine tau phosphorylée.....	124
4.3.1.3.	Localisation de la protéine tau déphosphorylée dans la rétine .....	128
4.3.1.4.	Localisation de la protéine tau agrégée dans la rétine.....	129
4.3.1.5.	Expression et localisation des kinases GSK3 $\beta$ et CDK5.....	131
4.3.2.	Analyses comparatives de la protéine tau et des kinases dans l'œil par rapport au cerveau dans les modèles murins 5xFAD et 5xFAD Tg30 .....	136
4.3.2.1.	Localisation des plaques amyloïdes dans la rétine .....	136
4.3.2.2.	Expression et localisation de la protéine tau .....	139
4.3.2.3.	Expression et localisation de la protéine tau phosphorylée.....	142
4.3.2.4.	Localisation de la protéine tau déphosphorylée dans la rétine .....	145
4.3.2.5.	Localisation de la protéine tau agrégée dans la rétine.....	146
4.3.2.6.	Expression et localisation de la kinase GSK3 $\beta$ .....	148
4.3.2.7.	Expression de la kinase CDK5 .....	151
<b>5.</b>	<b><u>DISCUSSION</u></b> .....	<b>153</b>
5.1.	<b>L'INJECTION INTRAVASCULAIRE DE PROTÉINES PHF-TAU ACCROÎT LA NEUROINFLAMMATION ET LES PATHOLOGIES AMYLOÏDE ET TAU DANS DES SOURIS TRANSGÉNIQUES 5xFAD</b> .....	<b>154</b>
5.2.	<b>L'INJECTION INTRAOCULAIRE DE PROTÉINES PHF-TAU NE PROPAGE PAS DE PATHOLOGIE TAU VERS LE CERVEAU PAR LA VOIE RÉTINO-TECTALE DANS DES SOURIS WT, hTAU ET Tg22</b> .....	<b>157</b>
5.3.	<b>LA PROTÉINE TAU DANS LA RÉTINE EST PEU PHOSPHORYLÉE PAR RAPPORT AU CERVEAU ET N'A PAS ÉTÉ OBSERVÉE SOUS UNE CONFORMATION ANORMALE OU AGRÉGÉE</b> .....	<b>160</b>

5.3.1.	Souris hTau .....	161
5.3.2.	Souris Tg22/30 .....	161
5.3.3.	Souris 5xFAD.....	162
5.3.4.	Souris 5xFAD Tg30 .....	163
<b>6.</b>	<b><u>PERSPECTIVES</u></b> .....	<b>167</b>
6.1.	ANALYSES DE LA PATHOLOGIE TAU DANS L'ŒIL ET LES RELAIS VISUELS CÉRÉBRAUX À LA SUITE D'UNE INJECTION INTRAOCULAIRE DE PHF-TAU HUMAINS DANS DES SOURIS TRANSGÉNIQUES POUR LA PROTÉINE TAU HUMAINE NORMALE (hTAU) OU MUTÉE (Tg22) APRÈS DES DÉLAIS D'INCUBATION SUPÉRIEURS À SIX MOIS .....	167
6.2.	ETUDES DES CAPACITÉS DE NUCLÉATION DES PHF-TAU ISOLÉS DE CERVEAUX DE PATIENTS DÉCÉDÉS DE LA MA ET DES PROTÉINES TAU PATHOLOGIQUES PRÉSENTES DANS L'ŒIL DE SOURIS TRANSGÉNIQUES ET DE CAS HUMAINS IN VITRO ET IN VIVO.....	167
6.3.	ETUDES DES PRÉDISPOSITIONS GÉNÉTIQUES DE LA MA (APOE) SUR LA TRANSMISSION ET LA SURVENUE D'UNE PATHOLOGIE TAU À LA SUITE D'UNE CONTAMINATION IATROGÈNE.....	168
6.4.	ETUDES DES PROPRIÉTÉS DE RÉSISTANCE À L'INDUCTION D'UNE PATHOLOGIE TAU DANS LA RÉTINE DE SOURIS SAUVAGES (WT) ET TRANSGÉNIQUES.....	169
<b>7.</b>	<b><u>ANNEXES</u></b> .....	<b>171</b>
7.1.	FIGURES SUPPLÉMENTAIRES.....	171
<b>8.</b>	<b><u>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u></b> .....	<b>179</b>
<b>9.</b>	<b><u>ARTICLES</u></b> .....	<b>209</b>
9.1.	HOUBEN S, DE FISENNE MA, ANDO K, VANDEN DRIES V, PONCELET L, YILMAZ Z, MANSOUR S, DE DECKER R, BRION JP, LEROY K. INTRAVENOUS INJECTION OF PHF-TAU PROTEINS FROM ALZHEIMER BRAIN EXACERBATES NEUROINFLAMMATION, AMYLOID BETA, AND TAU PATHOLOGIES IN 5XFAD TRANSGENIC MICE. FRONT MOL NEUROSCI. 2020 JUL 14;13:106. DOI: 10.3389/FNMOL.2020.00106. PMID: 32765217; PMCID: PMC7381181. ....	
9.2.	DE FISENNE MA, YILMAZ Z, DE DECKER R, SUAIN V, BUÉE L, ANDO K, BRION JP, LEROY K. ALZHEIMER PHF-TAU AGGREGATES DO NOT SPREAD TAU PATHOLOGY TO THE BRAIN VIA THE RETINO-TECTAL PROJECTION AFTER INTRAOCULAR INJECTION IN MOUSE MODELS. NEUROBIOL DIS. 2022 SEP 22:105875. DOI: 10.1016/J.NBD.2022.105875. EPUB AHEAD OF PRINT. PMID: 36154878. ....	

---

L'image en filagramme présente sur les intercalaires qui séparent les différents chapitres de cette thèse représente les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) après une coloration argentique dessinées par Aloïs Alzheimer en 1907.



**Liste des abréviations**

<b>A.a.</b>	Acides aminés
<b>AAC</b>	Angiopathie amyloïde cérébrale
<b>AD/MA</b>	Alzheimer's Disease/maladie d'Alzheimer
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AICD</b>	Domaine intracellulaire de l'APP
<b>ALP</b>	Voie de l'autophagie et du lysosome (Autophagy-lysosome pathway)
<b>ALS/PDC</b>	Syndrome de Guam
<b>ALZ</b>	(Maladie d') Alzheimer
<b>Aph-1</b>	Anterior pharynx-defective 1
<b>Apo E</b>	Apolipoprotéine E
<b>APP</b>	Protéine précurseur de l'amyloïde (Amyloid precursor protein)
<b>APS</b>	Ammonium persulfate/Persulfate d'ammonium
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>Aβ(40/42)</b>	Peptide β-amyloïde (1-40/1-42)
<b>BHE</b>	Barrière hémato-encéphalique
<b>BME</b>	β-mercaptoéthanol ou 2-mercaptoéthanol
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin/Albumine de sérum bovin
<b>C83/α-CTF</b>	Fragment C-terminal de l'APP α de 83 acides aminés
<b>C99/β-CTF</b>	Fragment C-terminal de l'APP β de 99 acides aminés
<b>CA(1-4)</b>	Corne d'ammon (régions 1-4)
<b>CBD</b>	Dégénérescence corticobasale
<b>CCG/GCL</b>	Couche des cellules ganglionnaires/Ganglion cell layer
<b>CDK5</b>	Kinase dépendante des cyclines 5 (cyclin-dependent kinase 5)
<b>CGL/LGN</b>	Corps genouillé latéral/Lateral geniculate nucleus
<b>CHO</b>	Chinese hamster ovary (cells)/(Cellules) d'ovaires de hamster de Chine
<b>CJD</b>	Creutzfeldt-Jakob Disease/Maladie de Creutzfeldt-Jakob
<b>CLDN 1/5</b>	Claudin(e) 1/5
<b>CNE/ONL</b>	Couche nucléaire externe/Outer nuclear layer
<b>CNI/INL</b>	Couche nucléaire interne/Inner nuclear layer
<b>CPE/OPL</b>	Couche plexiforme externe/Outer plexiform layer
<b>CPI/IPL</b>	Couche plexiforme interne/Inner plexiform layer
<b>Cryo-EM</b>	Cryo-microscopie électronique (Cryo-electron microscopy)
<b>CS/SC</b>	Colliculus supérieur/Superior colliculus
<b>CTF</b>	Fragment C-terminal de l'APP
<b>CTL</b>	Contrôle
<b>DAB</b>	3,3' diaminobenzidine
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phénylindole
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>DNF</b>	Dégénérescences neurofibrillaires
<b>DS</b>	Syndrome de Down
<b>ECL</b>	Enhanced chemiluminescence
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immuno sorbent assay (Méthode immuno-enzymatique)
<b>EM/ME</b>	Electron microscopy/Microscopie électronique

## Liste des abréviations

<b>EMA</b>	European Medicines Agency
<b>ETC</b>	Encéphalopathie traumatique chronique
<b>FAD</b>	Food and Drug Administration
<b>FRET</b>	Fluorescence resonance energy transfer/Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes
<b>FTD</b>	Démence fronto-temporale
<b>FTDP-17</b>	Démence fronto-temporale avec syndrome parkinsonien liée au chromosome 17 (Frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome-17)
<b>gCJD</b>	Maladie de Creutzfeldt-Jakob génétique
<b>GCL/CCG</b>	Ganglion cell layer/Couche des cellules ganglionnaires
<b>GD</b>	Gyrus denté
<b>GFAP</b>	Protéine acide fibrillaire gliale
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	Glycogène synthase kinase 3 $\beta$ (Glycogen synthase kinase 3 $\beta$ )
<b>HRP</b>	Horseradish peroxidase/Peroxydase de raifort
<b>Iba1</b>	Ionized calcium-binding adapter molecule 1
<b>IC</b>	(Injection) Intracérébrale
<b>iCJD</b>	Maladie de Creutzfeldt-Jakob iatrogène
<b>IHC</b>	Immunohistochimie
<b>INL/CNI</b>	Inner nuclear layer/Couche nucléaire interne
<b>IO</b>	(Injection) Intraoculaire
<b>IP</b>	(Injection) Intrapéritonéale
<b>IPL/CPI</b>	Inner plexiform layer/Couche plexiforme interne
<b>IRM</b>	Imagerie par résonance magnétique
<b>IV</b>	(Injection) Intravasculaire
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>KDa</b>	Kilodaltons
<b>KO</b>	Knock-out
<b>LCR/LCS</b>	Liquide céphalo-rachidien/Liquide cérébro-spinal
<b>LGN/CGL</b>	Lateral geniculate nucleus/Corps genouillé latéral
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharides
<b>MA/AD</b>	Maladie d'Alzheimer/Alzheimer's Disease
<b>MAP</b>	Protéine associée aux microtubules (Microtubule-associated protein)
<b>MAPT/Mapt</b>	Protéine associée aux microtubules tau (Microtubule-associated protein tau)
<b>MMP-2/9</b>	Métalloprotéases matricielles 2/9
<b>MPT</b>	Modification post-traductionnelle
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
<b>NIH</b>	National Institutes of Health
<b>NINCDS-ADRDA</b>	National Institute of Neurological and Communicative Diseases and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
<b>NMDA</b>	N-Méthyl-D-Aspartate
<b>O/N</b>	Overnight (Toute la nuit)
<b>ONL/CNE</b>	Outer nuclear layer/Couche nucléaire externe
<b>OPL/CPE</b>	Outer plexiform layer/Couche plexiforme externe
<b>P3</b>	Peptide $\beta$ -amyloïde (A $\beta$ ) 17–40/42

## Liste des abréviations

<b>pb</b>	Paire de bases
<b>PCR</b>	Réaction en chaîne par polymérase (Polymerase chain reaction)
<b>Pen-2</b>	Presenilin enhancer 2
<b>PEP</b>	Syndrome parkinsonien post-encéphalitique
<b>PET-scan</b>	Tomographie par émission de positrons
<b>PHF</b>	Paires de filaments hélicoïdaux (Paired helical filaments)
<b>PM</b>	Poids moléculaire
<b>PMCA</b>	Protein misfolding cyclic amplification
<b>PP2A</b>	Protéine phosphatase 2A (Protein phosphatase 2A)
<b>Prion</b>	Proteinaceous infectious particles (Particule infectieuse protéique)
<b>PRNP</b>	Gène encodant la protéine prion (humaine)
<b>PrPC</b>	Protease resistant protein (Protéine résistante aux protéases) = protéine prion cellulaire
<b>PrPSc</b>	Protease resistant protein (Protéine résistante aux protéases) = protéine prion pathologique (Sc = Scrapie)
<b>PS(EN)1/2</b>	Préséniline 1/2 (Presenilin 1/2)
<b>PSP</b>	Paralysie supranucléaire progressive
<b>PTFE</b>	Polytétrafluoroéthylène
<b>RIPA</b>	Radioimmunoprecipitation assay
<b>RT</b>	Room temperature/Température ambiante
<b>RT-QuIC</b>	Real-Time QUaking-Induced Conversion
<b>sAPP<math>\alpha/\beta</math></b>	APP soluble $\alpha/\beta$
<b>SC/CS</b>	Superior colliculus/Colliculus supérieur
<b>sCJD</b>	Maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulfate/Dodécylsulfate de sodium (ou laurylsulfate de sodium)
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis/Electrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du SDS
<b>SNC</b>	Système nerveux central
<b>SNP</b>	Système nerveux périphérique
<b>TANCs</b>	Tangle Associated Neuritic Clusters
<b>Tau</b>	Tubulin assembly unit
<b>TBS</b>	Tampon tris (Tris-buffered saline)
<b>TEM/MET</b>	Transmission electronic microscopy/Microscopie électronique à transmission
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
<b>Tg</b>	Transgénique
<b>TPK1/2</b>	Tau protein kinase 1/2
<b>UPS</b>	Système ubiquitine/protéasome (Ubiquitin-proteasome system)
<b>UV</b>	Ultraviolet
<b>vCJD</b>	Variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob
<b>WB</b>	Western blotting
<b>Wnt</b>	Wingless/Integrated (Wingless-related integration site)
<b>WT</b>	Wild type (sauvage)
<b>ZO-1</b>	Zonula occludens-1



**Liste des figures et tableaux****Introduction**

<b>Fig. 1</b>	Alois Alzheimer et sa patiente, Auguste Deter	23
<b>Fig. 2</b>	Les lésions neuropathologiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer : les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires	24
<b>Fig. 3</b>	Visualisation de l'atrophie cérébrale chez un patient atteint de la maladie d'Alzheimer par IRM	25
<b>Fig. 4</b>	Du gène MAPT à la protéine tau	30
<b>Fig. 5</b>	Structure de la protéine tau	31
<b>Fig. 6</b>	Sites de phosphorylation de la protéine tau en conditions physiologiques et pathologiques	33
<b>Fig. 7</b>	Les filaments torsadés ou « PHF » (Paired Helical Filaments) dans la maladie d'Alzheimer	34
<b>Fig. 8</b>	Profils typiques de migration par western blotting des protéines tau isolées de cerveaux humains atteints de différentes tauopathies à l'aide de l'anticorps AD2 qui met en évidence les protéines tau hyperphosphorylées et formant des PHF	37
<b>Fig. 9</b>	Schéma représentant certaines mutations de la protéine tau rencontrées dans les démences fronto-temporales (FTDP-17)	38
<b>Fig. 10</b>	Métabolisme du précurseur de la protéine amyloïde (APP)	39
<b>Fig. 11</b>	Morphologie des différents stades de maturité des dégénérescences neurofibrillaires au niveau du CA1 de la corne d'Ammon de l'hippocampe	47
<b>Fig. 12</b>	Résumé de colorations et d'anticorps utilisés pour évaluer le degré de maturité des dégénérescences neurofibrillaires	48
<b>Fig. 13</b>	Stades de Braak	50
<b>Fig. 14</b>	Mécanisme de conversion de protéines physiologiques par des protéines pathologiques qui conduit à l'agrégation de ces protéines. Mécanisme commun aux maladies à prions et à certaines maladies neurodégénératives (maladies d'Alzheimer et de Parkinson)	52
<b>Fig. 15</b>	Schéma de la rétine et section histologique d'une rétine de souris	56
<b>Fig. 16</b>	Schéma du système visuel (murin)	57
<b>Fig. 17</b>	Schéma des projections des fibres du nerf optique chez la souris	58

**Matériel et méthodes**

<b>Tableau 1</b>	Liste des anticorps primaires utilisés dans le projet de recherche	66
<b>Tableau 2</b>	Liste des anticorps secondaires utilisés en immunohistochimie (technique ABC/DAB) et en western blotting	67
<b>Fig. 18</b>	Représentation du système FRET utilisé dans des cellules HEK 293T	68
<b>Tableau 3</b>	Tableau récapitulatif des modèles murins utilisés dans le projet de recherche et leurs caractéristiques principales	69
<b>Fig. 19</b>	Construction du transgène exprimé par les souris Tg22 et Tg30	70
<b>Fig. 20</b>	Construction du transgène exprimé par les souris TauKO	70
<b>Fig. 21</b>	Construction des transgènes utilisés pour générer les souris 5xFAD	72
<b>Tableau 4</b>	Tableau récapitulatif des caractéristiques des lignées 5xFAD Tg30, Tg30 et 5xFAD observées au sein de notre laboratoire, dans l'étude de Héraud et al., 2014	72

<b>Tableau 5</b>	Liste des amorces utilisées en PCR, pour le génotypage des souris transgéniques	75
<b>Tableau 6</b>	Descriptif des cycles de PCR pour chaque gène d'intérêt, utilisé pour le génotypage des différents modèles murins	76
<b>Fig. 22</b>	Appareil de stéréotaxie et souris recevant une injection	78
<b>Fig. 23</b>	Illustrations du bregma et du point d'injection	78
<b>Tableau 7</b>	Coordonnées stéréotaxiques de deux régions cérébrales utilisées dans le projet de recherche pour des injections	78
<b>Fig. 24</b>	Point d'injection théorique pour le hile du gyrus denté de l'hippocampe selon les coordonnées stéréotaxiques	79
<b>Fig. 25</b>	Injection intraveineuse (rétro-orbitaire)	79
<b>Fig. 26</b>	Injection intraoculaire (intravitréenne)	80
<b>Fig. 27</b>	Technique d'immunomarquage indirecte utilisant le kit ABC	82
<b>Fig. 28</b>	Illustration des zones cérébrales relais du système visuel quantifiées	85
<b>Fig. 29</b>	Exemple d'une coupe histologique quantifiée à l'aide du logiciel « Stereo Investigator » (MBF Bioscience) associé au microscope « Axio Imager » (Zeiss)	86
<b>Tableau 8</b>	Volume de RIPA utilisé par type d'échantillon	86

### Résultats

<b>Fig. 30</b>	Les protéines tau insolubles, isolées d'un cerveau atteint de la MA, sont hyperphosphorylées et forment des filaments torsadés	91
<b>Fig. 31</b>	Les PHF-tau ne sont pas cytotoxiques in vitro sur des cellules CHO en culture	92
<b>Fig. 32</b>	Les PHF-tau ne sont pas cytotoxiques in vitro sur des neurones corticaux murins en culture primaire	93
<b>Fig. 33</b>	Les PHF-tau sont capables d'induire la nucléation des protéines tau dans des cellules en culture	94
<b>Fig. 34</b>	Schéma expérimental temporel des injections intracérébrales	94
<b>Fig. 35</b>	Les PHF-tau humains sont capables d'induire la nucléation des protéines tau dans le cerveau de souris WT après une injection intracérébrale (stéréotaxique)	95
<b>Fig. 36</b>	Schéma expérimental temporel des injections intravasculaires	96
<b>Fig. 37</b>	L'injection intraveineuse de PHF-tau aggrave la pathologie tau dans des souris 5xFAD	97
<b>Fig. 38</b>	La pathologie tau détectée dans les neurites dystrophiques des souris 5xFAD n'est pas composée des PHF-tau humains injectés	98
<b>Fig. 39</b>	L'injection intraveineuse de PHF-tau aggrave la pathologie amyloïde dans des souris 5xFAD	100
<b>Fig. 40</b>	L'injection intraveineuse de PHF-tau aggrave la neuroinflammation dans des souris 5xFAD	102
<b>Fig. 41</b>	L'injection intraveineuse de PHF-tau n'induit pas la production d'anticorps anti-tau	103
<b>Fig. 42</b>	Des immunoglobulines extravasées ont été détectées dans le cerveau de souris 5xFAD	104
<b>Fig. 43</b>	Schéma expérimental temporel des injections intraoculaires	105
<b>Fig. 44</b>	Localisation et expression des protéines tau dans la rétine de souris WT, hTau, Tg22 et TauKO	107
<b>Fig. 45</b>	Comparaison de l'œil humain et murin	108

<b>Fig. 46</b>	Détection de la sous-unité B de la toxine du choléra dans la rétine et le cerveau de souris WT injectées en intraoculaire	109
<b>Fig. 47</b>	Les PHF-tau sont détectés dans le cytoplasme des cellules ganglionnaires de la rétine 6 heures après l'injection	111
<b>Fig. 48</b>	Les PHF-tau n'induisent pas l'agrégation de protéines tau dans la rétine	112
<b>Fig. 49</b>	Les PHF-tau n'induisent pas une pathologie tau dans le corps genouillé latéral	113
<b>Fig. 50</b>	Les PHF-tau n'induisent pas une aggravation de la pathologie tau dans le colliculus supérieur de souris Tg22	115
<b>Fig. 51</b>	Les PHF-tau n'induisent pas de neuroinflammation dans la rétine	117
<b>Fig. 52</b>	Les PHF-tau n'induisent pas d'astrogliose dans le colliculus supérieur	119
<b>Fig. 53</b>	Les PHF-tau n'induisent pas d'activation microgliale dans le colliculus supérieur	120
<b>Fig. 54</b>	Localisation de la protéine tau murine dans la rétine de souris WT, hTau, Tg22 et TauKO	123
<b>Fig. 55</b>	Localisation et expression de la protéine tau phosphorylée (pSer396/404) dans la rétine de souris WT, hTau, Tg22 et TauKO	124
<b>Fig. 56</b>	Localisation de la protéine tau phosphorylée (pSer202/Thr305) dans la rétine de souris WT, hTau, Tg22 et TauKO	126
<b>Fig. 57</b>	Localisation de la protéine tau phosphorylée (pThr231) dans la rétine de souris WT, hTau, Tg22 et TauKO	127
<b>Fig. 58</b>	Localisation de la protéine tau déphosphorylée dans la rétine de souris WT, hTau, Tg22 et TauKO	128
<b>Fig. 59</b>	Localisation de la protéine tau de conformation anormale dans la rétine de souris WT, hTau, Tg22 et TauKO	129
<b>Fig. 60</b>	Localisation de la protéine tau agrégée dans la rétine de souris WT, hTau, Tg22 et TauKO	130
<b>Fig. 61</b>	Localisation et expression de la kinase GSK3 $\beta$ dans la rétine de souris WT, hTau, Tg22 et TauKO	132
<b>Fig. 62</b>	Localisation et expression de la kinase CDK5 dans la rétine de souris WT, hTau, Tg22 et TauKO	134
<b>Tableau 9</b>	Tableau récapitulatif des résultats obtenus par immunohistochimie (IHC) et western blotting (WB) pour les analyses comparatives de la protéine tau et des kinases dans l'œil par rapport au cerveau dans les modèles murins WT, hTau, Tg22 et TauKO	135
<b>Fig. 63</b>	Localisation des plaques amyloïdes A $\beta$ 40 ou A $\beta$ 42 dans la rétine de souris WT, 5xFAD, Tg30 et 5xFAD Tg30	137
<b>Fig. 64</b>	Illustration des plaques amyloïdes à l'aide de la coloration au Rouge Congo et des neurites dystrophiques en utilisant les anticorps anti-tau AT8 et MC1 dans le cerveau de souris 5xFAD et 5xFAD Tg30	138
<b>Fig. 65</b>	Localisation et expression des protéines tau dans la rétine de souris 5xFAD et 5xFAD Tg30	140
<b>Fig. 66</b>	Localisation et expression de la protéine tau phosphorylée (pSer396/404) dans la rétine de souris 5xFAD et 5xFAD Tg30	142
<b>Fig. 67</b>	Localisation et expression de la protéine tau phosphorylée (pSer202/Thr305) dans la rétine de souris 5xFAD et 5xFAD Tg30	143
<b>Fig. 68</b>	Localisation et expression de la protéine tau phosphorylée pThr231 dans la rétine de souris 5xFAD et 5xFAD Tg30	144
<b>Fig. 69</b>	Localisation et expression de la protéine tau déphosphorylée dans la rétine de souris 5xFAD et 5xFAD Tg30	145

<b>Fig. 70</b>	Localisation et expression de la protéine tau de conformation anormale dans la rétine de souris 5xFAD et 5xFAD Tg30	146
<b>Fig. 71</b>	Localisation de la protéine tau agrégée dans la rétine de souris 5xFAD et 5xFAD Tg30	147
<b>Fig. 72</b>	Localisation et expression de la kinase GSK3 $\beta$ dans la rétine de souris 5xFAD et 5xFAD Tg30	149
<b>Fig. 73</b>	Expression de la kinase CDK5 dans la rétine de souris 5xFAD et 5xFAD Tg30	151
<b>Tableau 10</b>	Tableau récapitulatif des résultats obtenus par immunohistochimie (IHC) et western blotting (WB) pour les analyses comparatives de la protéine tau et des kinases dans l'œil par rapport au cerveau dans les modèles murins 5xFAD et 5xFAD Tg30	152
<b>Annexes (Figures supplémentaires)</b>		
<b>Fig. Sup. 1</b>	Illustration de la pathologie amyloïde au niveau de l'hippocampe de souris transgéniques 5xFAD et 5xFAD Tg30 âgées entre 9 et 13 mois à l'aide des anticorps anti-A $\beta$ 42 et anti-A $\beta$ 40	171
<b>Fig. Sup. 2</b>	Illustration de la pathologie tau au niveau de l'hippocampe de souris sauvages (WT) et transgéniques Tg22, hTau, TauKO, 5xFAD et 5xFAD Tg30 âgées entre 9 et 13 mois à l'aide de l'anticorps AT8 qui reconnaît la protéine tau phosphorylée sur les épitopes Ser202/Thr305	172
<b>Fig. Sup. 3</b>	Schéma d'une coupe d'hippocampe d'une souris sauvage (WT) illustrant les différentes régions et le circuit trisynaptique	173
<b>Fig. Sup. 4</b>	Illustration de la pathologie tau sur une coupe de cerveau d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer	174
<b>Tableau Sup. 1</b>	Tableau récapitulatif des p-valeurs obtenues lors de la comparaison entre les densités du côté contralatéral et les densités du côté ipsilatéral chez des souris injectées avec une fraction sarkosyl AD ou CTL.	174
<b>Tableau Sup. 2</b>	Tableau récapitulatif des p-valeurs obtenues lors de la comparaison entre les densités des souris injectées avec une fraction AD et des souris injectées avec une fraction CTL dans le côté contralatéral ou ipsilatéral.	174
<b>Fig. Sup. 5</b>	Illustration de la mise en évidence artéfactuelle des vaisseaux sanguins sur des coupes histologiques de souris par l'utilisation d'anticorps secondaires anti-souris.	175
<b>Fig. Sup. 6</b>	Localisation et expression des protéines APP dans la rétine de souris 5xFAD et 5xFAD Tg30	176
<b>Fig. Sup. 7</b>	Expression des activateurs p35 et p25 de la kinase CDK5 dans la rétine et le cerveau de souris WT, hTau, Tg22, TauKO, 5xFAD et 5xFAD Tg30	177
<b>Tableau Sup. 3</b>	Tableau récapitulatif des résultats obtenus par immunohistochimie sur les neurones pyramidaux de la corne d'Ammon de l'hippocampe au niveau du CA1 avec les anticorps anti-tau ou à l'aide de la coloration Gallyas	177
<b>Tableau Sup. 4</b>	Tableau récapitulatif des résultats obtenus par immunohistochimie sur les neurones pyramidaux de la corne d'Ammon de l'hippocampe au niveau du CA1 avec les anticorps anti-GSK3 $\beta$ ou anti-CDK5	177
<b>Tableau Sup. 5</b>	Tableau récapitulatif des résultats obtenus par immunohistochimie avec les anticorps anti-amyloïde ou à l'aide de la coloration au Rouge Congo du cortex cérébral	177

**Lexique**

La nomenclature utilisée pour décrire la pathologie tau contient de nombreux termes qui sont repris (liste non-exhaustive) et définis dans le tableau ci-dessous. Celui-ci est largement inspiré de l'article de (Mudher et al., 2017).

Nom	Définition	Source (Modifié de)
<b>Pathologie tau</b>	Terme générique qui désigne les changements anormaux de la protéine tau : modifications post-traductionnelles et insolubilité ; localisation cellulaire anormale ; accumulation (formant des inclusions) ou agrégation de la protéine.	(Mudher et al., 2017)
<b>Inclusion de protéines tau</b>	Structure intracellulaire visible au microscope, composée d'une accumulation de protéines tau. <i>La définition donnée par (Mudher et al., 2017) a ici été modifiée, le terme « agrégat » a été remplacé par « accumulation » pour correspondre à la terminologie employée par notre laboratoire.</i>	(Mudher et al., 2017)
<b>Agrégat de protéines tau</b>	Assemblage de protéines tau hyperphosphorylées, formant des feuillettes $\beta$ plissés, en oligomères, fibrilles, filaments et DNF. Coloration positive au Gallyas, aux Thioflavines et au Rouge Congo.	(Mudher et al., 2017)
<b>PHF (-tau)</b>	« Paired Helical Filaments » ou « Paires de filaments hélicoïdaux » en français. Assemblage et agrégation de protéines (tau) hyperphosphorylées et anormalement phosphorylées en filaments torsadés.	
<b>« Seed »</b>	Une forme de la protéine tau, composée de feuillettes $\beta$ plissés, qui induit la nucléation (le changement conformationnel pathologique) et l'agrégation de la protéine tau.	(Mudher et al., 2017)
<b>Propagon</b>	Protéines, autres que les prions, qui induisent la conformation anormale de la protéine cible <i>in vitro</i> et/ou <i>in vivo</i> (capacité d'auto-réplication) et dont la transmission entre individus n'a pas été démontrée. Synonyme de « prionoïde ».	(Scheckel and Aguzzi, 2018, Colin et al., 2020)
<b>Prionoïde</b>	Synonyme de « propagon ».	(Scheckel and Aguzzi, 2018)
<b>« Prion-like »</b>	Processus de nucléation et de propagation attribués à d'autres protéines que les prions.	(Colin et al., 2020)
<b>« Seeding » ou nucléation</b>	Induction d'un changement conformationnel pathologique d'une protéine.	(Colin et al., 2020)
<b>Propagation</b>	Transport des protéines pathologiques, à la suite du processus de nucléation, qui permet le contact avec des protéines normales et la nucléation de celles-ci. La propagation peut avoir lieu par diffusion dans l'espace extracellulaire ou <i>via</i> des voies axoniques.	(Colin et al., 2020)
<b>DNF</b>	Dégénérescences NeuroFibrillaires. Accumulation de protéines tau agrégées sous forme de PHF dans le compartiment somato-dendritique des neurones. Synonyme de « Tangles ».	

## Lexique

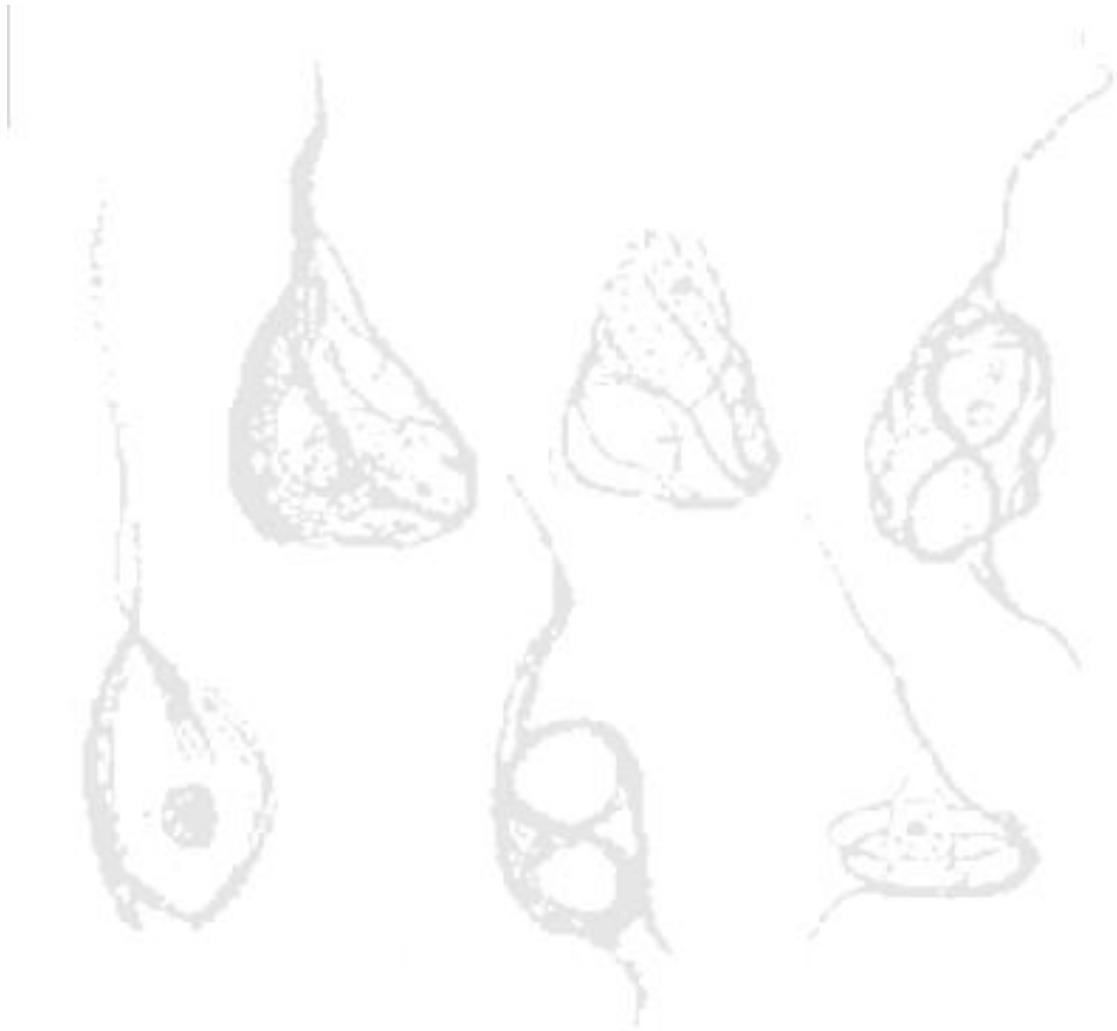
<b>« Tangles »</b>	« Enchevêtrements » en français. Agrégats de protéines tau, sous forme de PHF et de filaments droits, dans le soma (corps cellulaire) d'un neurone. Coloration positive au Gallyas. Synonyme de « DNF ».	(Mudher et al., 2017)
<b>« Neuropil threads »</b>	« Prolongements dans le neuropile » en français. Agrégats de protéines tau, sous forme de PHF et de filaments droits dans les neurites, majoritairement des dendrites. Coloration positive au Gallyas.	(Mudher et al., 2017)
<b>Neurites dystrophiques</b>	Neurites, majoritairement des axones, formant une couronne autour d'une plaque amyloïde (A $\beta$ ). Certains neurites contiennent des PHF et des filaments droits colorés par le Gallyas.	(Mudher et al., 2017)
<b>Plaque neuritique</b>	Structure composée d'une plaque amyloïde et des neurites dystrophiques qui l'entourent. Synonyme de plaque sénile.	(Moloney et al., 2021)
<b>Plaque sénile</b>	Synonyme de plaque neuritique.	

*“Even then, more than a year earlier, there were neurons in her head, not far from her ears, that were being strangled to death, too quietly for her to hear them. Some would argue that things were going so insidiously wrong that the neurons themselves initiated events that would lead to their own destruction. Whether it was molecular murder or cellular suicide, they were unable to warn her of what was happening before they died.”*

*« Déjà à cette époque, voilà plus d’un an, il y avait sous son crâne, non loin de ses oreilles, des cellules qui s’étouffaient à son insu. Une agonie insidieuse : les cellules génèrent elles-mêmes leur propre destruction. Meurtre moléculaire ou suicide cellulaire, peu importe : ses neurones ne parvenaient pas à donner l’alerte avant de mourir. »*

*— Lisa Genova, Still Alice / L’envol du papillon*





# *Introduction*

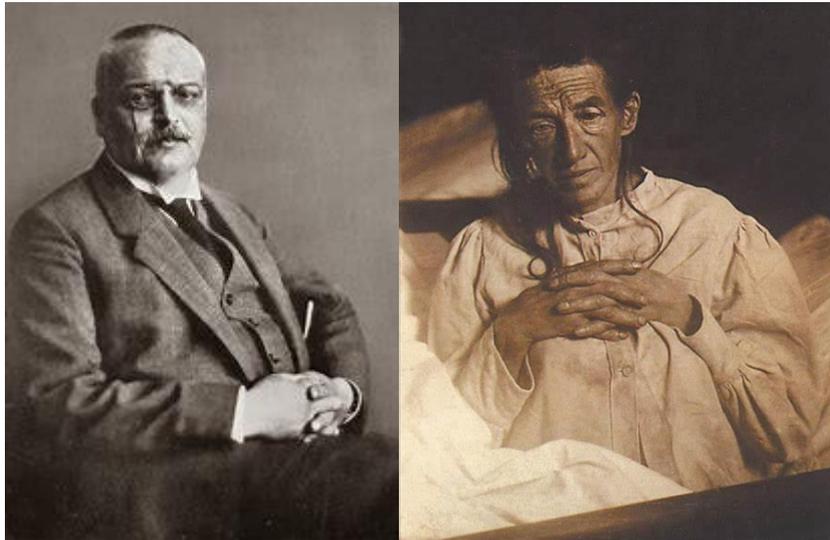


## 1. Introduction

### 1.1. La maladie d'Alzheimer

#### 1.1.1. L'histoire de la maladie

La maladie d'Alzheimer (MA) a été décrite pour la première fois par le psychiatre et neuropathologiste allemand Alois Alzheimer en 1901 lorsqu'il rencontra la patiente Auguste Deter, alors âgée de 51 ans et hospitalisée à Frankfort (**Fig. 1**). Il décrit que la patiente souffrait d'une maladie inhabituelle et progressive et présentait des symptômes de paranoïa, d'agressivité, de confusion et de perte de mémoire. Elle mourut cinq ans plus tard et Alzheimer procéda à son autopsie. Il observa que le cerveau était atrophié et qu'il présentait, à l'analyse microscopique, des dépôts anormaux qu'il nomma plaques et dégénérescences neurofibrillaires (DNF). Il présenta ces travaux en 1906 lors de la 37<sup>ème</sup> conférence des psychiatres allemands à Tübingen (Alzheimer, 1907). En 1912, un collègue d'Alzheimer, Emil Kraepelin, nomme cette maladie « la maladie d'Alzheimer » dans son « Traité de Psychiatrie » et la définit alors comme une démence du sujet jeune, la distinguant de la démence sénile qui est associée aux patients âgés. Depuis, la description de la MA a évolué. Néanmoins, les deux caractéristiques neuropathologiques, identifiées par des techniques histologiques, reste le seul diagnostic véritable pour la MA. Il s'agit, par conséquent, d'un diagnostic « *post-mortem* ». Actuellement, le diagnostic clinique de la MA repose sur différents critères décrits dans la section [1.1.4. Diagnostic].

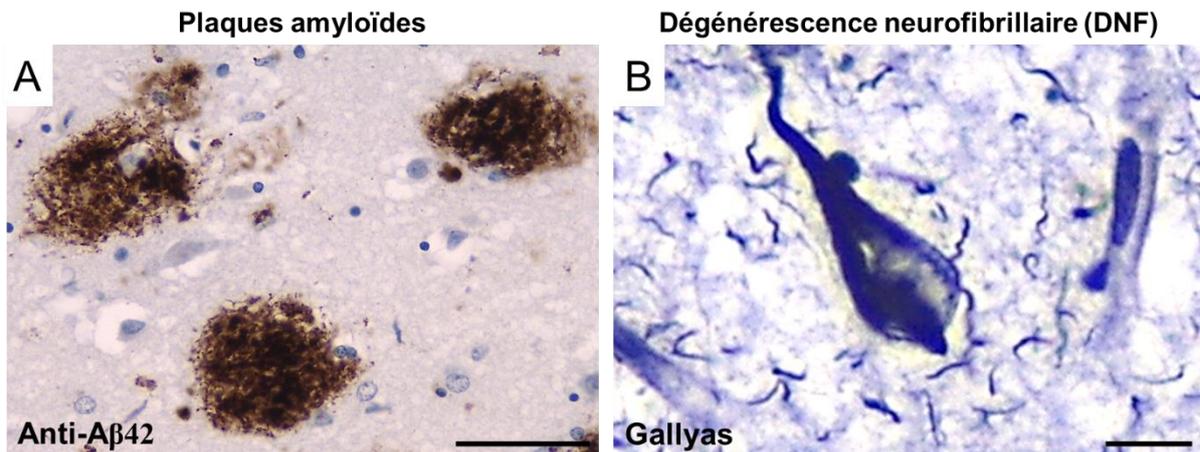


**Fig. 1 :** Alois Alzheimer et sa patiente, Auguste Deter. Le psychiatre et neuropathologiste allemand Alois Alzheimer a décrit pour la première fois en 1901 la maladie, qui portera un peu plus tard son nom, en observant Auguste Deter, une patiente de l'hôpital psychiatrique de Frankfurt alors âgée de 51 ans qui présentait des symptômes inhabituels pour son âge tels qu'une perte de mémoire à court terme. Lorsqu'elle décéda en 1906, Alzheimer autopsia son cerveau et mis en évidence, par des techniques d'imprégnation argentique, les deux lésions neuropathologiques qui deviendront les caractéristiques de la maladie : les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires.

## 1.1.2. Description clinique et épidémiologie

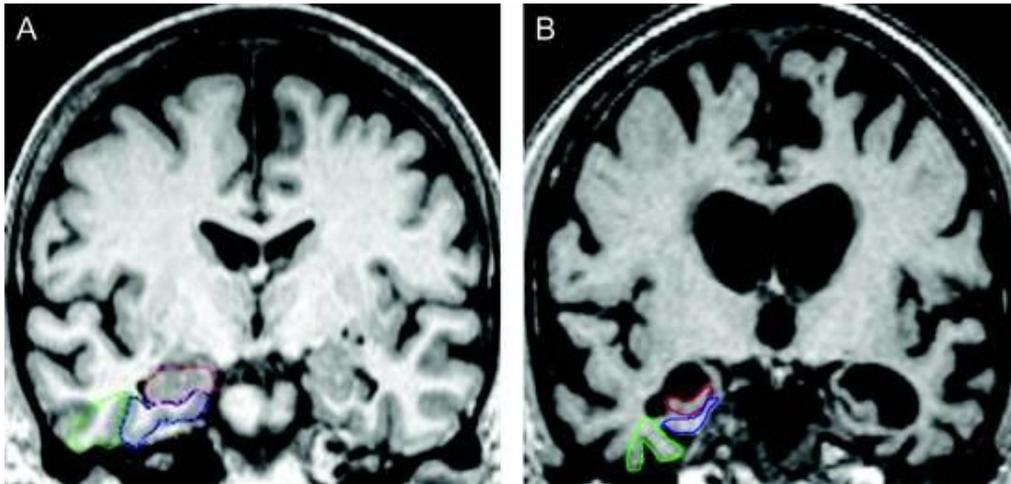
### 1.1.2.1. Description clinique

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative caractérisée par deux lésions neuropathologiques [détaillées dans les sections 1.1.3.1. et 1.1.3.2.] : les plaques amyloïdes composées de dépôts extracellulaires de peptides amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires composées d'une accumulation intracellulaire de protéines tau anormales dans les neurones (**Fig. 2**).



**Fig. 2 :** Les lésions neuropathologiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer : les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires. Les plaques amyloïdes (**A**), extracellulaires, sont composées d'agrégats de peptides amyloïdes mis en évidence en brun avec un anticorps anti-Aβ42. Les dégénérescences neurofibrillaires (**B**) sont composées de protéines tau anormales qui s'accumulent et s'agrègent dans le corps cellulaire du neurone. Ces protéines tau agrégées sont mises en évidence en noir à l'aide de la coloration Gallyas. Barres d'échelle : **A** : 50 μm et **B** : 10 μm.

Ces lésions sont accompagnées progressivement d'une perte des neurones et des synapses et d'une gliose réactive. L'hippocampe et le cortex cérébral s'atrophient tandis que les ventricules, qui permettent la circulation du liquide céphalo-rachidien, se dilatent (**Fig. 3**). Le volume de l'hippocampe évalué par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) a montré qu'il est de 15 à 40 % plus petit chez des patients atteints de la MA comparé à des sujets en bonne santé (Pini et al., 2016). Lors des stades précoces (démence légère) de la MA, le volume de l'hippocampe est déjà réduit de 15 à 30 % par rapport à des sujets contrôles (van der Flier et al., 2005). L'évaluation de l'atrophie du lobe temporal par IRM a été proposée comme un outil diagnostique de la MA (Duara et al., 2008) (**Fig. 3**).



**Fig. 3 :** Visualisation de l'atrophie cérébrale chez un patient atteint de la maladie d'Alzheimer par IRM. Le cerveau montre une atrophie sévère avec un élargissement des sillons et une dilatation des ventricules chez un patient atteint de la maladie d'Alzheimer (B) par rapport à un cerveau d'un sujet sain (A). L'hippocampe (en rouge), le cortex entorhinal (en bleu) et le cortex périrhinal (une région du lobe temporal) (en vert) sont fortement atrophiés (B). L'évaluation du volume des zones entourées en couleurs a été proposée comme outil diagnostique de la MA. Images de (Duara et al., 2008).

### 1.1.2.2. Epidémiologie

La maladie d'Alzheimer (MA) est la forme la plus courante de démence dans la population mondiale âgée de plus de 65 ans, comptant pour 60 à 80 % des cas. Par définition, la démence est un terme général qui reprend certains symptômes révélant un déclin des capacités mentales qui vont impacter progressivement la vie quotidienne de la personne affectée. Ces symptômes se caractérisent entre-autres par des difficultés de réflexion et de langage et des troubles de la mémoire. Un rapport de 2015 (Prince et al., 2015) estimait à 46 millions de personnes dans le monde (pour 10,5 millions en Europe) souffrant d'une forme de démence et ce chiffre pourrait atteindre les 131,5 millions d'ici 2050, ce qui représente un impact économique énorme pour les soins de santé. La prévalence de la démence dans la population augmente exponentiellement avec l'âge, doublant pour chaque tranche d'âge de 6,5 ans en Europe. Toujours selon ce rapport, l'incidence a été évaluée à 9,9 millions de nouveaux diagnostics de démence chaque année dans le monde, ce qui représente un nouveau cas toutes les 3,2 secondes.

#### 1.1.2.2.1. Contribution des facteurs génétiques dans la maladie

##### 1.1.2.2.1.1. Facteurs de risques génétiques liés aux cas sporadiques

La majorité des cas de la MA concernent des personnes âgées de plus de 65 ans, ce sont les cas dits sporadiques, à survenue tardive (« late-onset ») sans cause connue par opposition à la MA qui apparaît chez des sujets de moins de 65 ans (« early-onset ») dont la cause est le plus souvent génétique. Néanmoins, certains facteurs de risque seraient impliqués dans les formes sporadiques de la MA.

Ces facteurs de risque sont multifactoriels et comprennent des facteurs de risque génétiques et environnementaux. L'âge est le premier facteur de risque (Hebert et al., 1995). Ainsi, l'incidence de la MA est 14 fois plus élevée chez les personnes de plus de 85 ans par rapport aux personnes de 65 à 69 ans (Hebert et al., 1995). Le facteur de risque génétique le

plus impliqué est l'apolipoprotéine E (apo E). Cette protéine participe au transport des lipides tels que le cholestérol. Dans le système nerveux central (SNC), elle est principalement synthétisée par les astrocytes. Il existe trois allèles du gène de l'apo E dans la population : E2, E3 et E4 qui donne six phénotypes : E2/E2, E3/E3, E4/E4, E2/E3, E2/E4 et E3/E4. L'allèle E4 est associé à un risque plus élevé de développer la MA (Corder et al., 1993, Poirier et al., 1993) tandis que posséder l'allèle E2 semble avoir un effet protecteur (Chartier-Harlin et al., 1994, Serrano-Pozo et al., 2021). En effet, une première étude avait montré que la fréquence de l'allèle E4 atteignait 40 % chez des patients atteints d'une forme familiale tardive de la MA (Strittmatter et al., 1993) alors que la fréquence des allèles E2, E3 et E4 dans la population est de 8, 77 et 15 % respectivement selon une étude réalisée en 1997 (Bickeboller et al., 1997). La présence de l'allèle E4 augmente le risque pour la MA de 20 à 90 % et diminue l'âge moyen d'apparition de 84 à 68 ans (Corder et al., 1993). Par la suite, d'autres études ont observé cette association dans les formes sporadiques de la MA (Saunders et al., 1993, Chartier-Harlin et al., 1994).

### ***1.1.2.2.1.2. Mutations génétiques liées aux formes familiales***

La MA apparaissant de manière précoce (« early-onset »), c'est-à-dire chez des sujets « jeunes », de moins de 65 ans concernent 2 à 10 % des diagnostics de MA et parmi ceux-ci, 5 à 10 % sont attribuables à des formes familiales avec des mutations dans les gènes APP (Protéine Précurseur de l'Amyloïde/Amyloid Precursor Protein), PSEN1 (Préséniline1/Presenilin1) ou PSEN2 (Préséniline2/Presenilin2). Ces mutations sont autosomiques dominantes avec une pénétrance le plus souvent de 100 %, cela signifie que le sujet porteur d'une de ses mutations va déclarer la MA au cours de sa vie. Ces mutations sont néanmoins rares, avec une prévalence estimée à moins d'1 %.

Les mutations dans le gène de la préséniline 1 (PSEN1) sont les plus fréquentes (Kelleher and Shen, 2017) tandis que les mutations dans le gène PSEN2 sont les moins courantes (Sherrington et al., 1996), ces gènes sont localisés sur les chromosomes 14 et 1 respectivement. Ainsi, 10 mutations du gène PSEN2 ont été identifiées dans 18 familles tandis que 164 mutations ont été trouvées dans le gène PSEN1 dans 361 familles (Brouwers et al., 2008). Les mutations dans les présénilines 1 et 2 empêchent le clivage adéquat de l'APP en fragments A $\beta$  par la  $\gamma$ -sécrétase, ce qui se traduit par une augmentation du taux d'A $\beta$ 42, soit directement par une augmentation de la production d'A $\beta$ 42 ou soit par une diminution de la production d'A $\beta$ 40 ou soit par une combinaison des deux (Van Cauwenbergh et al., 2016). Les mutations dans le gène PSEN1 provoquent les formes les plus sévères de la MA avec une apparition de la maladie qui peut survenir très tôt, dès l'âge de 25 ans (25 à 65 ans) (Cruts et al., 2012). En comparaison, les mutations dans le gène PSEN2 entraînent une survenue de la maladie entre 39 et 88 ans (Sherrington et al., 1996, Jayadev et al., 2010).

Les mutations dans le gène de l'APP (Goate et al., 1991), localisé sur le chromosome 21, affectent la protéolyse de l'APP en faveur de la production du peptide A $\beta$ 42 qui est plus sujet à l'agrégation (Brouwers et al., 2008). La première mutation sur le gène de l'APP a été identifiée dans la région N-terminale de la séquence A $\beta$  et a été surnommée mutation « London » (V717I) (Goate et al., 1991). Une double mutation a aussi été trouvée dans la portion N-terminale de la séquence A $\beta$  et a été nommée la mutation « Swedish » (KM670/671NL) (Mullan et al., 1992). Depuis, plus d'une vingtaine de mutations ont été identifiées dans plus de 60 familles.

La découverte de ces mutations a conduit à la production de lignées murines transgéniques qui développent des plaques amyloïdes dans le cerveau. (Pour un aperçu des différentes lignées murines existantes, consulter la page web suivante : <https://www.alzforum.org/research-models> (Alzforum)). Dans ce projet de recherche, nous avons utilisé les souris transgéniques « 5xFAD » qui développent des plaques amyloïdes composées d'Aβ40 et 42 dans le cerveau (**Fig. Sup. 1**) à la suite de l'expression de deux transgènes portant au total cinq mutations identifiées sur les gènes qui codent pour les protéines APP et PSEN1 dans les formes familiales de la MA (Oakley et al., 2006). Il a été démontré que ces souris possédaient également une barrière hémato-encéphalique (BHE) altérée, ce qui reflète les observations faites dans la MA et chez la personne âgée. Ce dernier point est développé ci-dessous et les autres caractéristiques de ces souris transgéniques sont plus amplement développées dans le paragraphe [3.1.5.4.] du matériel et méthodes.

A ce jour, aucune mutation dans le gène de la protéine tau n'a été identifiée dans la maladie d'Alzheimer. Néanmoins, des mutations ont été identifiées dans le gène MAPT dans différentes maladies qui implique la protéine tau et qui par conséquent ont été dénommées « tauopathies ». Ces tauopathies partagent avec la maladie d'Alzheimer des modifications post-traductionnelles et conformationnelles rencontrées au niveau de la protéine tau pathologique. Les tauopathies sont décrites à la section [1.1.3.1.3.].

### *Altération de la barrière hémato-encéphalique dans la MA et au cours du vieillissement*

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une composante essentielle du SNC qui régule le flux d'ions, de molécules et de cellules entre le sang et le cerveau. Elle permet une fonction neuronale normale et protège le cerveau des toxines et des pathogènes. Elle est composée de vaisseaux sanguins continus non-fenestrés entourés de prolongements astrocytaires nommés « pieds astrocytaires ». Les cellules endothéliales qui composent la paroi de ces vaisseaux sanguins sont maintenues entre-elles par des jonctions serrées. L'ensemble de ces caractéristiques crée une véritable « barrière » très peu perméable qui permet un contrôle étroit du transport de molécules entre le sang et le cerveau. Bien que la plupart des régions cérébrales sont vascularisées par des capillaires possédant les propriétés de la BHE, certaines zones cérébrales (les organes circumventriculaires), proches des troisième et quatrième ventricules possèdent des capillaires continus fenestrés ayant une plus grande perméabilité. Cette perméabilité est nécessaire à leurs fonctions : détecter et évaluer la concentration de solutés dans le sang ou sécréter des molécules dans la circulation sanguine.

L'altération de la BHE, et par conséquent de ses fonctions, est observée dans les maladies neurodégénératives. Dans la maladie d'Alzheimer, les protéines β-amyloïdes s'accumulent dans la paroi des vaisseaux sanguins, provoquant une angiopathie amyloïde cérébrale (CAA) (Greenberg et al., 2020) qui pourrait notamment perturber le transport à travers la BHE, une voie majeure d'élimination des peptides Aβ du cerveau (Tarasoff-Conway et al., 2015). De plus, lors de la progression de la maladie, tandis que le peptide β-amyloïde 42 s'accumule dans les plaques extracellulaires, le taux de β-amyloïde 42 diminue dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) (Buchhave et al., 2012).

Des études d'imagerie médicale ont montré une détérioration de la BHE chez des sujets atteints de la MA (Rosenberg, 2014, van de Haar et al., 2016). Des analyses *post-mortem* du cerveau de patients décédés de la MA ont montré une diminution du nombre de péricytes

## Introduction

fortement corrélée à une augmentation de l'extravasation d'immunoglobulines<sup>1</sup> au niveau des capillaires de l'hippocampe et du cortex (Sengillo et al., 2013). L'étude a également observé une association entre l'accumulation de protéines  $\beta$ -amyloïdes et le déficit des péricytes dans les capillaires de l'hippocampe (Sengillo et al., 2013).

Une perte progressive de l'intégrité de la BHE, au niveau de l'hippocampe, est associée à l'âge selon une étude réalisée par une méthode d'imagerie médicale sur des sujets qui ne présentaient pas de troubles cognitifs (Montagne et al., 2015).

Les études sur des modèles animaux suggèrent que la protéine  $\beta$ -amyloïde est un facteur responsable de la perméabilité accrue de la BHE. Ainsi, l'A $\beta$ 40, qui est l'isoforme majoritairement retrouvée dans la paroi des microvaisseaux sanguins cérébraux entraînerait une diminution d'expression des protéines claudine 1 et 5 (CLDN 1 et 5) impliquées dans les jonctions serrées et augmenterait l'expression de métalloprotéases (MMP-2 et 9) dans des souris transgéniques (Tg2576) qui expriment une protéine APP humaine mutée (APP<sup>swe</sup>) (Hartz et al., 2012). Aussi, les peptides  $\beta$ -amyloïdes 42 induisent une perméabilité plus élevée de la BHE dans des souris 5xFAD (Oakley et al., 2006) qui expriment des protéines APP et PSEN1 humaines mutées, en diminuant l'expression de la zonula occludens-1 (ZO-1) et en augmentant la sécrétion des métalloprotéases (Kook et al., 2012, Kook et al., 2013). De manière indirecte, une autre étude a montré l'implication des protéines  $\beta$ -amyloïdes dans la perméabilité de la BHE dans des souris 5xFAD (Batarseh et al., 2017).

De même, l'analyse *post-mortem* de cerveaux atteints de la MA a montré que les taux de protéines impliquées dans les jonctions serrées des cellules endothéliales (CLDN5 et occludine (OCLN)) sont diminués dans le cortex et que cette diminution est associée à la sévérité de la MA et au taux d'agrégats de protéines  $\beta$ -amyloïdes (A $\beta$ 40 > A $\beta$ 42) (Yamazaki et al., 2019). La perméabilité de la BHE est uniquement augmentée lorsque les capillaires présentent une angiopathie amyloïde ou lorsqu'ils sont entourés de plaques amyloïdes selon une étude de (Wisniewski et al., 1997).

---

<sup>1</sup> Les immunoglobulines présentes dans le tissu cérébral sont un signe d'une rupture de l'imperméabilité de la BHE qui ne leurs permet normalement pas de quitter le compartiment sanguin.

### 1.1.3. Etiologie

#### 1.1.3.1. La pathologie tau

##### 1.1.3.1.1. *Physiologie de la protéine tau*

La protéine tau a été identifiée en 1975 et a été décrite initialement comme un facteur qui a la capacité d'induire la formation des microtubules (Weingarten et al., 1975). La protéine tau, pour « Tubulin Assembly Unit » est encodée dans l'espèce humaine par le gène MAPT (« microtubule-associated protein tau ») de 134 kb situé sur le bras long du chromosome 17 à la position 17.q21 (Neve et al., 1986). Deux haplotypes du gène humain ont été découverts et nommés H1 et H2, l'haplotype H1 est le plus répandu et est surexprimé dans certaines maladies neurodégénératives comme la paralysie supranucléaire progressive (PSP) et la dégénérescence corticobasale (CBD) (Houlden et al., 2001). Chez la souris, le gène *Mapt* se situe sur le chromosome 11 et contient 100 kb. La séquence du gène est bien conservée chez les mammifères avec une homologie de 97 à 100 % entre les primates. Le promoteur du gène MAPT lui confère une expression neuronale (Heicklen-Klein and Ginzburg, 2000).

Le gène MAPT contient 16 exons dont 8 sont alternativement épissés pour donner 6 isoformes de la protéine tau (**Fig. 4**). Le premier exon, qui appartient au promoteur, et l'exon 14 sont transcrits en ARNm mais ne sont pas traduits en protéines. Les exons 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13 sont constitutifs tandis que les exons 2, 3 et 10 sont alternativement transcrits. La protéine tau peut contenir l'exon 2, les exons 2 et 3 (l'exon 3 est exprimé uniquement en combinaison avec l'exon 2) ou aucun. La présence ou l'absence de ces exons 2 et 3 se traduit par la présence d'un (exon 2, 1N) ou deux inserts (exons 2 et 3, 2N) ou par l'absence d'insert (0N) dans le domaine N-terminal de la protéine. Les exons 9, 10, 11 et 12 encodent les domaines répétitifs de liaison aux microtubules. La protéine tau peut contenir 3 (3R) ou 4 (4R) domaines répétitifs de liaison aux microtubules selon l'épissage alternatif de l'exon 10, ce dernier étant responsable de l'expression du quatrième domaine de liaison aux microtubules. Au total ce sont 3 isoformes 3R et 3 isoformes 4R qui sont formées, chacune des isoformes 3R ou 4R possédant 0, 1 ou 2 inserts N-terminaux (0, 1 ou 2N) et comptant entre 352 et 441 acides aminés (a.a.) pour un poids moléculaire de 45 à 65 kDa. C'est pourquoi ces isoformes sont nommées 0N3R, 1N3R, 2N3R, 0N4R, 1N4R et 2N4R. L'exon 4a, quant à lui, est exprimé dans le système nerveux périphérique (SNP) et double le poids moléculaire de la protéine (110 kDa), ce qui lui vaut le nom de « Big tau » (Goedert et al., 1992a). Trois transcrits ont été identifiés : un transcrit de 2 kb localisé dans le noyau (Wang et al., 1993), un transcrit de 6 kb retrouvé majoritairement dans les neurones du SNC (Goedert et al., 1989a) et un transcrit de 8 kb rencontré dans la rétine et le système nerveux périphérique (SNP) (Couchie et al., 1992).

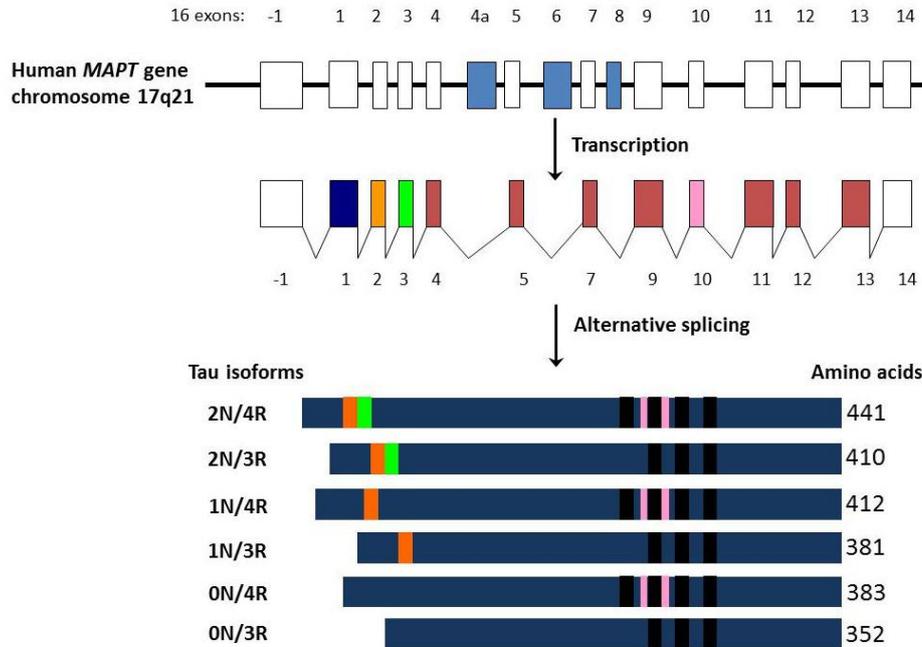
L'expression des différentes isoformes est régulée au cours de la vie humaine. Ainsi, durant la vie fœtale, seule l'isoforme 0N3R est présente dans le SNC et à l'âge adulte, ce sont les 6 isoformes qui sont exprimées avec un ratio de 1:1 pour les isoformes 3R et 4R (Hong et al., 1998). Cependant, la proportion des isoformes 0N, 1N et 2N diffèrent entre elles avec respectivement 37 %, 54 % et 9 % d'expression (Goedert and Jakes, 1990). De plus, la distribution des isoformes au sein des neurones diffèrent selon la région cérébrale. Par exemple, les cellules granulaires du gyrus denté de l'hippocampe<sup>2</sup> n'expriment que les isoformes 3R

---

<sup>2</sup> Un schéma explicatif de l'hippocampe qui illustre les différentes régions et les connectivités entre ces régions est proposé en figure supplémentaire 3 (**Fig. Sup. 3**).

## Introduction

(Goedert et al., 1989b). Au contraire de l'être humain, la souris à l'âge adulte n'exprime que les 3 isoformes 4R de la protéine tau (Kosik et al., 1989). La différence fonctionnelle entre les isoformes 3R et 4R est la plus grande affinité pour les microtubules des isoformes 4R comparées aux isoformes 3R. Les séquences protéiques du tau humain et murin sont à 88 % identiques (Poorkaj et al., 2001). La différence majeure entre les protéines des deux espèces réside dans la présence de 11 résidus supplémentaires dans la protéine tau humaine dans le domaine N-terminal (a.a. 17 à 27).

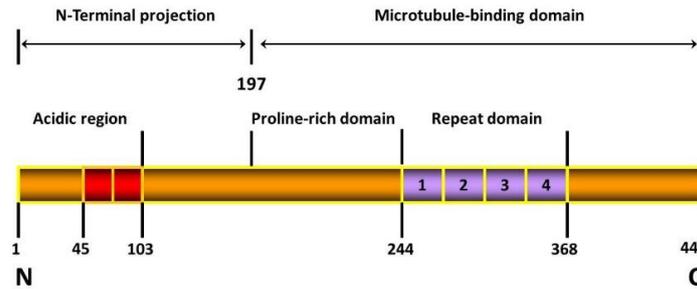


**Fig. 4 : Du gène MAPT à la protéine tau.** La protéine tau humaine est encodée par le gène MAPT situé sur le chromosome 17 qui donne par épissage alternatif des exons 2, 3 et 10, 6 isoformes de la protéine tau. Ces isoformes sont caractérisées par le nombre d'inserts en N-terminale (0N,1N ou 2N) et par le nombre de domaines de liaison aux microtubules en C-terminale (3R ou 4R). Figure de (Luna-Muñoz et al., 2013).

La région N-terminale de la protéine tau contient tout d'abord une région riche en glycine de 44 a.a. puis deux régions acides qui s'étendent des résidus 45 à 102 (la numérotation des résidus est basée sur la plus longue isoforme de la protéine tau, l'isoforme 2N4R de 441 a.a.). Les résidus 103 à 243 comprennent une région intermédiaire riche en proline (a.a. 151 à 243) et les résidus 244 à 367 forment les domaines répétitifs de liaison aux microtubules qui sont suivis par une région de 75 a.a., constituant la partie C-terminale de la protéine (**Fig. 5**). La partie C-terminale de la protéine se lie aux microtubules tandis que la région N-terminale peut notamment se lier à des composants de la membrane plasmique (Brandt et al., 1995).

La protéine tau ne possède pas de structures secondaire et tertiaire bien définies, ce qui en fait une protéine hautement soluble et thermostable. Néanmoins, une structure en « paper clip » (trombone) a été suggérée (Jeganathan et al., 2006, Kadavath et al., 2015).

## Introduction



**Fig. 5 : Structure de la protéine tau.** La région N-terminale de la protéine tau contient des domaines de liaison à différents constituants tels que la membrane plasmique et une région riche en proline. La partie C-terminale de la protéine contient les domaines de liaison aux microtubules. L'isoforme représentée est la plus longue isoforme de la protéine tau qui possède 441 acides aminés. Figure de (Luna-Muñoz et al., 2013).

La protéine tau est localisée majoritairement dans les axones des neurones où elle remplit plusieurs fonctions. La première fonction décrite de la protéine tau est son rôle dans la stabilisation des microtubules. Les neurones sont des cellules polarisées qui possèdent des dendrites et des axones. Le maintien de leur morphologie cellulaire est primordial pour la conduction de l'influx nerveux à travers les synapses qui sont les zones situées entre deux cellules nerveuses et qui permettent la transmission d'informations entre ces deux cellules. Le cytosquelette neuronal, qui permet le maintien de la structure cellulaire, est composé des microfilaments, des neurofilaments (filaments intermédiaires spécifiques aux neurones) et des microtubules. Les microtubules sont des structures dynamiques qui se polymérisent et se dépolymérisent en permanence et sont constitués de dimères de tubulines, chaque dimère étant composé d'une sous-unité de tubuline  $\alpha$  et d'une sous-unité de tubuline  $\beta$ . Les dimères s'assemblent en protofilaments pour former les microtubules qui possèdent un diamètre de 25 nm. Outre le maintien de la forme cellulaire, les microtubules sont impliqués dans le transport de différents éléments vers les extrémités cellulaires ou inversement vers le corps cellulaire, on parle alors de transport axonal antérograde ou rétrograde respectivement.

Il existe plusieurs protéines, à l'instar de la protéine tau, dont le rôle est de stabiliser les microtubules, ce sont les protéines associées aux microtubules « MAP » (« microtubule-associated proteins ») tels que MAP1A, MAP1B et MAP2. Alors que la protéine tau est une protéine axonale, la protéine MAP2 est retrouvée majoritairement dans les dendrites (Binder et al., 1985).

Les fonctions de la protéine tau sont régulées par différentes modifications post-traductionnelles (MPT). La première MPT mise en évidence (Cleveland et al., 1977) et la plus étudiée est la phosphorylation. La protéine tau compte 85 sites de résidus sérine, thréonine et tyrosine qui peuvent potentiellement être phosphorylés. Ces résidus se situent majoritairement dans la région riche en proline et dans les régions entourant les domaines de liaison aux microtubules. En conditions physiologiques, la protéine tau est relativement peu phosphorylée à l'exception de l'isoforme 0N3R durant le développement embryonnaire qui est fortement phosphorylée. Différentes kinases peuvent phosphoryler la protéine tau. Parmi elles, la GSK3 $\beta$  et la CDK5, deux sérine/thréonine kinases, sont capables de phosphoryler la protéine tau en conditions physiologiques et pathologiques. En effet, ces kinases ont été particulièrement étudiées car elles semblent jouer un rôle majeur dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer et plus particulièrement dans l'hyperphosphorylation de la protéine tau. Une brève

## Introduction

description de la GSK3 $\beta$  et de la CDK5 est présentée ci-dessous. Leurs rôles pathologiques sont décrits dans la section [1.1.3.1.2. La protéine tau pathologique].

La GSK3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ ) est une enzyme impliquée notamment dans l'homéostasie du glucose et le métabolisme énergétique et dans les voies de signalisation cellulaire de l'apoptose. Elle est exprimée de manière ubiquitaire dans le cerveau et dans de nombreux autres tissus. Elle est constitutivement active et est principalement inhibée par l'insuline et Wnt. Ainsi, la liaison de la protéine Wnt à son récepteur va induire l'inhibition de la GSK3 $\beta$  qui ne pourra plus phosphoryler la  $\beta$ -caténine, augmentant dès lors le taux de  $\beta$ -caténine dans la cellule. En effet, lorsque la GSK3 $\beta$  est active, elle phosphoryle la  $\beta$ -caténine qui sera ensuite dégradée par le protéasome. Pour atteindre son maximum d'activité, la GSK3 $\beta$  doit être phosphorylée sur son résidu Tyr216 (Hughes et al., 1993). A l'inverse, la phosphorylation du résidu Ser9 conduit à une réduction de l'activité de la kinase.

La GSK3 $\beta$  peut phosphoryler la protéine tau par deux mécanismes. La GSK3 $\beta$  peut phosphoryler directement la protéine sur les épitopes Ser396 ou Ser404 ou requiert une phosphorylation préalable de la protéine par une autre kinase pour phosphoryler le résidu Thr231 (Cho and Johnson, 2004), ces épitopes sont reconnus par les anticorps PHF-1 et AT-180 respectivement (Cho and Johnson, 2003). Néanmoins, une autre équipe a montré que le résidu Ser404 doit être *primo* phosphorylé afin que la GSK3 $\beta$  puisse à son tour phosphoryler la Ser396 (Li and Paudel, 2006). Chose intéressante, il semblerait que la CDK5 soit responsable de la pré-phosphorylation de certains résidus nécessaires à l'action ultérieure de la GSK3 $\beta$  (Li et al., 2006).

La CDK5 (Cyclin Dependent Kinase 5) est une enzyme principalement exprimée à des taux élevés dans les neurones du SNC où elle est impliquée dans la migration neuronale et la plasticité synaptique en phosphorylant des protéines qui jouent un rôle dans l'organisation du cytosquelette, dans les processus d'endocytose et d'exocytose et dans l'apoptose. Pour être activée, la CDK5 a besoin de se lier à une sous-unité régulatrice nommée « p35 ». p35 est une protéine qui est exprimée de manière spécifique par les neurones (Hellmich et al., 1992) et qui est rapidement dégradée par le système ubiquitine/protéasome (UPS) après autophosphorylation par la CDK5 (Patrick et al., 1998). p35 peut être clivée en p25 par la calpaïne, une enzyme lysosomale. Ce clivage en p25 entraîne une augmentation de la durée de vie de cette sous-unité et modifie l'activité de la CDK5 (Patrick et al., 1999) ainsi que la spécificité de ses substrats. De plus, la localisation de la kinase change, lorsqu'elle est associée à p35, elle est liée à la membrane ou au cytosquelette tandis que lorsqu'elle est jointe à p25, elle devient une protéine soluble (Hisanaga and Saito, 2003).

A l'inverse des kinases, qui ajoutent des groupements phosphates sur les protéines, les phosphatases les enlèvent. Plusieurs parmi elles sont capables de déphosphoryler la protéine tau dont la PP2A (« Protein Phosphatase 2 »). Une étude a montré que l'inhibition de la PP2A entraînait une diminution de l'activité de la GSK3 $\beta$  *via* l'augmentation de la phosphorylation de son résidu Ser9 (Qian et al., 2010).

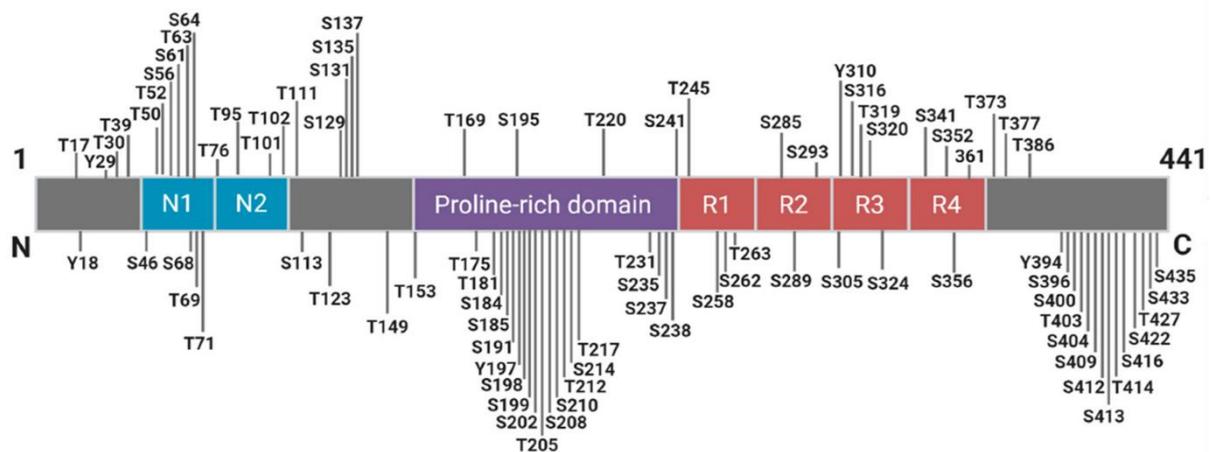
Les autres modifications post-traductionnelles (*pour revue, voir* : (Martin et al., 2011, Tapia-Rojas et al., 2019)) qui ont été décrites pour la protéine tau sont la glycosylation, la glycation, la méthylation, l'acétylation, la sumoylation, la prolyl-isomérisation, la nitration et l'ubiquitination. Néanmoins, la glycation et la nitration sont observés en conditions pathologiques (Martin et al., 2011).

La protéine tau peut être dégradée par le système ubiquitine/protéasome (UPS) et par la voie de l'autophagie et du lysosome (ALP). Un dysfonctionnement de ces systèmes d'élimination pourrait jouer un rôle dans l'accumulation des protéines tau (et amyloïdes) au cours de la MA. Par exemple, la présence des PHF-tau dans un cerveau atteint de la MA semble être corrélée à une diminution de l'activité du protéasome (Keck et al., 2003).

### 1.1.3.1.2. La protéine tau pathologique

Le constituant des dégénérescences neurofibrillaires (**Fig. 2B**) fut identifié comme étant la protéine tau pour la première fois en 1985 par le Prof. Jean-Pierre Brion (Brion et al., 1985). D'autres équipes ont ensuite confirmés cette découverte (Grundke-Iqbal et al., 1986, Kosik et al., 1986, Wood et al., 1986, Lee et al., 1991).

La protéine tau en conditions pathologiques a été rapidement identifiée comme une protéine hyperphosphorylée (Grundke-Iqbal et al., 1986). En effet, la protéine tau dans un cerveau humain en bonne santé contient 2-3 moles de groupements phosphates/mole de protéines tau tandis que la protéine tau dans un cerveau atteint de la MA est 3 à 4 fois plus phosphorylée que la protéine tau normale. L'hyperphosphorylation (temporaire) de la protéine tau peut également avoir lieu dans certaines conditions physiologiques telles que pendant le développement embryonnaire (Yu et al., 2009) ou pendant l'hibernation de certains animaux (Arendt et al., 2003) et durant certaines situations comme une anesthésie (Planel et al., 2007, Whittington et al., 2013) ou une hypothermie (Bretteville et al., 2012). Néanmoins, cette hyperphosphorylation n'est pas comparable à celle observée dans la MA. De plus, la phosphorylation de la protéine tau se fait également sur des sites qui ne sont pas phosphorylés en conditions physiologiques (**Fig. 6**).



**Fig. 6 :** Sites de phosphorylation de la protéine tau en conditions physiologiques et pathologiques.

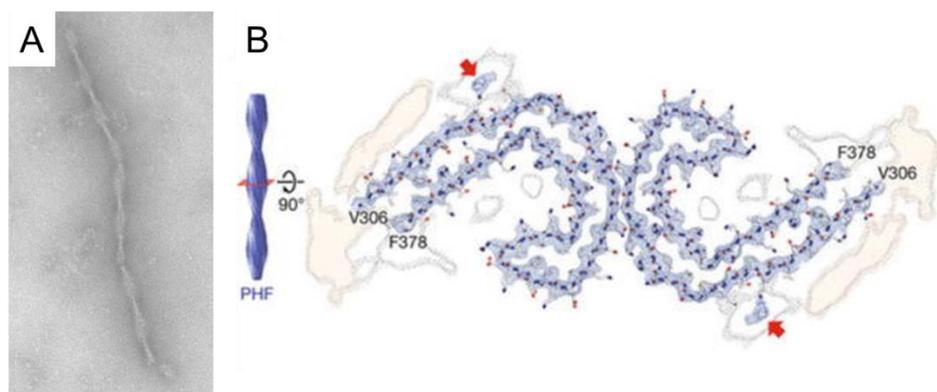
La protéine tau contient approximativement 85 résidus thréonine (T), sérine (S) ou tyrosine (Y) qui peuvent être phosphorylés en conditions physiologiques et/ou en conditions pathologiques. 49 sites phosphorylés ont été identifiés dans les cerveaux atteints de la maladie d'Alzheimer et sont indiqués sous la représentation de l'isoforme 2N4R. Image modifiée de (Arastoo et al., 2020), les auteurs ont tiré les informations représentées de (Hanger, 2020).

Les protéines tau hyperphosphorylées et anormalement phosphorylées s'assemblent et s'agrègent ensuite en filaments torsadés nommés « PHF » (paired helical filaments) (**Fig. 7**) et dans une moindre proportion en filaments droits dans la MA (Yagishita et al., 1981) pour former les dégénérescences neurofibrillaires (DNF). Les PHF et les filaments droits ont été observés

## Introduction

en microscopie électronique dès 1963 (KIDD, 1963). Les filaments de PHF sont composés de deux « brins » torsadés l'un autour de l'autre avec une périodicité de 80 nm et une largeur variant de 8 à 20 nm (Crowther and Wischik, 1985) tandis que les filaments droits n'ont pas cette périodicité (Crowther, 1991). L'accumulation de protéines tau, sous forme de PHF et de filaments droits, dans le compartiment somato-dendritique des neurones forment les DNF. Ces « enchevêtrements » de protéines tau dans le corps cellulaire neuronal sont appelés « tangles » en anglais. On peut également retrouver des accumulations de protéines tau pathologiques dans des prolongements axonaux et dendritiques (« neuropil threads ») et des neurites dystrophiques (« dystrophic neurites ») qui entourent les plaques amyloïdes. La protéine tau est une protéine dont les fonctions sont régulées par la phosphorylation. Lorsqu'elle est phosphorylée en conditions physiologiques, la protéine tau se détache des microtubules. Par conséquent, lorsqu'elle est hyperphosphorylée et anormalement phosphorylée en conditions pathologiques, comme dans la MA, elle ne peut plus se fixer aux microtubules qui se déstabilisent (Iqbal et al., 1986) entraînant probablement une altération du transport axoplasmique et par la suite une dégénérescence de l'axone qui aboutit à une perte de connectivité des neurones affectés. En effet, la protéine tau contient des domaines de liaison aux microtubules chargés positivement qui sont attirés par les microtubules chargés négativement. La phosphorylation anormale et excessive de la protéine tau pourrait neutraliser ses charges positives (Jho et al., 2010) et l'empêcher de se lier à la tubuline. De plus, la phosphorylation anormale de la protéine tau augmenterait les interactions entre ces protéines tau (Zhang et al., 2021a) et entraînerait la séquestration d'autres protéines associées aux microtubules (MAP) (Alonso et al., 1997), ce qui renforcerait la déstabilisation des microtubules.

Les PHF sont formés d'une partie centrale (« core »), résistante à la pronase (Wischik et al., 1988), d'où ressortent les extrémités N- et C-terminales des protéines tau (« fuzzy coat »). La structure des PHF et des filaments droits est composée de feuillettes  $\beta$  plissés (Berriman et al., 2003). Une étude détaillée par Cryo-EM de la structure des PHF (Fig. 7) et des filaments droits (Fitzpatrick et al., 2017) a montré que la partie centrale est composée des répétitions R3 et R4 (a.a. V306 à F378) qui forment 8 feuillettes  $\beta$  plissés et qui comprennent l'hexapeptide  ${}_{306}\text{VQIVYK}_{311}$  nécessaire pour la formation des filaments de tau (von Bergen et al., 2000).



**Fig. 7 : Les filaments torsadés ou « PHF » (Paired Helical Filaments) dans la maladie d'Alzheimer.** **A :** Filament observé en microscopie électronique à transmission. **B :** Représentation schématique de la structure d'un PHF. Les PHF sont composés de paires de protofilaments de protéines tau qui comprennent les résidus 306 à 378 et forment le « core » du PHF qui est probablement nécessaire et suffisant pour l'assemblage des protéines tau dans la MA. Photo du laboratoire d'histologie en **A** et image modifiée de (Fitzpatrick et al., 2017) en **B**.

## Introduction

Dans la MA, les six isoformes de la protéine tau sont hyperphosphorylées et présentes dans les PHF. En effet, l'analyse par western blotting (WB) des PHF isolés d'un cerveau atteint de la MA (**Fig. 8**) montre trois bandes majeures de 60 kDa (correspondant à l'isoforme 0N3R), 64 kDa (correspondant aux isoformes 0N4R et 1N3R) et 68 kDa (correspondant aux isoformes 1N4R et 2N3R) et une bande mineure à 72 kDa (correspondant à l'isoforme 2N4R) (Goedert et al., 1992b). Les trois bandes majeures des PHF-tau forment un triplet de protéines aussi connues sous le nom de fraction « A68 » (Ksiezak-Reding et al., 1990, Brion et al., 1991, Lee et al., 1991). L'hyperphosphorylation des différentes isoformes de tau est responsable du poids moléculaire (PM) plus élevé observé en WB par rapport à la protéine tau en conditions physiologiques (Brion et al., 1991) dont le PM est compris entre 45 et 65 kDa. L'analyse des PHF a été rendue possible grâce à leur isolation de cerveaux humains atteints de la MA (ou d'une autre tauopathie) par la méthode sarkosyl (Goedert et al., 1992b). Les PHF sont contenus dans la fraction dite « insoluble » au sarkosyl car ils sont résistants à ce détergent, contrairement aux protéines « solubles ».

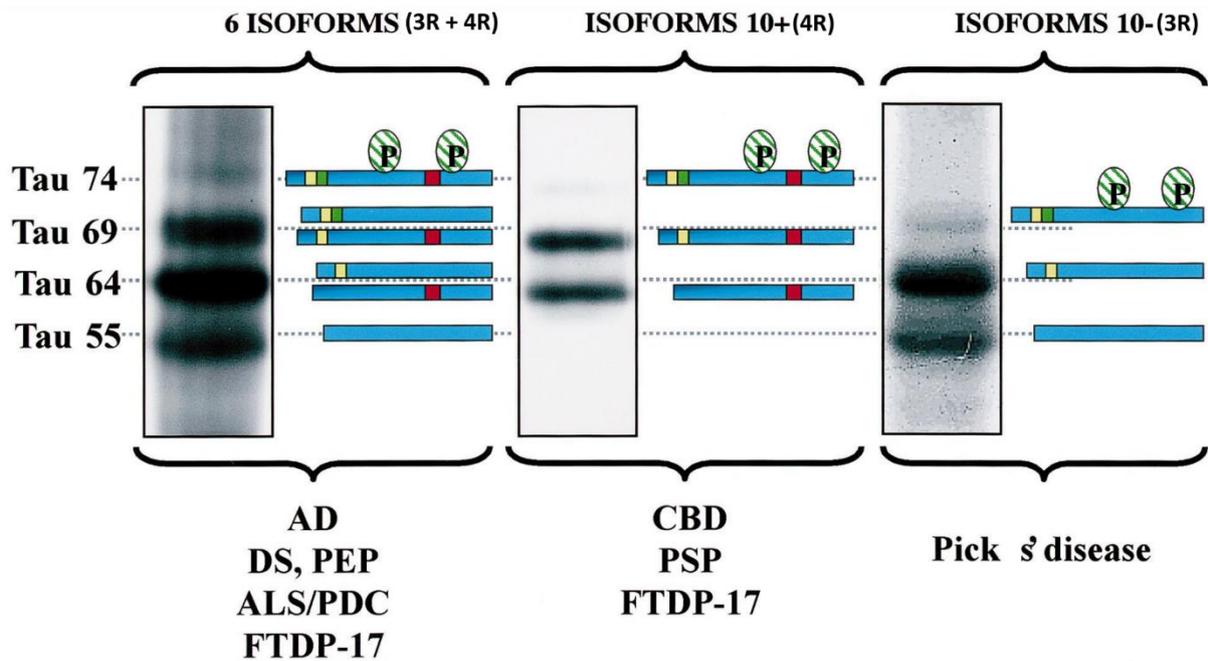
La phosphorylation de la protéine tau est importante pour son agrégation. En effet, la déphosphorylation *in vitro* des protéines tau empêchent la formation des PHF (Alonso et al., 2001). L'hyperphosphorylation de la protéine tau dans la MA pourrait être la conséquence d'une augmentation de l'activité des kinases et/ou d'une diminution de l'activité des phosphatases (Chung, 2009). Deux kinases (isolées originellement à partir de microtubules de cerveaux bovins) ont montré une capacité particulière à phosphoryler la protéine tau et ont été nommées TPK1 et TPK2 pour « Tau Protein Kinase 1 ou 2 ». La TPK1 a montré une aptitude à phosphoryler des épitopes présents dans les PHF (Ishiguro et al., 1992b, Ishiguro et al., 1992a). Un peu plus tard, les TPK1 et 2 ont été identifiées comme la GSK3 $\beta$  (Ishiguro et al., 1993) et la CDK5 (Ishiguro et al., 1993) respectivement. A l'instar de la GSK3 $\beta$ , la CDK5 peut phosphoryler des résidus de la protéine tau observés dans la MA (Baumann et al., 1993). Les kinases GSK3 $\beta$  et CDK5 peuvent s'influencer et augmenter la phosphorylation de la protéine tau (Engmann and Giese, 2009). Par exemple, la *primo* phosphorylation de la protéine tau par la TPK2/CDK5 favorise la phosphorylation ultérieure de la protéine par la TPK1/GSK3 $\beta$  (Imahori and Uchida, 1997, Sengupta et al., 1997, Li et al., 2006). L'expression et l'activité de la GSK3 $\beta$  sont augmentées dans les cerveaux atteints de la MA par rapport à des cerveaux en bonne santé (Hye et al., 2005, Leroy et al., 2007b), de même, le taux de p25 (Tseng et al., 2002), et par conséquent l'activité de la CDK5, sont augmentés dans les cerveaux affectés par la MA (Patrick et al., 1999). De plus, les deux kinases sont co-localisées avec les DNF (Yamaguchi et al., 1996). (*Pour revues, voir : GSK3 $\beta$  (Hernandez et al., 2013) et CDK5 : (Kimura et al., 2014) ).*

En ce qui concerne les phosphatases, et plus spécifiquement la protéine phosphatase 2A (PP2A), qui est l'enzyme majeure impliquée dans les activités phosphatases du cerveau, a une activité moindre dans un cerveau atteint de la MA (Gong et al., 1993, Gong et al., 1995) et la déphosphorylation de PHF-tau isolés de cerveaux atteints de la MA par la phosphatase PP2A empêche leur polymérisation en PHF tout en restaurant leurs capacités de se lier aux tubulines et de promouvoir leur assemblage pour former les microtubules (Wang et al., 2007). (*Pour revue, voir : (Sontag and Sontag, 2014).*)

### *1.1.3.1.3. Tauopathies*

L'étude de la pathologie tau dans la MA a connu un regain d'intérêt avec la découverte en 1998 de mutations dans le gène MAPT (Hutton et al., 1998), qui code pour la protéine tau, dans certaines démences fronto-temporales qui font partie d'un groupe de maladies nommées « tauopathies ». Ces mutations entraînent une pathologie tau similaire à celle observée dans la MA mais en l'absence de dépôts amyloïdes. Par conséquent, cela démontrait que la protéine tau pouvait induire, à elle seule, une maladie neurodégénérative. La recherche sur la MA a en effet longtemps privilégié l'étude de la pathologie amyloïde, étant donné que la forme familiale de la MA résulte de mutations dans les gènes impliqués dans le métabolisme de l'amyloïde. Néanmoins, le nombre et la localisation des DNF, et non les plaques amyloïdes, sont fortement corrélées avec la sévérité des troubles cognitifs et par conséquent avec les symptômes cliniques (Alafuzoff et al., 1987, Duyckaerts et al., 1987, Dickson et al., 1988, Arriagada et al., 1992, Giannakopoulos et al., 2003). De plus, le nombre de plaques amyloïdes chez des sujets en bonne santé est souvent comparable à celui trouvé chez des personnes du même âge atteintes de la MA (Mann et al., 1989). Enfin, les échecs consécutifs des essais cliniques ciblant le peptide amyloïde ont poussé nombre de chercheurs à reconsidérer l'implication de la protéine tau dans le déclin cognitif observé dans la MA.

Les tauopathies sont un groupe de maladies neurodégénératives caractérisées par la présence de dépôts anormaux de la protéine tau dans le cerveau. Le terme « tauopathie » a été introduit pour la première fois en 1997 pour décrire une démence précoce à transmission autosomique dominante caractérisée par une pathologie tau en l'absence d'une pathologie amyloïde (Spillantini et al., 1997). Les différents symptômes cliniques des tauopathies sont associés aux zones cérébrales affectées par les DNF. Les DNF présentes dans ces tauopathies sont composées des 6 isoformes de la protéine tau, des formes 4R ou 3R uniquement. La maladie d'Alzheimer (AD), le syndrome de Down (DS), le syndrome de Guam (ALS/PDC), l'encéphalopathie traumatique chronique (ETC), le syndrome parkinsonien post-encéphalitique (PEP) et certaines formes de démence fronto-temporale (FTDP-17) sont des exemples de tauopathies qui impliquent les 6 isoformes de la protéine tau. Les tauopathies avec des isoformes 4R comprennent la dégénérescence corticobasale (CBD), la paralysie supranucléaire progressive (PSP) et certaines formes de démences fronto-temporales (FTDP-17). La maladie de Pick est une tauopathie qui engendre l'agrégation uniquement des isoformes 3R. L'analyse par western blotting des PHF et/ou des filaments droits montre des profils typiques de migration avec 3 bandes majeures observées à 69, 64 et 55 kDa dans les tauopathies qui impliquent les 6 isoformes de la protéine tau telles que la MA tandis que les formes 4R de tauopathies montrent 2 bandes majeures à 69 et 64 kDa comme dans la CBD ou la PSP. Les formes 3R telles que la maladie de Pick montrent 2 bandes majeures à 64 et 55 kDa (**Fig. 8**). L'accumulation de protéines tau anormales est présente dans les neurones mais peut également être observée dans les astrocytes et les oligodendrocytes comme dans la PSP et la CBD mais également dans les démences fronto-temporales (Mirra et al., 1999, Rizzo et al., 2000).



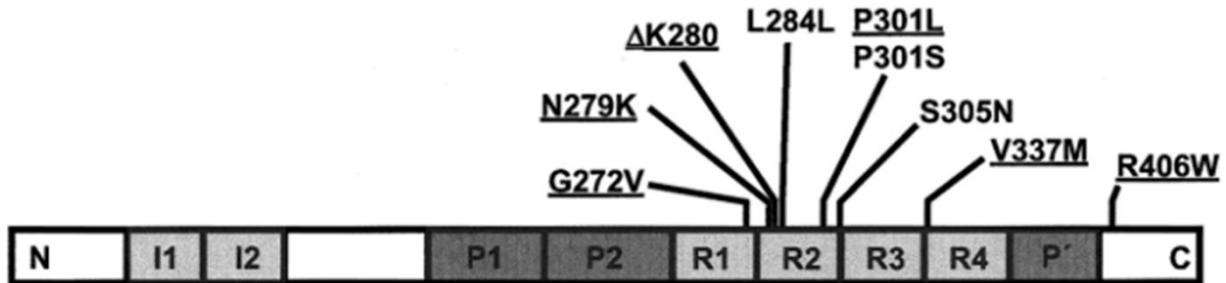
**Fig. 8 :** Profils typiques de migration par western blotting des protéines tau isolées de cerveaux humains atteints de différentes tauopathies à l'aide de l'anticorps AD2 (Buée-Scherrer et al., 1996) qui met en évidence les protéines tau hyperphosphorylées et formant des PHF. Les bandes obtenues par western blotting sont illustrées à gauche et les isoformes qui composent ces bandes sont représentées schématiquement à droite (insert jaune : 1N, insert jaune et vert : 2N, insert rouge : 4R et P : (hyper)phosphorylation). Les 6 isoformes de la protéine tau sont impliquées dans la maladie d'Alzheimer (AD) et forment un triplet typique (Tau 55, 64 et 69) avec une bande mineure à 74 kDa (Tau 74). Ce motif est également observé avec le syndrome de Down (DS), le syndrome parkinsonien post-encéphalitique (PEP), le syndrome de Guam (ALS/PDC) et certaines formes de démence fronto-temporale (FTDP-17). Les tauopathies qui impliquent les isoformes 4R montrent un doublet typique à 69 et 64 kDa (Tau 69 et 64) et sont la dégénérescence corticobasale (CBD), la paralysie supranucléaire progressive (PSP) et certaines formes de FTDP-17. La maladie de Pick est une tauopathie qui implique les isoformes 3R et qui montre un doublet typique à 64 et 55 kDa (Tau 64 et 55). Figure modifiée de (Buee et al., 2000).

Bien que la plupart des tauopathies sont sporadiques, certaines résultent de mutations dans le gène MAPT (**Fig. 9**), ce sont les démences fronto-temporales liée au chromosome 17 (en anglais « FTDP-17 pour familial frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome-17 »). Les démences fronto-temporales sont caractérisées par la présence de filaments de tau dans les neurones et parfois dans les cellules gliales des lobes frontaux et temporaux du cortex accompagnés par une atrophie de ces régions cérébrales (Ghetti et al., 2015). Plus de 50 mutations ont été découvertes dans approximativement 150 familles (Strang et al., 2019). L'âge d'apparition des symptômes est compris entre 20 et 70 ans avec une moyenne de 49 ans, comme observé dans les cas sporadiques (Ghetti et al., 2015).

Les mutations (**Fig. 9**) entraînent différents effets sur la protéine tau en modifiant ses propriétés physiologiques. Ainsi, les mutations (P301L, V337M et R406W) réduisent la capacité de la protéine tau à promouvoir l'assemblage des microtubules (Hasegawa et al., 1998, Hong et al., 1998) probablement en favorisant l'hyperphosphorylation de tau (Alonso Adel et al., 2004) qui entraîne son agrégation (Nacharaju et al., 1999, Barghorn et al., 2000, von Bergen et al., 2001). Certaines mutations (I260V) entraînent une pathologie 4R uniquement (Grover et

## Introduction

al., 2003) tandis que d'autres (P301L) ne modifient pas le ratio 4R/3R (Rizzu et al., 2000). Quelques mutations, telles que la mutation N279K, peuvent augmenter le ratio 4R/3R en favorisant directement l'épissage de l'exon 10 (Hong et al., 1998). Aussi, plusieurs mutations confèrent, aux protéines tau, des capacités élevées à s'(auto-)agréger, en particulier les mutations  $\Delta$ K280 et P301L (Barghorn et al., 2000). Ces effets peuvent également se cumuler dans le cas de certaines mutations ( $\Delta$ N296 et N296H) (Yoshida et al., 2002). D'autres mécanismes pourraient aussi jouer un rôle, par exemple, certaines mutations (P301L, P301S, V337M et R406W) entraînent une capacité moindre de la protéine tau à se lier à la phosphatase 2A (PP2A) (Goedert et al., 2000).



**Fig. 9 :** Schéma représentant certaines mutations de la protéine tau rencontrées dans les démences fronto-temporales (FTDP-17). L'image illustre la plus longue isoforme de la protéine tau humaine (441 acides aminés) qui comprend quatre domaines de liaison aux microtubules (R1 à R4), entourés de régions riches en prolines (P1, P2 et P') et deux inserts (I1 et I2) situés à l'extrémité N-terminale. Le domaine de liaison aux microtubules R2 et les deux inserts (I1 et I2) peuvent être absents en fonction de l'épissage alternatif. La majorité des mutations de la protéine tau ont été identifiées dans les domaines de liaisons aux microtubules (R1 à R4). Les mutations présentes dans le domaine R2 affectent, par conséquent, uniquement les isoformes 4R de la protéine tau. Image modifiée de (Barghorn et al., 2000).

La découverte de ces mutations dans le gène MAPT a conduit rapidement à la production de lignées murines transgéniques qui reproduisent l'essentiel de la pathologie cérébrale observée dans les tauopathies. (Pour un aperçu des différentes lignées murines existantes, consulter la page web suivante : <https://www.alzforum.org/research-models> (Alzforum)). Dans ce projet de recherche, nous avons utilisé les souris transgéniques « Tg22 » (Schindowski et al., 2006) et « Tg30 » (Leroy et al., 2007a) qui expriment une protéine tau mutée aux acides aminés G272V et P301S. Ces souris développent une pathologie tau dans l'hippocampe (**Fig. Sup. 2**) et le cortex. Les caractéristiques de ces souris sont plus amplement discutées dans le paragraphe [3.1.5.1.] du matériel et méthodes.

### 1.1.3.2. La pathologie amyloïde

#### 1.1.3.2.1. Physiopathologie de la protéine amyloïde

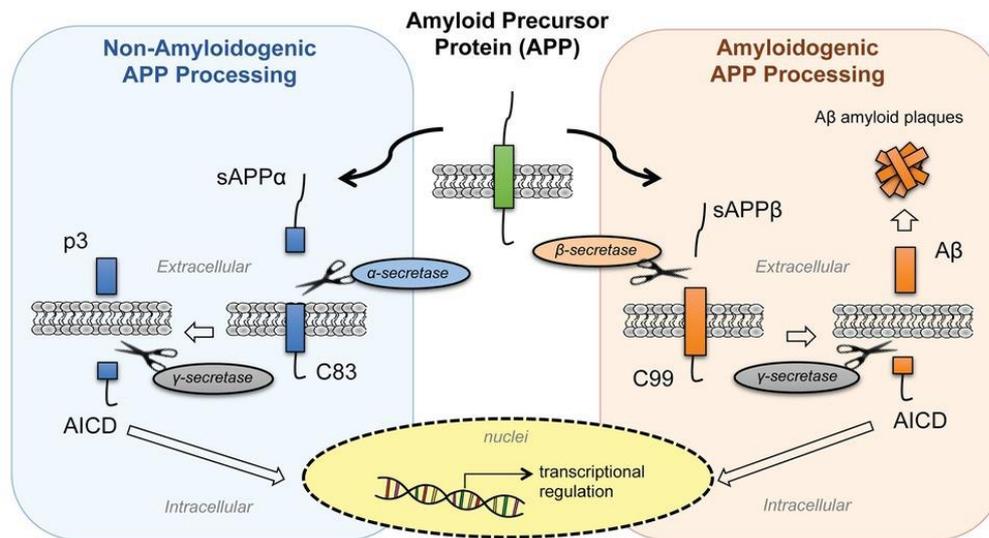
La protéine précurseur de l'amyloïde- $\beta$  (APP) est une protéine transmembranaire de 695 à 770 acides aminés encodée par le gène APP situé sur le chromosome 21 dans l'espèce humaine. Il existe deux voies métaboliques de l'APP, la voie « non-amyloïdogénique » et la voie « amyloïdogénique » qui entraînent respectivement, la production du peptide sAPP $\alpha$  qui aurait des propriétés neuroprotectrices et la production du peptide A $\beta$  notamment (**Fig. 10**).

Dans la voie « non-amyloïdogénique » (**Fig. 10**), l'APP transmembranaire est clivée par l'enzyme  $\alpha$ -sécrétase qui libère un fragment soluble sAPP $\alpha$  et produit un fragment transmembranaire C83/ $\alpha$ -CTF. Ce dernier est ensuite clivé par l'enzyme  $\gamma$ -sécrétase (composée

## Introduction

de 4 sous-unités : PSEN1/2, nicastrin, Aph-1 et Pen-2) pour donner un fragment P3 extracellulaire et un fragment AICD intracellulaire.

Par la voie « amyloïdogénique » (**Fig. 10**), l'APP transmembranaire est clivée par l'enzyme  $\beta$ -sécrétase pour produire un fragment soluble sAPP $\beta$  et un fragment transmembranaire C99/ $\beta$ -CTF qui sera à son tour clivé par l'enzyme  $\gamma$ -sécrétase pour libérer le peptide A $\beta$  dans l'espace extracellulaire et le facteur de transcription AICD dans l'espace intracellulaire. La longueur du fragment A $\beta$  est déterminée par la position du clivage par la  $\gamma$ -sécrétase qui conduit à la génération de peptides ayant de 38 à 42 acides aminés.



**Fig. 10 : Métabolisme du précurseur de la protéine amyloïde (APP).** L'APP est une protéine transmembranaire clivée par l'enzyme  $\alpha$ -sécrétase dans la voie « non-amyloïdogénique » ou par l'enzyme  $\beta$ -sécrétase dans la voie « amyloïdogénique » pour donner les fragments solubles sAPP ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) et les fragments transmembranaires C83 ou C99. Les fragments C83 et C99 sont ensuite clivés par l'enzyme  $\gamma$ -sécrétase pour donner le peptide intracellulaire AICD dans les 2 voies et pour libérer le peptide p3 dans la voie non-amyloïdogénique ou le peptide A $\beta$  dans la voie amyloïdogénique. L'accumulation et l'agrégation des peptides A $\beta$  forment les plaques amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer. Figure de (Ristori et al., 2020).

Parmi les protéines A $\beta$  produites, l'A $\beta$ 40 est le peptide majoritairement sécrété (80 à 90 % des protéines A $\beta$ ) en conditions physiologiques alors que le peptide A $\beta$ 42, qui compte pour 10 % des protéines A $\beta$  totales, est le peptide qui constitue majoritairement les plaques amyloïdes dans un cerveau atteint de la MA, cela étant dû à ses propriétés d'agrégation (Iwatsubo et al., 1994). En conditions physiologiques, l'APP est principalement protéolysée par la voie non-amyloïdogénique et le peptide A $\beta$  est constitutivement généré à des taux faibles. La voie amyloïdogénique n'est donc pas la voie pathologique du métabolisme de l'APP, ce sont les changements au niveau du ratio des peptides A $\beta$ 40/42 produits et au niveau des propriétés physico-chimiques des peptides qui d'une nature soluble deviennent agrégés qui sont pathologiques.

Dans le complexe formant la  $\gamma$ -sécrétase, la préséniline 1 ou 2 remplit le rôle de sous-unité catalytique. Le gène de la préséniline 1 (PSEN1), situé sur le chromosome 14, contient  $\pm$  84 kb et contient 13 exons (Rogaev et al., 1997) tandis que le gène de la préséniline 2 (PSEN2), situé sur le chromosome 1, est constitué de  $\pm$  25 kb et possède 12 exons (Levy-Lahad et al.,

1996). Les présénilines sont des protéines de respectivement 467 et 441 acides aminés et qui partagent 67 % d'homologie.

Les présénilines sont exprimées dans différents organes dont le cerveau (Suzuki et al., 1996), bien que, l'expression de la PSEN2 est remarquablement faible dans celui-ci (Brouwers et al., 2008). Les présénilines sont principalement exprimées dans les neurones (Kovacs et al., 1996).

### ***1.1.3.2.2. Théorie de la cascade amyloïde***

C'est en 1984 que le composant majeur des plaques séniles a été identifié comme le peptide amyloïde (A $\beta$ ) (Glennner and Wong, 1984). Il a ensuite été découvert que les formes familiales de la maladie d'Alzheimer, à début précoce, étaient d'origine génétique et impliquaient les gènes qui codent l'APP et les présénilines (cf. [1.1.2.2.1.1.]). Les mutations identifiées dans ces gènes favorisent la production du peptide A $\beta$ , ce qui fut un argument majeur pour la théorie de la cascade amyloïde qui prédit que l'accumulation du peptide amyloïde entraîne une cascade d'événements qui aboutissent à la démence (Hardy and Higgins, 1992). De plus, les personnes affectées par le syndrome de Down, dû à 3 copies du chromosome 21 (qui contient le gène de l'APP), développent une MA, cette observation a renforcé l'idée qu'un taux élevé d'A $\beta$  jouait un rôle majeur dans la pathogenèse de la MA. Brièvement, selon cette théorie, l'accumulation de peptides A $\beta$  déclencherait des réponses inflammatoires (activation des cellules microgliales et des astrocytes) et entraînerait progressivement des altérations des synapses et des neurones avec une hyperphosphorylation de la protéine tau conduisant à une démence associant les pathologies amyloïde et tau (Barage and Sonawane, 2015).

### **1.1.3.3. Interactions des pathologies tau et amyloïde**

Bien que la distribution neuroanatomique des lésions de la pathologie tau et de la pathologie amyloïde ne coïncident pas dans les stades précoces de la MA (cf. section [1.2.1. Séquence spatio-temporelle de la pathologie tau]), il semblerait pourtant que les deux lésions s'influencent l'une l'autre. En effet, l'injection de fibrilles de protéines A $\beta$ 42 dans le cerveau de souris P301L, qui expriment une protéine tau humaine mutée, provoque une augmentation et une accélération de la formation des DNF (Götz et al., 2001). Inversement, l'injection de PHF-tau isolés de cerveaux atteints de la MA dans le cerveau de souris transgéniques (5xFAD) qui expriment une protéine amyloïde mutée accélère la propagation de la pathologie tau (He et al., 2018, Vergara et al., 2019). Le croisement entre des lignées transgéniques qui expriment une protéine tau mutée avec des lignées transgéniques qui expriment une protéine amyloïde APP mutée (en présence ou non d'une protéine PS1 mutée) ont montré également une exacerbation de la pathologie tau dans ces souris (Lewis et al., 2001, Hurtado et al., 2010, Héraud et al., 2014, Pooler et al., 2015, Bennett et al., 2017). Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé des souris transgéniques 5xFAD Tg30 (Héraud et al., 2014) qui co-expriment des protéines tau, APP et PS1 mutées. Ces souris développent des pathologies amyloïde (**Fig. Sup. 1**) et tau (**Fig. Sup. 2**) dans le cerveau. La figure supplémentaire 2 (**Fig. Sup. 2**) permet d'apprécier l'exacerbation de la pathologie tau dans l'hippocampe de cette lignée murine par rapport au modèle transgénique « Tg30 » qui développe une pathologie tau en l'absence d'une pathologie amyloïde. Des informations supplémentaires sur la lignée 5xFAD Tg30 sont présentes dans le paragraphe [3.1.5.5.] du matériel et méthodes.

### 1.1.3.4. Neuroinflammation

La neuroinflammation est un processus régulé par les cellules microgliales, les macrophages qui résident dans le cerveau. En conditions physiologiques, lorsque les stimuli pro-inflammatoires ont été éliminés, l'inflammation disparaît et les cellules microgliales reviennent à un état homéostatique. A l'inverse, en conditions pathologiques, les cellules microgliales restent activées et créent une inflammation chronique, qui est délétère pour le bon fonctionnement du cerveau. Aussi, lorsque les cellules microgliales ont été « *primo-activées* », des stimuli inflammatoires supplémentaires peuvent induire une exacerbation de la réponse inflammatoire (Cunningham et al., 2005).

Dans la MA, les peptides A $\beta$  (Meda et al., 1995) et la protéine tau pathologique (Perea et al., 2020) activent la microglie. En conditions physiologiques, les cellules microgliales sont capables de dégrader les peptides amyloïdes (Ries and Sastre, 2016) mais l'activation à long terme de ces cellules pourraient avoir des effets néfastes dû à la libération de médiateurs pro-inflammatoires. De plus, les cellules microgliales activées pourraient éliminer les synapses et conduire à une neurodégénérescence (Hansen et al., 2018). La protéine Iba1, utilisée historiquement comme un marqueur spécifique des cellules microgliales (Imai et al., 1996), est néanmoins également exprimée par les macrophages associés au cerveau (« brain-associated macrophages »), ces cellules se trouvant à l'interface entre le cerveau et les tissus périphériques (Mildenberger et al., 2022), et les macrophages dérivés des monocytes sanguins qui peuvent infiltrer le parenchyme cérébral durant la progression (notamment) de certaines maladies neurodégénératives. Les cellules microgliales était autrefois divisées en deux grands phénotypes nommés M1 et M2. Les sous-groupes M1 et M2 ont été classés comme pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire respectivement selon que les cellules réagissaient, *in vitro*, à des molécules induisant (LPS) ou limitant (IL-4) une réponse immunitaire innée (Gordon, 2003) et en sécrétant des cytokines pro- (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  (« tumor necrosis factor- $\alpha$  »)) ou anti-inflammatoires (IL-10, IL-4) (Varnum and Ikezu, 2012). Cependant, les avancées technologiques telles que les analyses « single-cell » ont montré que les phénotypes des cellules microgliales sont bien plus complexes et cette nomenclature dichotomique (Paolicelli et al., 2022) n'est plus adaptée pour les répertorier (Ransohoff, 2016). Les termes « activé » et « au repos » (en opposition au premier terme) sont également rencontrés dans la littérature mais cette nomenclature a le défaut de suggérer que ces cellules n'ont qu'une forme de réponse alors qu'elles sont continuellement actives, en surveillant le parenchyme cérébral avec leurs prolongements. Cette terminologie n'est donc pas non plus la plus adaptée pour représenter l'hétérogénéité des cellules microgliales (Paolicelli et al., 2022). Néanmoins, dans un souci de simplification, le terme « activé » pour les cellules microgliales sera, dans la suite de ce manuscrit, utilisé pour décrire un état de la cellule associé à des conditions pathologiques qui induisent des changements transcriptomiques et/ou protéomiques pouvant être observés au sein des cellules tels qu'une augmentation de l'expression de la protéine Iba1. Un sous-type de cellules microgliales dénommées « DAM » pour « Disease Associated Microglia » a été identifié dans la maladie d'Alzheimer. Ces cellules microgliales sont localisées autour des plaques amyloïdes et possèdent des activités phagocytaires accrues (Keren-Shaul et al., 2017). L'expression de la protéine Iba1 (qui participe aux processus de phagocytose) est ainsi augmentée dans ces cellules microgliales (Kenkhuis et al., 2022). Dans la maladie d'Alzheimer, les cellules microgliales sont donc observées autour des plaques amyloïdes et pourraient être responsable de la formation initiale de ces plaques. En effet, en phagocytant les peptides A $\beta$ , ceux-ci se retrouvent dans des lysosomes où leur concentration augmente dans un milieu à pH

acide, ce qui favorise l'agrégation des monomères de peptides A $\beta$  (Spangenberg et al., 2019). D'autre part, les cellules microgliales pourraient aussi contribuer au développement des plaques, notamment en augmentant la production et l'activité de la  $\beta$ -sécrétase *via* l'action des cytokines, ce qui résulte en une augmentation de la production de peptides A $\beta$  (Sastre et al., 2003). La neuroinflammation peut aussi avoir un effet délétère sur la pathologie tau. En effet, les cytokines libérées (telles que l'IL-6 et l'IL-1) peuvent activer des voies de signalisation dépendantes de la CDK5 et de la MAPK (« mitogen-activated protein kinase »), résultant en une augmentation de la phosphorylation de la protéine tau (Calsolaro and Edison, 2016). Les cellules microgliales sont également impliquées dans la propagation de la pathologie tau en sécrétant des lysosomes qui contiennent des protéines tau à la suite de leur phagocytose (Asai et al., 2015). L'implication des cellules microgliales et de l'inflammation résultante dans le développement de la MA a également été montré par des études génétiques. Des analyses GWAS (« genome-wide association studies ») ont ainsi mis en évidence une relation entre certains composants du système immunitaire inné et l'incidence de MA sporadiques. Par exemple, des variants du gène TREM2 (« triggering receptor expressed on myeloid cells 2 ») ont une prévalence plus élevée chez les patients atteints de la MA (Karch and Goate, 2015). Le gène TREM2 est exprimé par les cellules microgliales et les macrophages et encode un récepteur qui stimule la phagocytose. De plus, des études épidémiologiques ont montré une association inverse entre l'utilisation prolongée d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) et la MA (McGeer and McGeer, 2007). Des études réalisées sur des souris triple-transgéniques ont ainsi montré une diminution des plaques amyloïdes et de la phosphorylation de la protéine tau lorsque ces souris ont été traitées avec un inhibiteur de la Cox-1 (Cyclooxygenase-1), une enzyme impliquée dans les processus inflammatoires (Choi et al., 2013).

Les astrocytes jouent également un rôle dans la neuroinflammation. Dans le cerveau de patients atteints de la MA, les astrocytes réactifs entourent les dépôts amyloïdes et les phagocytent (Nagele et al., 2003). L'expression de la protéine GFAP, un filament intermédiaire, est essentielle pour les réactions astrogliales et pour la formation des cicatrices gliales. La protéine GFAP est classiquement utilisée comme un marqueur des astrocytes en immunohistochimie. Lorsque que les astrocytes sont activés, l'expression de la protéine GFAP est augmentée et reflète ainsi la présence d'une inflammation dans le cerveau. Les astrocytes peuvent être activés par certaines cytokines telles que l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  (Morales et al., 2014) qui sont produites par les cellules microgliales activées (Liddel et al., 2017). La perturbation ou la perte des fonctions normales astrocytaires par les astrocytes réactifs pourrait conduire à une neurodégénération (Sofroniew and Vinters, 2010). Les astrocytes sont en effet des cellules macrogliales qui remplissent de nombreuses fonctions intervenant dans la synaptogenèse, la neurotransmission, la formation et le maintien de la BHE, etc... Les astrocytes sont également impliqués dans l'élimination des peptides A $\beta$ . De manière analogue aux cellules microgliales, les astrocytes ont été classés en deux phénotypes différents nommés A1 et A2 et qui représentent le phénotype pro-inflammatoire (neurotoxique) et le phénotype anti-inflammatoire (protecteur) respectivement (Fan and Huo, 2021). Cependant, comme pour les cellules microgliales, ces termes ne reflètent pas la diversité phénotypique des astrocytes et sont également soumis à une réflexion pour réviser leur nomenclature (Escartin et al., 2021). A l'instar des cellules microgliales, le terme « activé » ou « réactif » sera utilisé dans la suite de cette thèse pour décrire des astrocytes qui subissent des changements cellulaires, tels qu'une augmentation de l'expression de la protéine GFAP, en réponse à des situations pathologiques.

Les maladies à prions (décrites dans la section [1.2.2.1]), comme la MA, sont des maladies neurodégénératives caractérisées par une accumulation de protéines « amyloïdes »<sup>3</sup> et qui présentent une réponse microgliale importante, associée à une inflammation chronique. Dans les maladies à prions, l'inflammation semble être un événement précoce qui précède la neurodégénérescence (Eikelenboom et al., 2002). Dans la MA, la neuroinflammation pourrait également apparaître très tôt et son intensité augmenterait avec l'accumulation des pathologies amyloïde et tau au cours de la progression de la maladie (Calsolaro and Edison, 2016).

### 1.1.4. Diagnostic

On estime que la MA commence 20 ans ou plus avant l'apparition des premiers symptômes, c'est le stade « pré-clinique » de la maladie (Morris, 2005, Sperling et al., 2014).

Concrètement, les premiers symptômes, qui constituent la phase « clinique » de la maladie comprennent des difficultés à se rappeler de conversations, de noms ou d'événements récents. L'apathie et la dépression sont également des symptômes précoces. Ensuite, des troubles de la communication apparaissent, ainsi que de la confusion, une désorientation, des troubles du jugement, des changements de comportement et finalement des difficultés à parler, déglutir et marcher se présentent (Alzheimer's association, 2021).

D'un point de vue clinique, le diagnostic pour la MA est un diagnostic de MA « probable ». En effet, le seul diagnostic définitif est un examen *post-mortem* du tissu cérébral. La combinaison des DNF et des plaques amyloïdes est nécessaire pour établir ce diagnostic selon les critères du NINCDS-ADRDA (McKhann et al., 1984, Dubois et al., 2007).

En outre, plus de la moitié des personnes affectées par la MA aurait une ou plusieurs autres causes de démence telles qu'une maladie neurovasculaire ou une maladie à corps de Lewy. On parle alors de « démence mixte ».

De nos jours, le diagnostic clinique repose principalement sur les antécédents médicaux du patient et de sa famille, sur les comportements du patient relatés par un proche et sur une évaluation cognitive réalisée par le médecin, au besoin à l'aide de différents tests recommandés pour le diagnostic de la MA. Des examens médicaux peuvent être également proposés mais ils sont surtout employés pour exclure d'autres causes de démence. Néanmoins, des taux anormaux de protéines  $\beta$ -amyloïdes dans le cerveau peuvent être visualisées par un PET-scan et détectées dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). Les protéines tau totales et phosphorylées (pThr181 et pThr231) peuvent être également mesurées dans le LCR. Le PET-scan peut aussi révéler une diminution du métabolisme du glucose dans le cerveau.

Différents biomarqueurs sont actuellement recherchés dans le LCR et le plasma pour détecter la maladie et poser un diagnostic. Aussi, différents traceurs de la protéine tau pathologique sont en cours de développement pour évaluer, par PET-scan, la distribution et la sévérité de la pathologie tau dans le cerveau.

---

<sup>3</sup> Les protéines qui adoptent une conformation en feuillets  $\beta$  plissés et qui s'agrègent pour former des fibres insolubles sont appelées « amyloïdes ». Historiquement, le terme « amyloïde » provient de l'identification erronée de cette substance par l'anatomopathologiste Virchow (1821-1902) qui a cru y reconnaître une forme d'amidon. Les protéines « amyloïdes » comprennent notamment les protéines  $\beta$ -amyloïdes (dérivées de la protéine APP) et la protéine tau dans la maladie d'Alzheimer et la protéine prion pathologique (PrP<sup>Sc</sup>) dans la maladie de Creutzfeldt-Jakob.

### 1.1.5. Traitement

Il n'existe actuellement aucun traitement curatif de la MA.

En juin 2021, la FAD (« Food and Drug Administration ») aux Etats-Unis a autorisé, de manière accélérée, la mise sur le marché de l'«Aduhelm (aducanumab)», un nouveau médicament pour le traitement de la MA produit par la firme « Biogen » (<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-grants-accelerated-approval-alzheimers-drug> ; [https://investors.biogen.com/news-releases/news-release-details/fda-grants-accelerated-approval-aduhelmtm-first-and-only?cid=aff-aduhelm-hp\\_cta\\_biogen-app\\_news\\_release](https://investors.biogen.com/news-releases/news-release-details/fda-grants-accelerated-approval-aduhelmtm-first-and-only?cid=aff-aduhelm-hp_cta_biogen-app_news_release)). Cela faisait 18 ans qu'aucun médicament n'avait été approuvé à la suite des nombreux échecs des essais cliniques. L'Aduhelm est un anticorps monoclonal humain dirigé contre l'amyloïde- $\beta$  qui réduit les plaques amyloïdes dans le cerveau des patients atteints de la MA. Néanmoins, si les bénéfices cliniques (tels que l'amélioration des capacités cognitives) ne sont pas prouvés d'ici 2030, la FDA engagera une procédure pour retirer l'approbation du médicament. En Europe, l'EMA (« European Medicines Agency ») a refusé la commercialisation du médicament en décembre 2021 car d'une part, le lien entre la réduction des plaques amyloïdes et l'amélioration des symptômes cliniques n'a pas été établie et d'autre part, car le traitement n'a pas montré qu'il était suffisamment sûr. De plus, les résultats des premières études étaient parfois contradictoires et n'ont pas montré d'efficacité sur les stades précoces de la maladie. Depuis, l'entreprise Biogen qui avait sollicité une seconde évaluation de leur demande de commercialisation de l'Aduhelm a retiré cette demande le 20 avril 2022, avant la fin de ce ré-examen. Biogen a déclaré que leurs données ne seraient pas suffisantes pour convaincre l'EMA qui est toujours d'avis que les avantages du médicament ne l'emportaient pas sur les risques (<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/withdrawn-applications/aduhelm>).

Par conséquent, à présent, la seule médication proposée aux patients est principalement composée d'inhibiteurs de la cholinestérase (rivastigmine (Exelon), galantamine (Rémínyl), donépézil (Aricept)) qui permettent d'améliorer la qualité de vie en agissant sur les symptômes mais qui ne permettent pas d'agir sur l'évolution de la maladie ou sur la vitesse du déclin des capacités cognitives. L'acétylcholine est le neurotransmetteur majeur du système cholinergique qui est impliqué entre autres dans les processus de mémoire et d'apprentissage. Dans la maladie d'Alzheimer, ce système cholinergique est altéré dû principalement à une perte progressive des neurones cholinergiques situés dans le noyau basal de Meynert et dont les axones se projettent dans le cortex cérébral. L'inhibition de l'enzyme cholinestérase qui dégrade l'acétylcholine permet de maintenir son activité dans les synapses cholinergiques et d'améliorer les facultés cognitives (Hampel et al., 2018).

La mémantine (Ebixa), un antagoniste non compétitif du récepteur NMDA, est également utilisée pour éviter l'excitotoxicité neuronale induite par un dysfonctionnement du système glutaminergique. La mémantine est recommandée dans les formes modérées à sévères de la MA, seule (Reisberg et al., 2003) ou en combinaison avec le donépézil (Howard et al., 2012).

### **1.1.6. Contribution de l'immunohistochimie dans l'étude de la neuropathologie de la maladie d'Alzheimer**

L'étude de la maladie d'Alzheimer a commencé par l'analyse histologique du cerveau et reste actuellement la seule méthode pour poser un diagnostic définitif. Ainsi, les DNF peuvent être observées grâce à différentes colorations et méthodes immunohistochimiques. Depuis plus de 100 ans, colorants et anticorps sont développés et utilisés pour étudier la neuropathologie de la MA. Les colorations et les anticorps utilisés dans ce projet de recherche seront préférentiellement cités dans les explicatifs liés aux différents stades des DNF dans la suite de cette introduction. Des exemples supplémentaires d'anticorps employés pour l'analyse histopathologique des DNF sont présentés dans la figure 12 (**Fig. 12**).

#### **1.1.6.1. Evolution des dégénérescences neurofibrillaires**

Les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) sont des structures dynamiques, qui évoluent dans le temps. Ces changements peuvent être visualisés grâce à différentes colorations et à différents anticorps qui marquent les DNF à différents stades de maturation. Les DNF sont rangées en trois stades : « pré-tangles », « tangles matures » et « tangles fantômes » (Bancher et al., 1989, Moloney et al., 2021). Néanmoins, dans le reste de ce travail, le terme « DNF » englobe les différents stades de maturation sans distinction (sauf mention contraire). Aussi, la traduction française de « tangles » est « enchevêtrements » mais ce terme n'est pas très utilisé. Par conséquent, pour plus de clarté, le terme anglophone est privilégié.

##### **1.1.6.1.1. Stade « Pré-Tangles »**

Au stade « pré-tangles », les protéines tau hyperphosphorylées et anormalement phosphorylées s'accumulent (Bancher et al., 1989) et forment de petites inclusions visibles sous forme de granulations dans le compartiment somato-dendritique du neurone (Li et al., 2011) (**Fig. 11**) comparé à la localisation préférentiellement axonale de la protéine tau observée dans des conditions physiologiques (Higuchi et al., 2002). Cette accumulation pourrait être un mécanisme de protection du neurone qui accumule les protéines tau anormales, à l'image des lipofuscines qui sont des lysosomes remplis de lipides que la cellule ne parvient plus à dégrader. A l'instar des lipofuscines, ces inclusions de protéines tau semblent ne pas entraîner directement la mort du neurone. En effet, les neurones avec des DNF peuvent survivre plus de 20 ans (Morsch et al., 1999) et rester fonctionnels (Kuchibhotla et al., 2014). Néanmoins cette théorie est controversée. Au niveau ultrastructurel, les protéines tau contenues dans les inclusions sont sous forme de PHF et de filaments droits (Bancher et al., 1989). A ce stade, les protéines tau sont dépourvues d'ubiquitine (Bancher et al., 1989, Bancher et al., 1991) et ne sont en général pas de nature argyrophile (elles ne sont pas colorées par le Gallyas) mais sont immunoréactives aux anticorps AT8 (pS202/pT205) (Braak et al., 1994) et MC1 (**Fig. 12**) qui est un anticorps conformationnel reconnaissant les a.a. 7-9 du domaine N-terminal et les a.a. 312-322 présents dans le domaine de liaison aux microtubules de la protéine tau (Jicha et al., 1997).

##### **1.1.6.1.2. Stade « Tangles Matures »**

Les tangles « matures » sont argyrophiles et ont été décrits pour la première fois par Alzheimer en 1907 qui les a observés à l'aide de la coloration Gallyas. Les tangles prennent la forme du neurone qu'ils occupent, ainsi, les tangles dans les neurones pyramidaux ont généralement une forme de flamme (**Fig. 11**). Le noyau est déplacé ou rétréci dans la cellule. A ce stade, les filaments de tau sont pourvus d'ubiquitine (Perry et al., 1987) et principalement

immunoréactifs à l'anticorps PHF-1 (pSer396/404) mais ils peuvent également réagir aux anticorps AT8 et MC1 (**Fig. 12**). Les colorations à la Thioflavine S, au Rouge Congo et au Rouge Thiazine mettent en évidence ces tangles (**Fig. 12**) en se liant aux feuillettes  $\beta$  plissées.

### **1.1.6.1.3. Stade « Tangles Fantômes » (« Ghost Tangles »)**

Le stade tangles « fantômes » ou « ghost tangles » est le stade de maturité le plus avancé des tangles. Les ghost tangles ont également été décrits par Alzheimer comme les filaments de tau restants après la désintégration du noyau et du neurone (**Fig. 11**). Ces tangles sont moins argyrophiles que les tangles matures et sont aussi pourvus d'ubiquitine. A l'instar des tangles matures, ils sont également colorés par la Thioflavine S, au Rouge Congo et au Rouge Thiazine (**Fig. 12**).

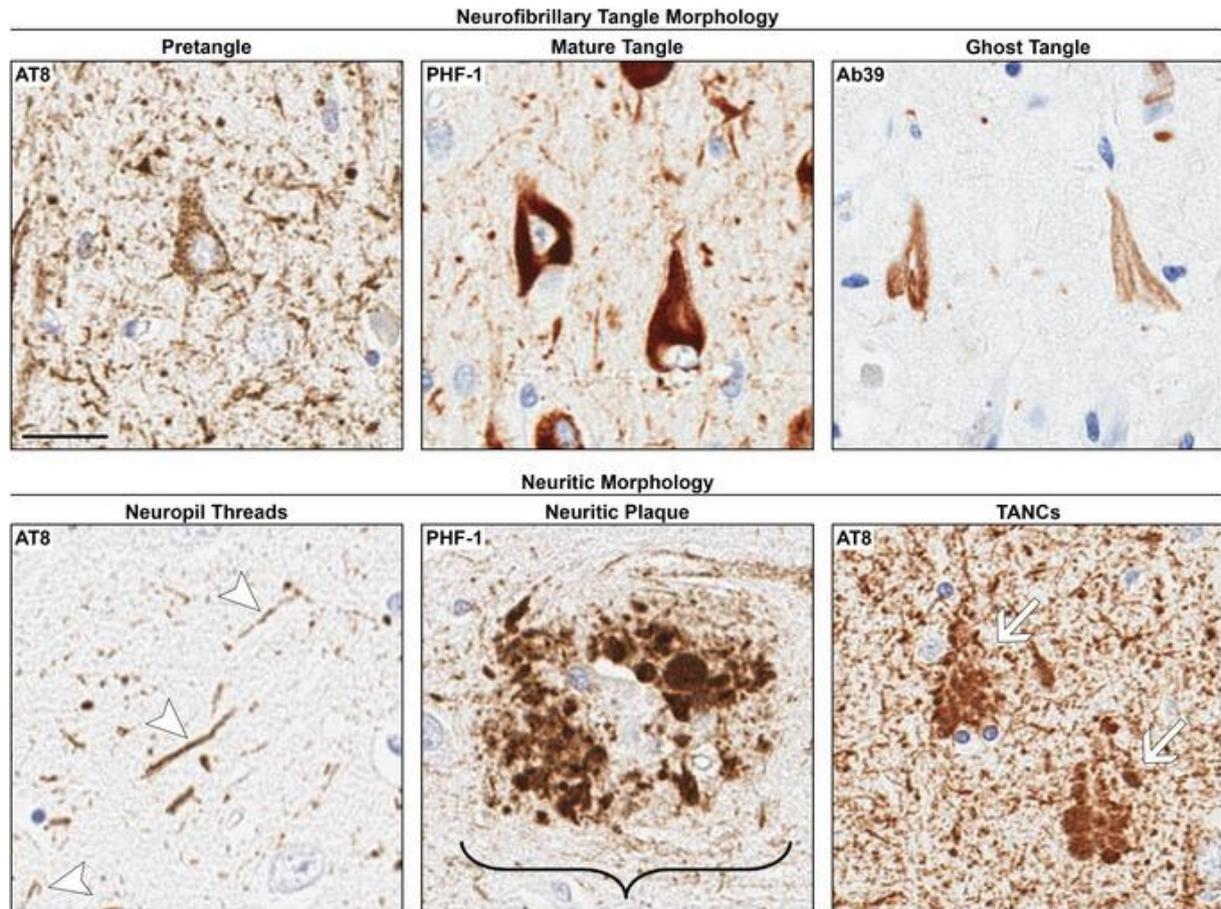
### **1.1.6.2. La pathologie tau dans les prolongements neuronaux**

Les dégénérescences neurofibrillaires font référence à l'apparence des fibres de tau qui se forment à l'intérieur du corps cellulaire, aussi appelé soma, des neurones. Néanmoins, la pathologie tau peut également être observée dans les neurites (prolongements neuronaux). Ces neurites qui ont accumulés des protéines tau anormales sont visibles sous forme de prolongements dans le neuropile (« neuropil threads »), de neurites dystrophiques formant des plaques neuritiques (« neuritic plaques ») et d'amas de neurites (« TANCs : Tangle Associated Neuritic Clusters ») (**Fig. 11**).

Les prolongements (« neuropil threads ») sont de type dendritique (Braak and Braak, 1988) (majoritairement) ou axonale (Perry et al., 1991). Ces prolongements sont marqués par les différentes colorations et les différents anticorps utilisés pour mettre en évidence les DNF.

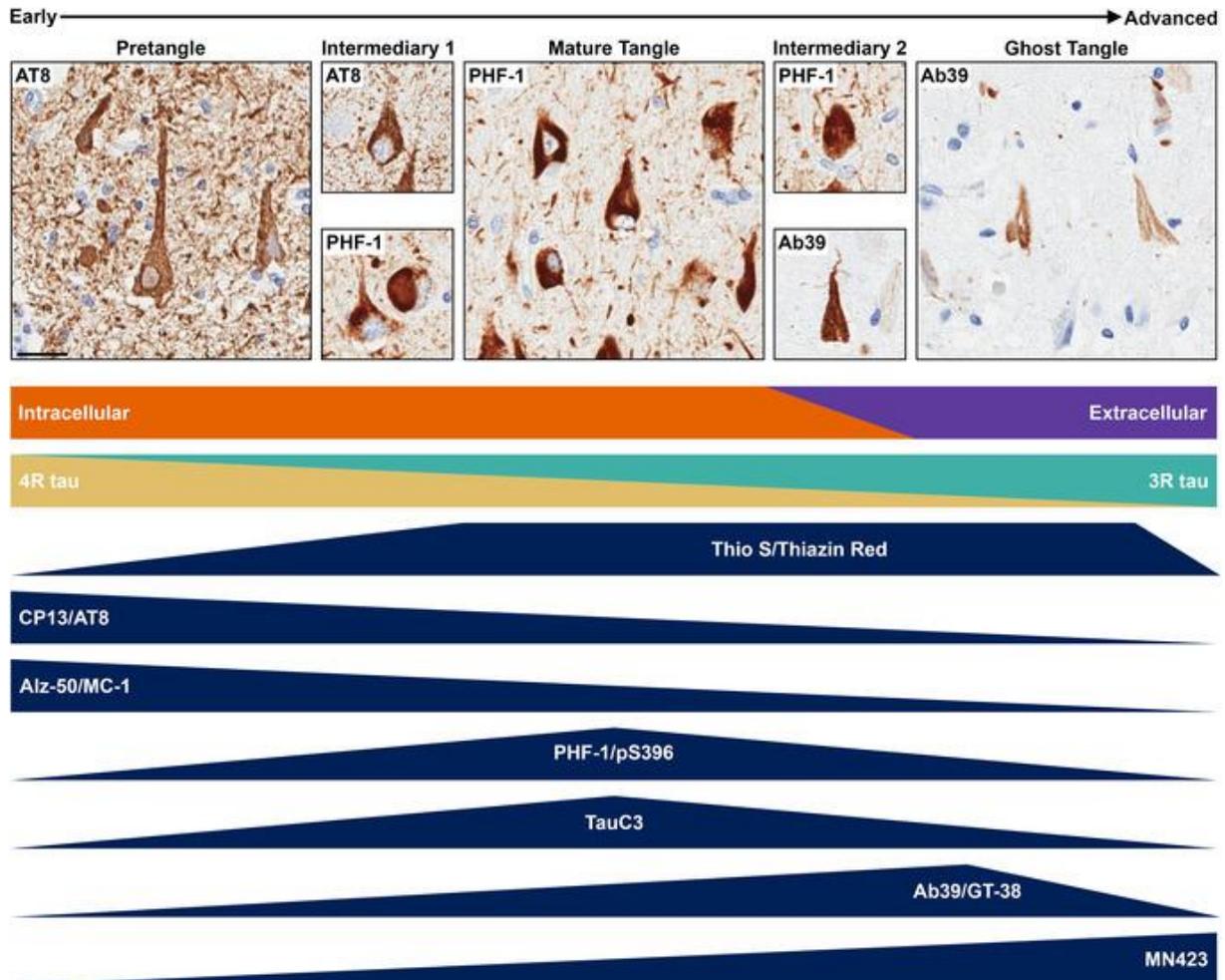
Les neurites dystrophiques entourent une plaque amyloïde et l'ensemble forme une plaque neuritique. Les neurites dystrophiques sont composés de dendrites ou d'axones (Probst et al., 1983) avec toutefois une prédominance de ces derniers (Kosik et al., 1987, Su et al., 1993) et sont marqués par différents anticorps anti-tau.

Les amas de neurites (« TANCs ») ont d'abord été identifiés autour de tangles fantômes (Munoz and Wang, 1992). Néanmoins, tous les tangles fantômes ne sont pas associés à cet amas de neurites qui sont mis en évidence par différents anticorps anti-tau.



**Fig. 11 : Morphologie des différents stades de maturité des dégénérescences neurofibrillaires au niveau du CA1 de la corne d'Ammon de l'hippocampe.** Les protéines tau s'accumulent dans le compartiment somato-dendritique du neurone et sont visibles sous forme de granulations au stade « pré-tangles ». Au stade « tangles matures », les agrégats de protéines tau (les tangles) prennent la forme du neurone dans lequel ils se trouvent (il s'agit souvent d'une forme de flamme). Lors du stade « ghost tangles » ou « tangles fantômes », les agrégats de protéines tau sont situés dans l'espace extracellulaire à la suite de la mort du neurone. Les prolongements neuronaux situés dans le neuropile (« neuropil threads ») accumulent également des protéines tau anormales. L'accumulation de neurites dystrophiques forment les plaques neuritiques (« neuritic plaques »). L'accumulation de neurites peut également être observée sous forme d'amas (« TANCs : Tangle Associated Neuritic Clusters »). L'anticorps AT8 (pS202/pT205) met en évidence les pré-tangles, l'accumulation de protéines tau dans les prolongements neuronaux (« neuropil threads ») et les amas de neurites (« TANCs »). L'anticorps PHF-1 marque les tangles matures et les plaques neuritiques. L'anticorps Ab39, qui reconnaît la protéine tau sous une conformation anormale, montre les tangles fantômes. Les immunohistochimies ont été contre-colorées à l'hématoxyline. Les flèches montrent les lésions marquées par les différents anticorps. La parenthèse montre la plaque neuritique. Barre d'échelle : 25  $\mu$ m. Figure de (Moloney et al., 2021).

## Introduction



**Fig. 12 :** Résumé de colorations et d'anticorps utilisés pour évaluer le degré de maturité des dégénérescences neurofibrillaires. Certains stades sont dits intermédiaires car ils ne remplissent pas totalement les critères établis pour un stade donné. Les prétangles et les tangles matures sont intracellulaires tandis que les tangles fantômes (« ghost tangles ») sont extracellulaires. Les prétangles sont principalement constitués des isoformes 4R de la protéine tau tandis que les tangles fantômes sont surtout composés des formes 3R. Les colorations à la Thioflavine S ou au Rouge Thiazine montrent préférentiellement les tangles matures et fantômes. Les anticorps CP13, AT8, Alz50 et MC1 reconnaissent particulièrement les stades précoces des DNF. Les anticorps PHF-1, pS396 et TauC3 marquent surtout les tangles matures. Enfin, les anticorps Ab39, GT-38 et MN423 identifient des stades avancés des DNF. Barre d'échelle : 25 µm. Figure de (Moloney et al., 2021).

## 1.2. Théorie de la propagation de type « prion-like » de la protéine tau

### 1.2.1. Séquence spatio-temporelle d'apparition de la pathologie tau

Alors que les plaques amyloïdes sont distribuées de façon diffuse et variable dans tout le cortex cérébral et dans les structures sous-corticales (Duyckaerts et al., 1986, Delaère et al., 1991), les DNF sont observées dans certaines populations neuronales vulnérables. Les DNF sont ainsi présentes dans les cellules pyramidales de l'hippocampe<sup>4</sup> et du cortex entorhinal et dans les couches II, III, V et VI des aires associatives tandis que les aires sensorielles et le cortex moteur sont relativement épargnés (Arnold et al., 1991, Braak and Braak, 1991), suggérant que la MA n'est pas une maladie globale du cerveau (Hyman and Gomez-Isla, 1994).

Les DNF furent ainsi utilisées par Braak et Braak en 1991 (Braak and Braak, 1991) pour mesurer la progression de la maladie d'Alzheimer. Les auteurs ont défini six stades nommés les stades de Braak qui sont largement utilisés en recherche et pour préciser le diagnostic de la MA (**Fig. 13**). Ils ont utilisé la méthode Gallyas, qui est une technique d'imprégnation argentique, pour observer les DNF. Tandis que les DNF sont distribuées de manière caractéristique entre les individus, avec peu de variations inter-individuelles, les plaques neuritiques, quant à elles, sont distribuées de façon irrégulière et par conséquent, ne représentent pas un bon outil pour identifier différents stades (Braak and Braak, 1991).

Au stade I, les DNF sont confinées au cortex transentorhinal. Le stade II est une aggravation du stade I qui montre de nombreuses DNF dans le cortex transentorhinal. Quelques DNF sont également présentes dans le cortex entorhinal et la région CA1 de l'hippocampe. Par conséquent, les auteurs ont appelé ces stades, les « stades transentorhinaux ».

Au stade III, les DNF ont envahi les régions transentorhinal et entorhinal et des tangles fantômes commencent à apparaître dans la région transentorhinal. Les cellules pyramidales du subiculum commencent à développer des DNF.

Le stade IV est caractérisé par de nombreux tangles fantômes dans les régions transentorhinal et entorhinal. La région CA1 de l'hippocampe développe de plus en plus de DNF. Quelques DNF sont présentes dans la région CA4 de la corne d'Ammon, dans certaines régions du putamen, dans le noyau accumbens et dans certains noyaux thalamiques. Les stades III et IV sont résumés comme les « stades limbiques ».

Au stade V, les tangles fantômes deviennent plus abondants. Toutes les régions de l'hippocampe sont affectées par des DNF et quelques cellules granulaires du gyrus denté peuvent présenter des DNF. L'isocortex est sévèrement atteint. Ce dernier point constitue la principale caractéristique du stade V. L'isocortex temporal est particulièrement touché. Les noyaux sous-corticaux (mentionnés au stade IV) sont de plus en plus envahis de DNF et présentent des tangles fantômes.

Dans le stade VI, les DNF sont davantage présentes. Certains tangles fantômes peuvent être dégradés et remplacés par des cellules gliales. La formation hippocampique est envahie de DNF dont les cellules granulaires du gyrus denté (ce qui permet de distinguer le stade VI du stade V). Le CA1 est caractérisé par une perte importante de neurones. Toutes les régions

---

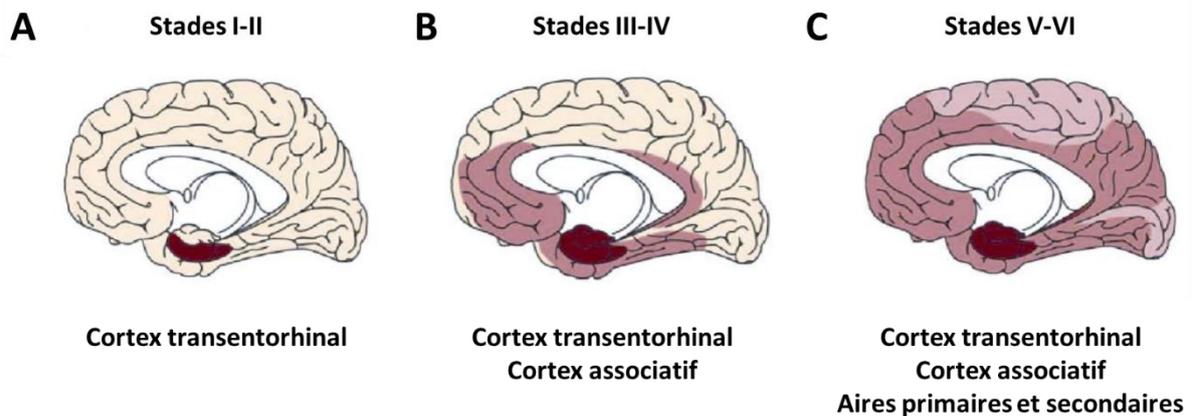
<sup>4</sup> Un schéma explicatif de l'hippocampe qui illustre les différentes régions et les connectivités entre ces régions est proposé en figure supplémentaire 3 (**Fig. Sup. 3**).

## Introduction

isocorticales et sous-corticales sont sévèrement atteintes. Quelques DNF sont observées dans les aires primaires sensorielles (couche V). A l'inverse, le cortex primaire moteur est pratiquement dépourvu de DNF. Le stade VI est caractérisé également par l'atteinte du système extrapyramidal. Les stades V et VI sont les stades « isocorticaux ».

Les symptômes cliniques sont corrélés avec la présence des DNF dans les différentes zones cérébrales. Les stades transentorhinales (I et II) correspondent à la phase pré-clinique de la maladie. Les premiers symptômes apparaissent avec les stades limbiques tandis que les stades isocorticaux sont responsables de la démence associée à la MA.

Bien que le cortex transentorhinal a été identifié comme le point de départ des DNF et de la MA, celui-ci est remis en question avec le locus coeruleus, un noyau sous-cortical situé dans le tronc cérébral qui envoie des projections notamment vers l'hippocampe, l'amygdale et le cortex cérébral. En effet, Braak et son équipe ont observé des lésions associées à la MA dans les neurones noradrénergiques du locus coeruleus chez des sujets prépubères ou chez de jeunes adultes, ce qui suggère que la formation des DNF ne commencerait pas dans le cortex cérébral mais plutôt dans des noyaux sous-corticaux (Braak and Del Tredici, 2011, Braak et al., 2011).



**Fig. 13 : Stades de Braak.** Ces stades permettent d'évaluer la progression des DNF et la sévérité de la MA. Aux stades I et II, les DNF s'observent dans le cortex transentorhinal. Aux stades III et IV, les DNF progressent dans le cortex transentorhinal, l'hippocampe et le cortex temporal (associatif). Aux stades V et VI, les DNF continuent leur progression dans le cortex associatif et peuvent envahir les aires primaires et secondaires. Les symptômes cliniques apparaissent aux stades III et IV et aux stades V et VI, des déficits cognitifs sévères sont présents. L'intensité de la couleur (du plus clair au plus sombre) illustre la sévérité des atteintes dans les zones mises en évidence par cette couleur. Figure modifiée de (Braak et al., 2011).

A l'inverse des DNF, les plaques amyloïdes dans la MA sont d'abord observées exclusivement dans le néocortex (phase 1) puis dans l'allocortex qui comprend le système olfactif et l'hippocampe (phase 2). Ensuite, à la phase 3, le diencephale, le striatum et les noyaux cholinergiques présentent des dépôts amyloïdes. A la phase 4, le tronc cérébral est affecté et, finalement, à la phase 5, des dépôts amyloïdes sont observés dans le cervelet (Thal et al., 2002). Les phases 3, 4 et 5 sont uniquement observées chez des sujets atteints de la MA (Thal et al., 2002).

## 1.2.2. Propriétés « prion-like » des protéines tau pathologiques

### 1.2.2.1. Similitudes avec les protéines à prions

Les observations faites par les époux Braak en 1991 (Braak and Braak, 1991) suggéraient que la pathologie tau n'apparaissait pas au hasard dans le cerveau mais suivait des voies neuroanatomiquement connectées. Cela sous-entendait que les protéines tau pathologiques devaient se répliquer et se propager à travers ces réseaux neuronaux, ce qui évoquait des mécanismes attribués aux protéines prions. Néanmoins, les maladies à prions sont caractérisées par leur transmission et à ce jour, aucune étude n'a montré que les maladies neurodégénératives pouvaient être contagieuses. Par conséquent, les mécanismes des protéines pathologiques furent nommés « prion-like » pour évoquer des propriétés physico-chimiques similaires aux prions mais en l'absence de transmission entre individus.

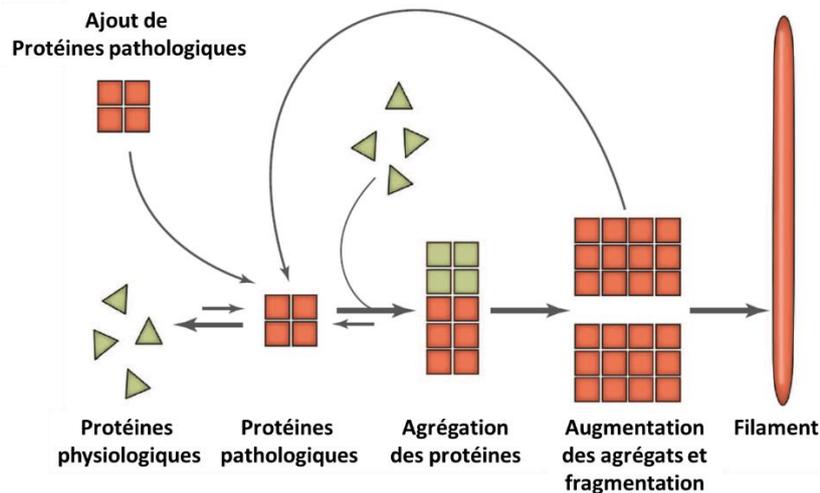
Le terme « prion » (acronyme de « proteinaceous infectious particles ») a été inventé par Stanley Prusiner en 1982 (Prusiner, 1982). Les prions sont composés de protéines PrP<sup>c</sup> modifiées appelées PrP<sup>Sc</sup>. Les protéines prions sont exprimées physiologiquement (PrP<sup>c</sup>) dans les cellules du SNC (neurons et cellules gliales) et par les cellules du système immunitaire et peuvent être converties en une forme anormale composées de feuillettes  $\beta$  plissés (PrP<sup>Sc</sup>) (Pan et al., 1993). Les prions sont caractérisés par l'identification de la protéine comme étant l'agent infectieux et l'existence de différentes souches qui possèdent des propriétés propres à chacune, par leur transmissibilité entre individus d'une même espèce et dans certains cas entre espèces, par leur capacité à induire une conformation anormale et à agréger les protéines correspondantes dans le SNC, par une longue période d'incubation asymptomatique et par leur résistance aux protéases, aux UV, à la chaleur et aux méthodes classiques de décontamination.

Les maladies à prions sont des maladies neurodégénératives rares qui apparaissent dans l'espèce humaine et dans d'autres espèces animales. Citons la tremblante du mouton (scrapie), la vache folle (encéphalopathie spongiforme bovine (ESB)) et la maladie débilante chronique (« chronic wasting disease ») qui touchent les cervidés d'Amérique du Nord. Dans l'espèce humaine, les maladies à prions apparaissent de façon sporadique ou génétique, ou à la suite d'une transmission (formes acquises).

Bien que les maladies à prions aient été majoritairement connues du grand public notamment par la crise de la vache folle au Royaume-Uni dans les années 1990, la majorité des cas de maladie de Creutzfeldt-Jakob sont sporadiques (sCJD), comptant pour plus de 85 % des cas de maladies à prions chez les humains (Ladogana et al., 2005). Les formes génétiques proviennent de mutations dans le gène PRNP qui code pour la protéine prion cellulaire (PrP<sup>c</sup>) et incluent la maladie de Creutzfeldt-Jakob (gCJD), l'insomnie fatale familiale et le syndrome de Gerstmann-Straeussler-Scheinker (GSS). Les formes acquises sont induites par la transmission de prions et comprennent le variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vCJD), qui est causé par des prions d'origine bovine ; la CJD iatrogène (iCJD) qui est transmise à la suite de procédures médicales et le kuru en Papouasie Nouvelle-Guinée qui était transmis au cours de rituels cannibales.

Plusieurs maladies neurodégénératives impliquent une conformation anormale et une agrégation de protéines qui se propagent telles que les protéines tau (cf. [1.2.2.2.]) et amyloïde dans la MA et les  $\alpha$ -synucléines dans la maladie de Parkinson (Irwin et al., 2013, Spires-Jones et al., 2017).

En résumé, certaines maladies neurodégénératives et les maladies à prions partagent un mécanisme commun (**Fig. 14**) d'auto-propagation de la maladie dans lequel des protéines de conformation anormale qui, en interagissant avec leurs homologues cellulaires, induisent la formation de feuilletts  $\beta$  plissés au sein de ces protéines qui vont s'agréger. Ces nouvelles protéines agrégées vont se propager de cellule en cellule à travers des voies neuroanatomiques bien définies.



**Fig. 14 :** Mécanisme de conversion de protéines physiologiques par des protéines pathologiques qui conduit à l'agrégation de ces protéines. Mécanisme commun aux maladies à prions et à certaines maladies neurodégénératives (maladies d'Alzheimer et de Parkinson). Les protéines de conformation anormale (pathologiques) induisent ce changement de forme chez les protéines normales (physiologiques) qui vont s'agréger. La fragmentation génère de nouvelles protéines pathologiques qui vont accélérer la formation des agrégats. Les filaments représentent le stade le plus agrégé des protéines. Figure modifiée de (Goedert, 2015).

#### 1.2.2.2. Arguments en faveur des propriétés « prion-like » de la protéine tau *in vitro* et *in vivo*

L'hypothèse de propagation « prion-like » de la protéine tau (Mudher et al., 2017) inclut par conséquent deux mécanismes : la nucléation et la propagation. Les mécanismes de nucléation (utilisé ici pour définir le processus de conversion d'une conformation protéique physiologique en une conformation pathologique) et d'agrégation sont encore mal connus ainsi que les formes de la protéine tau qui possèdent ces propriétés (appelées « seeds » en anglais ; les termes « propagon » (Colin et al., 2020) et « prionoïde » (Aguzzi, 2009, Scheckel and Aguzzi, 2018) sont également utilisés). Le mécanisme de propagation implique une libération des protéines tau dans l'espace extracellulaire et une internalisation de ces protéines par les cellules suivantes. Les mécanismes proposés (Mudher et al., 2017, Colin et al., 2020) sont la libération des protéines tau par diffusion à travers la membrane cellulaire, par exocytose, *via* des exosomes ou des ectosomes ou *via* des nanotubes. A l'exception des nanotubes qui connectent directement les cellules entre-elles, les autres mécanismes impliquent que les protéines tau sont relâchées dans l'espace extracellulaire sous forme libre ou à l'intérieur de vésicules. Une autre cellule pourrait alors internaliser ces protéines tau par endocytose/macropinocytose, *via* la fusion des vésicules avec la membrane plasmique ou *via* des récepteurs membranaires.

## Introduction

Des études *in vitro* ont montré que la phosphorylation de la protéine tau était importante pour sa sécrétion, son internalisation et sa propagation. Ainsi, les protéines tau anormalement phosphorylées sont sécrétées de manière plus efficace que les protéines non-phosphorylées dans des cellules en culture (Katsinelos et al., 2018). Une autre étude a montré que les protéines de haut poids moléculaire et hyperphosphorylées isolées de cerveaux atteints de la MA étaient préférentiellement internalisées dans des cultures primaires de neurones corticaux murins (Takeda et al., 2015). Ainsi, les formes hyperphosphorylées de la protéine tau sont internalisées 10 fois plus facilement comparé aux formes peu phosphorylées dans des cellules en culture (Wauters et al., 2016). Une autre étude a montré que des fibrilles de tau recombinantes étaient internalisées par endocytose et induisaient l'agrégation des protéines tau exprimées dans des cellules en culture (Frost et al., 2009). Ces protéines tau agrégées peuvent ensuite être transférées dans d'autres cellules comme observé à l'aide de co-cultures (Frost et al., 2009, Kfoury et al., 2012). De plus, les protéines tau hyperphosphorylées et agrégées contenues dans la fraction sarkosyl insoluble isolée d'un cerveau murin exprimant la protéine tau mutée (P301S) semblent posséder plus de capacités de nucléation, d'une part, par rapport à la fraction soluble (contenant des formes monomériques de tau) et d'autre part, par rapport à des agrégats de tau recombinants dans des cultures cellulaires (Falcon et al., 2015).

La maladie d'Alzheimer est la preuve la plus convaincante d'une propagation d'un « prionoïde<sup>5</sup> » avec la protéine tau à travers des circuits neuronaux, notamment avec les stades de Braak décrits au paragraphe [1.2.1.]. De plus, une autopsie d'une patiente atteinte de la MA qui, à la suite d'une chirurgie pour enlever un méningiome, avait subi des lésions importantes de la substance blanche menant à une déconnection d'une partie du cortex frontal, montrait des plaques amyloïdes et des DNF dans le cerveau à l'exclusion de la zone corticale déconnectée qui, cependant, bien que présentant des plaques amyloïdes, n'avait pas de DNF (Duyckaerts et al., 1997). Ces observations suggéraient que la présence des DNF était donc déterminée par les connections neuronales.

En 2009, Clavaguera et son équipe (Clavaguera et al., 2009) ont démontré *in vivo* les capacités de nucléation et de propagation de la protéine tau en injectant dans l'hippocampe de souris transgéniques qui expriment l'isoforme humaine sauvage 2N4R (lignée ALZ17), des homogénats de cerveau de souris transgéniques exprimant l'isoforme 0N4R humaine mutée (P301S). A la suite de l'injection intracérébrale, ils ont observé le développement d'agrégats de tau (sous forme de DNF) qui se propageaient du point d'injection vers des zones anatomiquement connectées. Par la suite, de nombreuses équipes ont analysé les capacités de nucléation et de propagation de différentes formes de tau, isolées de cerveaux murins ou humains ou synthétiques/recombinantes (p. ex. les PFFs (« preformed fibrils »)) (Iba et al., 2013) par cette méthode d'injection intracérébrale. Ainsi, en 2014, l'injection d'homogénats de cerveaux de souris transgéniques P301S âgées de 5,5 mois dans le cerveau de souris de la même lignée âgées de 2 mois ont montré une exacerbation et une survenue plus rapide de la pathologie tau (Ahmed et al., 2014). De plus, l'injection d'homogénats de cerveaux humains atteints de différentes tauopathies dans le cerveau de souris transgéniques ALZ17 (Clavaguera et al., 2013) ou non-transgéniques (Clavaguera et al., 2013, Narasimhan et al., 2017) provoque des lésions caractéristiques de chaque tauopathie. Ce qui suggère l'existence de différentes souches

---

<sup>5</sup> Rappel : le terme « prionoïde » est utilisé pour définir une protéine qui possède des propriétés en commun avec les prions (mécanismes « prion-like ») mais dont le caractère infectieux n'a pas été démontré (transmission entre individus).

## Introduction

pathologiques (différentes conformations) de la protéine tau qui induisent différentes tauopathies à l'instar des protéines prions. De plus, l'injection de PHF isolés de cerveaux humains atteints de la MA par la méthode sarkosyl dans l'hippocampe de souris sauvages (wild-type) induit une pathologie tau beaucoup plus importante (Guo et al., 2016) que celle observée avec l'utilisation d'homogénats qui n'étaient pas enrichis en PHF (Clavaguera et al., 2013). Notre laboratoire a également démontré que l'injection intracérébrale de PHF humains dans l'hippocampe de souris sauvages induit une pathologie tau composée d'isoformes murines 4R (Audouard et al., 2016). L'induction d'une pathologie tau dans des souris sauvages par des PHF humains pourrait s'expliquer par la séquence de la protéine tau nécessaire à la formation des PHF-tau et des filaments droits qui comprend les acides aminés 306 à 378, cette séquence étant identique chez la souris et l'être humain (Fitzpatrick et al., 2017). De plus, la phosphorylation présente sur la protéine tau dans les PHF semble être nécessaire pour induire une pathologie tau. En effet, des protéines tau isolées d'un cerveau atteint de la MA et déphosphorylées (à l'aide de la protéine phosphatase 2A (PP2A)) n'induisent pas de DNF après leur injection dans l'hippocampe de souris transgéniques (hTau) qui expriment la protéine tau humaine sauvage (Hu et al., 2016). Ces observations démontrent les propriétés de nucléation et de propagation des PHF et l'injection de ceux-ci dans des lignées murines non-transgéniques permet d'obtenir un modèle pour l'étude des tauopathies sporadiques.

De plus, la diversité des phénotypes observés dans la MA pourrait s'expliquer par des formes variables de la protéine tau pathologique qui posséderaient différentes propriétés « prion-like » (Dujardin et al., 2020, Li et al., 2021).

### **1.3. Transmission iatrogène de maladies à prions par des voies extracérébrales**

Le plus grand nombre de cas de maladies de Creutzfeldt-Jakob iatrogènes (iCJD) se sont déclarés à la suite de l'utilisation d'hormones de croissance ou gonadotropes contaminées, dérivées de glandes pituitaires prélevées sur des cadavres humains (Brown, 1988) ou à la suite de greffes de dures-mères (Brown et al., 2012). Depuis lors, les hormones et les dures-mères d'origine humaine ont été remplacées par des hormones pituitaires recombinantes et par des prothèses de substitution pour les dures-mères. Cependant, des cas de transmissions ont été également observés ou suspectés à la suite de transfusions sanguines ou de chirurgies oculaires.

#### **1.3.1. Transmission par voie sanguine**

##### **1.3.1.1. Transmission de maladies à prions par voie sanguine**

Depuis 2004 au Royaume-Uni, des études épidémiologiques ont associé des transmissions du variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) avec des transfusions sanguines (Llewelyn et al., 2004, Wroe et al., 2006, Urwin et al., 2016) tandis que la transmission de la forme sporadique n'a pas été démontrée (Dorsey et al., 2009, Molesworth et al., 2011) mais le risque de contamination pourrait être sous-estimé (Puopolo et al., 2011).

##### **1.3.1.2. La protéine tau dans le sang**

La protéine tau est présente dans le sang à des taux très faibles (de l'ordre du pg/ml) et est difficilement détectable. Elle peut néanmoins être décelée par des méthodes ultrasensibles (Yang et al., 2017). La détection de la protéine plasmatique est d'un intérêt majeur pour la clinique puisqu'elle pourrait devenir un biomarqueur permettant un diagnostic précoce de la MA. Plusieurs protéines sont actuellement à l'étude, citons p-tau181 (Guo et al., 2021, Moscoso et al., 2021) et p-tau217 (Thijssen et al., 2021). Les méthodes développées pourraient également être utilisées pour détecter la protéine tau dans les produits sanguins destinés aux transfusions.

La protéine tau est détectée dans le sang des individus en bonne santé et sa concentration plasmatique augmente progressivement avec la présence de troubles cognitifs légers<sup>6</sup> et la MA (Chiu et al., 2014). Les mêmes observations ont été montrées avec la forme phosphorylée de la protéine tau (pThr181) (Yang et al., 2018, Moscoso et al., 2021). De plus, lors du vieillissement normal, le taux plasmatique de la protéine tau augmente en association avec l'âge de l'individu (Chiu et al., 2017, Lue et al., 2019) et les sujets porteurs de l'ApoE4 présentent un taux plasmatique de la protéine tau plus élevé par rapport aux non-porteurs de l'ApoE4 (Chiu et al., 2017). Néanmoins, une autre étude n'a pas trouvé de différence du taux plasmatique de la protéine tau entre les porteurs et les non-porteurs de l'ApoE4 (Lue et al., 2019).

##### **1.3.1.3. Transmission de la pathologie tau par voie sanguine**

La transmission de protéines tau pathologiques par la voie sanguine est incertaine, étant donné que les études épidémiologiques n'ont pas montré d'association entre le risque pour la MA et les produits sanguins (O'Meara et al., 1997, Edgren et al., 2016) ou, au contraire, ont montré une augmentation du risque (Lin et al., 2019).

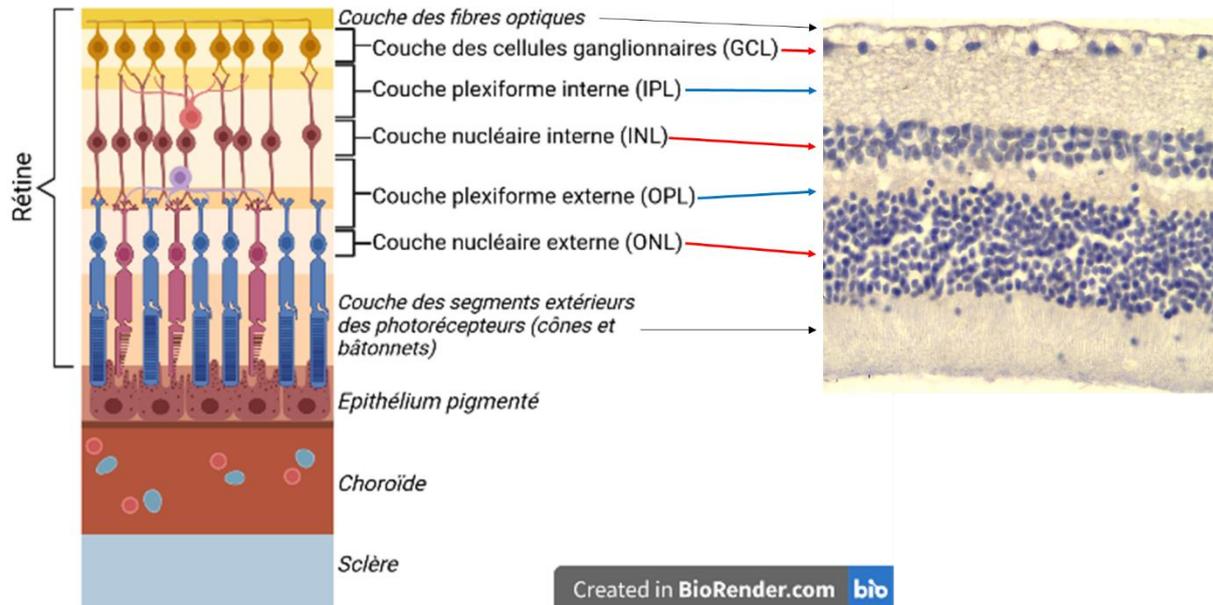
---

<sup>6</sup> La déficience cognitive légère (« mild cognitive impairment (MCI) ») désigne un état de transition entre les changements cognitifs normaux liés au vieillissement normal et ceux liés à une démence à un stade très précoce.

### 1.3.2. Transmission par le système visuel

#### 1.3.2.1. Le système visuel chez l'homme et la souris

L'œil appartient au SNC et est composé de plusieurs structures dont la rétine qui est la partie sensible à la lumière et qui est capable de transmettre cette information au cerveau avec lequel elle est connectée. La rétine est composée de plusieurs couches de cellules qui possèdent un phénotype neuronal. L'organisation de la rétine est présentée dans la figure 15 (**Fig. 15**).



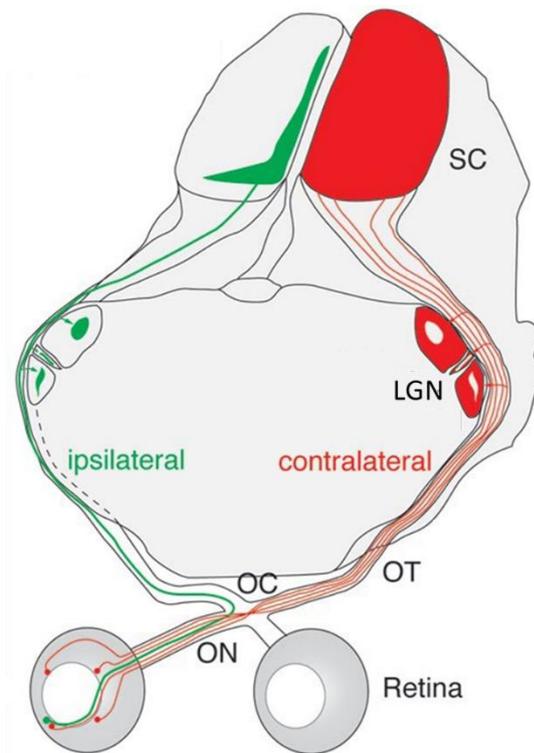
**Fig. 15 :** Schéma de la rétine (à gauche) et section histologique d'une rétine de souris (à droite). La rétine est composée de cinq couches très organisées. La couche des cellules ganglionnaires (GCL) contient les neurones dont les axones vont former le nerf optique. Les couches plexiformes interne et externe sont formées de neurites. La couche nucléaire interne possède des cellules bipolaires et la couche nucléaire externe contient les cellules photoréceptrices (cônes et bâtonnets). Le schéma illustre également l'épithélium pigmenté, qui doit son nom aux grains de mélanine qu'il contient, la choroïde qui est riche en vaisseaux sanguins et la sclère qui est une membrane protectrice recouvrant l'œil. Des cellules amacrines (en rose) et horizontales (en mauve) sont aussi représentées schématiquement, elles se situent dans la couche plexiforme interne et externe respectivement. Les abréviations font référence aux dénominations anglaises des couches : GCL : ganglion cell layer ; IPL : inner plexiform layer ; INL : inner nuclear layer ; OPL : outer plexiform layer ; ONL : outer nuclear layer. Image (à gauche) créée avec BioRender.com. Image (à droite) : photo personnelle ; coupe colorée à l'hématoxyline (mise en évidence des noyaux cellulaires en bleu).

Les neurones ganglionnaires forment la couche la plus interne de la rétine, située autour de la chambre postérieure de l'œil qui contient l'humeur vitrée. Les neurones ganglionnaires envoient leurs axones qui quittent l'œil par la papille optique pour former le nerf optique. Les nerfs optiques se croisent au niveau du chiasma optique et forment des connections avec deux zones cérébrales : le colliculus supérieur et le corps genouillé latéral. Les neurones présents dans ces deux zones envoient à leur tour des prolongements vers le cortex visuel primaire où les informations visuelles sont traitées (**Fig. 16**). Plus précisément, au niveau du chiasma optique, environ 50% des axones du nerf optique de chaque œil sont décussés (partent vers le

## Introduction

côté contralatéral) et les autres 50 % restent du côté ipsilatéral<sup>7</sup> (Kupfer et al., 1967). Le corps genouillé latéral est situé dans le thalamus. Il reçoit 80 à 90 % des prolongements axonaux rétiniens dans l'espèce humaine (Gupta and Yücel, 2007) et forme une zone relais qui se connecte au cortex visuel primaire, formant la voie rétinogéniculocorticale (voie visuelle primaire). Les 10 à 20 % restants se projettent sur le colliculus supérieur dans le mésencéphale (Perry and Cowey, 1984), dont le rôle est de coordonner les mouvements des yeux et de la tête vers les objets d'intérêt, c'est la voie rétinotectale<sup>8</sup>.

En plus des cellules neuronales, la rétine contient, comme le cerveau, des cellules gliales. Les astrocytes sont présents uniquement dans la couche des fibres du nerf optique (ce sont les premiers segments des prolongements axonaux des cellules ganglionnaires), cette couche est située au-dessus de la couche des cellules ganglionnaires (**Fig. 15**). Les cellules microgliales résident dans la couche des cellules ganglionnaires et dans les couches plexiformes (interne et externe).

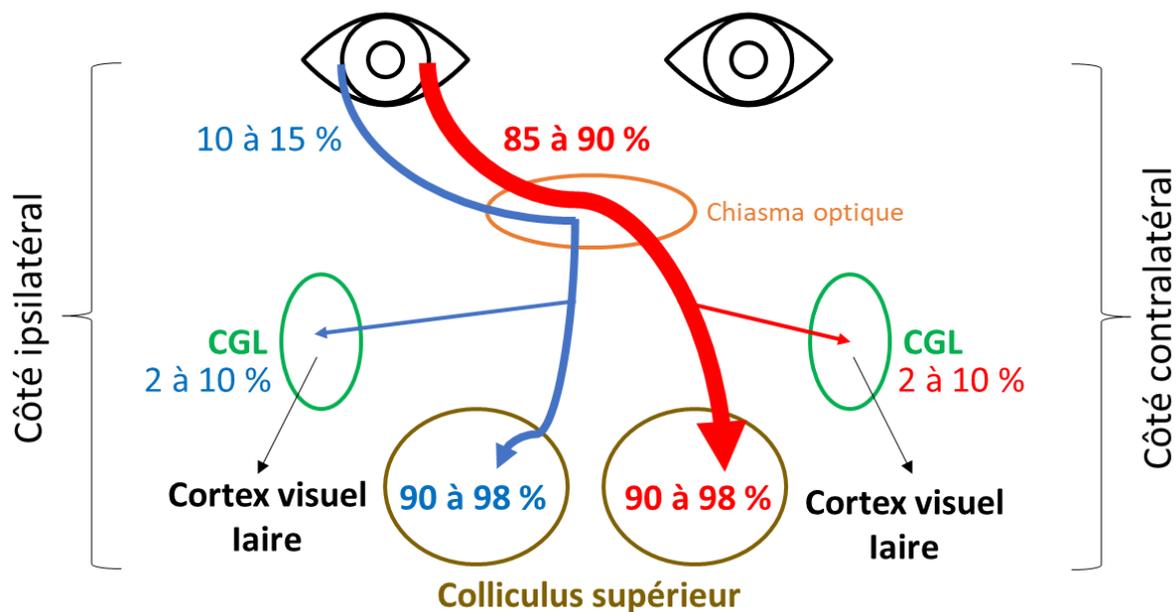


**Fig. 16 : Schéma du système visuel (murin).** Les axones des cellules ganglionnaires de la rétine forment les nerfs optiques (ON) qui se croisent au niveau du chiasma optique (OC) et vont se connecter aux neurones du corps genouillé latéral (LGN) et au colliculus supérieur (SC) *via* le tractus optique (OT). La partie contralatérale fait référence à la partie cérébrale opposée à l'œil examiné et la partie ipsilatérale est la partie du cerveau située du même côté que l'œil considéré. Les abréviations font référence aux termes anglais : SC : superior colliculus ; LGN : lateral geniculate nucleus ; OT : optic tract ; OC : optic chiasm ; ON : optic nerve. Image modifiée de <http://www.rebsam.org/research> ; © Alexandra Rebsam (Institut de la vision, Inserm, France).

<sup>7</sup> Les fibres axonales issues des zones temporales de la rétine sont directes tandis que celles venant des zones nasales sont envoyées du côté contralatéral.

<sup>8</sup> La voie est dénommée rétinotectale en référence au tectum optique qui est l'équivalent du colliculus supérieur chez les vertébrés non-mammifères.

L'œil de la souris est similaire à celui de l'être humain, à l'exception du cristallin qui est une lentille biconvexe chez l'humain et qui ressemble à une bille chez le rongeur. Le cristallin de la souris occupe la majeure partie de la chambre vitrée de l'œil tandis que l'humeur vitrée occupe environ 80 % du volume total de l'œil chez l'humain. De plus, chez la souris, 85 à 90 % des fibres du nerf optique partent du côté contralatéral au niveau du chiasma optique et 10 à 15 % restent du côté ipsilatéral (Levkovitch-Verbin, 2004). Aussi, la principale cible des axones rétiniens chez l'humain est le corps genouillé latéral (CGL) alors qu'elle est le colliculus supérieur chez la souris. En effet, 90 à 98 % des fibres du nerf optique projettent dans cette aire (Forrester and Peters, 1967, Chiu et al., 2008) et par conséquent, 2 à 10 % sont envoyés dans le CGL chez le rongeur (**Fig. 17**).



**Fig. 17 :** Schéma des projections des fibres du nerf optique chez la souris. Explications dans le texte. CGL : Corps genouillé latéral.

### 1.3.2.2. Transmission de maladies à prions par le système visuel

Le premier cas de maladie de Creutzfeldt-Jakob iatrogène (iCJD) a été reporté en 1974 avec un patient ayant reçu une greffe de cornée contaminée qui avait été prélevée sur un cadavre humain (Duffy et al., 1974). Un cas similaire a été reporté par la suite (Heckmann et al., 1997). Des cas de transmission de iCJD ont également été décrits après des procédures neurochirurgicales avec l'utilisation d'instruments (Bernoulli et al., 1977, Will and Matthews, 1982) ou d'électrodes contaminées (Gibbs et al., 1994).

### 1.3.2.3. Propagation de la protéine prion *via* des connections neuronales

Les maladies à prions se transmettent naturellement par des voies périphériques. Les protéines prions se répliquent dans les organes lymphoïdes avant d'atteindre le cerveau par la moëlle épinière (Aguzzi et al., 2008). Les protéines prions n'entrent donc pas dans le système nerveux par la circulation sanguine mais par des nerfs, majoritairement de nature sympathique (Glatzel et al., 2001, Prinz et al., 2003).

Au niveau expérimental, certaines observations semblent démontrer que les protéines prions peuvent se propager en suivant d'autres connections neuronales. Ainsi, l'ingestion de protéines prions par des hamsters suggèrent que celles-ci se propagent vers le cerveau par le nerf vague plutôt que le long de la moëlle épinière (Beekes et al., 1998).

Aussi, deux études ont montré que l'injection de protéines prions dans l'œil atteignent le colliculus supérieur et le corps genouillé latéral qui sont, comme nous l'avons vu précédemment (cf. [1.3.2.1.] et Fig. 16), des zones cérébrales neuroanatomiquement connectées à la rétine. (Fraser, 1982, Brandner et al., 1996).

### **1.3.2.4. Expression des protéines tau et APP normales dans l'œil**

L'analyse immunohistologique à l'aide d'un anticorps reconnaissant la forme déphosphorylée de la protéine tau dans la rétine humaine montre un marquage intense dans la CNI et dans la CPI, un marquage plus faible dans la CPE et la CCG et aucun marquage dans la CNE (Löffler et al., 1995). La forme phosphorylée de la protéine tau a été observée, avec un marquage faible, dans la CPI et la CCG (Löffler et al., 1995). Aucun changement relatif à l'âge n'a été observé (Löffler et al., 1995). Une autre étude a confirmé ces observations. Cependant, cette étude a montré une corrélation positive entre l'âge et la présence de cellules ganglionnaires marquées avec un anticorps anti-tau indépendant de l'état de phosphorylation de la protéine. De plus, l'étude ne rapporte aucun marquage des rétines humaines avec un anticorps anti-tau phosphorylé (Leger et al., 2011). Une étude de 2008 a également décrit un marquage des CNI et CPI et un marquage variable de la CCG dans la rétine humaine en utilisant un anticorps anti-tau (Gupta et al., 2008).

La protéine APP est aussi présente dans la rétine humaine comme l'indiquent plusieurs études. Elle apparaît majoritairement dans la CCG lorsqu'elle est observée à la suite d'un immunomarquage sur une rétine humaine et l'intensité du marquage semble augmenter avec l'âge de l'individu (Löffler et al., 1995).

Dans la rétine de souris adultes sauvages (WT), la protéine tau est détectée principalement dans le corps cellulaire et les axones (couche des fibres optiques) des cellules ganglionnaires, dans la couche nucléaire interne et dans les couches plexiformes (Rodriguez et al., 2020). La protéine APP est également exprimée dans toutes les couches de la rétine des souris sauvages à l'exception de la couche nucléaire externe (CNE) (Ho et al., 2012a).

### **1.3.2.5. La pathologie tau dans la rétine dans la maladie d'Alzheimer**

Plusieurs changements pathologiques ont été observés dans la rétine de patients atteints de la MA tels qu'une perte de cellules ganglionnaires (Blanks et al., 1996) et une réduction de l'épaisseur de la couche des fibres du nerf optique (Hedges et al., 1996). La dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine humaine est observée en l'absence de DNF et de plaques amyloïdes (Hinton et al., 1986, Blanks et al., 1989).

L'analyse *post-mortem* de rétines humaines ont montré des inclusions marquées par l'anticorps AT8 (pSer202/Thr205) dans la CCG, les couches plexiformes et la CNI. Néanmoins ces protéines tau hyperphosphorylées ne sont pas agrégées comme l'indiquent l'absence de coloration au Gallyas et à la Thioflavine S ou l'utilisation de différents anticorps anti-tau (AT100, AT180, AT270 ou PHF-1) (Schön et al., 2012). Des observations similaires ont été obtenues par l'équipe de (den Haan et al., 2018). En effet, ils ont montré, par des analyses immunohistologiques, la présence de la protéine tau dans les couches plexiformes (IPL et OPL),

## Introduction

en accord avec les observations de (Löffler et al., 1995) et la protéine tau phosphorylée a été également été détectée dans ces couches avec les anticorps anti-tau phosphorylé AT8, AT100 et AT270. Les mêmes observations ont été reportées par l'équipe de (Grimaldi et al., 2019) pour les anticorps AT8 et AT-100. En concordance avec l'étude de (Schön et al., 2012), la protéine tau n'a pas été observée sous une forme agrégée puisqu'aucun marquage avec les anticorps MC1 et anti-tau pS422 n'a été observé, ces anticorps détectant les protéine tau sous forme de PHF. De plus, les structures typiques formées par la protéine tau dans le cerveau telles que les DNF, les plaques neuritiques et les neurites marqués dans le neuropile ne sont pas retrouvées dans la rétine (den Haan et al., 2018). Aussi, la présence de la protéine tau phosphorylée dans la rétine permet de discriminer les rétines de patients atteints de la MA et les rétines de sujets contrôles, contrairement à la présence de dépôts amyloïdes (den Haan et al., 2018). Cependant, d'autres études n'ont pas détecté de protéine tau hyperphosphorylée dans la rétine de patients décédés de la MA (Ho et al., 2014, Williams et al., 2017).

La phosphorylation de la protéine tau dans la rétine, analysée par western blotting, apparaît d'abord sur les épitopes reconnus par les anticorps AT8 et PHF-1 et ensuite sur l'épitope S199 tandis que la conformation de la protéine n'est pas modifiée (MC1 négative) dans un modèle murin transgénique qui co-exprime une protéine amyloïde humaine mutée (APP<sub>swe</sub>/PS1-M146V) et une protéine tau humaine mutée (P301L) (Chiasseu et al., 2017). L'analyse immunohistologique de ces souris triple transgéniques a montré l'expression de la protéine tau dans toutes les couches de la rétine à l'exception de la CNE et l'intensité du marquage augmente avec l'âge de la souris particulièrement dans la CPI et dans le corps cellulaire des cellules ganglionnaires de la rétine (Chiasseu et al., 2017). Les souris transgéniques qui expriment une protéine tau humaine mutée (P301S) montrent également une expression de la protéine tau dans le corps cellulaire et les neurites (Gasparini et al., 2011). D'autres études ont aussi observé la protéine tau phosphorylée par immunohistochimie sur les épitopes reconnus par AT8 et AT100 (Gasparini et al., 2011, Schön et al., 2012) et sur les épitopes PHF-1 et AT-180 (Gasparini et al., 2011) dans un modèle murin qui exprime une protéine tau mutée (P301S). L'épitope reconnu par l'anticorps AT-100 est considéré comme mettant en évidence une forme fibrillaire (agrégée) de la protéine tau (Gasparini et al., 2011, Schön et al., 2012). Aussi, l'équipe de (Gasparini et al., 2011) a observé la présence de protéines tau hyperphosphorylées dans la fraction sarkosyl insoluble de la rétine des souris transgéniques analysée par western blotting et des filaments semblables à ceux isolés du cerveau ont été observés par microscopie électronique. De plus, la pathologie tau dans la rétine est détectée avant l'apparition de la pathologie tau corticale dans des modèles murins qui surexpriment une protéine tau humaine mutée (Schön et al., 2012, Chiasseu et al., 2017).

L'accumulation de protéines tau hyperphosphorylées a également été observée dans la rétine de patients souffrant de glaucome<sup>9</sup> (Gupta et al., 2008). Certaines études suggèrent qu'un lien pourrait exister entre ces deux maladies neurodégénératives (Wostyn et al., 2009).

---

<sup>9</sup> Le glaucome est caractérisé par une perte progressive des cellules ganglionnaires de la rétine et une atrophie du nerf optique qui conduisent à une perte visuelle, voire à la cécité.

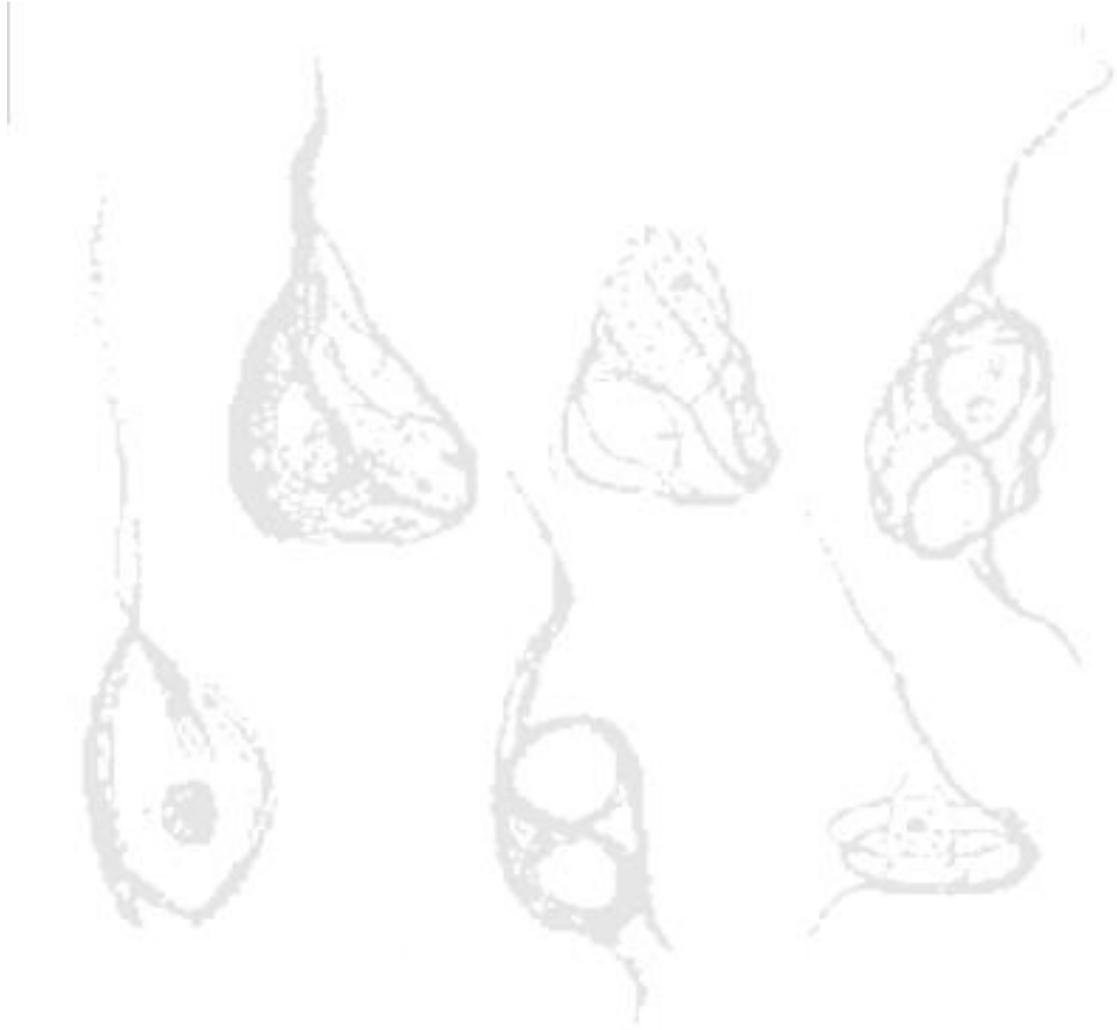
### 1.3.2.6. La pathologie amyloïde dans la rétine dans la maladie d'Alzheimer

La protéine APP est exprimée dans les cellules ganglionnaires de la rétine (CCG) et le peptide  $\beta$ -amyloïde est présent dans la couche des fibres optiques dans différents modèles transgéniques qui surexpriment une protéine amyloïde humaine mutée (Ning et al., 2008, Liu et al., 2009). Les plaques amyloïdes ont été détectées dans le modèle murin APP<sub>swe</sub>/PS1 $\Delta$ E9, surexprimant une protéine amyloïde humaine mutée (Perez et al., 2009, Koronyo-Hamaoui et al., 2011) et dans un modèle murin triple transgénique (APP<sub>swe</sub>/PS1M146V/MAPTP301L) (Grimaldi et al., 2018). Les dépôts amyloïdes dans la rétine sont observés avant le développement de la pathologie amyloïde dans le cerveau murin pour l'étude de (Koronyo-Hamaoui et al., 2011) ou après l'apparition des dépôts amyloïdes cérébraux pour l'étude de (Perez et al., 2009). Une étude a également montré que la présence de plaques amyloïdes dans la rétine était liée à une hyperphosphorylation (AT8) de la protéine tau murine endogène dans un modèle murin (Tg2576) qui surexprime une protéine amyloïde humaine mutée (APP<sub>swe</sub>) (Liu et al., 2009). Cependant, une étude a analysé, par western blotting, l'état de phosphorylation de la protéine tau dans le modèle murin APP<sub>swe</sub>/PS1 $\Delta$ E9 sur les épitopes T181 et S262 et n'a pas trouvé de phosphorylation sur ces sites (Chidlow et al., 2017). L'analyse protéique des taux d'A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42 par ELISA dans la rétine de souris transgéniques a montré une expression élevée dans le génotype 5xFAD par rapport aux génotypes Tg2576, 3xTg-AD et PSAPP et les taux mesurés dans les souris 5xFAD sont similaires à ceux détectés dans la rétine humaine atteinte de MA (Alexandrov et al., 2011). De plus, les taux d'A $\beta$ 42 détectés dans la rétine de différents modèles transgéniques exprimant une protéine amyloïde humaine mutée sont inférieurs à ceux mesurés dans le cerveau (Dutescu et al., 2009, Alexandrov et al., 2011). Cependant, certaines études n'ont pas détecté la présence de dépôts amyloïdes dans la rétine de souris transgéniques surexprimant une protéine amyloïde humaine mutée (Schön et al., 2012, Chidlow et al., 2017).

Des plaques amyloïdes ont également été détectées *post-mortem* dans les rétines humaines de patients atteints de la MA au niveau des couches internes (Koronyo-Hamaoui et al., 2011, Grimaldi et al., 2019). Néanmoins, la majorité des études indiquent l'absence de plaques amyloïdes dans la rétine humaine de patients atteints de la MA (Hinton et al., 1986, Blanks et al., 1989, Schön et al., 2012, Ho et al., 2014, Williams et al., 2017). Les divergences de résultats peuvent s'expliquer par les différentes méthodologies utilisées dans les études et notamment les anticorps choisis pour détecter la pathologie amyloïde. En effet, une étude de 2018 (den Haan et al., 2018) montre que les rétines humaines prélevées sur des patients décédés de la MA développent des dépôts amyloïdes qui sont mis en évidence par certains anticorps anti-A $\beta$  et pas par d'autres. Un marquage intracellulaire des cellules ganglionnaires de la rétine et de la CNI et des plaques extracellulaires dans les CCG et CNI ont été observés avec l'anticorps anti-A $\beta$  « 6E10 » mais l'utilisation de l'anticorps anti-A $\beta$  « 4G8 » ou du colorant Thioflavine S ne permet pas de visualiser de plaques extracellulaires. Cependant, ces observations ne permettent pas de distinguer des rétines de patients atteints de la MA ou de sujets contrôles.

### **1.3.3. Transmission de la pathologie tau par voie extracérébrale dans des modèles expérimentaux**

L'administration périphérique, par une injection intrapéritonéale de protéines tau pathologiques isolées de cerveaux de souris transgéniques exprimant une isoforme humaine mutée de la protéine tau (P301S) a conduit à une exacerbation de la pathologie tau cérébrale chez ces souris, 9 mois après l'injection (Clavaguera et al., 2014), ce qui suggère qu'une transmission vers le cerveau peut avoir lieu à la suite d'une contamination périphérique.



# *Objectifs*



## 2. Objectifs

Etant donné que la protéine tau partage des propriétés avec les protéines prions (Mudher et al., 2017) et que des cas de transmission iatrogène de la maladie de Creutzfeldt-Jakob ont été rapportés ou suspectés à la suite de transfusions sanguines (Llewelyn et al., 2004, Wroe et al., 2006) ou de chirurgies oculaires (Heckmann et al., 1997, Mehta and Franks, 2002), nous avons voulu éprouver l'hypothèse qu'une transmission de la pathologie tau au cerveau était peut-être possible par des voies extra-cérébrales similaires à celles utilisées par les protéines prions. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons étudié les voies sanguines et visuelles comme voies de transmission et de propagation de la pathologie tau.

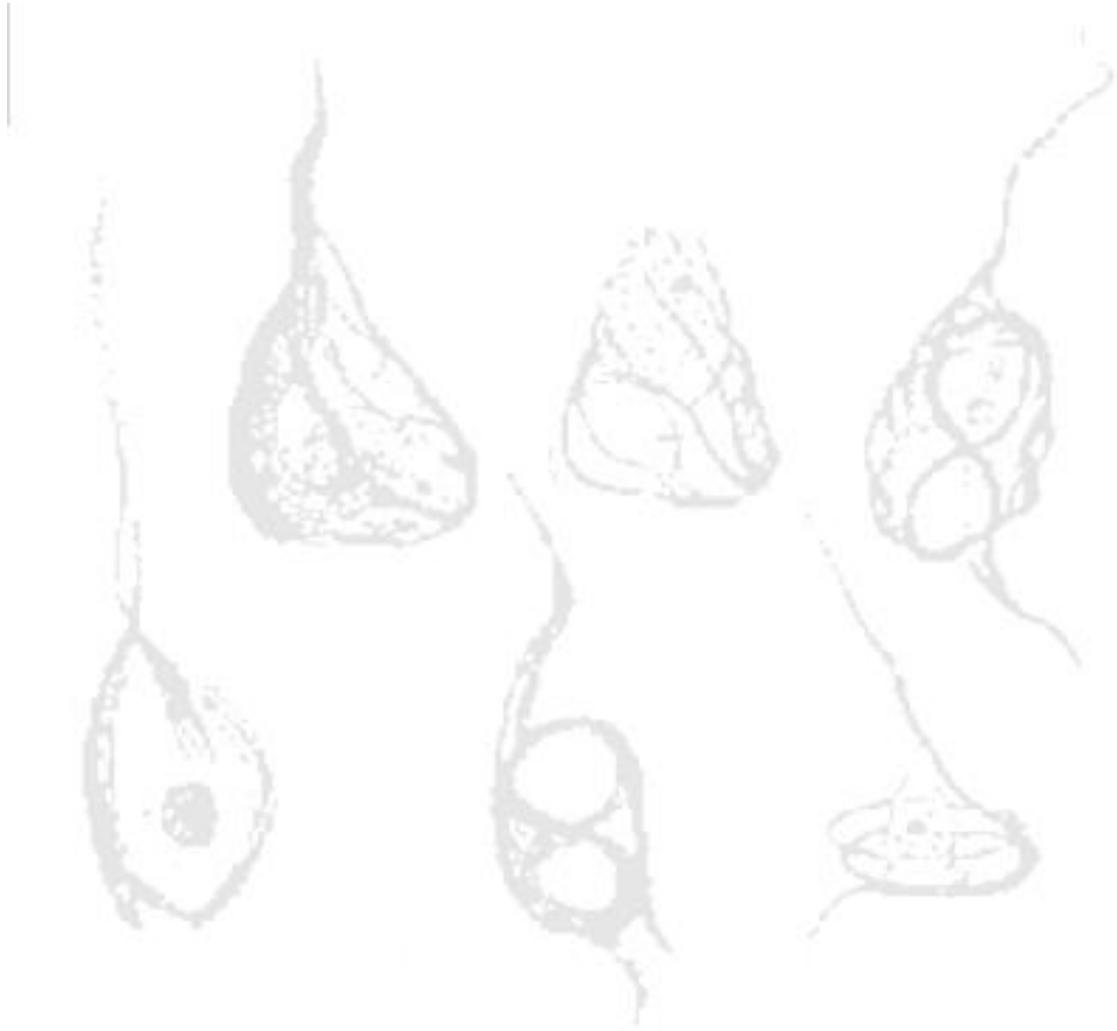
### **2.1. Propagation de la pathologie tau par voie sanguine**

Chez des sujets humains, le développement d'une pathologie tau à la suite de l'injection intraveineuse d'hormones de croissance d'origine humaine et contaminées par des protéines tau pathologiques suggère qu'une transmission de la pathologie tau est possible par voie sanguine (Duyckaerts et al., 2018). Nous avons étudié l'effet d'une injection intraveineuse de protéines tau pathologiques (PHF-tau) isolées à partir de cerveaux de sujets atteints de la maladie d'Alzheimer sur la propagation de la pathologie tau dans le cerveau de modèles murins sauvages (WT) ou transgéniques.

### **2.2. Propagation de la pathologie tau par le système visuel**

La protéine prion pathologique est rencontrée dans les couches plexiformes de la rétine de cas sporadiques de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (Head et al., 2003, Head et al., 2005) et de cas du variant de la CJD (vCJD) (Head et al., 2003). La protéine prion pourrait, dès lors, être transmise par des instruments chirurgicaux contaminés après un contact avec des tissus infectés lors de procédures en neurochirurgie ou en chirurgie ophtalmologique (Mehta and Franks, 2002, S-Juan et al., 2004). Par conséquent, si la protéine tau partage des propriétés avec la protéine prion et puisque la pathologie tau a été détectée dans la rétine (den Haan et al., 2018) et dans les fluides de l'œil (Gijs et al., 2021, Romaus-Sanjurjo et al., 2022) dans la maladie d'Alzheimer, la propagation de la pathologie tau à partir de la rétine au cerveau est-elle possible à la suite d'une contamination ophtalmique ? Nous avons étudié l'effet d'une injection intraoculaire de protéines tau pathologiques (PHF-tau) isolées à partir de cerveaux de sujets atteints de la maladie d'Alzheimer sur la propagation de la pathologie tau par la voie retino-tectale dans différents modèles murins sauvages (WT) ou transgéniques.





*Matériel et  
Méthodes*



### 3. Matériel et Méthodes

#### 3.1. Matériel

##### 3.1.1. Anticorps primaires

Les différents anticorps primaires utilisés pour les immunomarquages (immunohistochimie) et en western blotting sont repris et détaillés dans le **tableau 1**. Les différentes dilutions ainsi que les pré-traitements éventuels, nécessaires pour démasquer les épitopes des antigènes d'intérêt en immunohistochimie, sont également mentionnés. Les pré-traitements consistent à immerger les coupes histologiques dans du tampon citrate 0,01 M (acide citrique monohydraté 0,01 M ; citrate de Na dihydraté 0,01 M ; pH 6) et les chauffer à ébullition dans une cocotte à pression pendant 20 minutes.

La mise en évidence des protéines amyloïdes nécessitent de pré-traiter les coupes histologiques en les immergeant dans de l'acide formique 99% pendant 15 minutes. L'acide formique détruit les fonctions aldéhydes créées par la fixation et rend les sites antigéniques plus accessibles pour les anticorps.

	Anticorps primaire	Epitope/Immogène	Code	Origine	Référence	Espèce	Clonalité	Prétraitement*	ABC/DAB	Western Blot	PM (kDa)**
Tau	Anti-tau total	Tau adulte et fœtale (P. indep.) humain et murin	B19	JP Brion	Brion et al., 1991a	Lapin	Polyclonal	-	1/10 000	1/2000	45-75
	Anti-tau total	Tau humain et murin	A0024	DAKO	A0024	Lapin	Polyclonal	-	1/5000	1/5000	45-75
	Anti-tau humain	Tau humain (16-28 a.a.)	BR21	JP Brion	Ando et al., 2011	Lapin	Polyclonal	-	1/5000	1/5000	45-75
	Anti-tau murin	Tau murin	mTau5	M. Mercken	Semvik et al., 2007	Souris	Monoclonal	-	1/1000	-	-
	Anti-phosphotau	Tau pSer396-pSer404	PHF-1	Davies P.	Otvos et al., 1994	Souris	Monoclonal	-	1/50 000	1/2000	45-75
	Anti-phosphotau	Tau pSer202-pThr205	AT8	Thermo Fisher	MN1020	Souris	Monoclonal	-	1/500	-	-
	Anti-phosphotau	Tau pThr231	AT-180	ImmoGenetics	BR-007	Souris	Monoclonal	-	1/500	-	-
	Anti-phosphotau	Tau pThr231	pThr231	Sigma	AB9668	Lapin	Polyclonal	-	1/1000	-	-
	Anti-tau déphosphorylé	Tau déphosphorylé (Ser195/198/199/202)	Tau-1	Millipore	MAB3420	Souris	Monoclonal	-	1/1000	-	-
	Anti-tau conformationnel	Epitope conformationnel (N-term. Et C-term.)	MCI	Davies P.	Jicha et al., 1997	Souris	Monoclonal	-	1/500	-	-
Kinases	Anti-GSK3β	N-term. (1-160 a.a.)	TPK1	Transduction	G22320	Souris	Monoclonal	Cocotte à pression	1/500	1/5000	47
	Anti-GSK3α-pTyr279/β-pTyr216	GSK3α/β (211-220 a.a.)	PY279-216	Invitrogen	711262	Lapin	Polyclonal	-	-	1/2000	51/47
	Anti-β-caténine	β-caténine (571-781 a.a.)	C14/β-Cat.	Transduction	610154	Souris	Monoclonal	-	-	1/2000	94
	Anti-CDK5	CDK5 (full length)	DC-17	Santa Cruz	Sc-249	Souris	Monoclonal	Cocotte à pression	1/100	1/2000	30
	Anti-p35	p35 (C-term.)	C19	Santa Cruz	Sc-820	Lapin	Monoclonal	-	-	1/2000	25/35
Amyloïde	Anti-APP humain	APP humain (N-term.)	3H5	JN Octave	Philippe et al., 1993	Souris	Monoclonal	-	1/6000	1/2000	100-130
	Anti-APP total	APP humain et murin (C-term.)	BR15	JP Brion	Leroy et al., 2012	Lapin	Polyclonal	-	-	1/1000	100-130
	Anti-amyloïde Aβ40	Aβ40	Aβ40	Thermo Fisher	44-136	Lapin	Polyclonal	Acide Formique 99%	1/5000	-	-
	Anti-amyloïde Aβ42	Aβ42 (C-term.)	Aβ42	Millipore	AB5078P	Lapin	Polyclonal	Acide Formique 99%	1/500	-	-
	Anti-amyloïde	Amyloïde (1-16 a.a. N-term.)	6E10	Novus Biologicals	NBP2-62566	Souris	Monoclonal	Acide Formique 99%	1/10 000	-	-
Neuroinflammation	Anti-GFAP	GFAP	GA5	Sigma	G3893	Souris	Monoclonal	-	1/20 000	-	-
	Anti-Iba1	Iba1 (135-147 a.a.)	Iba1	Abcam	Ab5076	Chèvre	Polyclonal	-	1/200	-	-
Autres	Anti-Sous-unité B de la toxine du choléra	Toxine du choléra, sous-unité B	CTxB	Calbiochem	227040	Chèvre	Polyclonal	-	1/200	-	-
	Anti-Actine	β-actine	Actine	Sigma	A5441	Souris	Monoclonal	-	-	1/5000	42
	Anti-Actine	Actine (C-term.)	Actine	Sigma	A2066	Lapin	Polyclonal	-	-	1/1000	42

\* Uniquement ABC/DAB

\*\* En gel SDS-PAGE

**Tableau 1 : Liste des anticorps primaires utilisés dans le projet de recherche.** Les dilutions et les pré-traitements éventuels effectués en immunohistochimie (technique ABC/DAB) sont également mentionnés.

### 3.1.2. Anticorps secondaires

Les anticorps secondaires sont choisis en fonction de l'espèce animale chez laquelle les anticorps primaires ont été produits. Les anticorps secondaires utilisés en immunohistochimie sont couplés à de la biotine et les anticorps secondaires utilisés en western blotting sont, quant à eux, couplés directement à l'enzyme peroxydase (HRP). L'ensemble des anticorps secondaires sont mentionnés dans le **tableau 2**.

Anticorps secondaire	Code	Origine	Référence	Espèce	ABC/DAB	Western Blot
Anti-souris biotinylé	HAM-Biot.	Vector	BA-2001	Cheval	1/100	-
Anti-souris biotinylé	GAM-Biot.	Jackson	115-065-068	Chèvre	1/100	-
Anti-lapin biotinylé	GAR-Biot.	Vector	BA-1000	Chèvre	1/300	-
Anti-souris couplé peroxydase	GAM-HRP	Sigma	A6782	Chèvre	-	1/2000
Anti-lapin couplé peroxydase	GAR-HRP	Cell Signaling	7074S	Chèvre	-	1/2000

**Tableau 2 :** Liste des anticorps secondaires utilisés en immunohistochimie (technique ABC/DAB) et en western blotting.

### 3.1.3. Cerveaux humains

Les cerveaux humains utilisés dans ce projet sont issus de la banque de cerveaux (« brain bank ») du Pr Jean-Pierre Brion au sein du laboratoire d'histologie, de neuroanatomie et de neuropathologie (Agrément n° BB190052). Les cerveaux ont été prélevés à l'autopsie chez un patient dément diagnostiqué cliniquement comme ayant la MA (femme de 60 ans, délai *post-mortem* de 24 heures) et chez un sujet sain, non-dément (homme de 67 ans, délai *post-mortem* de 24 heures) qui servira de contrôle. Pour chaque cerveau, un des hémisphères a été fixé dans du formol 10 % et enrobé de paraffine et l'autre a été congelé et stocké à -80°C. L'examen neuropathologique réalisé sur des coupes histologiques a confirmé la présence de DNF et de plaques amyloïdes chez le patient MA (stade de Braak VI, stade de Thal 4) et leurs absences chez le patient non-dément. Les études sur ce matériel humain ont été réalisées en conformité et avec l'accord du comité éthique de la faculté de Médecine de l'Université Libre de Bruxelles (numéro de protocole éthique P2009/015).

### 3.1.4. Culture cellulaire

#### 3.1.4.1. Culture de CHO

Les cellules CHO (« Chinese Hamster Ovary ») sont une lignée de cellules épithéliales issues d'ovaires de hamster de Chine qui n'expriment pas la protéine tau. Ces cellules sont maintenues dans du milieu F12 (21765-029, Gibco) agrémenté de 10% (v/v) de FBS (sérum fœtal bovin) (10500-064, Gibco) et d'1% (v/v) de L-glutamine (25030-024, Gibco) (concentration finale de 2 mM) et complété par des antibiotiques (15140-122, Gibco) (100 U de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine). Les cellules sont gardées dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> et sont passées une fois par semaine, lorsqu'elles atteignent 90 à 100% de confluence.

#### 3.1.4.2. Culture primaire de neurones corticaux murins

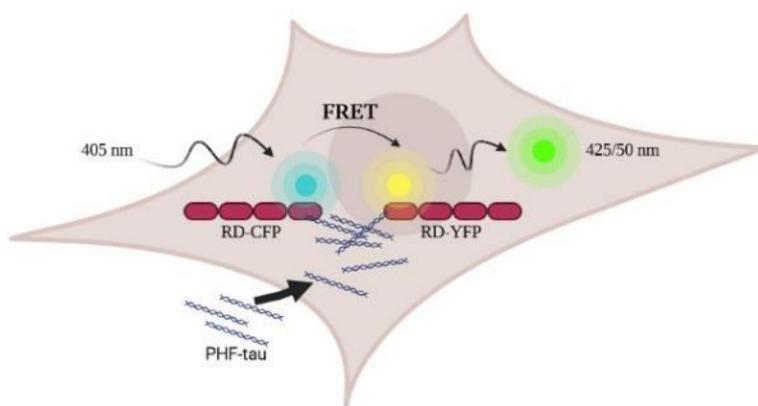
Les cultures primaires de neurones corticaux murins sont réalisées à partir d'embryons prélevés chez une souris au 18<sup>ième</sup> jour de gestation. La souris gestante est sacrifiée et le chapelet d'embryons est prélevé. Le placenta est ôté et chaque embryon est à son tour sacrifié avant de prélever stérilement les cortex qui sont d'abord placés dans un milieu D1 (NaCl 0,13 M ; KCl

5 mM ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 mM ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2 mM, sucrose 44 mM, glucose 33 mM ; Hepes 10 mM). Les méninges sont alors retirées des cortex et ceux-ci sont ensuite placés dans un milieu Neurobasal (21103-049, Gibco) enrichi avec 2% (v/v) de B27 (17504-044, Gibco) et 0,5 mM de Glutamax (35050-061, Gibco), qui contient des dipeptides de L-alanyl-L-glutamine. Ce milieu favorise la survie des cellules neuronales. Des antibiotiques (15140-122, Gibco) sont également ajoutés au milieu (140 U de pénicilline et 140  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de streptomycine). Les cortex sont homogénéisés à l'aide de pipettes en verre rodées afin de dissocier les cellules, qui sont comptées en utilisant une cellule de Neubauer. Les cellules sont remises en suspension à une concentration de 400 000 à 600 000 cellules par millilitre dans des plaques de culture cellulaire multipuits préalablement recouvertes de poly-L-Lysine (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (P1399, Sigma). Les cultures sont maintenues dans un incubateur à 37°C et 5% de  $\text{CO}_2$ . Après trois ou quatre jours de culture, la moitié du milieu est changé. Ensuite, le milieu est changé tous les trois jours. Les cultures primaires de neurones peuvent ainsi être maintenues environ deux semaines.

### 3.1.4.3. Culture de cellules FRET

La capacité de nucléation (« seeding ») des PHF-tau humains, a été évaluée, *in vitro*, en utilisant des cellules « FRET » (Tau RD P301S FRET Biosensor (ATCC CRL-3275)).

Le principe de la méthode est basé sur le système « FRET » qui utilise le transfert d'énergie par résonance de fluorescence. Des cellules monoclonales HEK 293T qui expriment de manière stable les domaines répétitifs de liaison aux microtubules de la protéine tau portant la mutation P301S fusionnés à des molécules fluorescentes CFP (RD-CFP) ou YFP (RD-YFP) produisent un signal FRET lorsque ces protéines RD-CFP et RD-YFP s'agrègent après que les cellules ont internalisés des protéines ayant des capacités de nucléation (Furman et al., 2015). Ces protéines sont appelées « seeds » en anglais et correspondent aux PHF-tau dans nos expériences. Lorsque les PHF-tau sont internalisés par la cellule, les protéines tau exprimées (RD-CFP et RD-YFP) dans celle-ci sont « recrutées » par les PHF-tau, les protéines RD-CFP et RD-YFP sont dès lors assez proches pour permettre à la molécule fluorescente CFP, lorsqu'elle est excitée à une longueur d'onde de 405 nm, de transférer son énergie à la molécule fluorescente YFP qui se met alors à émettre une fluorescence verte (425/50 nm). Les PHF-tau ont donc la capacité d'agréger les protéines tau endogènes, le phénomène étant mis en évidence par la fluorescence verte comme décrit précédemment (**Fig. 18**).



**Fig. 18 :** Représentation du système FRET utilisé dans des cellules HEK 293T. Explications dans le texte. Image créée avec BioRender.com.

Les cellules FRET ont été mises en culture à une densité de 400 000 cellules par puits d'une plaque six puits. 18 heures plus tard, les cellules ont été transfectées avec des liposomes qui contiennent des fractions sarkosyl provenant de cerveaux humains sains (CTL) ou atteints de la MA (AD) à une concentration de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . La formation des liposomes est rendue possible grâce à l'ajout d'un réactif de transfection (X-tremeGENE HP, Roche). La

préparation des liposomes est réalisée dans du milieu Opti-MEM (Thermo Fisher) et est laissée pendant 20 minutes à température ambiante (pour permettre la formation des liposomes) avant d'être ajoutée dans le milieu de culture des cellules (Milieu DMEM (41965-039, Gibco) ; 10% (v/v) FBS (Gibco) ; 1% (v/v) Glutamax (Gibco) ; 1% (v/v) Pen Strep (Gibco) (100 U de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine)). Les cellules sont observées 24 heures après la transfection au microscope à fluorescence (Zeiss Axioplan).

### 3.1.5. Souris transgéniques

Les souris ont été maintenues sur un cycle de lumière/obscurité de 12 heures avec nourriture et eau *ad libitum*. Toutes les études ont été réalisées en conformité et après approbation du comité d'éthique pour le bien-être et l'utilisation des animaux de laboratoire de la faculté de médecine de l'Université Libre de Bruxelles (numéros d'autorisation 682N et 599N).

Les modèles transgéniques utilisés sont décrits ci-dessous et listés dans un tableau récapitulatif (**tableau 3**). La présence (ou l'absence) de pathologies amyloïde et tau dans l'hippocampe de ces souris peut être visualisé dans les figures supplémentaires 1 (**Fig. Sup. 1**) et 2 (**Fig. Sup. 2**) respectivement.

Les différentes lignées murines sont toutes maintenues sur un fond génétique C57BL/6.

Modèle murin	"Tau"			"Amyloïde"	"Tau et Amyloïde"
	<b>hTau</b>	<b>Tg22/Tg30</b>	<b>TauKO</b>	<b>5xFAD</b>	<b>5xFAD Tg30</b>
	Tau humain	Tau humain muté	Pas d'expression de Tau	Amyloïde humaine pathologique	Amyloïde et Tau humaines pathologiques
Expression Tau murin	X	V	X	X	V
Expression Tau humain	V 6 isoformes WT	V 1 isoforme mutée (1N4R)	X	X	V
Expression Amyloïde humaine	X	X	X	V	V
Mutation(s)	X	V MAPT (P301S, G272V)	X	V APP (KM670/671NL, I716V, V717I) ; PSEN1 (M146L, L286V)	V Identiques MAPT, APP et PSEN1 décrites ci-avant
Phénotype	-	DNF	-	Plaques amyloïdes	Plaques amyloïdes et DNF
Origine	Peter Davies ( <i>Albert Einstein College of Medicine</i> ) - Karen Duff ( <i>Nathan Kline Institute</i> ) *	Luc Buée ( <i>Université de Lille</i> )	Kerry Tucker ( <i>Ruprecht Karls University of Heidelberg</i> ) *	Robert Vassar ( <i>Northwestern University</i> ) *	Souris générées au sein du laboratoire d'histologie (JP Brion)
Référence	<i>Andorfer et al., 2003</i>	<i>Schindowski et al., 2006 / Leroy et al., 2007</i>	<i>Tucker et al., 2001</i>	<i>Oakley et al., 2006</i>	<i>Héraud et al., 2014</i>

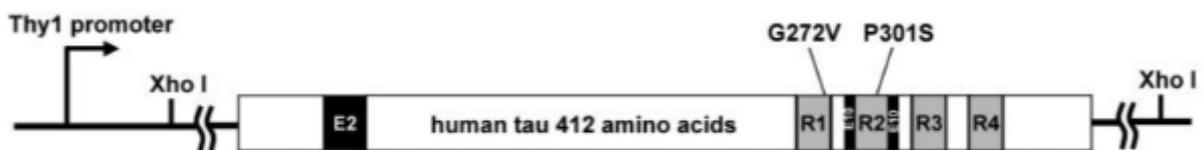
\* Chercheurs donateurs. Ces lignées de souris sont disponibles auprès du laboratoire Jackson (Bar Harbor, ME USA).

**Tableau 3 :** Tableau récapitulatif des modèles murins utilisés dans le projet de recherche et leurs caractéristiques principales.

#### 3.1.5.1. Tg22 et Tg30 : Lignées de souris exprimant une isoforme de la protéine tau humaine mutée

Les souris Tg22 et Tg30, également connues sous le nom de « THY-Tau22 » (Schindowski et al., 2006) et « Tg30tau » (Leroy et al., 2007a) respectivement, expriment l'isoforme 1N4R de la protéine tau humaine mutée aux positions G272V et P301S, sous le contrôle du promoteur Thy1.2 (**Fig. 19**). Ce dernier conduit à l'expression du transgène exclusivement dans les neurones, à partir du 6<sup>ème</sup> jour de vie post-natale. Les souris expriment aussi les protéines tau murines. La différence entre les deux modèles murins se situe dans le nombre de copies et les positions d'intégration du transgène dans le génome murin. Les souris

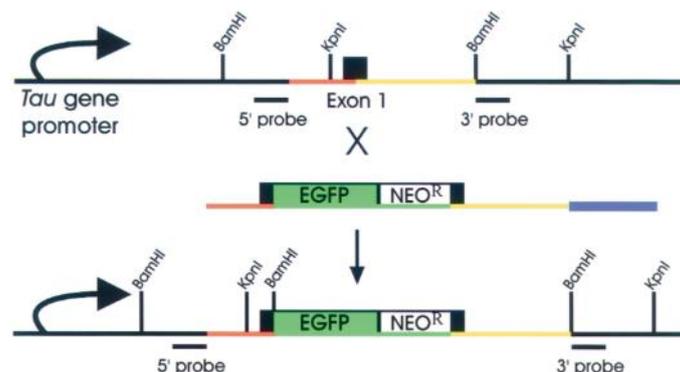
Tg30 montrent notamment une expression plus importante du transgène dans la moëlle épinière par rapport aux souris Tg22. Seules les souris hétérozygotes pour l'expression de la protéine tau humaine ont été utilisées dans le projet de recherche. Les mutations G272V et P301S ont été décrites dans des formes familiales de démence fronto-temporale avec syndrome Parkinsonien lié au chromosome 17 (FTDP-17) (cf. [1.1.3.1.3. Tauopathies]) et se situent dans le premier et le second domaine de liaison aux microtubules de la protéine tau respectivement. Ces mutations diminuent la capacité de tau à se fixer aux microtubules et lui confère des propriétés pro-agrégantes. L'analyse histologique du cerveau montre une hyperphosphorylation de tau sur des épitopes impliqués dans la maladie d'Alzheimer (AT8, AT180, ...) et des dégénérescences fibrillaires mises en évidence par l'anticorps MC1 et la coloration Gallyas. Ces lésions apparaissent entre 3 et 6 mois d'âge dans le cortex et l'hippocampe et s'aggravent avec le temps. Le phénotype des souris Tg30 montre d'importants troubles moteurs qui évoluent vers une atrophie puis une paralysie des membres postérieurs. Les souris Tg30 ont une survie moindre que les souris Tg22 à cause de ces troubles moteurs que les souris Tg22 ne présentent pas. On pourrait reprocher à ce modèle murin d'être un modèle de tauopathie telle que la FTDP-17 plutôt qu'un modèle AD. Néanmoins, la pathologie tau développée par ces souris est proche de celle observée dans la MA. De plus, à ce jour, aucune mutation n'a été découverte dans le gène MAPT dans la MA, il est donc impossible de créer un modèle murin qui reproduirait la pathologie tau de la MA à partir de mutations.



**Fig. 19 :** Construction du transgène exprimé par les souris Tg22 et Tg30 (Schindowski et al., 2006).

### 3.1.5.2. TauKO : Lignée de souris n'exprimant aucune protéine tau

Les souris TauKO (Tucker et al., 2001) n'expriment aucune protéine tau, excepté un fragment contenant les 31 premiers acides aminés et fusionné à une protéine EGFP. En effet, une cassette encodant la protéine EGFP couplée au gène de résistance à la néomycine a été intégrée dans l'exon 1 du gène tau murin (Mapt) (**Fig. 20**).



**Fig. 20 :** Construction du transgène exprimé par les souris TauKO (Tucker et al., 2001).

Ces souris ne montrent pas de phénotype particulier et la morphologie du SNC et du SNP est normale. Les souris homozygotes ont été utilisées dans ce projet de recherche. D'autres protéines de liaison aux microtubules, les protéines MAP, et plus spécifiquement la protéine MAP1A, permettrait de compenser l'absence de tau, surtout lors de l'embryogenèse (Harada et al., 1994, Dawson et al., 2001).

### ***3.1.5.3. hTau : Lignée de souris exprimant les six isoformes de la protéine tau humaine sauvage***

Les souris expriment, à l'âge adulte, trois isoformes 4R de la protéine tau tandis que chez l'homme, on identifie six isoformes exprimées, trois isoformes 3R et trois isoformes 4R avec un ratio de 1:1. Le modèle murin hTau a été développé pour correspondre plus exactement à la réalité humaine. En effet, ces souris expriment un transgène tau humain sauvage qui permet l'expression des six isoformes en l'absence de l'expression des protéines tau murines. Brièvement, ces souris ont été générées en croisant deux lignées, la lignée 8c (Duff et al., 2000) qui surexprime, de manière hétérozygote, un transgène qui code pour la protéine tau humaine sauvage sous le contrôle du promoteur du gène tau et la lignée TauKO (Tucker et al., 2001) qui n'exprime aucune protéine tau. Les souris utilisées dans notre étude sont de génotype hTau<sup>+/-</sup> et tau murin<sup>-/-</sup>. Andorfer et son équipe (Andorfer et al., 2003, Andorfer et al., 2005) ont observé une accumulation anormale de protéines tau phosphorylées dans le corps cellulaire et les dendrites des neurones hippocampiques et corticaux à partir de trois mois d'âge et ils ont montré que cette accumulation augmente avec le vieillissement de la souris.

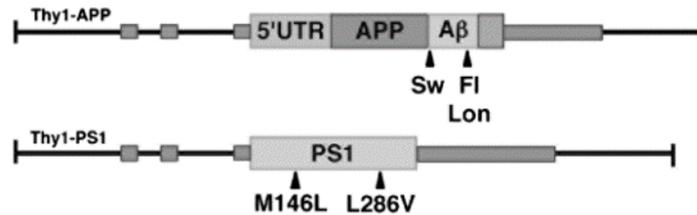
### ***3.1.5.4. 5xFAD : Lignée de souris exprimant les protéines APP et PS1 humaines mutées***

Les souris transgéniques 5xFAD (Oakley et al., 2006), aussi connues sous le nom de Tg6799, surexpriment les protéines  $\beta$ -amyloïdes 42 (A $\beta$ 42) et développent des plaques amyloïdes, similaires à celles observées dans la MA. Ces souris ont été générées à l'aide de deux transgènes, tous deux sous le contrôle du promoteur Thy-1 qui permet l'expression des protéines dans les neurones. Le premier transgène contient le gène APP qui porte les mutations « Swedish » (K670N/M671L), « Florida » (I716V), et « London » (V717I). Le second transgène contient le gène PS1 qui porte les mutations M146L et L286V (**Fig. 21**). Ces mutations ont été découvertes dans des formes familiales de la MA (« FAD » voulant dire « Familial Alzheimer's Disease ») (cf. [1.1.2.2.1.2. Mutations génétiques liées aux formes familiales]) et provoquent une augmentation de la production du peptide A $\beta$ 42, impliqué dans la formation de fibrilles insolubles, qui, en s'accumulant, forment les plaques amyloïdes, une des caractéristiques de la MA. Le peptide A $\beta$  provient du clivage protéolytique de l'APP, la protéine précurseur de l'amyloïde, par l'action de deux protéases, les  $\beta$ - et  $\gamma$ -sécrétases (cf. [1.1.3.2.1. Physiopathologie de la protéine amyloïde]). En conditions pathologiques, une majorité de peptides A $\beta$ 42 est produite, ceux-ci ayant une propension plus importante à former des fibrilles insolubles que les peptides A $\beta$ 40, formés en conditions physiologiques. La préséniline 1 ou PS1 est impliquée dans la régulation de l'activité du complexe enzymatique formant la  $\gamma$ -sécrétase. Les mutations de la PS1 conduisent également à une production accrue du peptide A $\beta$ 42.

Les souris 5xFAD développent très rapidement, à partir de deux mois d'âge, une pathologie amyloïde notamment dans le cortex et l'hippocampe, semblable à celle observée dans la MA. Le phénotype de ces souris comprend des plaques amyloïdes extracellulaires

composées de peptides Aβ42 agrégés, une gliose associée aux plaques amyloïdes, une neurodégénération et des troubles de la mémoire.

Les souris 5xFAD utilisées dans le présent projet sont hétérozygotes pour les deux transgènes (APP<sup>+/-</sup> et PS1<sup>+/-</sup>).



**Fig. 21 :** Construction des transgènes utilisés pour générer les souris 5xFAD (Oakley et al., 2006).

### 3.1.5.5. 5xFAD Tg30 : Lignée de souris exprimant les protéines APP, PS1 et tau humaines mutées

Les souris 5xFAD Tg30 (Héraud et al., 2014) ont été générées en croisant deux lignées préexistantes, les lignées 5xFAD (Oakley et al., 2006) et Tg30 (Schindowski et al., 2006, Leroy et al., 2007a) décrites ci-avant. Les souris 5xFAD Tg30 ont été obtenues en croisant des souris hétérozygotes 5xFAD avec des souris hétérozygotes Tg30.

Ce modèle a été créé pour produire et étudier de façon concomitante les deux lésions neuropathologiques typiques de la MA, les plaques séniles, composées de protéines amyloïdes et les DNF, composées de PHF-tau. En effet, les souris 5xFAD qui surexpriment les gènes APP et PS1 humains mutés développent des plaques amyloïdes en l’absence de DNF et inversement, les souris Tg30 qui expriment une protéine tau humaine mutée présentent des DNF en l’absence de plaques séniles.

Les souris 5xFAD Tg30 produisent des plaques amyloïdes mais dans une moindre quantité que celle observée chez les souris 5xFAD (**Tableau 4 et Fig. Sup. 1**). En revanche, la quantité de DNF est plus importante chez les souris 5xFAD Tg30 par rapport aux souris Tg30 (**Tableau 4 et Fig. Sup. 2**). La distribution neuroanatomique des protéines tau et amyloïde chez les souris 5xFAD Tg30 est similaire à celles observées chez les souris Tg30 et 5xFAD pour les protéines tau et amyloïde respectivement (**Fig. Sup. 1 et 2**). L’analyse du tau insoluble montre une augmentation de la phosphorylation et de la conformation pathologique de la protéine tau et le recrutement du tau murin est augmenté chez les souris 5xFAD Tg30 par rapport aux souris 5xFAD. Aussi, le déficit moteur est encore aggravé chez les souris 5xFAD Tg30 par rapport aux souris Tg30 (**Tableau 4**) et leur espérance de vie est également diminuée.

Characteristics of transgenic lines.

Transgenic line	Motor deficit	Hippocampal neuronal loss	NFT	Levels of insoluble tau	Misfolding of insoluble tau	Phosphorylation of insoluble tau	Truncation of insoluble tau	Phosphorylation of soluble tau	Insoluble murine tau	Amyloid pathology
Wild-type	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
5xFAD	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+++
Tg30	++	-	++	++	+	++	-	++	+	-
5xFAD × Tg30	+++	+	+++	+++	++	+++	+	+++	++	++

Behavioral and brain pathological features of transgenic lines. - : absent; + : moderate; ++ : important; +++ : very important.

**Tableau 4 :** Tableau récapitulatif des caractéristiques des lignées 5xFAD Tg30, Tg30 et 5xFAD observées au sein de notre laboratoire, dans l’étude de Héraud et al., 2014 (Héraud et al., 2014).

### **3.2. Méthodes**

#### **3.2.1. Préparation des fractions sarkosyl enrichies en PHF-tau humains insolubles**

La préparation des fractions sarkosyl est basée sur des protocoles déjà décrits dans la littérature scientifique (Ksiezak-Reding et al., 1990, Brion et al., 1991, Audouard et al., 2016).

Le fractionnement biochimique utilisé ici permet d'enrichir une fraction insoluble à un détergent, en l'occurrence le N-lauroyl-sarcosine de sodium ou sarkosyl (Sigma L-5750), à partir d'un homogénat cérébral *post-mortem*. Le sarkosyl solubilise les protéines natives dans le cerveau sans solubiliser les agrégats de protéines tels que les PHF-tau.

Un échantillon de cortex frontal humain, débarrassé des méninges, de la substance blanche et des vaisseaux sanguins visibles est homogénéisé dans un tampon H (EDTA 1mM ; Tris 10 mM (pH 7,4) ; sucrose 10% (m/v) ; NaCl 0,8 M) dont le volume ajouté correspond à 10 x le poids de l'échantillon cérébral (1g/10 ml). L'homogénéisation s'effectue à l'aide d'un broyeur de tissu de type Potter-Elvehjem (dont le principe est décrit dans la section [3.2.1.2.1. Préparation des homogénats tissulaires]). L'homogénat obtenu est ensuite centrifugé à 15 000x g pendant 20 minutes à 4°C.

Après la centrifugation, le sarkosyl (Sigma L-5750) est ajouté au surnageant pour obtenir une concentration finale de 1% (m/v) (10 mg/ml). Le tube contenant l'homogénat et le sarkosyl est ensuite placé sur un rotor qui est mis à tourner à une vitesse légère durant une nuit (O/N) en chambre froide à 4°C.

Le lendemain, l'homogénat est ultracentrifugé à 180 000x g pendant 30 minutes à 4°C.

Par la suite, le surnageant, qui correspond à la fraction sarkosyl soluble est retiré et le culot, qui équivaut à la fraction sarkosyl insoluble, est tout doucement lavé avec du PBS (AM9624, Invitrogen). Le culot est ensuite resuspendu dans du PBS (AM9624, Invitrogen) à raison de 0,25 ml de PBS par un gramme de tissu cérébral de départ.

Un dosage protéique (méthode de Bradford, Bio-Rad) de la fraction sarkosyl insoluble est réalisé et la concentration protéique est ajustée à 1 µg/µl (le plus souvent) en ajoutant du PBS (AM9624, Invitrogen), ce qui correspond à 3,5 mg de tissu cérébral de départ. La solution est ensuite aliquotée et conservée à -20°C. Une analyse biochimique de la fraction sarkosyl insoluble par western blotting est aussi réalisée en utilisant les anticorps B19 (tau total) et PHF-1 (pSer396/Ser404).

La présence des PHF-tau dans la fraction sarkosyl insoluble est vérifiée visuellement en microscopie électronique.

#### **3.2.2. Coloration négative des PHF-tau par microscopie électronique**

L'ultrastructure des PHF-tau (filaments) contenus dans la fraction sarkosyl insoluble a été caractérisée par microscopie électronique en transmission (TEM).

Le matériel à analyser est absorbé sur des grilles recouvertes de formvar et de carbone puis une coloration négative avec du phosphotungstate de potassium est effectuée (Brion et al., 1991) avant l'observation du matériel au microscope électronique (Zeiss EM 809T) à 80 kV.

La longueur moyenne des filaments de tau est estimée en mesurant  $\pm 200$  filaments à l'aide du logiciel ImageJ.

### **3.2.3. Tests de viabilité cellulaire/cytotoxicité sur des cellules traitées avec des PHF-tau humains**

La cytotoxicité des PHF-tau humains a été estimée en évaluant la viabilité de cellules en culture qui ont été traitées avec ces PHF-tau humains. Deux tests et deux types cellulaires ont été utilisés.

#### **3.2.3.1. Test MTT sur cellules CHO**

La viabilité des cellules CHO qui ont été traitées avec des PHF-tau humains a été évaluée à l'aide d'une solution de MTT (M2128, Sigma). Le bleu de thiazolyl tétrazolium ou MTT qui produit une solution de couleur jaune est converti en formazan de couleur bleu foncé par les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes.

Les cellules CHO ont étéensemencées à une concentration de 30 000 cellules par millilitre dans une plaque 96 puits. 24 heures après la mise en culture, une fraction sarkosyl qui contient les PHF-tau humains (AD) ou une fraction sarkosyl contrôle (CTL) qui n'en contient pas a été ajoutée dans le milieu de culture à une concentration de 10  $\mu\text{g/ml}$ . Les cellules ont été traitées pendant trois, six (temps courts), 24, 48 ou 72 heures (temps longs). Après le temps de traitement, la solution de MTT est ajoutée dans le milieu de culture pour obtenir une concentration finale d'un milligramme de MTT par millilitre. Les cellules sont incubées à 37°C pendant 30 minutes puis le milieu est aspiré des puits et 100  $\mu\text{l}$  de diméthylsulfoxyde (DMSO) sont ajoutés dans chaque puits de la plaque 96 puits. Le DMSO est utilisé pour solubiliser les cristaux de formazan qui sont insolubles dans l'eau. L'intensité de la coloration (densité optique) est mesurée grâce à un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 540 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules vivantes par rapport à des cellules non-traitées et qui représentent 100%.

#### **3.2.3.2. Test Calcéine-Propidium iodide sur neurones**

La viabilité des neurones qui ont été traités avec des PHF-tau humains a été évaluée à l'aide d'un kit (04511, Sigma) qui contient une solution de calcéine AM et une solution de propidium iodide qui colorent les cellules vivantes et mortes respectivement. Brièvement, la calcéine AM qui est hautement lipophile, traverse la membrane plasmique et, sous l'action de l'enzyme estérase dans une cellule vivante, va émettre une fluorescence verte. Le propidium iodide (PI), qui ne peut pas passer la membrane plasmique d'une cellule vivante, met en évidence le noyau des cellules mortes en s'intercalant dans l'ADN et en émettant une fluorescence rouge.

Les neurones, qui ont étéensemencés en plaque six puits, ont été, au 10<sup>ième</sup> jour qui suit la mise en culture, soit non traités, soit traités avec des PHF-tau humains, directement ajoutés dans le milieu de culture, à une concentration de 0,5 ou 10  $\mu\text{g/ml}$  pendant 24 heures.

Les neurones ont été ensuite rincés plusieurs fois avec du PBS (AM9624, Invitrogen) puis incubés avec les solutions de calcéine AM et de PI. Deux microlitres de la solution A et un microlitre de la solution B, contenues dans le kit, ont été mélangés dans un millilitre de PBS (AM9624, Invitrogen), puis, deux millilitres de milieu de culture ont été ajoutés à la solution. Les neurones ont été incubés avec un millilitre (par puits) de ce mélange pendant 15 minutes à

37°C puis les cellules mortes et vivantes ont été observées et comptées (dix champs par condition) au microscope inversé à fluorescence (Zeiss Axiovert). Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules vivantes par condition.

### 3.2.4. Géotypage

#### 3.2.4.1. Extraction de l'ADN

L'ADN est extrait d'un échantillon tissulaire de queue ou d'oreille de souris de  $\pm$  un mm<sup>3</sup> à l'aide du kit « KAPA express extract DNA extraction kit with PCR ready mix (Kapa biosystems, KK7152) ».

Brièvement, pour un échantillon de  $\pm$  un mm<sup>3</sup>, 2,5  $\mu$ l de « 10X KAPA Express Extract Buffer », 0,5  $\mu$ l de « 1U/ $\mu$ l KAPA Express Extract Enzyme » et 22  $\mu$ l d'eau distillée autoclavée sont mélangés (volume total de 25  $\mu$ l). L'échantillon est ensuite incubé dans un thermocycleur et subit un cycle de lyse à 75°C pendant 11 minutes suivi d'un cycle à 95°C pendant 5 minutes afin d'inactiver les protéases. L'échantillon peut être stocké à 10°C en attendant la procédure de PCR. Pour un stockage à moyen terme ( $\pm$  1 mois), les échantillons sont stockés à 4°C et pour un stockage à long terme, les échantillons sont stockés à -20°C.

Modèle murin	Gène amplifié	Séquence de l'amorce "sens" (5')	Séquence de l'amorce "anti-sens" (3')	Taille de l'amplicon	Fournisseur
Tg22/30	Tau humain	ATGGCTGAGCCCCGCCAGGAG	TGGAGGTTCCAGAGCTGGG	250 pb	Invitrogen (Thermo Fisher)
hTau-TauKO	Tau humain	CGAAGTGATGGAAGATCACG	GTCTTGGTGCATGGTGTAGC	79 pb	Invitrogen (Thermo Fisher)
	EGFP	TGCTCAGGTAGTGGTTGTCG	AAGTTCATCTGCACCACCG	270 pb	Invitrogen (Thermo Fisher)
	Tau murin	CCAGTTGTGTATGTCCACCC	CTCAGCATCCCACCTGTAAC	187 pb	Invitrogen (Thermo Fisher)
5xFAD	APP humain	AGAGTACCAACTGCATGACTACG	ATGCTGGATAACTGCCTTCTATC	560 pb	Invitrogen (Thermo Fisher)

**Tableau 5 :** Liste des amorces utilisées en PCR, pour le géotypage des souris transgéniques.

#### 3.2.4.2. Amplification de l'ADN par PCR

L'ADN est amplifié à l'aide du kit « KAPA Taq EXtra HotStart ReadyMix (Kapa biosystems, KK3605) ».

Pour un échantillon d'ADN d'un  $\mu$ l, un  $\mu$ l (contenant 250 pmol) de chaque amorce (sens et anti-sens) ciblant le gène d'intérêt (**Tableau 5**) et un  $\mu$ l (contenant 250 pmol) de chaque amorce (sens et anti-sens) ciblant un gène de référence (qui servira de contrôle positif) sont ajoutés dans une solution de 10  $\mu$ l de « Ready Mix » et de l'eau distillée autoclavée vient compléter la solution pour obtenir un volume final de 20  $\mu$ l. Le « Ready Mix » contient notamment une ADN polymérase, des nucléotides (dNTP) et du chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>) nécessaires à la réplication des fragments d'ADN d'intérêts. Le « mix » contient également deux colorants qui permettent de charger directement les produits de PCR sur des gels d'agarose sans ajouter une solution de « loading buffer ». Ces colorants permettent de visualiser la migration de l'ADN pendant l'électrophorèse.

Les échantillons sont ensuite placés dans un thermocycleur et subissent des cycles successifs de dénaturation, d'hybridation et d'élongation selon un protocole établi pour chaque gène d'intérêt à amplifier (**Tableau 6**).

Gènes Tau humain				Gène Tau murin			
Étape	T°(°C)	Temps (sec.)	Nb de cycles	Étape	T°(°C)	Temps (sec.)	Nb de cycles
Dénaturation initiale	95	180	1	Dénaturation initiale	95	180	1
Dénaturation	95	20	35	Dénaturation	95	20	35
Hybridation	60	20	35	Hybridation	60	20	35
Elongation	72	30	35	Elongation	72	30	35
Elongation finale	72	60	1	Elongation finale	72	60	1
Gène EGFP				Gène APP humain			
Étape	T°(°C)	Temps (sec.)	Nb de cycles	Étape	T°(°C)	Temps (sec.)	Nb de cycles
Dénaturation initiale	95	180	1	Dénaturation initiale	95	120	1
Dénaturation	95	20	35	Dénaturation	95	20	30
Hybridation	62	20	35	Hybridation	55	20	30
Elongation	72	30	35	Elongation	72	30	30
Elongation finale	72	60	1	Elongation finale	72	60	1

**Tableau 6 :** Descriptif des cycles de PCR pour chaque gène d'intérêt, utilisé pour le génotypage des différents modèles murins.

### 3.2.4.3. Migration de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose

Un gel d'agarose 2,5% est préparé en diluant 2,5 grammes d'agarose (Eurogentec) dans 100 ml de Tampon TAE (Tris 4 mM ; EDTA (pH 8) 1 mM ; acide acétique 0,1% (v/v)). La solution est chauffée au micro-ondes (350 W, 4 min.) puis versée dans un portoir avec 0,01% (v/v) (10 µl) d'un intercalant de l'ADN (RotiGelStain, 3865.2, Roth) et les peignes sont ajoutés.

Lorsque le gel a figé, il est déposé avec le portoir dans une cuve de migration, remplie de tampon TAE (Tris 4 mM ; EDTA (pH 8) 1 mM ; acide acétique 0,1% (v/v)). 20 µl de chaque produit PCR sont déposés dans un puits du gel et 10 µl d'un marqueur de bandes (SmartLadder SF MW-1800-04, Eurogentec) sont également ajoutés. La migration est effectuée à 120 volts pendant 15 minutes.

### 3.2.4.4. Révélation de l'ADN

L'ADN ayant migré dans le gel d'agarose est visualisé grâce à un intercalant (RotiGelStain, 3865.2, Roth) précédemment ajouté dans le gel d'agarose et qui, exposé aux UV (Vilber Lourmat), donne un signal fluorescent. La taille des bandes des échantillons est alors comparée au marqueur de bandes (SmartLadder SF MW-1800-04, Eurogentec) pour s'assurer que la taille des amplicons soit celle attendue (**Tableau 5**).

### 3.2.5. Anesthésie préopératoire des souris

En vue des injections intracérébrales (stéréotaxiques), décrites plus loin, les souris sont préalablement anesthésiées avec **5%** de xylazine (Rompun 2%, Bayer) et **10%** de kétamine (Nimatek 10%) dilués dans du sérum physiologique (B. Braun Vet Care Ringer Lactate Hartmann sol). 100 µl de la solution d'anesthésiques/10 g de poids corporel sont injectés en IP (intrapéritonéal).

La dose finale d'anesthésiques est de **10 mg/kg de xylazine et de 100 mg/kg de kétamine**.

En ce qui concerne les injections IV et IO décrites ci-après, les souris sont préalablement anesthésiées avec **5%** de xylazine (Rompun 2%, Bayer) et **7,5%** de kétamine (Nimatek 10%) dilués dans du sérum physiologique (B. Braun Vet Care Ringer Lactate Hartmann sol). 100 µl de la solution d'anesthésiques/10 g de poids corporel sont injectés en IP (intrapéritonéal).

La dose finale d'anesthésiques est de **10 mg/kg de xylazine et de 75 mg/kg de kétamine**.

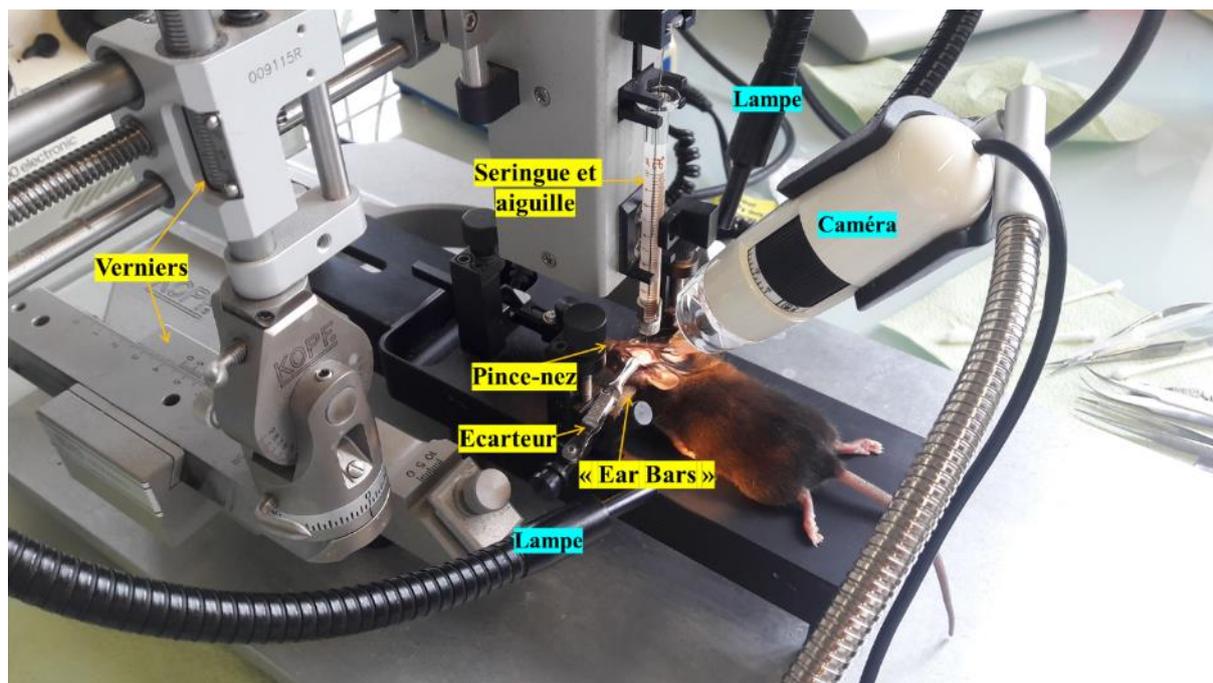
L'état de conscience de l'animal est évalué en lui pinçant modérément la plante du pied pour rechercher l'absence de réponse à ce stimulus nociceptif. Lorsque l'animal est profondément endormi, on peut procéder à l'injection.

L'anesthésie générale conduit à une hypothermie. Il faut donc veiller à réchauffer les souris afin de maintenir une bonne température corporelle (ex. : tapis chauffant). La température ambiante de la pièce joue également un rôle dans la prévention d'une trop forte hypothermie.

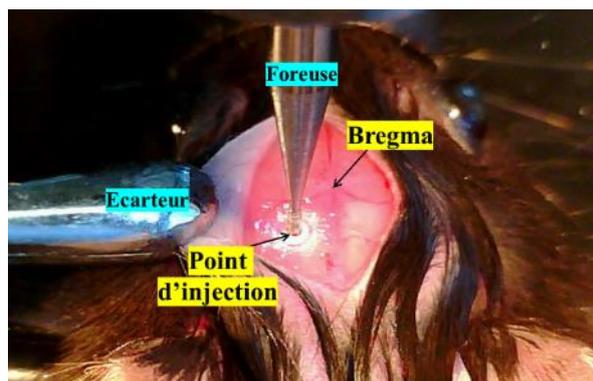
### **3.2.6. Injection intracérébrale (stéréotaxique)**

La stéréotaxie est une technique neurochirurgicale qui permet de cibler avec précision une zone cérébrale grâce à des coordonnées en trois dimensions (X, Y et Z) et d'y accéder pour procéder, par exemple, à une injection, comme réalisée dans notre étude.

Lorsque la souris est profondément endormie, à la suite de l'anesthésie générale détaillée au paragraphe [3.2.5.], la souris est placée sur un appareil de stéréotaxie (Kopf Instruments (Tunjunda, Californie, Etats-Unis)) et fixée à l'aide d'un « **pince-nez** ». Brièvement, la langue est poussée hors de la bouche (à gauche) et le pince-nez est inséré, en plaçant les incisives supérieures dans les trous prévus. Une vis permet ensuite de serrer le pince-nez afin de maintenir le nez en place (en évitant tout de même d'appliquer trop de pression sur celui-ci). De plus, la tête de la souris est maintenue fermement grâce à deux barres (« **ear bars** »), qui sont perpendiculaires au corps de la souris et positionnées sur le crâne, en avant des conduits auditifs. La peau du crâne est désinfectée avec de l'isopropanol 70%, ce qui permet également de regrouper les poils. Une incision au milieu de la peau du crâne est ensuite pratiquée dans l'axe longitudinal à l'aide d'un scalpel sur  $\pm 1,5$  cm. Des **écarteurs** sont placés pour maintenir la peau de part et d'autre de l'os du crâne, qui est maintenant visible (**Fig. 22**).



**Fig. 22 :** Appareil de stéréotaxie et souris recevant une injection. Les annotations sont expliquées dans le texte (mots en gras).



**Fig. 23 :** Illustrations du bregma et du point d'injection. Explications dans le texte.

Les coordonnées du **bregma**, qui correspond au point d'intersection des sutures sagittale et coronale du crâne murin et situé  $\pm$  au centre de l'os, sont prises pour chaque souris à l'aide des **verniers** présents sur l'appareil de stéréotaxie. Le bregma est considéré comme le point de référence, de coordonnées (0:0:0), dans les atlas du cerveau murin en coordonnées stéréotaxiques (Franklin and Paxinos, 2008).

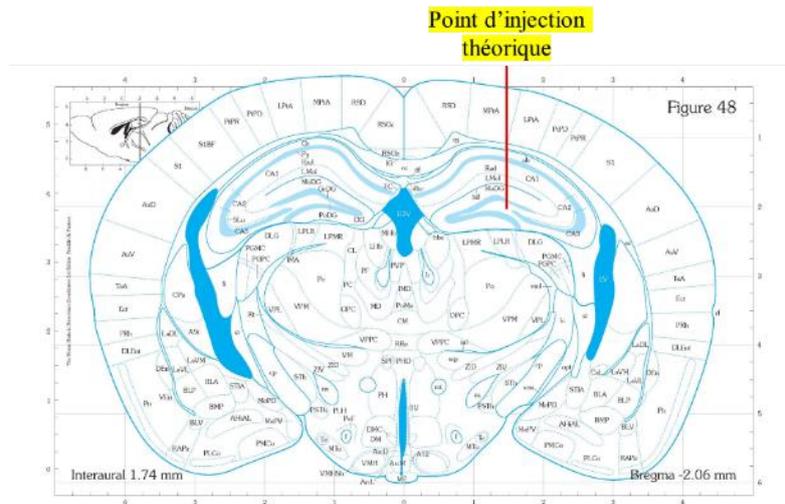
Les coordonnées stéréotaxiques d'une région cérébrale sont ainsi déterminées à partir du bregma (**Tableau 7**). La position du **point d'injection** (**Fig. 24**) est alors calculée et l'os

du crâne est ensuite percé à l'aide d'une **foreuse** (Foredom, Bethel, CT 06801/USA) (**Fig. 23**). L'injection du matériel d'intérêt (1  $\mu$ g de fraction sarkosyl AD ou CTL) est ensuite réalisée avec une **microseringue** Hamilton 10  $\mu$ l (HAM7635-01-1EA) et une **aiguille** Hamilton de 33G (7803-05 HAM RN Needle) à une vitesse de 100 nl/min pour un volume total injecté d'un microlitre et d'une durée totale d'injection de 10 minutes grâce à une pompe à seringue (KD Scientific Legato, 78-8130) (**Fig. 22**). L'ensemble des procédures est visualisée de manière adéquate à l'aide d'une caméra (Dino-Lite).

<i>Coordonnées Atlas :</i>	<b>Latéral</b>	<b>Rostro-caudal</b>	<b>Profondeur</b>
<b>Hile du gyrus denté de l'hippocampe gauche</b>	+ 1,5 mm	- 2,1 mm	- 2 mm
<b>Cortex somatosensoriel primaire gauche</b>	+ 0,15 mm	- 1,46 mm	- 0,10 mm

**Tableau 7 :** Coordonnées stéréotaxiques de deux régions cérébrales utilisées dans le projet de recherche pour des injections.

L'aiguille est ensuite lentement retirée et la peau du crâne de la souris est suturée (fil SMI 8151512) avec trois points simples de trois nœuds. La souris est remise dans sa cage pour se rétablir et surveillée jusqu'à son sacrifice. Un anti-inflammatoire non-stéroïdien (carprofène, Rimadyl) peut être administré en IP si la souris présente des signes de souffrance post-injection.

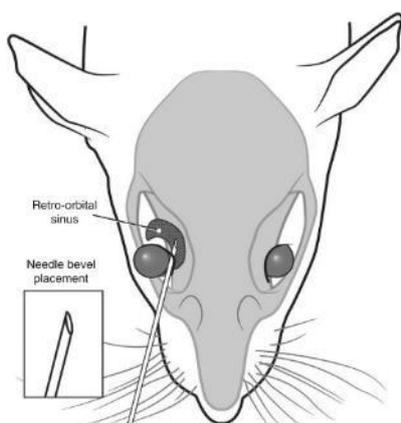


**Fig. 24 :** Point d'injection théorique pour le hile du gyrus denté de l'hippocampe selon les coordonnées stéréotaxiques (The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (Franklin and Paxinos, 2008)).

### 3.2.7. Injections périphériques

#### 3.2.7.1. Injection intravasculaire (rétro-orbitaire)

Après l'anesthésie générale, les souris ont été injectées en IV (intravasculaire), dans le plexus veineux sous-orbitaire, avec 10 µg de fraction sarkosyl isolée d'un cerveau humain atteint de la MA (AD) ou d'un cerveau humain sain (CTL) dilués dans du sérum physiologique (B. Braun Vet Care Ringer Lactate Hartmann sol) pour un volume total de 100 µl. L'injection a été réalisée à l'aide d'une aiguille biseautée d'une gauge de 27 (27G).



**Fig. 25 :** Injection intraveineuse (rétro-orbitaire) (Yardeni et al., 2011).

Pour procéder à l'injection, écarter délicatement les tissus qui entourent l'œil afin de le faire ressortir très légèrement. L'aiguille est alors introduite, biseau vers le bas, dans le canthus médial (commisure de l'œil se trouvant du côté du nez) avec un angle de 30°. L'aiguille suit le bord du globe oculaire jusqu'à ce que la pointe de celle-ci touche l'os sphénoïde (os de la cavité orbitaire), on procède ensuite lentement à l'injection. Lorsque l'injection est terminée, l'aiguille est doucement retirée. Ainsi procédé, il n'y a que peu ou pas de saignement (**Fig. 25**) (Yardeni et al., 2011).

La souris est ensuite replacée dans sa cage pour se rétablir. L'état de l'œil et l'état général de la souris sont par la suite surveillés jusqu'à ce qu'elle soit sacrifiée.

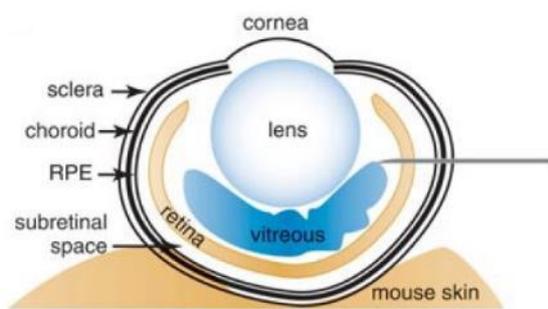
### 3.2.7.2. Injection intraoculaire (intravitréenne)

Après l'anesthésie générale et avant l'injection, une goutte d'anesthésique local (oxybuprocaine chlorhydrate 0,4% (4 mg/ml) (Unicaïne, Théa)) est appliqué sur l'œil de la souris, ce qui permet une analgésie supplémentaire pendant et après la procédure.

Les souris ont été injectées en IO (intraoculaire), dans l'humeur vitrée de la chambre postérieure de l'œil, avec deux microgrammes de fraction sarkosyl isolée d'un cerveau humain atteint de la MA (AD) ou avec un microgramme de fraction sarkosyl isolée d'un cerveau humain sain (CTL) dans un volume total d'un microlitre.

Pour la validation de la méthode d'injection et pour visualiser la toxine du choléra le long du système visuel comme décrit précédemment dans la littérature (Angelucci et al., 1996), une solution d'1 µl contenant 2 µg de la sous-unité B de la toxine du choléra (ThermoFisher) a été injectée dans la chambre postérieure de l'œil de souris WT.

L'injection intraoculaire a été réalisée, sous un stéréomicroscope, à l'aide d'une aiguille biseautée de 33G (7803-05 HAM RN Needle) et d'une microsiringue Hamilton de cinq microlitres (7634-01, Model 75 RN, Hamilton).



**Fig. 26 : Injection intraoculaire (intravitréenne)** (Venkatesh et al., 2013).

L'œil est légèrement sorti de son orbite en repoussant la peau autour de l'œil. Le globe oculaire est ainsi maintenu en dehors de son orbite en poussant la peau autour de l'œil avec le pouce et l'index. L'aiguille est insérée, biseau vers le haut, dans l'humeur vitrée, sous la rétine, de manière perpendiculaire à la sclère (de manière parallèle par rapport à la cornée et à la paupière inférieure). L'aiguille est légèrement repoussée par la pression intraoculaire. Le matériel est injecté lentement dans l'œil puis l'aiguille est retirée délicatement (**Fig. 26**) (Venkatesh et al., 2013).

La souris est ensuite replacée dans sa cage pour se rétablir. L'état de l'œil et l'état général de la souris sont par la suite surveillés jusqu'à ce qu'elle soit sacrifiée.

### 3.2.8. Sacrifice et dissection des souris injectées

Les souris injectées en IC ou en IO ont été sacrifiées par dislocation cervicale et disséquées afin de prélever les cerveaux, et, pour les souris injectées en IO, les yeux ont également été prélevés.

Les souris injectées en IV ont, quant à elles, été anesthésiées, avant sacrifice, avec 5% de xylazine (Rompun 2%, Bayer) et 7,5% de kétamine (Nimatek 10%) dilués dans du sérum physiologique (B. Braun Vet Care Ringer Lactate Hartmann sol), injectés en IP (100 µl de la solution d'anesthésiques/10 g de poids corporel ; dose finale d'anesthésiques : 10 mg/kg de xylazine et 75 mg/kg de kétamine). Lorsque les souris étaient profondément endormies, le sang a été récupéré par une ponction intracardiaque. Celle-ci a été réalisée à l'aide d'une aiguille biseautée de 23G (Terumo Neolus Needle) (ayant un diamètre assez large pour éviter l'hémolyse des GR) et d'une seringue d'un millilitre. L'aiguille, biseau orienté vers le haut, est

insérée dans le cœur, parallèlement à celui-ci, à travers le diaphragme ou perpendiculairement au cœur, à travers les côtes. Environ la moitié du volume total sanguin peut être prélevé par ponction intracardiaque, soit, pour une souris de 25 g, cela correspond à  $\pm$  un millilitre de sang.

Après la ponction, l'aiguille est retirée de la seringue (pour éviter à nouveau un maximum l'hémolyse des globules rouges) et le sang est transféré dans un Eppendorf. Le sang est laissé à coaguler (10 min. à RT) puis est centrifugé pendant 10 minutes à 1000x g à RT. Le sérum, qui correspond au surnageant dans le tube, est récolté et placé dans un nouvel Eppendorf puis stocké à -20°C.

La souris est sacrifiée par dislocation cervicale directement après la ponction intracardiaque et le cerveau est ensuite prélevé.

Pour les analyses histologiques, les cerveaux et les yeux sont fixés dans un volume de formol (Merck) 10% (formaldéhyde 3,7%), correspondant à dix fois le volume de l'échantillon, pendant 24 heures à RT (température ambiante). Les échantillons sont ensuite rincés à l'eau de ville pendant deux heures et placés dans de l'isopropanol 70%. Les échantillons sont ensuite placés dans un Histokinet (Thermo Scientific Microm STP 120 Spin Tissue Processor) avec un cycle standard de 18h. Les échantillons sont ainsi déshydratés à l'aide de bains d'alcools de concentration croissante (isopropanol (IPA) 70% [2 x 1h30] ; IPA 90% [2 x 1h30] et IPA 100% [3 x 1h] et de bains de toluène [3 x 1h] avant d'être imprégnés de paraffine liquide (Paraplast Plus, 39602004, Leica) à 60°C [4 x 1h30]. Les échantillons sont ensuite inclus dans un bloc de paraffine à l'aide d'une console d'enrobage des tissus (Tissue-Tek, TEC 5, Sakura).

Les prélèvements en paraffine sont coupés à l'aide d'un microtome à glissière (Reichert, Vienne, Autriche) à une épaisseur de sept microns et les coupes sont déposées sur des lames porte-objet adhérentes SuperFrost Plus (J1800AMNZ, EpreDia).

Pour les analyses biochimiques, les cerveaux et les yeux ont été plongés, directement après dissection, dans de l'azote liquide ou de l'isopentane (Sigma) puis stockés à -80°C.

### **3.2.9. Immunohistochimie**

Les techniques d'immunomarquages permettent de mettre en évidence des protéines d'intérêt grâce à des anticorps qui reconnaissent de manière spécifique ces protéines.

Avant de procéder à une coloration ou à un immunomarquage, les coupes histologiques sont déparaffinées grâce à deux bains de toluène [5 min./bain] suivis de deux bains d'isopropanol 100% [2 min./bain]. Les coupes destinées à un immunomarquage des protéines amyloïdes sont également, à la suite des bains d'isopropanol 100%, plongées dans un bain d'isopropanol 90% et un bain d'isopropanol 70% [2 min./bain] pour les réhydrater. Ces traitements sont nécessaires car les colorations ou les solutions utilisées pour réaliser un immunomarquage sont hydrophiles et la paraffine est hydrophobe. L'activité de la peroxydase endogène est ensuite inactivée à l'aide d'un bain de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0,3% dilué dans du méthanol [30 min.] car le protocole d'immunomarquage utilise cette enzyme peroxydase pour détecter les protéines d'intérêt. Les lames sont ensuite rincées dans de l'eau distillée [5 min.].

Selon l'anticorps primaire utilisé, un démasquage préalable des épitopes est parfois nécessaire. Pour ce faire, les lames sont immergées dans une solution de tampon citrate 0,01 M (acide citrique monohydraté 0,01 M ; citrate de Na dihydraté 0,01 M ; pH 6) et mises à chauffer

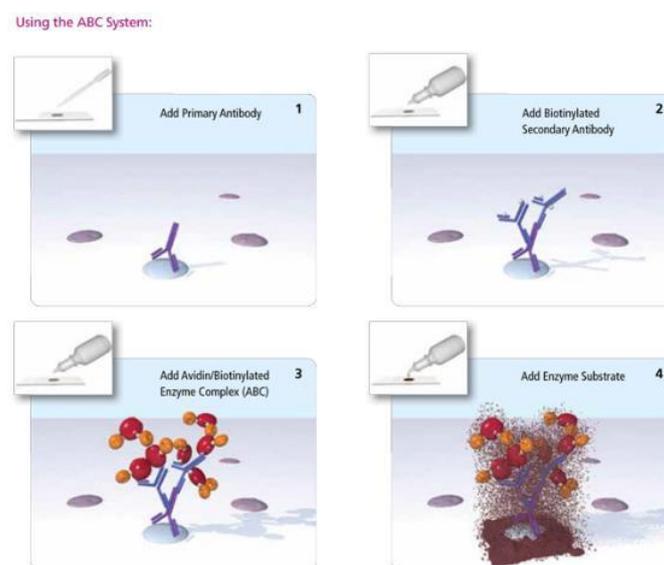
## Matériel et méthodes

dans une cocotte-minute pendant 20 minutes. Lorsque la solution a refroidi, les lames sont rincées rapidement dans de l'eau distillée puis dans du TBS (Tris 0,01 M ; NaCl 0,15 M ; pH 7,4) [10 min.]. En ce qui concerne la mise en évidence des peptides amyloïdes, les coupes sont immergées dans un bain d'acide formique 99% pendant 15 minutes puis rincées dans de l'eau distillée et du TBS comme décrit précédemment. Les coupes sont ensuite traitées avec un sérum 10%, dilué dans du TBS (Tris 0,01 M ; NaCl 0,15 M ; pH 7,4), de cheval (NHS) ou de chèvre (NGS) (Gibco), selon la nature (l'espèce) de l'anticorps secondaire pendant une heure. Cette étape est primordiale pour éviter des liaisons non-spécifiques de l'anticorps sur le tissu. Les coupes sont ensuite incubées toute la nuit (O/N) à température ambiante (RT) avec l'anticorps primaire dilué dans le même sérum utilisé à l'étape précédente mais à une concentration de 1%. Les différentes dilutions utilisées pour les anticorps primaires sont reprises dans le **tableau 1**.

Le lendemain, les coupes sont rincées trois fois dix minutes dans du TBS (Tris 0,01 M ; NaCl 0,15 M ; pH 7,4) puis incubées avec un anticorps secondaire couplé à des molécules de biotine et dilué à nouveau dans le même sérum 1% que précédemment pendant 30 minutes. Les coupes sont ensuite rincées trois fois dix minutes puis incubées pendant 20 minutes avec la solution ABC (Vectastain ABC Kit, PK-6100, Vector Labs) qui contient de l'avidine et de la peroxydase biotinylée. L'avidine est une glycoprotéine qui possède une forte affinité pour la biotine. Ce système permet une amplification du marquage à l'instar de l'utilisation de deux anticorps pour montrer la protéine d'intérêt (« méthode indirecte »).

Les coupes sont ensuite lavées trois fois dix minutes avec du TBS (Tris 0,01 M ; NaCl 0,15 M ; pH 7,4) puis le substrat de la peroxydase, la DAB (3,3' diaminobenzidine) (K3468, DAKO) est ajoutée. La peroxydase transforme la DAB en un précipité brun visible en microscopie optique. Cette réaction peut être suivie au microscope. Lorsque que le chromogène apparaît, la réaction est arrêtée en plongeant les lames dans de l'eau distillée (**Fig. 27**).

Une contre-coloration à l'hématoxyline (4302, Merck) est réalisée et les lames sont ensuite déshydratées à l'aide de bains d'isopropanol de concentration croissante (70%, 90% et 2 x 100%) et de trois bains de toluène [2 min./bain] puis les lames sont montées à l'aide du milieu de montage DPX (HX90969979, Merck).



**Fig. 27 :** Technique d'immunomarquage indirecte utilisant le kit ABC (<https://vectorlabs.com/vectastain-abc-kit-standard.html#description>).

### **3.2.10. Colorations de coupes histologiques**

#### **3.2.10.1. Hématoxyline**

L'hématoxyline est un colorant basique (acidophile) qui colore en bleu les composants cellulaires acides (basophiles) tels que l'ADN dans le noyau.

Les coupes utilisées dans le projet de recherche ont été contre-colorées à l'hématoxyline après les immunomarquages. Les coupes sont plongées  $\pm$  une minute dans une solution d'hématoxyline de Mayer. Le surplus de colorant est éliminé en rinçant les coupes avec de l'eau courante, laissée à couler le temps du lavage, pendant 10 minutes. Les lames sont ensuite transférées dans de l'eau distillée puis déshydratées et montées.

#### **3.2.10.2. Gallyas**

La coloration Gallyas est une méthode d'imprégnation argentique inventée par Gallyas (Gallyas, 1971). Elle permet notamment de mettre en évidence les agrégats de tau qui composent les DNF dans la maladie d'Alzheimer et a été utilisée par Braak (Braak and Braak, 1991) pour définir les stades de Braak qui décrivent la localisation des DNF dans le cerveau humain au fur et à mesure de l'avancement de la MA. La position des DNF est hautement corrélée avec les symptômes cliniques de la maladie. Après la coloration, les DNF apparaissent en noir sur les coupes histologiques.

Les coupes histologiques sont déparaffinées grâce à deux bains de toluène [5 min./bain] puis réhydratées à l'aide de bains d'isopropanol de concentration décroissante (2 x 100%, 90% et 70%), [2 min./bain]. Les coupes sont ensuite immergées dans une solution de permanganate de potassium ( $\text{KMnO}_4$ ) 0,3% pendant 10 minutes et sont ensuite lavées avec de l'eau de ville pendant cinq minutes puis avec de l'eau distillée pendant une minute. Les coupes sont alors blanchies avec une solution d'acide oxalique 1% [1 min.] puis lavées avec de l'eau de ville pendant cinq minutes suivies d'un lavage avec de l'eau distillée pendant une minute. Les coupes sont ensuite traitées avec une solution alcaline d'iodide d'argent ( $\text{NaOH}$  1 M ;  $\text{KI}$  0,6 M ; 3,5% (v/v)  $\text{AgNO}_3$  1%) pendant une minute et la réaction est neutralisée avec de l'acide acétique 0,5% [3 x 1 min.]. La coloration est révélée grâce à un développeur ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhydre 0,25 M ;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  13 mM ;  $\text{AgNO}_3$  6 mM ; acide tungstosilicique 2 mM ; 0,002% (v/v) formaldéhyde 40%) (préparé juste avant son utilisation) en sept à dix minutes et visualisée au microscope. Les coupes sont ensuite lavées avec de l'acide acétique 0,5% pendant trois minutes puis traitées avec du chlorure d'or 1% pendant cinq minutes. Après ce traitement, les coupes sont lavées avec de l'eau distillée [4 x 1 min.] et fixées à l'aide de thiosulfate de sodium 1% pendant cinq minutes puis lavées à nouveau avec de l'eau distillée [5 min.]. Les lames sont ensuite contre-colorées à l'hématoxyline (4302, Merck), puis déshydratées à l'aide de bains d'isopropanol de concentration croissante (70%, 90% et 2 x 100%) et de trois bains de toluène [2 min./bain] et enfin, les lames sont montées au DPX (HX90969979, Merck).

#### **3.2.10.3. Rouge Congo**

La coloration rouge Congo se dépose dans les feuillets  $\beta$  plissés qui composent la structure des plaques amyloïdes et des DNF dans la MA et qui apparaissent alors en rouge-orangé-rose à la lumière transmise et en vert à la lumière polarisée.

Dans ce projet de recherche, les coupes ont été contre-colorées au rouge Congo après un immunomarquage et une contre-coloration à l'hématoxyline.

Après le rinçage de l'hématoxyline à l'eau courante [10 min.], les coupes sont placées dans de l'eau distillée. Les coupes sont ensuite immergées dans une première solution saturée de NaCl dans de l'éthanol 80% et 0,01% (v/v) de NaOH 1% pendant 15 minutes. Les coupes sont ensuite contre-colorées dans une seconde solution saturée de Rouge Congo dans de l'éthanol 80% ; 0,0025% (v/v) de NaOH 1% et 0,01% (v/v) de la première solution, pendant 15 minutes. Les deux solutions ont été filtrées avant leur utilisation. Les coupes sont par après mises dans de l'eau distillée puis déshydratées rapidement dans un bain d'isopropanol 90% [10 sec.], deux bains d'isopropanol 100% [30 sec. et 2 min.] et trois bains de toluène [2 min./bain]. Finalement, les lames sont montées au DPX (HX90969979, Merck).

### **3.2.10.4. Thioflavine S**

La thioflavine S (ThS) est un fluorophore classiquement utilisé pour mettre en évidence les plaques  $\beta$ -amyloïdes et les DNF dans la MA. En présence d'agrégats protéiques (peptide A $\beta$  et tau), la fluorescence de la ThS augmente et les agrégats apparaissent colorés en vert au microscope à fluorescence.

Les coupes déparaffinées sont plongées dans une solution de Thioflavine S (T1892, Sigma) diluée à 0,0125% (m/v) dans de l'eau distillée, pendant huit minutes. Les coupes sont ensuite passées dans de l'éthanol 80% pendant une minute et rincées à l'eau distillée. Les coupes sont ensuite montées au Glycergel (C0563, DAKO).

### **3.2.10.5. DAPI**

Le DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) est un fluorophore qui se lie aux bases adénine et thymine de l'ADN, donnant une coloration bleue aux noyaux, visible au microscope à fluorescence.

Le DAPI a été utilisé ici en parallèle de la coloration à la Thioflavine S. Le DAPI (32670, Sigma), dilué 10 000x dans du TBS est laissé pendant 15 minutes sur les coupes.

## **3.2.11. Quantification de la pathologie tau sur coupes histologiques**

### **3.2.11.1. Quantification des pathologies tau et amyloïde et de la neuroinflammation dans l'hippocampe des souris injectées en IV**

Différents marqueurs de la MA ont été quantifiés dans le gyrus denté de l'hippocampe chez les souris ayant reçu une injection intravasculaire de fractions sarkosyl AD ou CTL. Les anticorps anti-GFAP et anti-Iba1 ont été utilisés pour évaluer la neuroinflammation, une expression augmentée des protéines GFAP et Iba1 mettant en évidence les astrocytes activés et les cellules microgliales activées respectivement. La pathologie amyloïde a été estimée en utilisant les anticorps anti-A $\beta$ 40 et anti-A $\beta$ 42 et à l'aide de la coloration des plaques amyloïdes avec la Thioflavine S. Les anticorps anti-tau pThr231, AT8 et MC1 ont été employés pour estimer la pathologie tau.

Des images, contenant l'entièreté du gyrus denté de l'hippocampe sur les coupes histologiques qui ont été marquées avec les différents anticorps ou colorées, ont été prises avec un objectif 2,5X, au microscope Axioplan (Carl Zeiss) équipé d'une caméra AxioCam Hrc et à l'aide du logiciel Axiovision (Carl Zeiss).

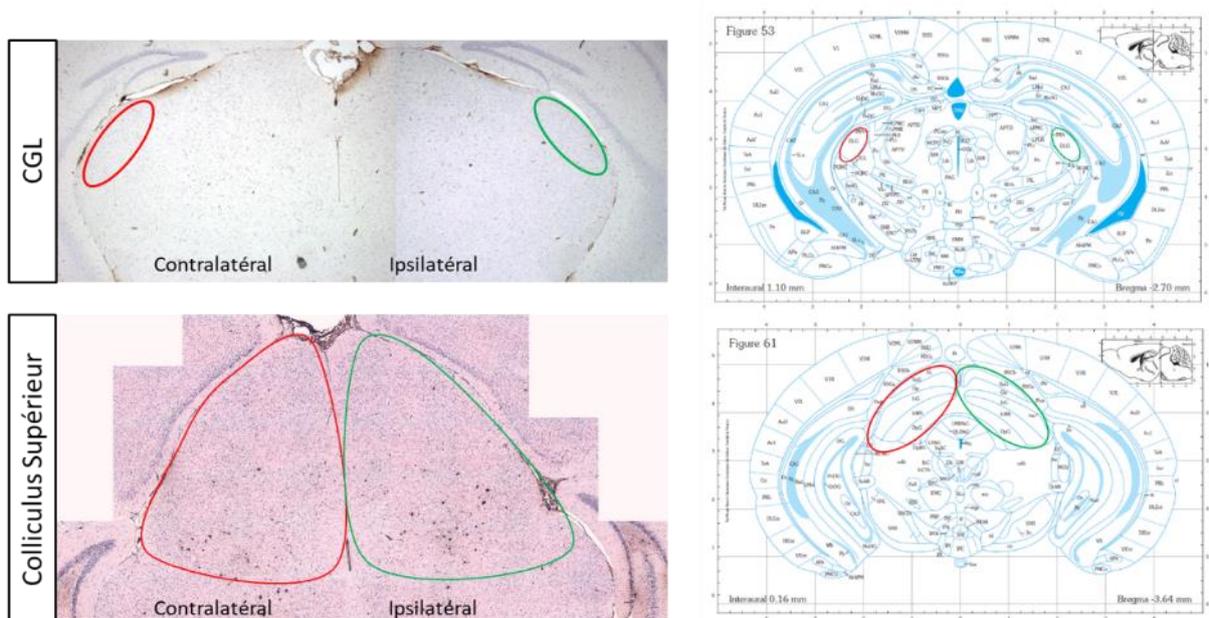
La surface totale du gyrus denté a été sélectionnée manuellement et mesurée à l'aide du logiciel ImageJ (NIH). Les zones marquées ou colorées dans le gyrus denté ont été quantifiées

en mesurant les pixels positifs après avoir déterminé un seuil de détection dans ce même logiciel (Héraud et al., 2014, Vanden Dries et al., 2017, Houben et al., 2019).

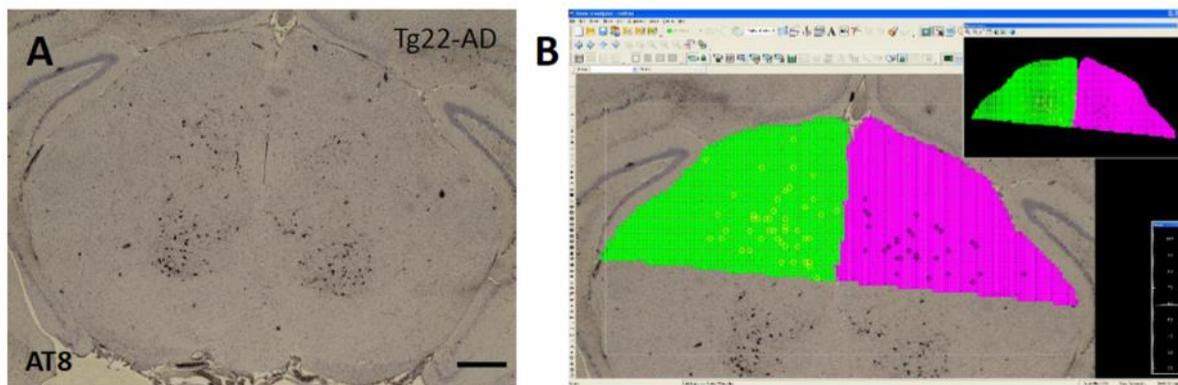
### 3.2.11.2. Quantification de la pathologie tau dans les relais visuels des souris injectées en IO

Afin d'évaluer la pathologie tau dans le cerveau des souris ayant reçu une injection intraoculaire de fractions sarkosyl AD ou CTL, des immunomarquages avec les anticorps anti-tau AT8, PHF-1, AT-180 et MC1 ont été réalisés sur des coupes histologiques et la densité de cellules positives aux différents anticorps dans le corps genouillé latéral et le colliculus supérieur, des côtés ipsilatéral et contralatéral, (**Fig. 28**) a été estimée chez les souris injectées avec la fraction sarkosyl AD ou CTL. Le côté ipsilatéral correspond à l'hémisphère situé sur le même côté que l'œil injecté, ce qui équivaut à l'hémisphère droit lorsque l'œil injecté est le droit. A l'inverse, le côté contralatéral correspond à l'hémisphère situé à l'opposé de l'œil injecté, ce qui équivaut à l'hémisphère gauche lorsque l'œil injecté est le droit.

Trois coupes adjacentes par souris et par région cérébrale ont été analysées. Le logiciel « Stereo Investigator » (MBF Bioscience) associé au microscope « Axio Imager » (Zeiss) ont permis une analyse automatisée et systématique de l'entièreté des aires cérébrales d'intérêt. La surface du corps genouillé latéral ou du colliculus supérieur a été mesurée sur chaque coupe à l'aide du logiciel et les cellules positives aux différents anticorps ont été marquées manuellement. La surface quantifiée du côté ipsilatéral a été définie en vert et la surface quantifiée du côté contralatéral a été définie en rose. Les cellules ont été marquées en jaune ou en mauve selon le côté quantifié (ipsilatéral et contralatéral respectivement) (**Fig. 29**). Le résultat obtenu est exprimé en une densité, définie comme le nombre de cellules positives à un anticorps sur l'aire étudiée (en mm<sup>2</sup>). Les résultats utilisés pour les analyses statistiques sont les résultats des moyennes des trois coupes.



**Fig. 28 :** Illustration des zones cérébrales relais du système visuel quantifiées. A gauche : Zones cérébrales (CGL (Corps Genouillé Latéral) et Colliculus Supérieur) quantifiées entourées en rouge (côté contralatéral) et en vert (côté ipsilatéral) sur des coupes histologiques. A droite : Zones cérébrales quantifiées représentées sur les planches de l'atlas « The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates » (Franklin and Paxinos, 2008).



**Fig. 29 :** Exemple d'une coupe histologique quantifiée à l'aide du logiciel « Stereo Investigator » (MBF Bioscience) associé au microscope « Axio Imager » (Zeiss). Explications dans le texte.

### 3.2.12. Western blotting

#### 3.2.12.1. Préparation des homogénats tissulaires

Les cerveaux et les yeux de souris ont été sortis du  $-80^{\circ}\text{C}$  où ils étaient stockés et ont été gardés sur glace durant tout le protocole. Les échantillons ont été homogénéisés dans 10 volumes de tampon RIPA (Tris (pH 7,4) 50 mM ; NaCl 150 mM ; NP 40 1% (v/v) ; Désoxycholate de Na 0,25% (v/v) ; inhibiteurs de protéases (Complete, Roche) ; inhibiteurs de phosphatases (Phosphatase Inhibitor Cocktail II, Sigma)). Le volume de RIPA utilisé pour chaque type d'échantillon est repris dans le **Tableau 8**.

Echantillon(s)	Poids (mg)	Vol. RIPA
<b>Cerveau (entier ou ½)</b>	<b>500 (entier) ; 250 (½)</b>	<b>10x poids → 5 ml ; 2,5 ml</b>
<b>Œil</b>	<b>20</b>	<b>10x poids → 200 µl</b>

**Tableau 8 :** Volume de RIPA utilisé par type d'échantillon.

Les échantillons ont été homogénéisés à l'aide d'un broyeur de tissu de type Potter-Elvehjem. L'échantillon tissulaire est placé dans un tube en verre borosilicaté avec la moitié du volume de RIPA puis broyé avec un pilon en PTFE (et tige en acier inoxydable) pendant une minute et l'opération est recommencée avec l'autre moitié du volume de RIPA. L'homogénat de cerveau est transféré dans un tube de 15 ml et l'homogénat d'œil est quant à lui transféré dans un Eppendorf. Les tubes et les Eppendorfs sont placés sur un rotor qui est mis en rotation à vitesse moyenne pendant une heure à  $4^{\circ}\text{C}$ , en chambre froide. Les homogénats sont ensuite centrifugés à  $1000\times g$  pendant 10 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$ . Les surnageants sont ensuite récupérés et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Un aliquot de 5-10 µl de chaque surnageant est également congelé et sera utilisé pour effectuer le dosage protéique.

### **3.2.12.2. Dosage des protéines totales**

Les protéines totales ont été dosées selon la méthode colorimétrique de Bradford.

La courbe étalon a été réalisée à l'aide d'un standard, l'albumine sérique bovine (BSA, Sigma). La BSA est diluée dans de l'eau distillée à une concentration finale de 80 µg/ml puis des dilutions successives sont réalisées pour obtenir les concentrations de 40, 20 et 10 µg/ml de protéines. La concentration de 0 µg/ml, constituée uniquement d'eau distillée, est également ajoutée pour créer la courbe étalon et servira également de « blanc ». Les échantillons de cerveaux et d'yeux sont dilués 1000 fois dans de l'eau distillée.

Ensuite, un colorant (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate) est dilué cinq fois dans chaque échantillon et dans chaque standard. Un « blanc » est aussi réalisé avec uniquement de l'eau distillée et du colorant.

Les standards et les échantillons sont ensuite déposés, en triplicata, dans une plaque 96 puits. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre (SpectraMax M2, Molecular Devices) à la longueur d'onde de 595 nm et les concentrations protéiques des échantillons sont directement calculées par le logiciel (SoftMax Pro).

### **3.2.12.3. Séparation des protéines par électrophorèse**

Les échantillons protéiques sont mélangés à du « sample buffer » (SDS 10% (m/v ; sucrose 50% (m/v) ; bleu de bromophénol 0,05% (v/v) ; Tris (pH 6,8) 0,125 M ; BME 10% (v/v)), dilué cinq fois dans chaque échantillon. Les échantillons sont ensuite dénaturés pendant cinq minutes à 100°C dans un bloc chauffant et peuvent être conservés à -20°C, en attente de procéder au western blotting.

100 µg (cerveaux et yeux) de protéines totales et 5 µl de marqueurs de poids moléculaire (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, ThermoScientific 26619) sont déposées sur un gel de polyacrylamide SDS-PAGE Tris-Glycine (0,75 mm) composé d'un gel de concentration à 4% (Tris (pH 6,8) 125 mM ; SDS 0,1% (v/v) ; Acrylamide/Bis-acrylamide (29:1) 3,9% (v/v) ; APS 0,06% (v/v) ; TEMED 0,12% (v/v)) et d'un gel de séparation à 10% (Tris (pH 8,8) 375 mM ; SDS 0,1% (v/v) ; Acrylamide/Bis-acrylamide (29:1) 10% (v/v) ; APS 0,06% (v/v) ; TEMED 0,06% (v/v)). Le pourcentage du gel, correspondant au pourcentage d'acrylamide, est choisi en fonction du poids moléculaire des protéines d'intérêt. Plus le poids moléculaire de la protéine est faible, plus le pourcentage en acrylamide du gel doit être élevé pour permettre une séparation optimale des protéines. Le gel de séparation à 10% permet la séparation de protéines de poids moléculaire entre 50 et 75 kDa, ce qui correspond au poids moléculaire de la protéine tau en conditions physiologique et pathologique. L'électrophorèse est réalisée avec un voltage constant à 150 Volts dans un tampon de migration (Tris 0,025 M ; Glycine 0,2 M ; SDS 3,5 mM ; pH 8,3) pendant ± une heure à température ambiante (système Bio-Rad). La migration est arrêtée lorsque le front de migration atteint la fin du gel de séparation.

### **3.2.12.4. Transfert sur membrane de nitrocellulose**

Les protéines qui ont migré dans le gel de polyacrylamide doivent être ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose pour permettre l'immunodétection. Les membranes de nitrocellulose utilisées dans le projet ont des pores de 0,45 µm (ou plus rarement de 0,22 µm).

Pour ce faire, la membrane de nitrocellulose (UltraCruz) est comprimée sur le gel de polyacrylamide à l'aide de deux papiers buvards « Whatman » et de deux éponges de part et d'autre du gel et de la membrane dans une cassette de transfert. Les cassettes de transfert sont alors immergées dans un tampon de transfert (Tris 0,025 M ; Glycine 0,2 M ; 20 % méthanol (v/v)) et l'électrophorèse se déroule avec un ampérage constant de 330 mA pendant une heure à 4°C (système Bio-Rad).

### **3.2.12.5. Immunodétection**

Après le transfert, les membranes sont plongées dans une solution qui contient 10 % (m/v) de lait demi-écrémé en poudre (Cora) réhydraté avec du TBS (Tris 0,01 M ; NaCl 0,15 M ; pH 7,4), pendant deux heures sous agitation constante à RT. Cette étape permet de saturer tous les sites de fixation non spécifiques à l'anticorps primaire utilisé. En effet, la fixation non spécifique de l'anticorps engendrerait des signaux qui ne correspondent pas à la protéine d'intérêt et un bruit de fond élevé.

Les membranes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire, dilué de manière appropriée dans une solution de TBS (Tris 0,01 M ; NaCl 0,15 M ; pH 7,4), BSA 2% (m/v) et 0,13% (m/v) d'azoture de sodium (NaN<sub>3</sub>) (**Tableau 1**), O/N sous agitation constante en chambre froide, à 4°C.

### **3.2.12.6. Révélation par chémiluminescence (ECL)**

Le lendemain, après l'incubation O/N de l'anticorps primaire, les membranes sont rincées avec du TBS (Tris 0,01 M ; NaCl 0,15 M ; pH 7,4) et 0,05% de Tween 20 (v/v) [3 x 10 min.] puis incubées avec l'anticorps secondaire adéquat couplé à la peroxydase de raifort (HRP) dilué dans du TBS (Tris 0,01 M ; NaCl 0,15 M ; pH 7,4) (**Tableau 2**) pendant deux heures, avec agitation, à température ambiante.

Les membranes sont ensuite lavées dans du TBS (Tris 0,01 M ; NaCl 0,15 M ; pH 7,4) et 0,05% de Tween 20 (v/v) [3 x 10 min.] suivi d'un lavage de cinq minutes au TBS (Tris 0,01 M ; NaCl 0,15 M ; pH 7,4).

L'activité de la peroxydase est détectée grâce à l'ajout d'une solution contenant un substrat ECL de l'enzyme, selon les indications fournies par la firme (SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, ThermoScientific). Après cinq minutes, l'acquisition des signaux chémiluminescents est effectuée avec le système Fusion Solo 4S (Vilber Lourmat), équipé d'une caméra DARQ-7. Les résultats sont ainsi directement numérisés.

### **3.2.12.7. Quantification des bandes protéiques par ImageJ**

La quantification des bandes révélées en western blot a été réalisée par l'analyse densitométrique (pixels) de ces bandes à l'aide du logiciel ImageJ (NIH).

Les résultats obtenus en western blotting sont semi-quantitatifs car la quantification reflète des quantités relatives sous la forme d'un rapport (ratio) de chaque bande protéique par rapport au contrôle de charge, l'actine.

### **3.2.12.8. Normalisation des valeurs quantifiées**

Afin de permettre une comparaison des résultats obtenus sur différentes membranes, une normalisation des données a été effectuée en utilisant un standard. En effet, les conditions

expérimentales peuvent fluctuer d'une membrane à l'autre et compromettre la bonne interprétation des résultats.

Un standard a donc été ajouté pour chaque membrane. Le standard choisi pour les analyses de la protéine tau est un homogénat cérébral d'une souris Tg30 et le standard choisi pour les analyses des kinases est un homogénat cérébral d'une souris WT. Le standard doit bien sûr provenir d'un même échantillon pour l'ensemble des membranes à comparer !

Le ratio du standard le plus élevé est pris comme référence. (C'est celui-ci qui est représenté sur les western blotting dans les figures de ce manuscrit.)

Tout d'abord, on normalise les standards. Pour ce faire, le ratio du standard pris comme référence est divisé par le ratio des différents standards : Ratio Standard Référence/Ratio Standard de chaque membrane.

Ensuite, on normalise les échantillons. Ainsi, le ratio de chaque échantillon est multiplié par le standard normalisé de sa membrane : Ratio échantillon x Standard normalisé de sa membrane.

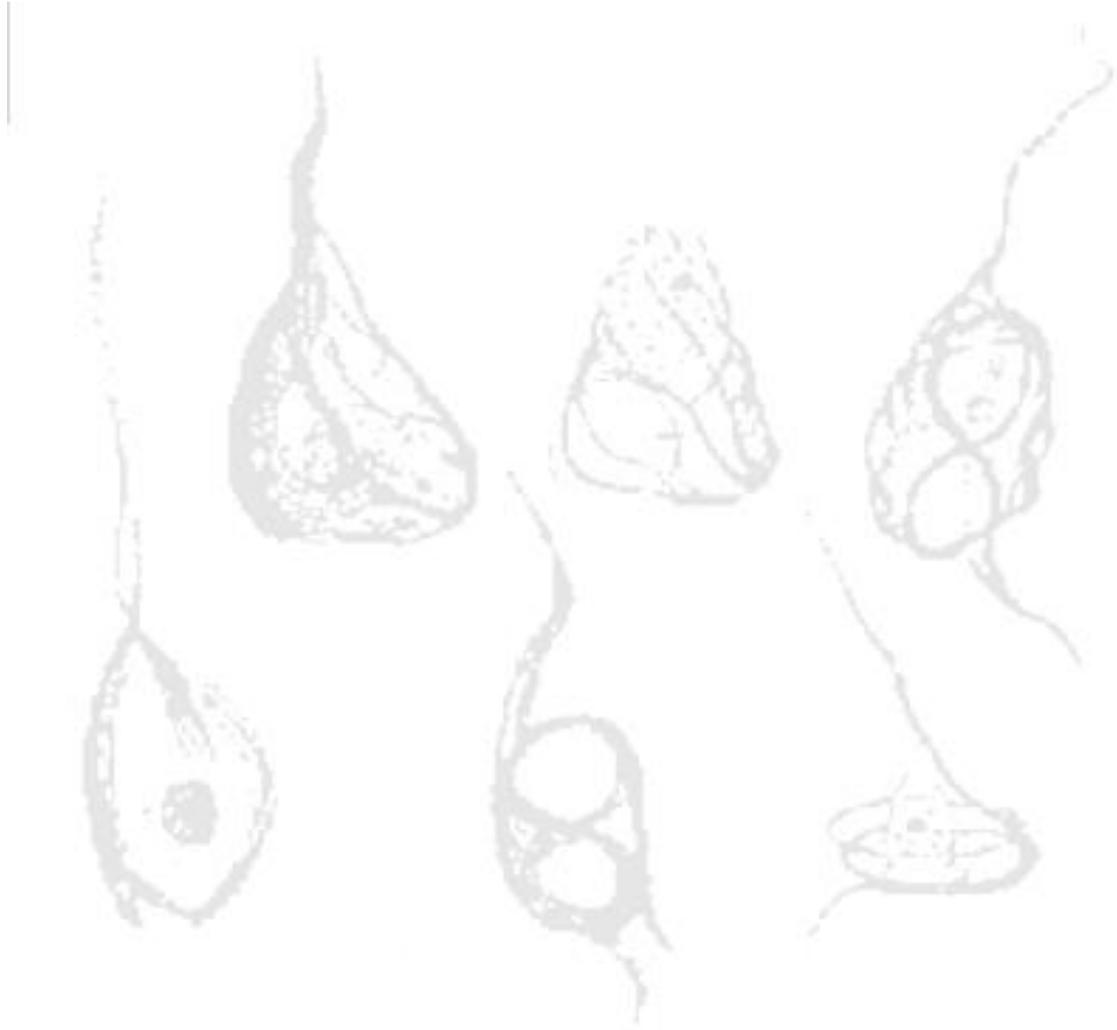
Pour finir, les résultats obtenus sont transformés en pourcentages. Le ratio normalisé de l'échantillon est divisé par le ratio du standard non-normalisé de sa membrane et le quotient obtenu est multiplié par 100. (Par conséquent, le ratio du standard pris comme référence est égal à 100 %.)

### **3.2.13. Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA). Les comparaisons statistiques ont été réalisées en utilisant le test non-paramétrique de Mann-Whitney (Two-Tailed) pour comparer deux groupes et le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaison multiple de Dunn pour comparer trois groupes ou plus.

Les p-valeurs inférieures à 0,05 ou 0,1 ont été considérées statistiquement significatives et sont signalées dans la légende de la figure. Les p-valeurs inférieures à 0,05 sont illustrées sur les graphiques par des astérisques (\*) et les p-valeurs inférieures à 0,1 sont représentées par des étoiles (★). Le nombre d'échantillons est également indiqué dans la légende de la figure. Les résultats sont représentés par des graphiques en nuages de points (scatter plot) dont les barres d'erreurs représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type (SD).





# *Résultats*



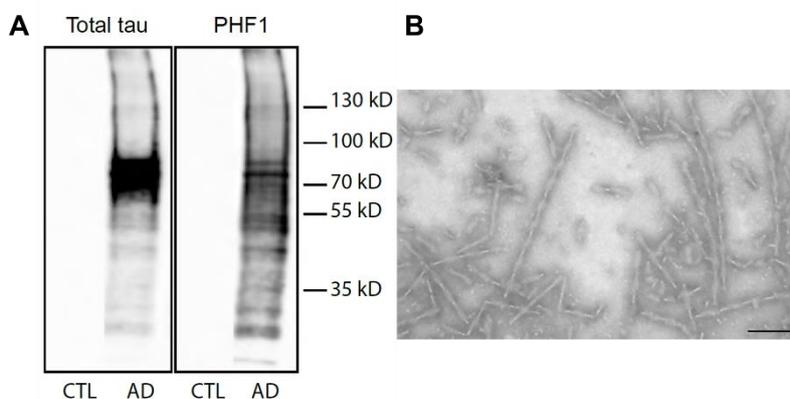
## 4. Résultats

### 4.1. Partie 1 : Caractérisation des fractions sarkosyl

Avant de procéder aux injections périphériques (intraveineuse et intraoculaire), nous avons caractérisé les fractions sarkosyl isolées des cerveaux humains atteints de la MA (AD) ou sain (CTL) en analysant leur contenu en PHF-tau (analyses biochimiques) et leur cytotoxicité *in vitro*. Nous avons ensuite analysé les capacités de nucléation des PHF-tau (« seeding ») *in vitro*, en utilisant des cellules FRET et *in vivo*, en réalisant des injections stéréotaxiques dans le cerveau de souris wild type (WT).

#### 4.1.1. Analyses biochimiques

La présence des PHF-tau dans les fractions sarkosyl insolubles a été vérifiée par western blotting et confirmée par microscopie électronique.



**Fig. 30 :** Les protéines tau insolubles, isolées d'un cerveau atteint de la MA, sont hyperphosphorylées et forment des filaments torsadés. **A :** Western blotting des fractions sarkosyl insolubles isolées d'un cerveau humain atteint de la MA (AD) ou sain (CTL) avec les anticorps anti-tau et PHF-1. Les protéines tau phosphorylées ont été détectées dans la fraction sarkosyl AD mais pas dans la fraction sarkosyl CTL. **B :** La présence des filaments torsadés (PHF-tau) a été observée dans la fraction sarkosyl AD en microscopie électronique. Barre d'échelle : 50 nm.

après la coloration négative de l'échantillon, a confirmé la présence de filaments torsadés (PHF-tau) dans la fraction sarkosyl insoluble AD (**Fig. 30B**). La longueur moyenne des PHF est de  $165,9 \pm 7,6$  nm.

Des bandes correspondant aux poids moléculaires attendus pour les protéines tau pathologiques ont été détectées dans la fraction sarkosyl « AD », isolée d'un cerveau d'un patient atteint de la MA par l'anticorps anti-tau total. Ces bandes ont également été détectées avec un anticorps reconnaissant la protéine tau phosphorylée sur les serines 396 et 404 (anticorps PHF-1) (**Fig. 30A**).

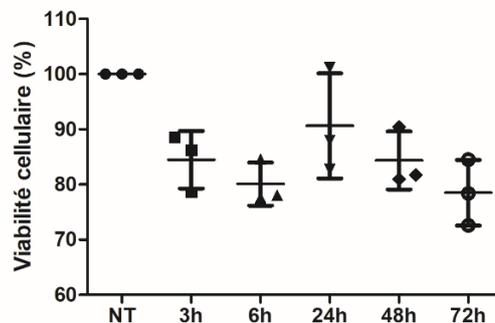
Les protéines tau sont absentes de la fraction sarkosyl isolée d'un cerveau humain sain et qui correspond à la fraction contrôle (CTL) (**Fig. 30A**). L'observation en microscopie électronique,

#### 4.1.2. Etude de la cytotoxicité des PHF-tau humains *in vitro*

##### 4.1.2.1. Sur des cellules CHO en culture

Un test de viabilité cellulaire utilisant le MTT a été réalisé pour évaluer la cytotoxicité des PHF-tau humains sur des cellules CHO en culture. Le MTT est métabolisé en un précipité bleu par les cellules vivantes. Les cellules ont été traitées avec 10 µg/ml de PHF-tau humains pendant 3, 6, 24, 48 ou 72h. Le pourcentage de cellules vivantes a été calculé par rapport à des cellules non-traitées (NT) qui représentent 100%.

La viabilité cellulaire est similaire entre les groupes (**Fig. 31**), ce qui suggère que les PHF-tau ne sont pas cytotoxiques à la concentration de 10 µg/ml et ce, durant les différents temps testés. Des résultats homologues ont été observé lorsque les cellules sont traitées avec des fractions sarkosyl contrôles (CTL), extraites de cerveaux humains sains (*résultats non présentés*).

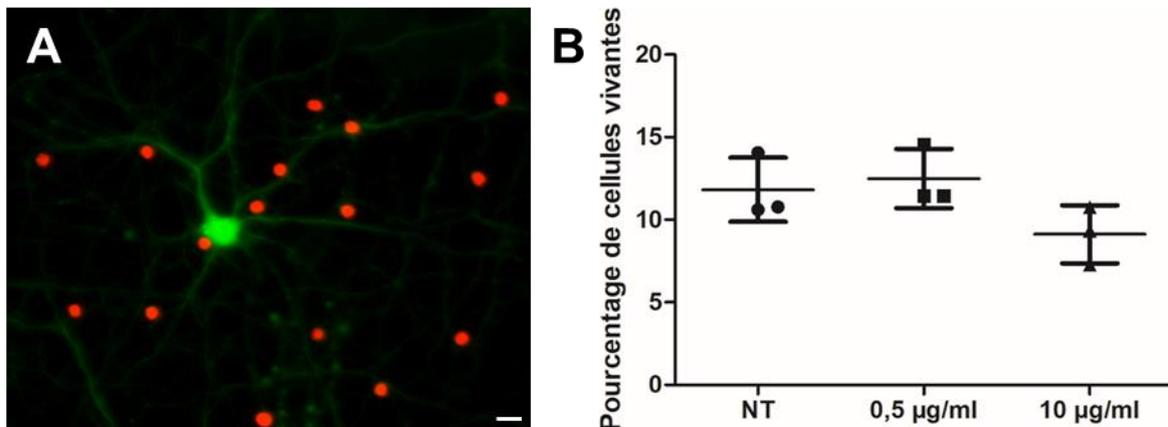


**Fig. 31 :** Les PHF-tau ne sont pas cytotoxiques *in vitro* sur des cellules CHO en culture. Graphique du pourcentage de cellules vivantes traitées avec 10 µg/ml de PHF-tau humains pendant 3, 6, 24, 48 ou 72h par rapport à des cellules non-traitées (NT) et qui représentent 100%. Aucune différence de la viabilité cellulaire n'a été observée entre les groupes ((n = 3) par condition). Test de Kruskal-Wallis, p = 0,0707 (résultat non-significatif).

#### 4.1.2.2. Sur des cultures primaires de neurones corticaux murins

La cytotoxicité des PHF-tau isolés de cerveaux AD a également été évaluée en utilisant la calcéïne et le propidium iodide qui colorent les cellules vivantes en vert et les cellules mortes en rouge respectivement (**Fig. 32A**). La viabilité cellulaire a été évaluée en comptant le nombre de cellules mortes et vivantes dans chaque condition testée et a été exprimée en un pourcentage de cellules vivantes.

Les neurones ont été traités pendant 24 heures avec 0,5 µg/ml ou 10 µg/ml de PHF-tau humains ou non-traités (condition contrôle). Le pourcentage de cellules vivantes est similaire dans chaque condition et est de ± 10 % (**Fig. 32B**). Ce faible nombre de cellules vivantes est lié à l'utilisation d'un milieu permettant la survie sélective des neurones. La majorité des cellules mortes sont sans doute des cellules gliales n'ayant pas survécu dans le milieu de sélection pour les neurones. Les PHF-tau humains ne semblent donc pas être toxiques pour les neurones en culture aux concentrations testées étant donné que la viabilité cellulaire est équivalente dans chaque groupe.



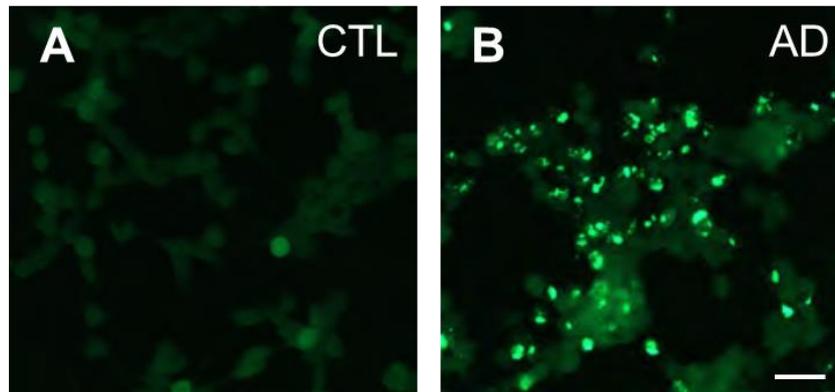
**Fig. 32 :** Les PHF-tau ne sont pas cytotoxiques *in vitro* sur des neurones corticaux murins en culture primaire. Test de cytotoxicité des PHF-tau isolés de cerveaux AD à une concentration de 0,5 ou 10 µg/ml sur des cultures primaires de neurones corticaux murins (10 jours de culture) traitées durant 24 heures. Le test utilise la calcéïne et le propidium iodide, qui colorent les cellules vivantes en vert et les cellules mortes en rouge respectivement. **A :** Image illustrant un neurone vivant en vert et des noyaux de cellules mortes en rouge. Barre d'échelle : 10 µm. **B :** Graphique du pourcentage de cellules vivantes non-traitées (NT) (n = 3), ou traitées avec 0,5 µg/ml (n = 3) ou 10 µg/ml (n = 3) de PHF-tau isolés de cerveaux AD. La viabilité cellulaire est similaire entre les différentes conditions testées. Test de Kruskal-Wallis, p = 0,0777 (résultat non-significatif).

#### 4.1.3. Etude des capacités de nucléation des PHF-tau humains

##### 4.1.3.1. *in vitro* : cellules FRET

Afin d'évaluer, *in vitro*, les capacités de nucléation des PHF-tau présents dans la fraction sarkosyl insoluble AD, nous avons ajouté ces PHF-tau dans le milieu de culture des cellules FRET. Pour optimiser l'internalisation des protéines tau, nous avons préparé des liposomes en combinant les protéines tau avec un agent de transfection (X-tremeGENE HP, Roche). 24 heures après la transfection, nous avons observé les cellules FRET au microscope à fluorescence. Les cellules FRET ayant été traitées avec la fraction sarkosyl AD ont montré des inclusions fluorescentes vertes, qui correspondent aux signaux FRET, ce qui suggère que les protéines tau recombinantes exprimées par les cellules FRET ont pu être « recrutées » par les PHF-tau présents dans la fraction sarkosyl AD (**Fig. 33B**). De plus, aucun signal fluorescent

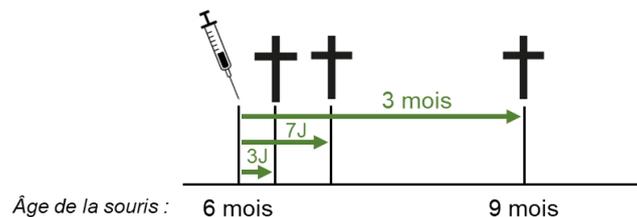
n'a été détecté dans les cellules FRET traitées avec la fraction sarkosyl CTL, ce qui suggère que ce sont les PHF-tau qui sont responsables des signaux observés (**Fig. 33A**).



**Fig. 33 :** Les PHF-tau sont capables d'induire la nucléation des protéines tau dans des cellules en culture. Les cellules ont été traitées avec 1 µg/ml de PHF-tau ou avec 1 µg/ml de fraction CTL pendant 24 heures. Des signaux fluorescents FRET sont observés dans les cellules traitées avec la fraction sarkosyl AD (**A**) et ne sont pas observés dans les cellules traitées avec la fraction sarkosyl CTL (**B**). Barre d'échelle : 20 µm.

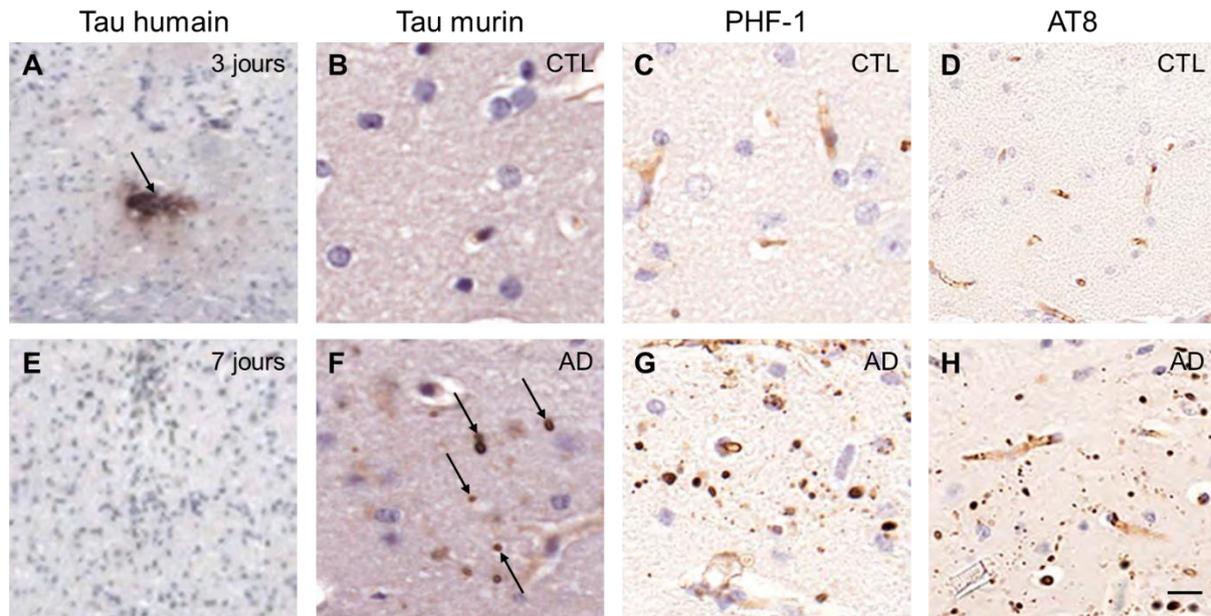
#### 4.1.3.2. *in vivo* : injection intracérébrale (stéréotaxique) dans des souris WT

Les propriétés de nucléation des PHF-tau ont été également évaluées *in vivo*, en réalisant des injections intracérébrales (stéréotaxiques) dans des souris WT âgées de 6 mois. Les analyses ont été effectuées 3 jours, 7 jours et 3 mois après l'injection (**Fig. 34**).



**Fig. 34 :** Schéma expérimental temporel des injections intracérébrales. J : jours.

Trois jours après l'injection, les PHF-tau humains ont été détectés dans le cerveau des souris injectées avec la fraction sarkosyl AD (**Fig. 35A**) et ne sont plus détectés sept jours après l'injection (**Fig. 35E**). Trois mois après l'injection, des inclusions de protéines tau murines ont été détectées dans le cortex cérébral des souris injectées avec la fraction sarkosyl AD (**Fig. 35F**). Ces inclusions ont été marquées avec les anticorps PHF-1 (**Fig. 35G**) et AT8 (**Fig. 35H**), qui reconnaissent la protéine tau phosphorylée sur les Ser396/404 et sur les Ser202/Thr205 respectivement, ce qui indique qu'elles sont composées de protéines tau dans un état de phosphorylation élevé. Le cortex cérébral des souris injectées avec la fraction sarkosyl CTL n'a montré aucune structure marquée avec l'anticorps anti-tau murin (**Fig. 35B**) ou avec les anticorps anti-tau phosphorylé (**Fig. 35C et D**). Ces résultats suggèrent que les PHF-tau humains dans notre préparation ont la capacité de recruter les protéines tau murines endogènes et d'induire des changements pathologiques, démontrés par la phosphorylation anormale de ces protéines tau murines. Ces dernières, en héritant des mêmes propriétés de nucléation, pourraient à leur tour « recruter » de nouvelles protéines tau et par conséquent propager la pathologie tau dans le cerveau. Les mêmes observations ont été décrites dans des études précédentes au sein du laboratoire (Audouard et al., 2016, Vergara et al., 2019).



**Fig. 35<sup>10</sup> :** Les PHF-tau humains sont capables d’induire la nucléation des protéines tau dans le cerveau de souris WT après une injection intracérébrale (stéréotaxique). Cerveaux de souris WT injectées stéréotaxiquement avec des PHF-tau humains et immunomarqués 3 jours (A), 7 jours (E) et 3 mois (B à H) après l’injection avec des anticorps anti-tau humain (A et E), anti-tau murin (B et F) ou anti-tau phosphorylé sur les Ser396/404 (PHF-1) (C et G) ou sur les Ser202/Thr305 (AT8) (D et H). Les PHF-tau humains ont été détectés trois jours après l’injection intracérébrale de la fraction sarkosyl AD (A) et ne sont plus détectés après sept jours (E). Des inclusions de protéines tau murines (F) phosphorylées (G et H) ont été visualisées trois mois après l’injection avec la fraction sarkosyl AD. Le cortex cérébral des souris injectées avec la fraction sarkosyl CTL ne montre aucune structure marquée avec l’anticorps anti-tau murin (B) ou avec les anticorps anti-tau phosphorylé (C et D). Barre d’échelle : 20 µm.

---

**En conclusion :**

- ⇒ Les PHF-tau sont présents dans la fraction sarkosyl (insoluble) isolée d’un cerveau humain atteint de la MA et sont absents de la fraction sarkosyl isolée d’un cerveau humain sain.
- ⇒ Les PHF-tau sont hyperphosphorylés et agrégés sous forme de filaments.
- ⇒ Les PHF-tau ne sont pas cytotoxiques *in vitro*.
- ⇒ Les PHF-tau possèdent des propriétés de nucléation, *in vitro* et *in vivo*.

---

<sup>10</sup> Une mise en évidence artéfactuelle des vaisseaux sanguins peut apparaître avec l’emploi d’anticorps secondaires anti-anticorps de souris, se reporter à la figure supplémentaire 5 (Fig. Sup. 5).

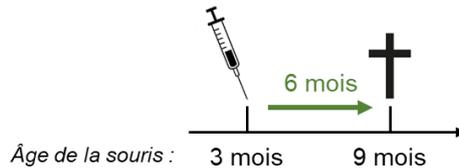
#### 4.2. Partie 2 : Effets des injections périphériques de PHF-tau humains dans des souris transgéniques

L'objectif de cette partie du travail concerne l'étude de la transmission possible de la pathologie tau par des voies extracérébrales. En effet, de nombreux modèles expérimentaux ont montré que la pathologie tau pouvait se développer dans le cerveau après une injection intracérébrale de PHF-tau isolés de cerveaux humains atteints de la maladie d'Alzheimer. Néanmoins, des études supplémentaires étaient nécessaires pour identifier d'autres voies de transmission telles que la voie intravasculaire ou à la suite d'une chirurgie de l'œil.

##### 4.2.1. Injection intravasculaire de PHF-tau humains dans des souris 5xFAD et WT

Nous avons étudié ici l'effet d'une injection intravasculaire de 10 µg de PHF-tau humains dans des souris 5xFAD et WT. Le modèle murin transgénique 5xFAD développe des plaques amyloïdes dans le cerveau et possède une barrière hémato-encéphalique (BHE) endommagée consécutive à la présence de peptides amyloïdes, qui conduit à une augmentation de sa perméabilité [cf. 1.1.2.2.1.2. – *Altération de la BHE dans la MA et au cours du vieillissement*]. Ces deux éléments (pathologie amyloïde et BHE perméable) reflètent ce qui est observé chez des patients atteints de la MA et au cours du vieillissement normal. Néanmoins, la pathologie tau, une des caractéristiques neuropathologiques de la MA (avec la pathologie amyloïde) n'est pas rencontrée dans ce modèle.

Les souris étaient âgées de trois mois lors de l'injection et ont été sacrifiées six mois plus tard, à l'âge de neuf mois (**Fig. 36**).



**Fig. 36 :** Schéma expérimental temporel des injections intravasculaires.

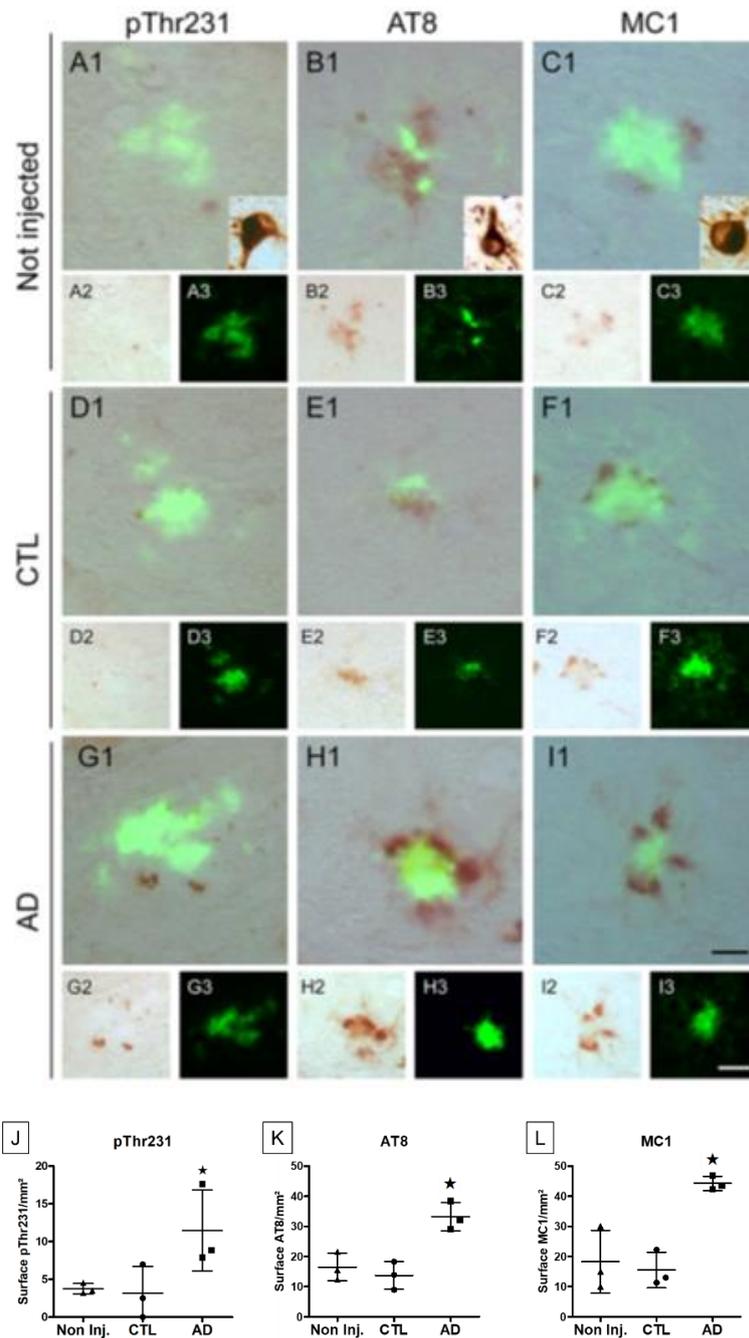
##### 4.2.1.1. Analyse de la pathologie tau

Nous avons tout d'abord étudié l'effet d'une injection intravasculaire de PHF-tau humains, contenus dans la fraction sarkosyl AD, sur le développement d'une pathologie tau dans le cerveau des souris injectées. Comme contrôle, nous avons injecté des souris avec une fraction sarkosyl contrôle (CTL), isolée d'un cerveau humain sain et qui ne contient pas de PHF-tau [cf. 4.1.1]. La pathologie tau a été évaluée sur des coupes histologiques des cerveaux murins à l'aide des anticorps anti-phosphotau pThr231 et AT8 (pSer202/pThr205) et à l'aide de l'anticorps MC1 qui reconnaît la protéine tau uniquement dans une conformation pathologique.

Les protéines tau, reconnues par les anticorps précités, pThr231, AT8 et MC1, ont été observées dans les neurites dystrophiques qui se trouvent autour des plaques amyloïdes, mises en évidence par la coloration à la thioflavine S (ThS) chez les souris 5xFAD injectées avec la fraction sarkosyl AD ou CTL (**Fig. 37**). L'accumulation de protéines tau phosphorylées n'a jamais été observée chez les souris WT injectées avec la fraction sarkosyl AD ou CTL (*données non montrées*).

## Résultats

De plus, la surface moyenne couverte par l'immunomarquage dans le gyrus denté de l'hippocampe avec les anticorps anti-phosphotau et par l'anticorps conformationnel dans les neurites dystrophiques était significativement augmenté dans les souris 5xFAD injectées avec la fraction sarkosyl AD comparée aux souris 5xFAD non-injectées ou injectées avec la fraction sarkosyl contrôle (CTL) (**Fig. 37, J-L**).

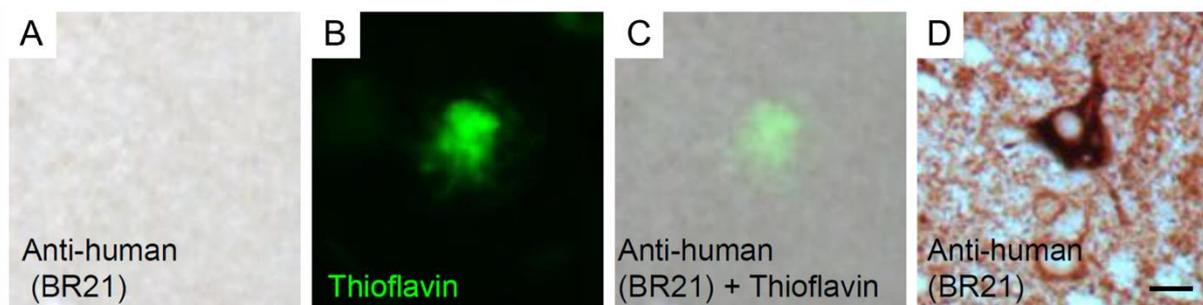


**Fig. 37 : L'injection intraveineuse de PHF-tau aggrave la pathologie tau dans des souris 5xFAD.** Immunomarquage du gyrus denté des souris 5xFAD non-injectées (A1-3, B1-3 et C1-3) ou injectées avec une fraction sarkosyl contrôle (CTL) (D1-3, E1-3 et F1-3) ou une fraction sarkosyl AD (G1-3, H1-3 et I1-3) avec l'anticorps anti-phosphoThr231 (A1-2, D1-2 et G1-2), l'anticorps AT8 (B1-2, E1-2 et H1-2) et l'anticorps MC1 (C1-2, F1-2 et I1-2). La quantification des neurites dystrophiques mis en évidence par les immunomarquages (en brun) avec pThr231, AT8 et MC1 autour des plaques amyloïdes (en vert) a montré une augmentation significative chez les souris 5xFAD injectées avec la fraction sarkosyl AD par rapport aux souris injectées avec la fraction sarkosyl CTL ou non-injectées (**J, K et L**).

## Résultats

Test de Kruskal-Wallis, test *post hoc* de Dunn, ★ $p < 0,1$ .  $p = 0,0608$  (pThr231),  $p = 0,0608$  (AT8) et  $p = 0,0665$  (MC1) ;  $n = 3$  par condition (Non Inj., CTL ou AD). Les coupes ont été contre-colorées avec la thioflavine S qui montrent les dépôts amyloïdes en vert. Une coupe de cerveau d'une souris Tg30 a servi de contrôle positif pour les différents anticorps anti-tau (cellules immunomarquées illustrées dans les petites images en **A1**, **B1** et **C1**). Barres d'échelle : 20  $\mu\text{m}$ .

L'augmentation de l'immunoréactivité envers la protéine tau dans les neurites dystrophiques associés aux plaques amyloïdes n'a pas été détectée par l'anticorps anti-tau humain BR21 (**Fig. 38, A-C**) dans les souris 5xFAD injectées avec la fraction sarkosyl AD, ce qui indique que cette augmentation de l'immunoréactivité envers la protéine tau n'est pas due à l'accumulation des protéines tau humaines injectées trois mois plus tôt. La protéine tau humaine a été détectée par l'anticorps anti-tau humain BR21 sur des coupes de souris Tg30, qui expriment une isoforme de la protéine tau humaine mutée 1N4R, et qui ont été utilisées comme contrôle positif.



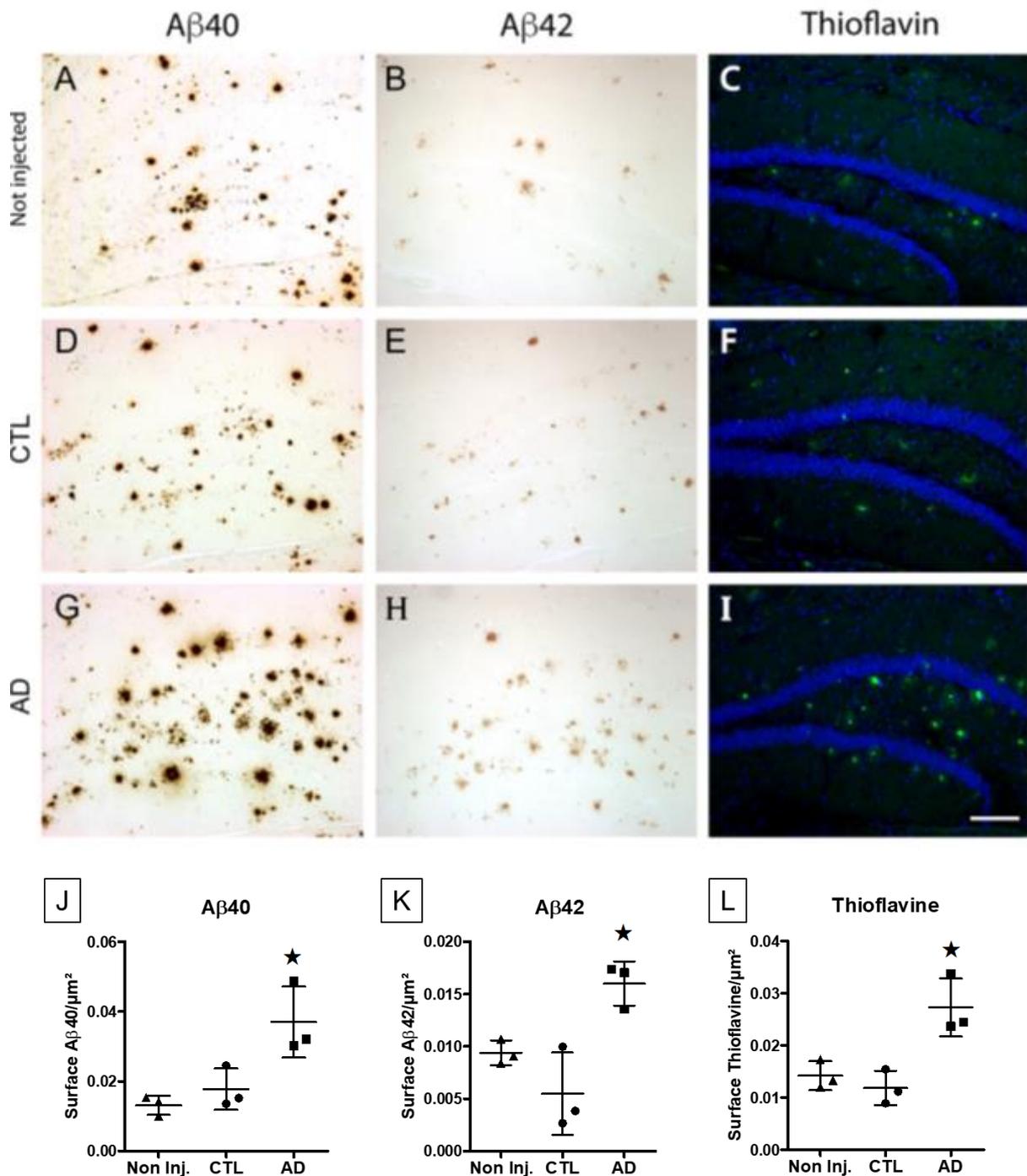
**Fig. 38** : La pathologie tau détectée dans les neurites dystrophiques des souris 5xFAD n'est pas composée des PHF-tau humains injectés. Immunomarquage de coupes d'hippocampe de souris 5xFAD injectées avec la fraction sarkosyl AD avec l'anticorps anti-tau humain (BR21) (**A,C**) et contre-colorées avec la Thioflavine S pour mettre en évidence les plaques amyloïdes en vert (**B,C**). Une coupe de cerveau d'une souris Tg30 qui exprime l'isoforme humaine mutée 1N4R a été utilisée comme contrôle positif pour l'immunomarquage anti-tau humain (**D**). Barre d'échelle : 10  $\mu\text{m}$ .

Parmi les modifications observées au cours de la maturation et la formation de la pathologie tau, seule la phosphorylation de tau était présente dans les neurites dystrophiques associés aux plaques amyloïdes. En effet, la coloration Gallyas n'a pas mis en évidence des agrégats de protéines tau dans ces structures. Aucune dégénérescence neurofibrillaire (DNF) n'a été observée dans les souris 5xFAD injectées avec la fraction sarkosyl AD ou CTL. Des souris Tg30 (exprimant une isoforme humaine mutée 1N4R) ont été utilisées comme contrôle positif pour les DNF, détectées dans les neurones de ce modèle murin (**petites images dans la Fig. 37A1,B1,C1**).

#### **4.2.1.2. Analyse de la pathologie amyloïde**

Nous avons ensuite investigués l'effet d'une injection intravasculaire de PHF-tau humains, contenus dans la fraction sarkosyl AD, sur la formation des plaques amyloïde dans le cerveau des souris injectées. Pour ce faire, nous avons quantifiés par immunohistochimie la surface occupée par les plaques amyloïdes, dans le gyrus denté de l'hippocampe des souris 5xFAD non-injectées ou injectées avec la fraction sarkosyl AD ou CTL, en utilisant des anticorps dirigés contre les peptides A $\beta$ 40 ou les peptides A $\beta$ 42 ou en se servant de la coloration à la Thioflavine S (**Fig. 39**).

La surface moyenne couverte par les plaques amyloïdes, mises en évidence par les anticorps anti-A $\beta$ 40 (**Fig. 39A,D,G**) ou anti-A $\beta$ 42 (**Fig. 39B,E,H**) était significativement augmentée dans le gyrus denté des souris 5xFAD injectées avec la fraction sarkosyl AD, comparée aux souris non-injectées ou injectées avec la fraction sarkosyl CTL (**Fig. 39J,K**). La même augmentation significative de la surface occupée par les dépôts amyloïdes dans le cerveau des souris 5xFAD injectées avec la fraction sarkosyl AD a aussi été observée à l'aide de la coloration à la Thioflavine S (**Fig. 39C,F,I,L**).

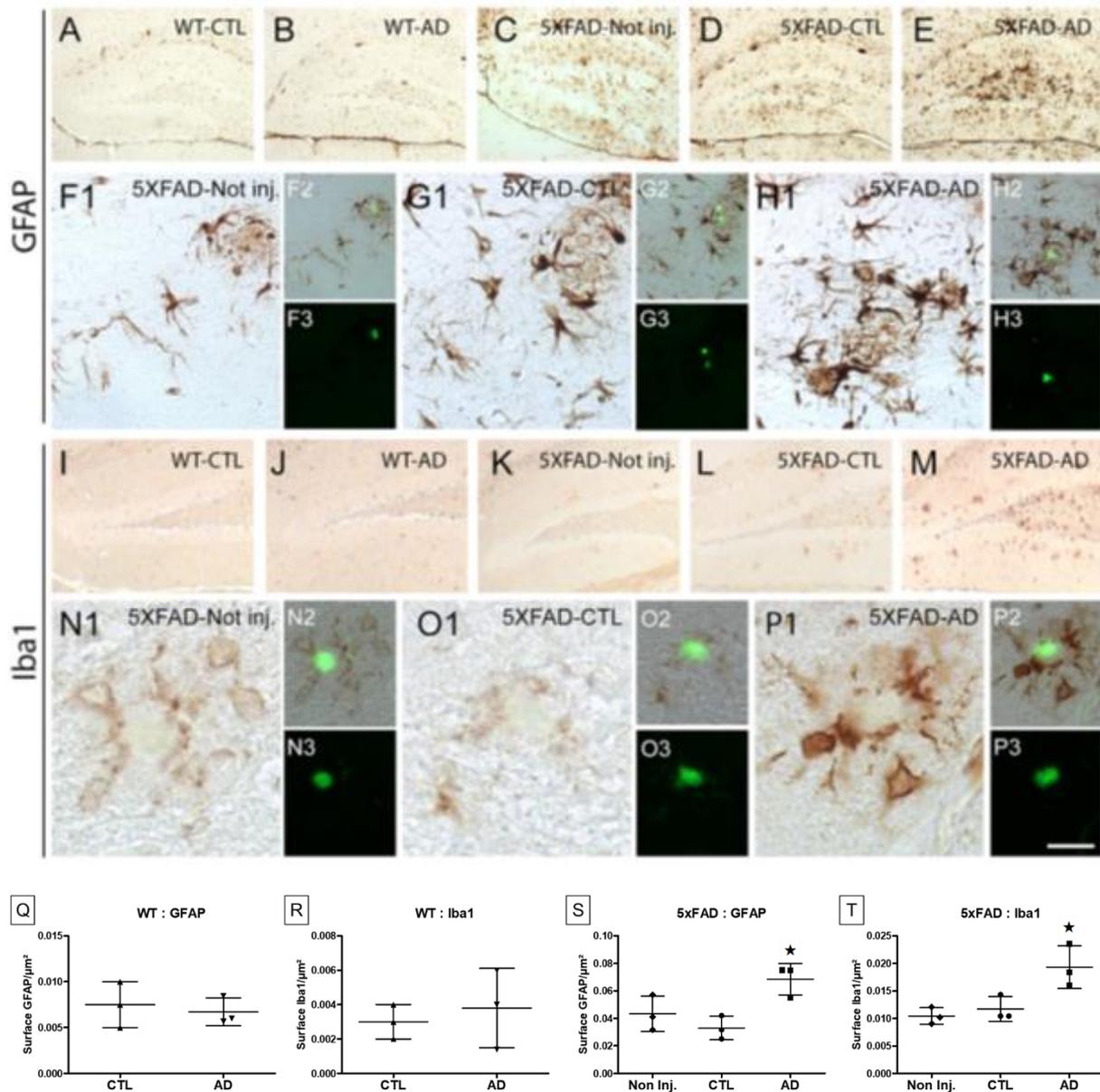


**Fig. 39 : L'injection intraveineuse de PHF-tau aggrave la pathologie amyloïde dans des souris 5xFAD.** Immunomarquage du gyrus denté des souris 5xFAD non injectées (A-C) ou injectées avec une fraction sarkosyl contrôle (CTL) (D-F) ou une fraction sarkosyl AD (G-I) avec l'anticorps anti-Aβ40 (A,D,G), l'anticorps anti-Aβ42 (B,E,H) et avec la coloration à la Thioflavine S (C,F,I). La quantification des plaques amyloïdes mises en évidence par les anticorps anti-Aβ40 et anti-Aβ42 et par la coloration à la Thioflavine S a montré une augmentation significative de la surface occupée par les plaques amyloïdes dans les souris 5xFAD injectées avec la fraction sarkosyl isolée d'un cerveau humain atteint de la MA (AD) comparée aux souris 5xFAD non-injectées ou injectées avec la fraction contrôle, isolée d'un cerveau humain sain (CTL) (J-L). Test de Kruskal-Wallis, test *post hoc* de Dunn, ★ $p < 0,1$ .  $p = 0,0608$  (Aβ40),  $p = 0,0509$  (Aβ42) et  $p = 0,0509$  (ThS) ;  $n = 3$  par condition (Non Inj., CTL ou AD). Les coupes ont été contre-colorées avec du DAPI qui montrent les noyaux des cellules en bleu sur les images C, F et I. Barre d'échelle : 200 μm.

#### 4.2.1.3. *Analyse de la neuroinflammation*

Ensuite, pour comprendre l'effet d'une injection intravasculaire de PHF-tau dans les souris WT ou 5xFAD, nous avons étudié l'activation gliale dans le gyrus denté de l'hippocampe par immunohistochimie à l'aide d'anticorps anti-GFAP, la protéine GFAP est un marqueur des astrocytes, et à l'aide d'anticorps anti-Iba1, qui reconnaissent les cellules microgliales (**Fig. 40**). Les protéines GFAP et Iba1 sont exprimées de manière physiologique, dans un contexte non-inflammatoire. Cependant, lors d'une réaction immunitaire, l'expression cellulaire de ces protéines est augmentée et est, dès lors, utilisée comme un marqueur de la présence d'une neuroinflammation (en comparaison avec l'expression basale de ces protéines).

La quantification de la surface occupée par les cellules astrocytaires ou microgliales a montré une importante astrocytose (**Fig. 40E,H**) et une microgliose (**Fig. 40M,P**) étendue dans le gyrus denté des souris 5xFAD injectées avec la fraction sarkosyl AD. Ces réactions gliales étaient significativement augmentées dans ces souris par rapport aux souris 5xFAD non-injectées ou injectées avec la fraction sarkosyl CTL (**Fig. 40S,T**). Les astrocytes réactifs et les cellules microgliales réactives étaient majoritairement localisés autour des plaques amyloïdes dans les souris 5xFAD injectées avec les protéines PHF-tau de la fraction sarkosyl AD (**Fig. 40H,P**). Aucune différence dans la surface occupée par les astrocytes ou les cellules microgliales n'a été observée entre les souris WT injectées avec la fraction sarkosyl AD et les souris WT injectées avec la fraction sarkosyl CTL (**Fig. 40Q,R**).



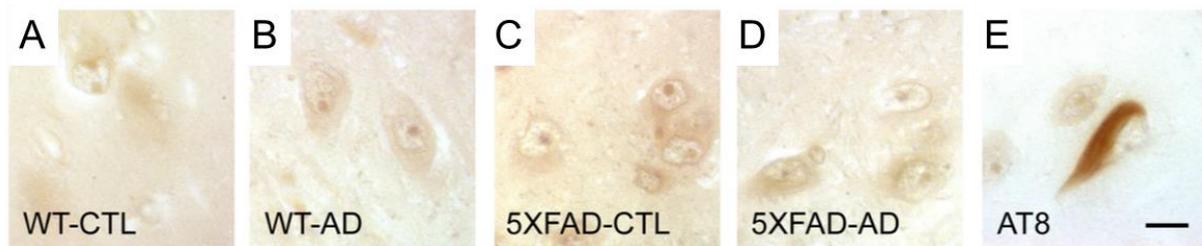
**Fig. 40 : L'injection intraveineuse de PHF-tau aggrave la neuroinflammation dans des souris 5xFAD.** Immunomarquage du gyrus denté des souris WT (A-B, I-J) et des souris 5xFAD (C-H3, K-P3) non injectées (C et F1-3, K et N1-3) ou injectées avec une fraction sarkosyl contrôle (CTL) (A,D et G1-3 ; I,L et O1-3) ou une fraction sarkosyl AD (B,E et H1-3 ; J,M et P1-3) avec l'anticorps anti-GFAP (A-H3) ou l'anticorps anti-Iba1 (I-P3). Les images illustrées en F1, G1, H1, N1, O1 et P1 sont des agrandissements du gyrus denté représenté en C, D, E, K, L et M respectivement. Les coupes ont été contre-colorées avec la coloration à la Thioflavine S (F3, G3 et H3 ; N3, O3 et P3) qui montrent les dépôts amyloïdes en vert. Les astrocytes mis en évidence par l'anticorps GFAP (F1,G1,H1) et les cellules microgliales mises en évidence par l'anticorps Iba1 (N1,O1,P1) se situent autour des plaques amyloïdes (en vert) (F2,G2,H2 et N2,O2,P2). La quantification de la surface occupée par les astrocytes (immunomarquage GFAP) ou par les cellules microgliales (immunomarquage Iba1) dans le gyrus denté des souris WT et 5xFAD non injectées ou injectées avec une fraction sarkosyl CTL ou AD a montré une augmentation significative de la surface occupée par les astrocytes (S) et par les cellules microgliales (T) dans les souris 5xFAD injectées avec la fraction sarkosyl AD comparée aux souris 5xFAD non injectées ou injectées avec la fraction sarkosyl CTL. Test de Kruskal-Wallis, test *post hoc* de Dunn, ★  $p < 0,1$ .  $p = 0,0794$  (GFAP) et  $p = 0,0509$  (Iba1) ;  $n = 3$  par condition (Non Inj., CTL ou AD). Aucune différence significative n'a été observée dans les souris WT injectées avec la fraction sarkosyl AD comparées aux souris injectées avec la fraction sarkosyl CTL (Q,R). Test de Mann-Whitney (Two-

## Résultats

Tailed),  $p = 1$  (GFAP) et  $p = 0,8248$  (Iba1);  $n = 3$  par condition (CTL ou AD). Barres d'échelle : **A-E** et **I-M** : 250  $\mu\text{m}$  ; **F1-H1** et **N1-P1** : 40  $\mu\text{m}$  ; **F2/3-H2-3** et **N2/3-P2/3** : 80  $\mu\text{m}$ .

### 4.2.1.4. Analyse du sérum des souris injectées à la recherche d'anticorps anti-tau

Afin d'évaluer la présence (ou l'absence) d'une réponse immunitaire humorale périphérique contre les protéines PHF-tau injectées par voie intraveineuse dans les souris WT ou 5xFAD, nous avons utilisé le sérum de ces souris WT ou 5xFAD injectées avec la fraction sarkosyl AD ou CTL comme anticorps primaires pour réaliser un immunomarquage sur des coupes de cerveaux de patients atteints de la MA. Aucun marquage n'a été observé sur les coupes de cerveaux avec les différents sérums (**Fig. 41A-D**). Une coupe adjacente de cerveau Alzheimer a été immunomarkuée avec l'anticorps anti-phospho tau AT8, qui met en évidence les DNF, pour servir de contrôle positif (**Fig. 41E**).



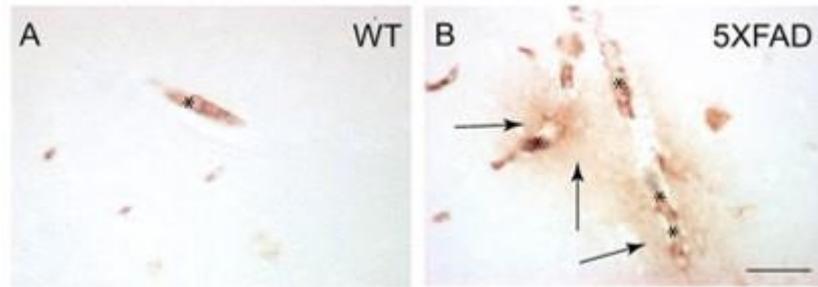
**Fig. 41 :** L'injection intraveineuse de PHF-tau n'induit pas la production d'anticorps anti-tau. Immunomarquage de coupes d'hippocampe d'un patient Alzheimer avec le sérum de souris WT (**A-B**) et 5xFAD (**C-D**) injectées avec une fraction sarkosyl contrôle (CTL) (**A,C**) ou AD (**B,D**). Les sérums des souris injectées ne montrent aucune immunoréactivité sur les coupes de cerveau de ce patient Alzheimer. Un immunomarquage avec l'anticorps AT8 a été utilisé comme contrôle positif (**E**). Barre d'échelle : 10  $\mu\text{m}$ .

### 4.2.1.5. Analyse de la perméabilité de la BHE des souris 5xFAD

De manière surprenante, l'effet d'une injection intraveineuse de protéines PHF-tau (fraction sarkosyl AD) sur les pathologies tau ou amyloïde et sur la neuroinflammation a été observé uniquement dans le cerveau des souris 5xFAD et non dans le cerveau des souris WT.

Des études précédentes ont montré que la barrière hémato-encéphalique (BHE) a une perméabilité plus élevée dans le cerveau des souris 5xFAD (Kook et al., 2012, Batarseh et al., 2017), ce qui suggère que les protéines PHF-tau pourraient plus facilement pénétrer dans le cerveau des souris 5xFAD par rapport aux souris WT.

Pour confirmer cette observation dans notre modèle murin, nous avons analysé la présence des immunoglobulines murines autour des vaisseaux sanguins dans le cerveau des souris WT ou 5xFAD. Nous avons observé une immunoréactivité diffuse pour les immunoglobulines de souris autour des vaisseaux sanguins cérébraux des souris 5xFAD (**Fig. 42B**). Dans le cerveau des souris WT, les immunoglobulines murines ont uniquement été observées à l'intérieur des vaisseaux sanguins (**Fig. 42A**). Ces résultats indiquent que la BHE des souris 5xFAD possède une perméabilité plus élevée, ce qui conduit à l'extravasation des immunoglobulines. Ceci pourrait expliquer l'effet différentiel des injections intraveineuses observé entre la souris WT et la souris 5xFAD.



**Fig. 42 : Des immunoglobulines extravasées ont été détectées dans le cerveau de souris 5xFAD.** Détection des immunoglobulines (anticorps) murines dans le cerveau de souris WT (A) et 5xFAD (B). Un immunomarquage diffus (flèches) a été observé autour des vaisseaux sanguins (étoiles) chez les souris 5xFAD (B) tandis qu'aucune extravasation d'immunoglobulines n'a été détectée autour des vaisseaux sanguins (étoile) chez les souris WT (A). Barre d'échelle : 50  $\mu$ m.

---

***En conclusion :***

- ⇒ *Les PHF-tau injectés en intraveineuse exacerbent les pathologies tau et amyloïde et la neuroinflammation dans le cerveau des souris 5xFAD.*
  - ⇒ *Les PHF-tau injectés en intraveineuse n'induisent pas la production d'anticorps anti-tau dans les souris WT ou 5xFAD.*
  - ⇒ *La perméabilité de la BHE des souris 5xFAD est plus élevée.*
- 

Les résultats obtenus sur les injections intravasculaires ont fait l'objet d'une publication :

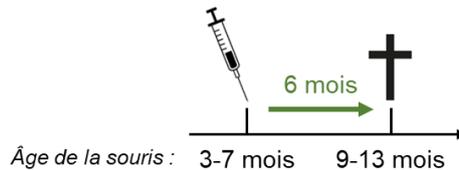
Houben S, de Fisenne MA, Ando K, Vanden Dries V, Poncelet L, Yilmaz Z, Mansour S, De Decker R, Brion JP, Leroy K. **Intravenous Injection of PHF-Tau Proteins From Alzheimer Brain Exacerbates Neuroinflammation, Amyloid Beta, and Tau Pathologies in 5XFAD Transgenic Mice.** Front Mol Neurosci. 2020 Jul 14;13:106. doi: 10.3389/fnmol.2020.00106. PMID: 32765217; PMCID: PMC7381181.

*L'article de recherche peut être consulté à la fin de ce manuscrit.*

#### 4.2.2. Injection intraoculaire de PHF-tau humains dans des souris Tg22, WT, hTau et TauKO

Dans cette partie du travail, nous avons étudié l'effet d'une injection intraoculaire de PHF-tau humains (fraction sarkosyl AD) (2 µg) dans des souris WT, hTau, Tg22 et TauKO.

Les souris étaient âgées de 3 à 7 mois lors de l'injection et ont été sacrifiées 6 mois plus tard, entre l'âge de 9 et 13 mois (**Fig. 43**).



**Fig. 43** : Schéma expérimental temporel des injections intraoculaires.

##### 4.2.2.1. Expression et localisation de la protéine tau dans la rétine

Dans cette étude, les expériences ont été réalisées avec des souris qui expriment la protéine tau murine (souris WT), la protéine tau humaine sauvage en l'absence de la protéine tau murine (souris hTau), la protéine tau humaine mutée et la protéine tau murine (souris Tg22) ou avec des souris qui n'expriment plus de protéine tau (souris TauKO). Il était avant tout primordial de vérifier l'expression des protéines tau dans la rétine car les phénomènes de nucléation et de propagation ne peuvent avoir lieu qu'en présence des protéines cibles.

Pour évaluer la distribution des protéines tau dans la rétine de ces différents modèles murins, des immunomarquages ont été effectués avec des anticorps anti-tau total ou anti-tau humain sur la rétine des souris WT (**Fig. 44A et I**), hTau (**Fig. 44B et J**), Tg22 (**Fig. 44C et K**) et TauKO (**Fig. 44D et L**). L'illustration d'une coupe de cerveau d'un patient atteint de la MA immunomarquée avec l'anticorps anti-tau total ou anti-tau humain est présentée dans la **Fig. Sup. 4**.

Les protéines tau (totales) ont été détectées dans la couche des cellules ganglionnaires (GCL pour « Ganglion Cell Layer » en anglais), les couches plexiformes interne et externe (IPL « Inner Plexiform Layer » et OPL « Outer Plexiform Layer ») et la couche nucléaire interne (INL « Inner Nuclear Layer ») de la rétine des souris WT (**Fig. 44A**), hTau (**Fig. 44B**) et Tg22 (**Fig. 44C**). Dans le cerveau, au niveau du CA1 de la corne d'Ammon de l'hippocampe, les protéines tau totales sont localisées dans les prolongements axonaux des neurones des souris WT (**Fig. 44E**) et hTau (**Fig. 44F**), ce qui se visualise sur les coupes histologiques par une coloration brunâtre du neuropile. Dans l'hippocampe des souris Tg22 (**Fig. 44G**), les protéines tau totales sont détectées dans le corps cellulaire des neurones. La translocation des protéines tau axonales vers le compartiment somato-dendritique est un marqueur pathologique des tauopathies.

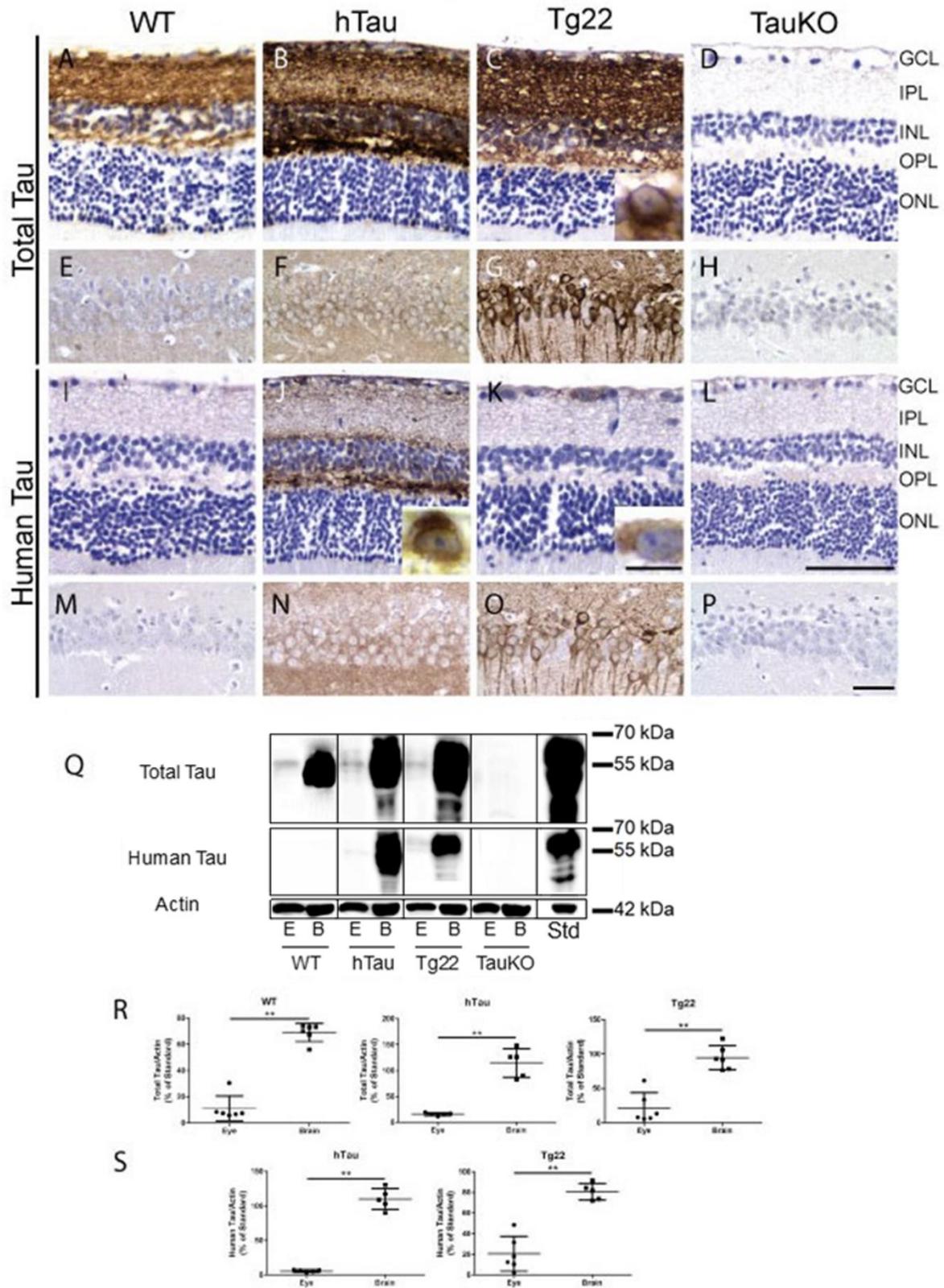
Les protéines tau humaines ont été décelées dans la couche des cellules ganglionnaires (GCL) et dans les couches plexiformes interne et externe de la rétine des souris hTau (**Fig. 44J**). Dans la rétine des souris Tg22 (**Fig. 44K**), les protéines tau humaines étaient seulement présentes dans le corps cellulaire des cellules ganglionnaires. Au niveau de l'hippocampe des souris Tg22 (**Fig. 44O**), les protéines tau humaines, exprimées par le transgène, sont observées dans le corps cellulaire des neurones. Dans l'hippocampe des souris hTau (**Fig. 44N**), l'expression du transgène, qui code pour les protéines tau humaines sauvages, est visualisée

## Résultats

dans le neuropile, reflétant la localisation axonale normale des protéines tau. Les protéines tau humaines n'ont pas été détectées ni dans la rétine (**Fig. 44I**) ni dans le cerveau des souris WT (**Fig. 44M**). Les protéines tau totales (**Fig. 44D et H**) ou humaines (**Fig. 44L et P**) n'ont pas été observées dans la rétine (**Fig. 44D et L**) ou le cerveau (**Fig. 44H et P**) des souris TauKO (**Fig. 44D et H, L et P**), comme attendu.

De plus, la quantification des bandes obtenues en western blotting avec l'anticorps anti-tau total (DAKO) et normalisées sur l'actine (**Fig. 44Q**), a montré que l'expression des protéines tau totales dans les souris WT, hTau et Tg22 était significativement plus basse dans la rétine par rapport au cerveau (**Fig. 44R**).

L'analyse des homogénats de rétine et de cerveau par western blotting à l'aide de l'anticorps anti-tau humain (BR21) (sur l'actine) (**Fig. 44Q**) a également montré que le cerveau des souris hTau et Tg22 avait une expression significativement plus élevée des protéines tau humaines par rapport à la rétine (**Fig. 44S**).



**Fig. 44 :** Localisation et expression des protéines tau dans la rétine de souris WT, hTau, Tg22 et TauKO. Immunomarquage de la rétine (A-D et I-L) et de l'hippocampe (E-H et M-P) de souris WT (A,E,I,M), hTau (B,F,J,N), Tg22 (C,G,K,O) et TauKO (D,H,L,P) avec l'anticorps anti-tau total (A-H) ou avec l'anticorps anti-tau humain (I-P). Western blotting d'homogénats d'yeux (« eye ») ou de cerveaux (« brain ») de souris WT, hTau, Tg22 et TauKO avec l'anticorps anti-tau total ou avec l'anticorps anti-tau humain (Q). L'actine a été utilisée comme contrôle de charge. La quantification de

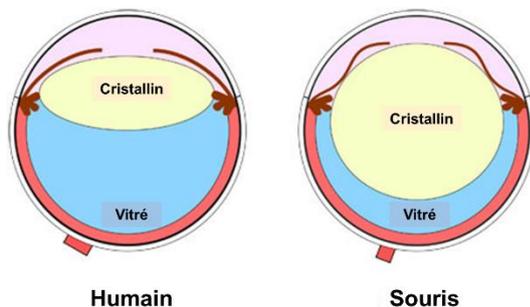
## Résultats

l'expression des protéines tau totales (**R**) ou des protéines tau humaines (**S**) dans les homogénats d'yeux et de cerveaux des souris WT, hTau et Tg22 a montré un taux d'expression significativement plus élevé dans les cerveaux par rapport aux yeux des différents modèles murins. Les résultats obtenus sont exprimés en un pourcentage par rapport à un standard (**Std**) pris comme référence et qui correspond au 100 %. Le standard utilisé est un homogénat de cerveau d'une souris Tg30. Test de Mann-Whitney (Two-Tailed),  $**p < 0,01$ . Total tau :  $p = 0,0022$  (WT),  $p = 0,0079$  (hTau) et  $p = 0,0022$  (Tg22) ; tau humain :  $p = 0,0079$  (hTau) et  $p = 0,0043$  (Tg22) ; WT (n=6), hTau (n=5) et Tg22 (n=6). **GCL** : couche des cellules ganglionnaires (Ganglion Cell Layer), **IPL** : couche plexiforme interne (Inner Plexiform Layer), **INL** : couche nucléaire interne (Inner Nuclear Layer), **OPL** : couche plexiforme externe (Outer Plexiform Layer) et **ONL** : couche nucléaire externe (Outer Nuclear Layer). Barres d'échelle : **L et P** : 50  $\mu\text{m}$ , petite image en **K** : 10  $\mu\text{m}$ .

### 4.2.2.2. Validation de la méthode d'injection

Nous avons tout d'abord vérifié notre méthode d'injection intraoculaire. Pour ce faire, nous avons injecté une solution contenant la sous-unité B de la toxine du choléra dans la chambre postérieure de l'œil (qui contient l'humeur vitrée) de souris WT. Une des difficultés techniques réside dans la large taille du cristallin et du petit volume de vitré des souris. En comparaison, l'humain possède un cristallin plus petit et un plus grand volume d'humeur vitrée (**Fig. 45**).

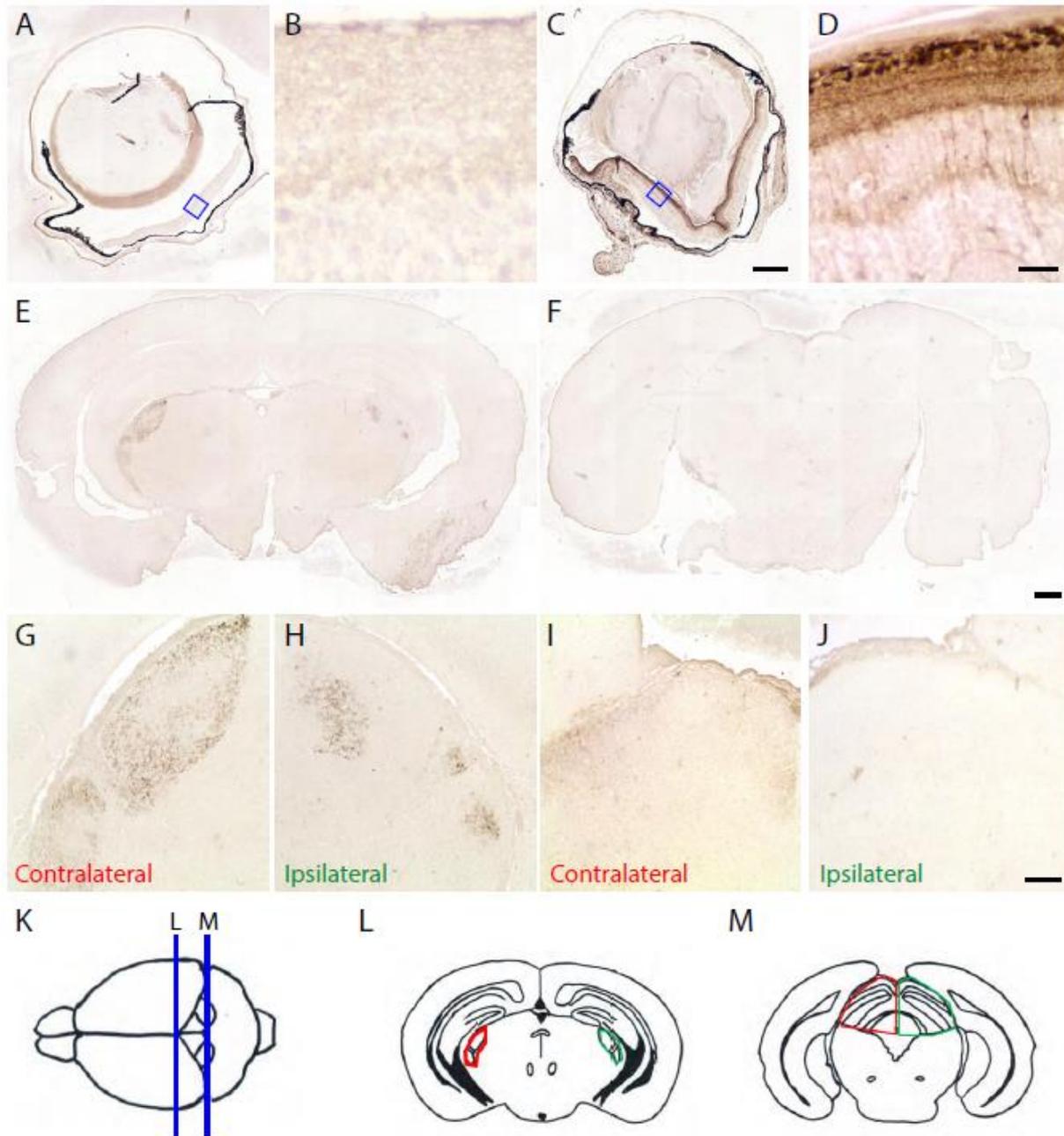
La sous-unité B de la toxine du choléra est la partie de la toxine qui se lie aux gangliosides (GM1) présents dans la membrane plasmique des cellules. Une fois liée, la sous-unité B est endocytée par la cellule. La toxine complète comprend aussi la sous-unité A, qui possède une activité enzymatique (toxique) mais n'est pas présente dans la solution commerciale utilisée dans ce travail. La sous-unité B est utilisée comme traceur neuronal pour le transport antérograde.



**Fig. 45** : Comparaison de l'œil humain et murin. La souris possède un volume de vitré réduit dû à son large cristallin. Image modifiée de (Skeie et al., 2011).

La toxine du choléra a été visualisée par immunohistochimie avec l'anticorps anti-toxine du choléra 24 heures après l'injection dans la couche des cellules ganglionnaires de la rétine (**Fig. 46C,D**), dans le corps genouillé latéral (**Fig. 46E**) et dans le colliculus supérieur (**Fig. 46F**) dans la partie contralatérale du cerveau (la partie opposée à l'œil injecté) (**Fig. 46G,I**) comme décrit précédemment dans la littérature (Angelucci et al., 1996). Nous avons également observé quelques fibres axonales dans la partie ipsilatérale du corps genouillé latéral (la partie située du côté de l'œil injecté) (**Fig. 46H**).

L'analyse du corps genouillé latéral (**Fig. 46L**) et du colliculus supérieur (**Fig. 46M**) ont été réalisées par la suite dans les zones cérébrales illustrées dans le schéma de la **Fig. 46**. Les aires cérébrales entourées en vert et en rouge représentent les zones ipsilatérales et les zones contralatérales respectivement (**Fig. 46L et M**).



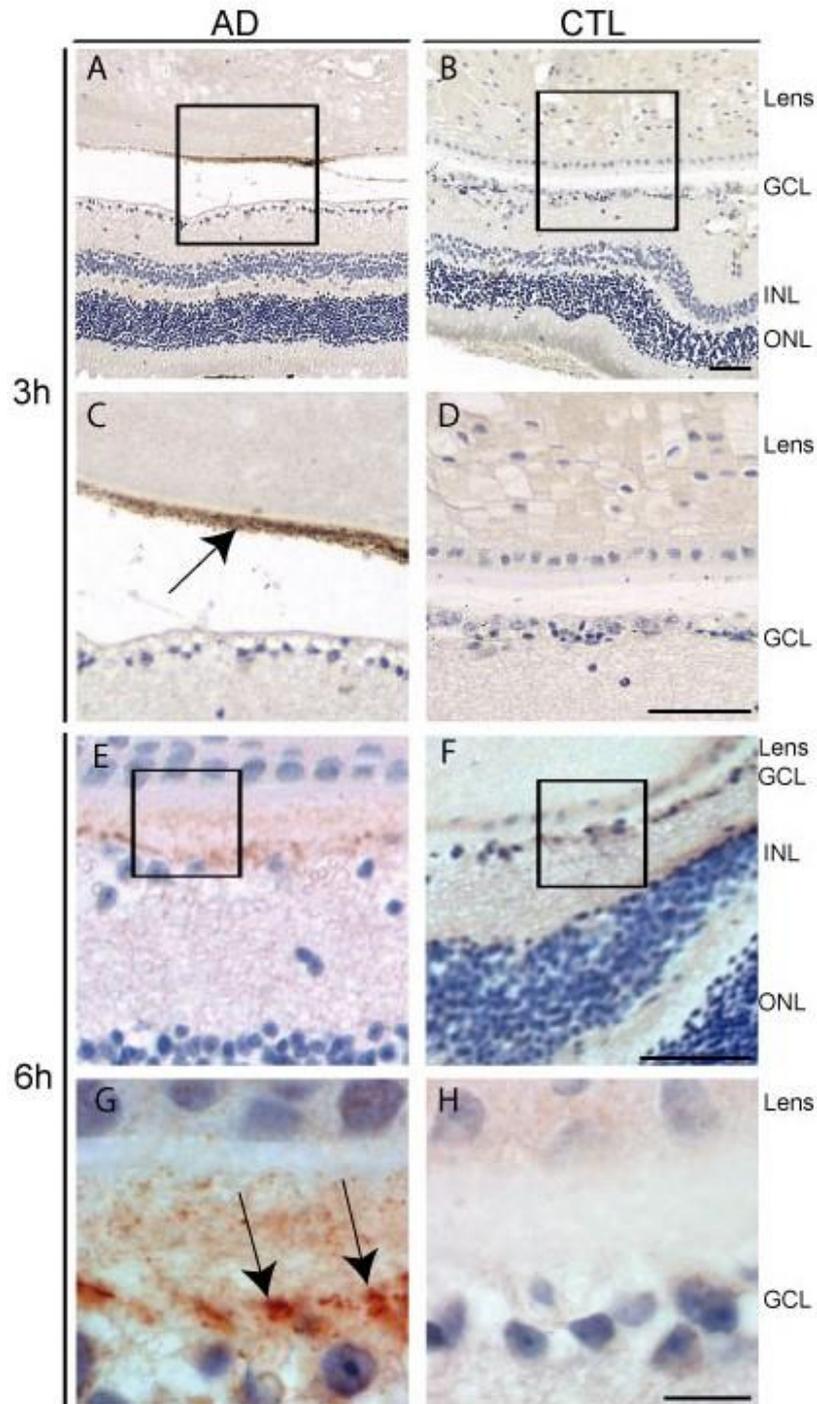
**Fig. 46 : Détection de la sous-unité B de la toxine du choléra dans la rétine et le cerveau de souris WT injectées en intraoculaire.** Immunomarquage des yeux (A-D) et du cerveau (E-J) des souris WT injectées dans la chambre vitrée de l'œil avec du sérum physiologique (A) ou avec la sous-unité B de la toxine du choléra (C,E,F) avec l'anticorps anti-toxine du choléra. Les images en B et D sont des agrandissements de la partie de la rétine qui est encadrée en bleu en A et C respectivement et les images en G, H, I et J sont des agrandissements des parties contralatérale (G) et ipsilatérale (H) du corps genouillé latéral et des parties contralatérale (I) et ipsilatérale (J) du colliculus supérieur. Les illustrations schématiques de coupes coronales du cerveau orienté de manière antéro-postérieure (K) montrent les zones contralatérales (entourées en rouge) et les zones ipsilatérales (entourées en vert) utilisées pour analyser et quantifier la formation d'une pathologie tau dans le corps genouillé latéral (L) et le colliculus supérieur (M). Barres d'échelle : C : 200  $\mu$ m, D : 20  $\mu$ m, F : 200  $\mu$ m et J : 40  $\mu$ m.

#### **4.2.2.3. Analyse de l'internalisation des PHF-tau dans les neurones ganglionnaires de la rétine**

Nous avons ensuite vérifié que les protéines PHF-tau pouvaient être internalisées par les cellules ganglionnaires de la rétine. En effet, l'internalisation des protéines tau pathologiques est une étape fondamentale pour les processus ultérieurs de nucléation et de propagation de ces protéines tau pathologiques.

Nous avons examiné les yeux des souris TauKO, par immunohistochimie, à la recherche des PHF-tau injectés en intravitréen 10 min., 30 min., 1, 3, 6, 24 heures et 5 jours après l'injection. Nous avons utilisé l'anticorps anti-tau humain BR21 pour mettre en évidence les protéines tau injectées.

3 heures après l'injection, les PHF-tau ont été observés dans la chambre postérieure de l'œil (près du cristallin sur les images illustrées en **(Fig. 47A et C)** dans les souris injectées avec la fraction sarkosyl AD. 6 heures après l'injection, les PHF-tau ont été détectés dans le corps cellulaire des cellules ganglionnaires de la rétine **(Fig. 47 E et G)**. Les yeux des souris injectées avec la fraction sarkosyl contrôle (CTL) n'ont pas montré de marquage positif, comme attendu **(Fig. 47B,D,F et H)**. Les PHF-tau n'étaient plus détectables dans la rétine 24 heures après l'injection (*données non représentées*).

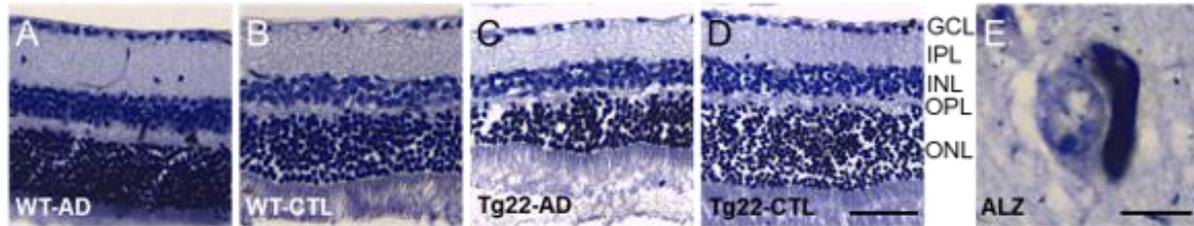


**Fig. 47 : Les PHF-tau sont détectés dans le cytoplasme des cellules ganglionnaires de la rétine 6 heures après l'injection.** Immunomarquage de l'œil d'une souris TauKO injectée avec une fraction sarkosyl AD (A et C, E et G) ou avec une fraction sarkosyl contrôle (CTL) (B et D, F et H) avec l'anticorps anti-tau humain (BR21), 3 heures (A-D) ou 6 heures (E-H) après l'injection intraoculaire. Les protéines PHF-tau ont été détectées (flèche) près de la partie postérieure du cristallin (« Lens ») 3 heures après l'injection (C) et ont été observées (flèches) à l'intérieur du cytoplasme des cellules ganglionnaires de la rétine (« GCL ») 6 heures après l'injection (G). Les images en C, D, G et H sont des agrandissements des parties de l'œil encadrées en A, B, G et H respectivement. **Lens** : cristallin, **GCL** : couche des cellules ganglionnaires (Ganglion Cell Layer), **INL** : couche nucléaire interne (Inner Nuclear Layer) et **ONL** : couche nucléaire externe (Outer Nuclear Layer). Barres d'échelle : **B, D et F** : 50 µm ; **H** : 10 µm.

#### 4.2.2.4. Analyse de la pathologie tau dans le système visuel

##### 4.2.2.4.1. Analyse de l'état d'agrégation de la protéine tau dans la rétine

Afin d'évaluer si les PHF-tau internalisés par les cellules ganglionnaires de la rétine avaient engendré une agrégation des protéines tau endogènes exprimées dans la rétine, nous avons analysé la rétine des souris WT (**Fig. 48A,B**) ou Tg22 (**Fig. 48C,D**) injectées avec la fraction sarkosyl AD (**Fig. 48A,C**) ou CTL (**Fig. 48B,D**) 6 mois après l'injection à l'aide de la coloration Gallyas. Aucune structure colorée par le Gallyas n'a été observée dans la rétine de ces différentes lignées murines injectées AD ou CTL.

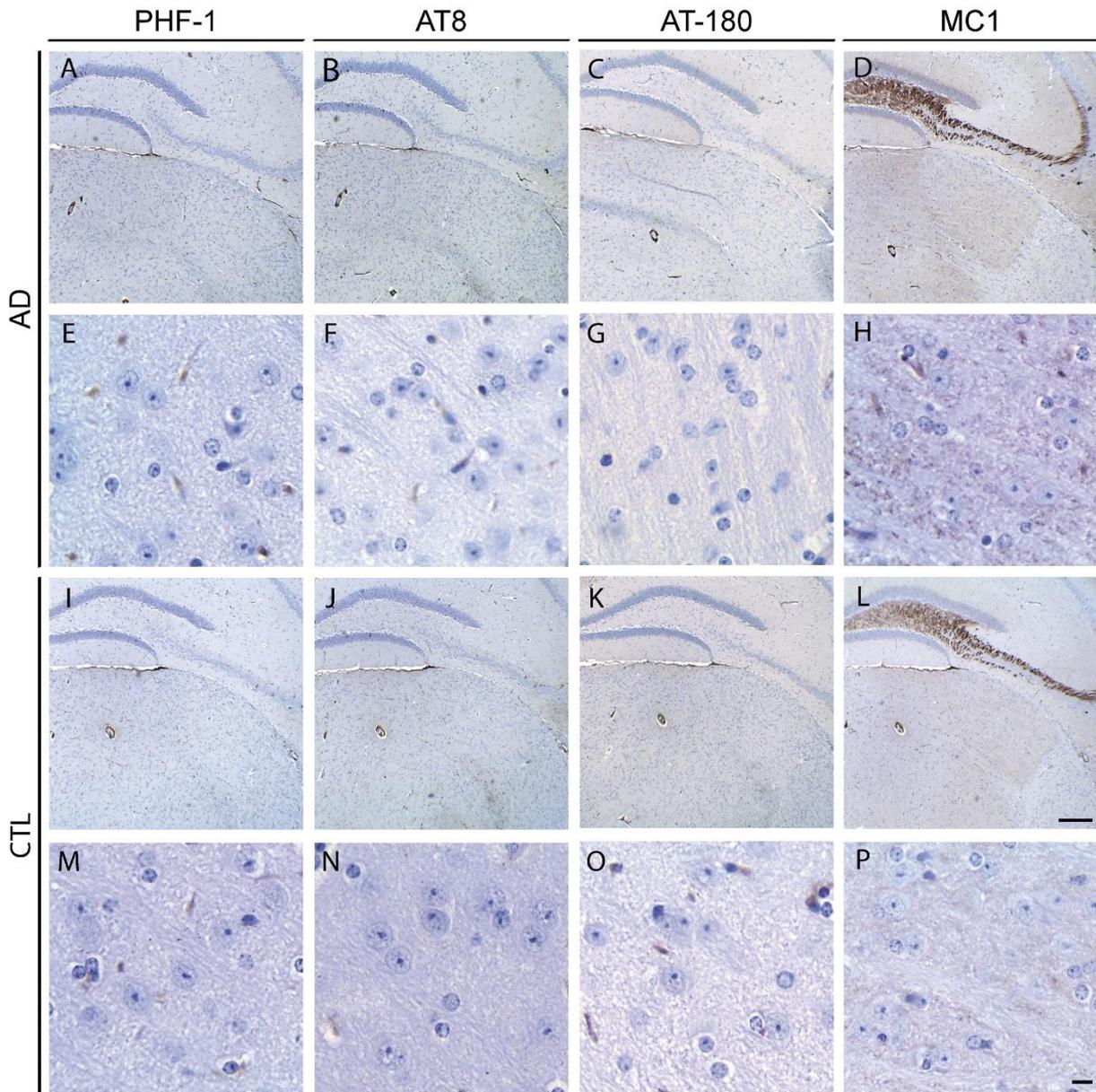


**Fig. 48 :** Les PHF-tau n'induisent pas l'agrégation de protéines tau dans la rétine. Coloration Gallyas de la rétine de souris WT (**A,B**) ou Tg22 (**C,D**) injectées avec une fraction sarkosyl AD (**A,C**) ou CTL (**B-D**). Aucune structure colorée au Gallyas n'a été observée. Une coupe de cerveau humain atteint de la MA (ALZ) a été utilisée comme contrôle positif (**E**). **GCL** : couche des cellules ganglionnaires (Ganglion Cell Layer), **IPL** : couche plexiforme interne (Inner Plexiform Layer), **INL** : couche nucléaire interne (Inner Nuclear Layer), **OPL** : couche plexiforme externe (Outer Plexiform Layer) et **ONL** : couche nucléaire externe (Outer Nuclear Layer). Barres d'échelle : **D** : 50  $\mu$ m et **E** : 10  $\mu$ m.

##### 4.2.2.4.2. Analyse du corps genouillé latéral

Ensuite, afin d'évaluer la propagation d'une pathologie tau le long du système visuel après l'internalisation des protéines PHF-tau dans les cellules ganglionnaires de la rétine, nous avons réalisé des immunomarquages avec des anticorps reconnaissant les protéines tau phosphorylées sur les sérines 396/404 (anticorps PHF-1), sur les sérines 202/thréonine 205 (anticorps AT8), sur les thréonines 231 (anticorps AT-180) et avec un anticorps reconnaissant une conformation anormale de la protéine tau (anticorps MC1) sur des coupes histologiques de cerveaux de souris WT, hTau et Tg22 injectées avec la fraction sarkosyl CTL ou AD.

Nous avons tout d'abord analysé le corps genouillé latéral 6 mois après l'injection intraoculaire. Aucune pathologie tau n'a été observée dans le corps genouillé latéral des souris WT, hTau et Tg22 injectées avec la fraction AD ou CTL. Le corps genouillé latéral des souris Tg22 est illustré dans la **Fig. 49**.



**Fig. 49<sup>11</sup> : Les PHF-tau n'induisent pas une pathologie tau dans le corps genouillé latéral.** Immunomarquage du corps genouillé latéral des souris Tg22 injectées dans la chambre postérieure de l'œil avec une fraction sarkosyl AD (**A-H**) ou contrôle (CTL) (**I-P**), avec l'anticorps PHF-1 (pSer396/404) (**A,E,I,M**), l'anticorps AT8 (pSer202/Thr205) (**B,F,J,N**), l'anticorps AT-180 (pThr231) (**C,G,K,O**) ou avec l'anticorps conformationnel MC1 (**D,H,L,P**). AD (n = 5) et CTL (n = 4). Barres d'échelle : **L** : 200  $\mu$ m et **P** : 10  $\mu$ m.

<sup>11</sup> Une mise en évidence artéfactuelle des vaisseaux sanguins peut apparaître avec l'emploi d'anticorps secondaires anti-anticorps de souris, se reporter à la figure supplémentaire 5 (**Fig. Sup. 5**).

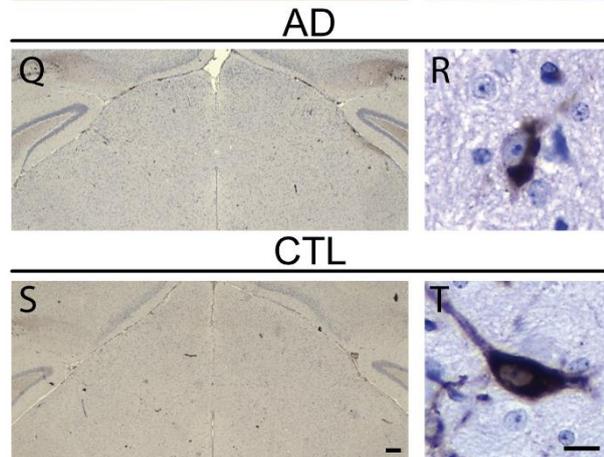
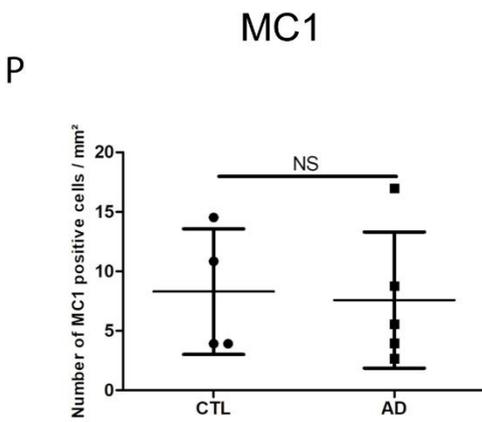
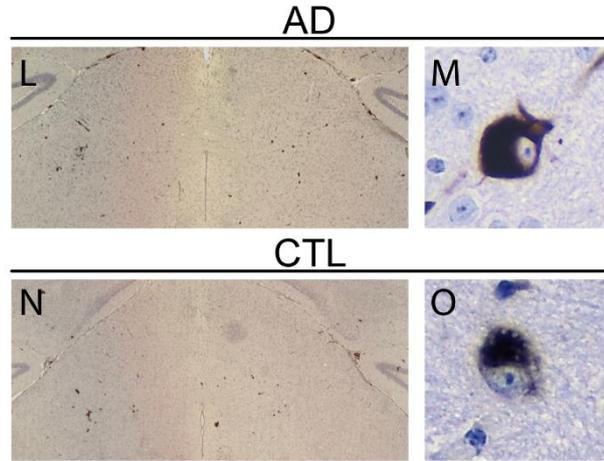
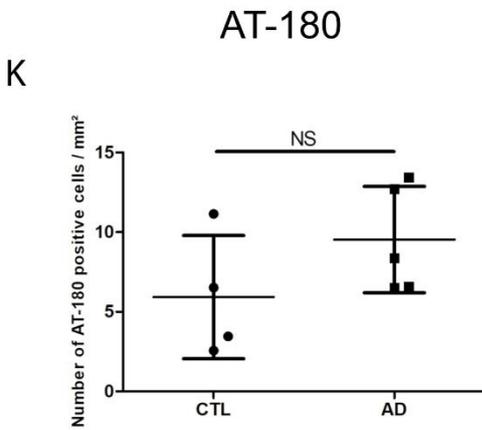
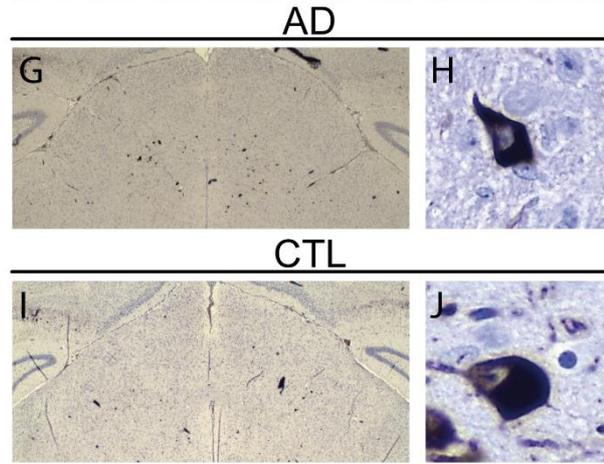
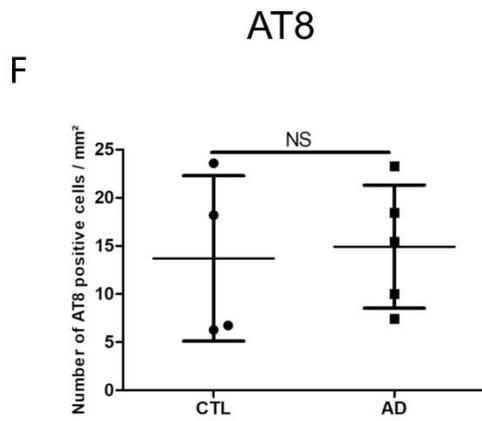
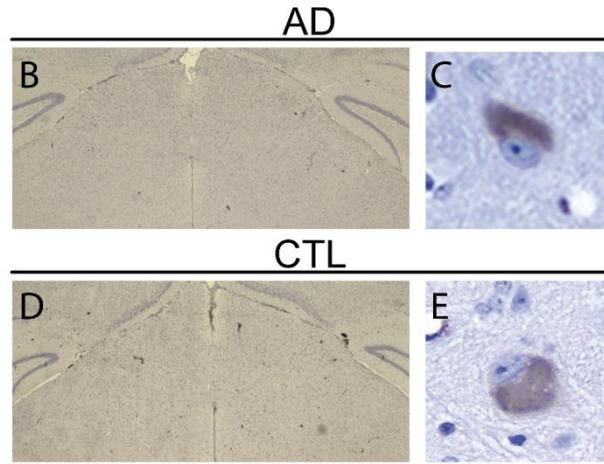
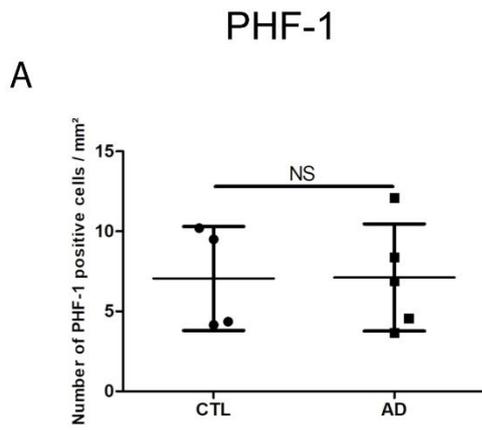
#### 4.2.2.4.3. *Analyse du colliculus supérieur*

Nous avons ensuite analysé le colliculus supérieur des souris WT, hTau et Tg22 injectées avec la fraction sarkosyl AD ou CTL 6 mois après l'injection intraoculaire en effectuant des immunomarquages avec les anticorps PHF-1, AT-8, AT-180 et MC1, ces anticorps reconnaissent les épitopes phosphorylés sur les Ser396/404, Ser202/Thr205, Thr231 et un changement pathologique de conformation de la protéine tau respectivement. Aucune pathologie tau n'a été détectée dans le colliculus supérieur des souris WT et hTau (*données non représentées*).

Dans le colliculus supérieur des souris Tg22, une pathologie tau a été détectée avec les anticorps PHF-1 (**Fig. 50B-E**), AT8 (**Fig. 50G-J**), AT-180 (**Fig. 50L-O**) et MC1 (**Fig. 50Q-T**) mais la quantification des cellules marquées par ces différents anticorps n'a montré aucune différence entre les souris injectées avec la fraction sarkosyl AD ou CTL (**Fig. 50A,F,K et P**).

Notons que nous avons regroupé les données des cellules quantifiées des côtés contralatéral et ipsilatéral car les tests statistiques effectués en amont ont montré, d'une part, qu'il n'y avait pas de différence significative entre les densités mesurées du côté contralatéral et les densités mesurées du côté ipsilatéral dans les souris injectées avec la fraction sarkosyl AD ou CTL pour les différents anticorps anti-tau (PHF-1, AT8, AT-180 et MC1) (**Tableau Sup. 1**).

D'autre part, les tests statistiques ont également montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les densités mesurées dans les souris injectées avec la fraction sarkosyl AD et les densités mesurées dans les souris injectées avec la fraction sarkosyl CTL dans le côté contralatéral ou le côté ipsilatéral pour les différents anticorps anti-tau (PHF-1, AT8, AT-180 et MC1) (**Tableau Sup. 2**).



**Fig. 50 :** Les PHF-tau n'induisent pas une aggravation de la pathologie tau dans le colliculus supérieur de souris Tg22. Immunomarquage du colliculus supérieur des souris Tg22 ayant reçu une injection intravitreuse d'une fraction sarkosyl AD (**B-C, G-H, L-M, Q-R**) ou CTL (**D-E, I-J, N-O, S-T**) avec l'anticorps PHF-1 (pSer396/404) (**B-E**), l'anticorps AT8 (pSer202/Thr205) (**G-J**), l'anticorps AT-180 (pThr231) (**L-O**) ou avec l'anticorps conformationnel MC1 (**Q-T**). La quantification du nombre de neurones marqués par les anticorps précités (PHF-1, AT8, AT-180 et MC1) ne montre aucune différence statistiquement significative entre les souris injectées avec la fraction sarkosyl AD ou CTL (**A** : PHF-1, **F** : AT-8, **K** : AT-180 et **P** : MC1). Test de Mann-Whitney (Two-Tailed),  $p = 0,8286$  (PHF-1),  $p = 0,6334$  (AT8),  $p = 0,0754$  (AT-180) et  $p = 0,6965$  (MC1). AD ( $n = 5$ ) et CTL ( $n = 4$ ). Barres d'échelle : **S** : 200  $\mu\text{m}$  et **T** : 10  $\mu\text{m}$ .

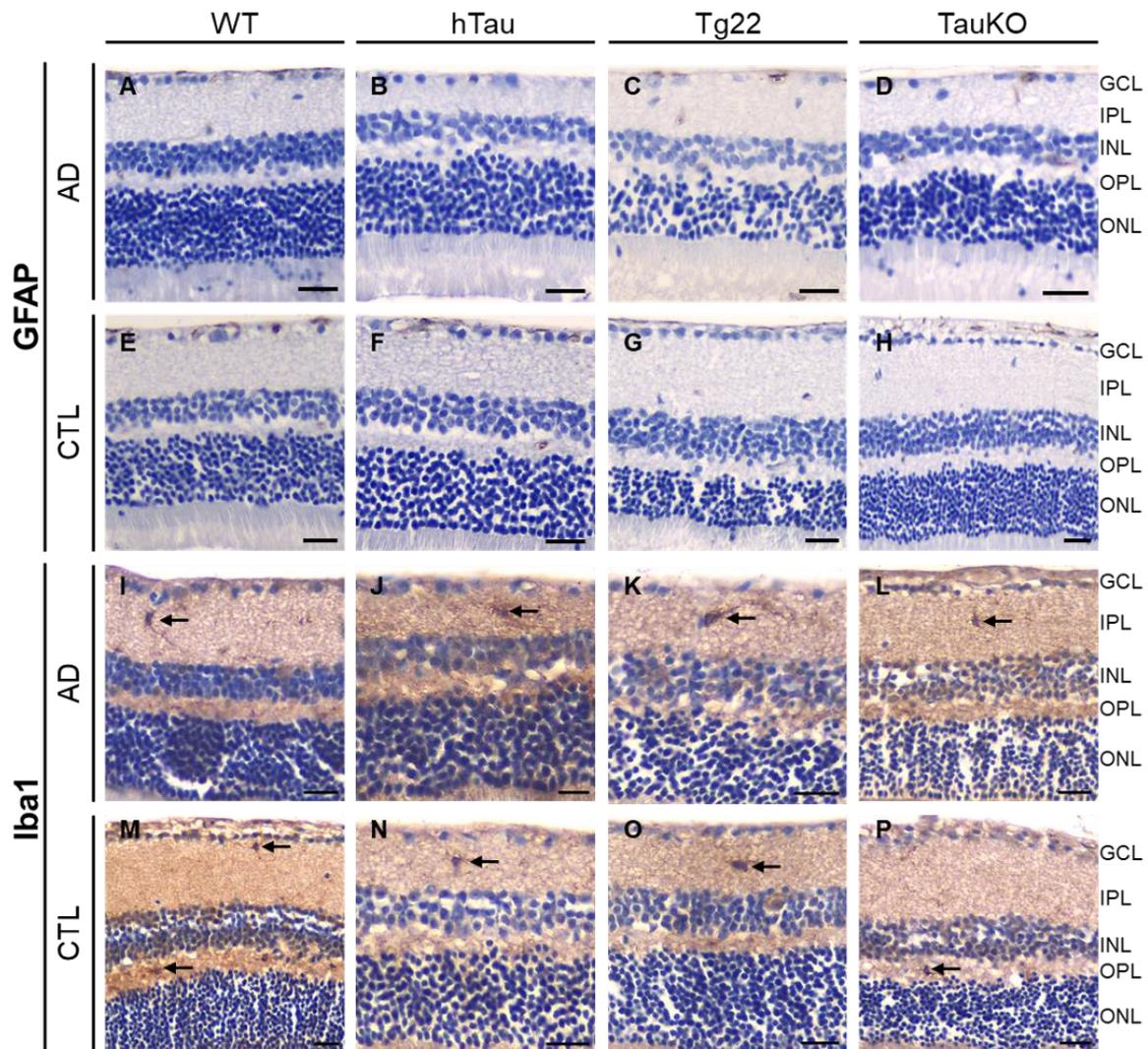
#### 4.2.2.5. Analyse de la neuroinflammation

##### 4.2.2.5.1. Dans la rétine

Après les analyses de la pathologie tau qui ont montré une absence de celle-ci le long du système visuel après l'injection de protéines PHF-tau, nous avons étudié la neuroinflammation dans la rétine et le colliculus supérieur. En effet, la présence d'une inflammation dans le cerveau, caractérisée par des astrocytes réactifs et des cellules microgliales activées, est un événement qui précède la neurodégénérescence dans la maladie d'Alzheimer et dans les maladies à prions (Eikelenboom et al., 2002).

Nous avons réalisé des immunomarquages sur la rétine et le cerveau de souris WT (**Fig. 51A,E,I,M**), hTau (**Fig. 51B,F,J,N**), Tg22 (**Fig. 51C,G,K,O**) et TauKO (**Fig. 51D,H,L,P**) injectées avec la fraction sarkosyl AD (**Fig. 51A-D,I-L**) ou CTL (**Fig. 51E-H,M-P**) avec les anticorps anti-GFAP (**Fig. 51A-H**) ou anti-Iba1 (**Fig. 51I-P**). La protéine GFAP est un filament intermédiaire exprimé par les astrocytes et la protéine Iba1 participe au processus de phagocytose des cellules microgliales.

Nous n'avons pas observé de cellules astrocytaires (réactives) (GFAP) dans la rétine des différentes lignées murines (**Fig. 51A-H**) 6 mois après l'injection des protéines PHF-tau (AD) (**Fig. 51A-D**) ou la fraction contrôle (CTL) (**Fig. 51E-H**) dans la chambre postérieure de l'œil. Quelques cellules microgliales ont été détectées dans les couches plexiformes interne et externe de la rétine des souris WT (**Fig. 51I,M**), hTau (**Fig. 51J,N**), Tg22 (**Fig. 51K,O**) et TauKO (**Fig. 49L,P**) mais la proportion de cellules observées dans les souris injectées avec la fraction sarkosyl AD (**Fig. 51I-L**) ou CTL (**Fig. 51M-P**) ne montre pas de différences entre les différents génotypes ou les différentes conditions.



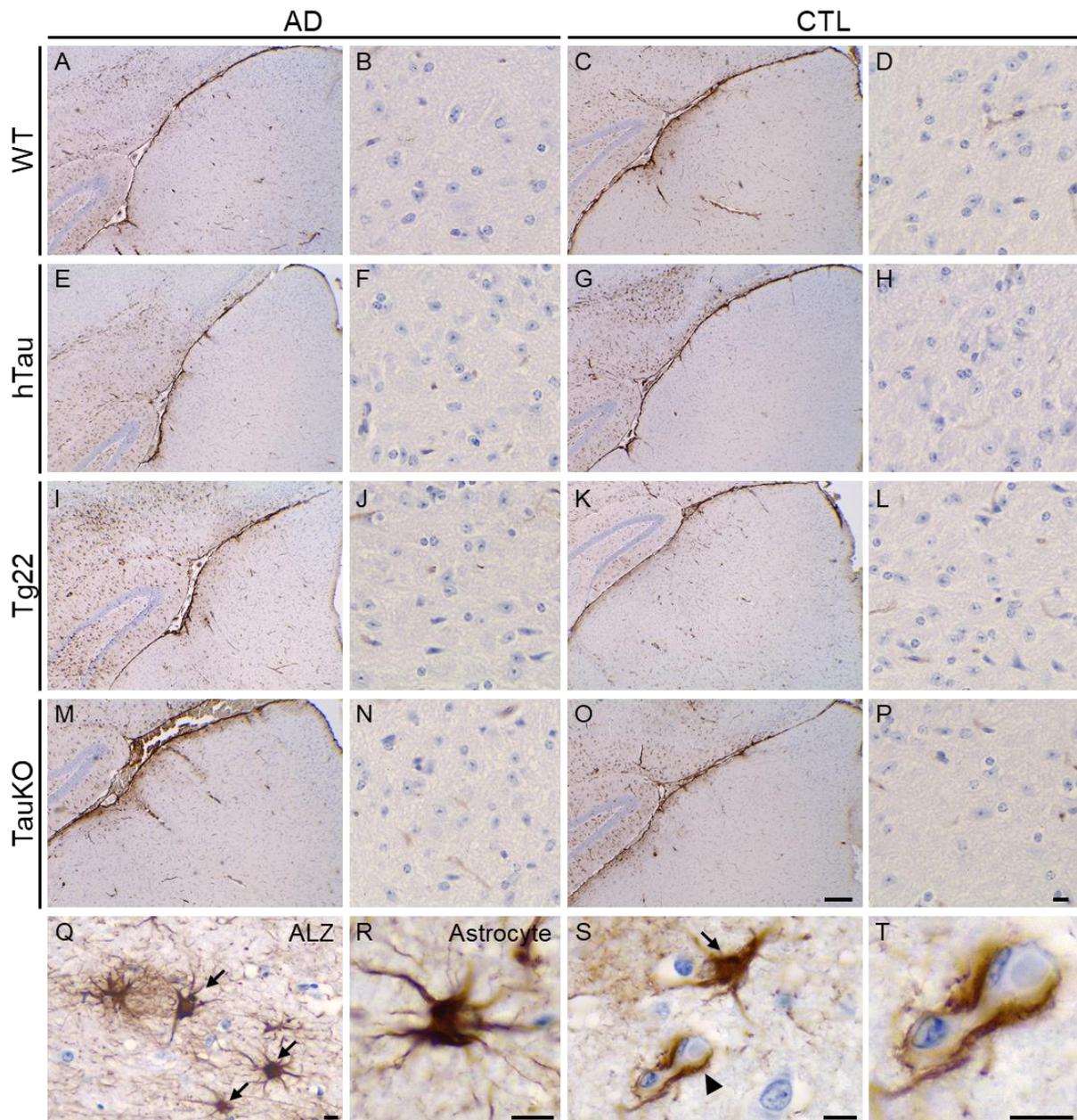
**Fig. 51 : Les PHF-tau n'induisent pas de neuroinflammation dans la rétine.** Immunomarquage de la rétine des souris WT (A,E,I,M), hTau (B,F,J,N), Tg22 (C,G,K,O) et TauKO (D,H,L,P) injectées dans la chambre postérieure de l'œil avec une fraction sarkosyl AD (A-D, I-L) ou CTL (E-H, M-P) avec l'anticorps GFAP (A-H) ou Iba1 (I-P) qui met en évidence les astrocytes et les cellules microgliales respectivement. Les astrocytes n'ont pas été observés dans la rétine des différentes lignées murines et dans les différentes conditions (AD ou CTL) (A-H). Quelques cellules microgliales ont été observées dans les couches plexiformes interne (IPL) et externe (OPL) de la rétine des souris WT (I,M), hTau (J,N), Tg22 (K,O) et TauKO (L,P) injectées avec la fraction sarkosyl AD (I-L) ou CTL (M-P). Néanmoins, l'analyse visuelle des coupes histologiques ne semble pas montrer de différences dans la proportion des cellules microgliales observées (I-P). **GCL** : couche des cellules ganglionnaires (Ganglion Cell Layer), **IPL** : couche plexiforme interne (Inner Plexiform Layer), **INL** : couche nucléaire interne (Inner Nuclear Layer), **OPL** : couche plexiforme externe (Outer Plexiform Layer) et **ONL** : couche nucléaire externe (Outer Nuclear Layer). Barres d'échelle : A-P : 20  $\mu$ m.

#### 4.2.2.5.2. *Dans le colliculus supérieur*

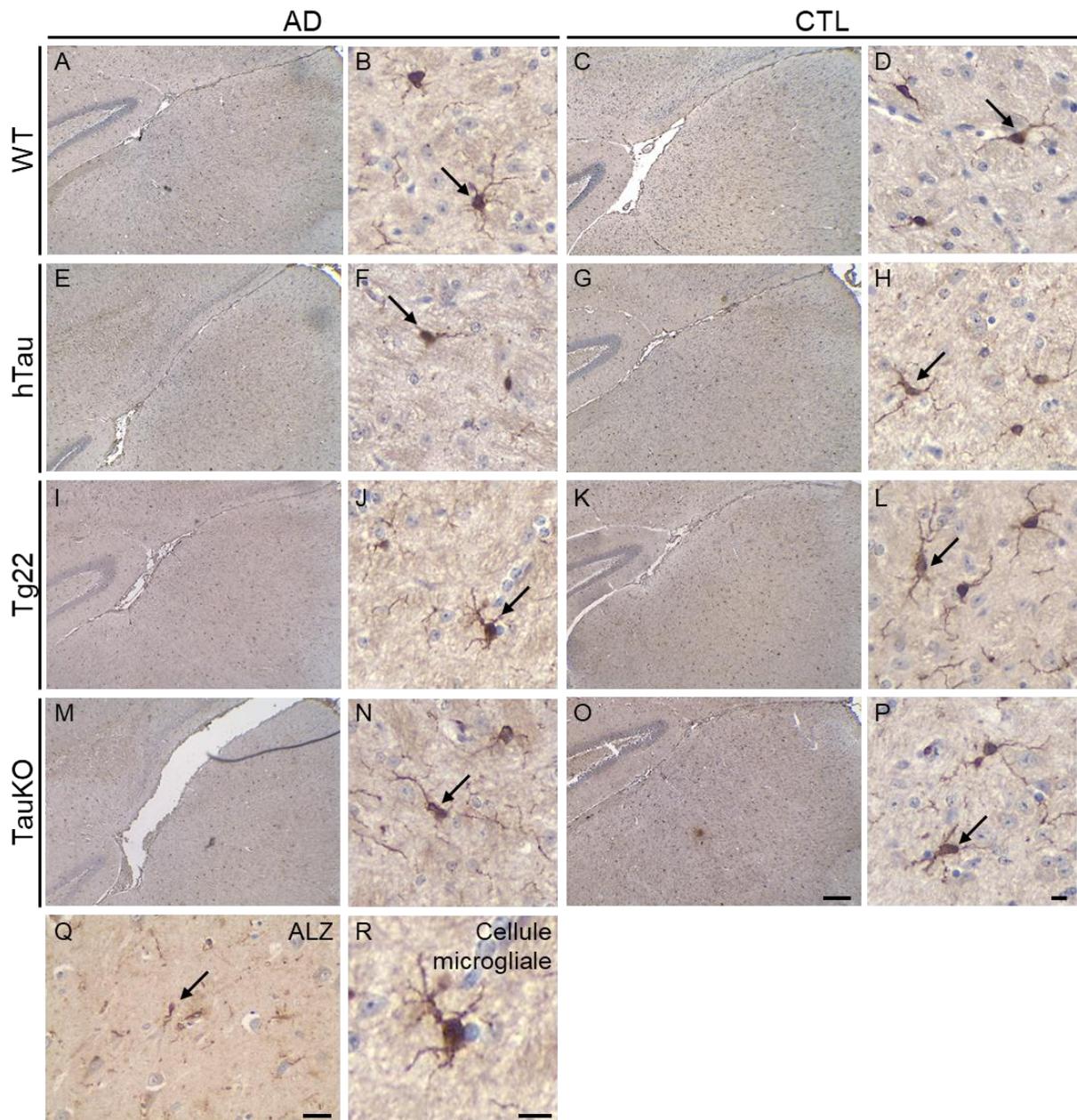
Nous avons ensuite étudié la présence d'une neuroinflammation dans le colliculus supérieur des souris WT, hTau, Tg22 et TauKO injectées avec la fraction sarkosyl AD ou CTL en réalisant des immunomarquages avec l'anticorps anti-GFAP (**Fig. 52**) qui reconnaît spécifiquement les astrocytes dans le système nerveux central ou avec l'anticorps Iba1 (**Fig. 53**) qui met en évidence les cellules microgliales.

Nous n'avons pas détecté la présence d'astrocytes réactifs dans le colliculus supérieur des différents génotypes et dans les différentes conditions (**Fig. 52A-P**) 6 mois après l'injection intraoculaire de PHF-tau (AD) ou la fraction contrôle (CTL).

A l'instar de la rétine, quelques cellules microgliales ont été observées dans le colliculus supérieur des souris WT (**Fig. 53E-H**), hTau (**Fig. 53A-D**), Tg22 (**Fig. 53I-L**) et TauKO (**Fig. 53M-P**) injectées avec la fraction sarkosyl AD (**Fig. 53A-B,E-F,I-J,M-N**) ou CTL (**Fig. 53C-D,G-H,K-L,O-P**). Néanmoins, l'analyse visuelle des coupes cérébrales ne révèle pas de différence entre les différents génotypes de souris ou entre les différentes conditions (CTL ou AD).



**Fig. 52 : Les PHF-tau n'induisent pas d'astroglie dans le colliculus supérieur.** Immunomarquage du colliculus supérieur des souris WT (A-D), hTau (E-H), Tg22 (I-L) et TauKO (M-P) injectées avec la fraction sarkosyl AD (A-B,E-F,I-J,M-N) ou CTL (C-D,G-H,K-L,O-P) avec l'anticorps GFAP qui reconnaît les astrocytes. Une coupe de cerveau d'un patient atteint de la MA (ALZ) (Q) montre des astrocytes réactifs (flèches) en brun. L'image (R) est un agrandissement d'une cellule astrocytaire. Les astrocytes (flèche) participent à la formation de la barrière hémato-encéphalique avec leurs pieds astrocytaires (tête de flèche) autour des capillaires cérébraux (S). L'image (T) est un agrandissement d'un capillaire cérébral entouré par des prolongements astrocytaires (en brun), un globule rouge est visible dans la lumière du vaisseau sanguin. Barres d'échelle : O : 200  $\mu$ m et P-T : 10  $\mu$ m.



**Fig. 53 :** Les PHF-tau n'induisent pas d'activation microgliale dans le colliculus supérieur. Immunomarquage du colliculus supérieur des souris WT (A-D), hTau (E-H), Tg22 (I-L) et TauKO (M-P) injectées avec la fraction sarkosyl AD (A-B,E-F,I-J,M-N) ou CTL (C-D,G-H,K-L,O-P) avec l'anticorps Iba1 qui reconnaît les cellules microgliales. Une coupe de cerveau d'un patient atteint de la MA (ALZ) (Q) montre quelques cellules microgliales (flèche) en brun. L'image (R) est un agrandissement d'une cellule microgliale. Barres d'échelle : O : 200  $\mu$ m, Q : 50  $\mu$ m, P et R : 10  $\mu$ m.

---

**En conclusion :**

- ⇒ *La protéine tau murine est exprimée dans la rétine des souris WT et Tg22.*
  - ⇒ *Le transgène qui code pour la protéine tau humaine est exprimé dans la rétine des souris hTau et Tg22.*
  - ⇒ *Les PHF-tau injectés en intraoculaire sont internalisés dans le cytoplasme des cellules ganglionnaires de la rétine.*
  - ⇒ *Les PHF-tau injectés en intraoculaire n'induisent pas de pathologie tau dans le système visuel (souris WT et hTau) ou n'aggravent pas la pathologie tau déjà présente dans le cerveau (souris Tg22).*
  - ⇒ *Les PHF-tau injectés en intraoculaire n'induisent pas de neuroinflammation.*
- 

Les résultats obtenus sur les injections intraoculaires ont fait l'objet d'une publication :

**de Fisenne MA, Yilmaz Z, De Decker R, Suain V, Buée L, Ando K, Brion JP, Leroy K. Alzheimer PHF-tau aggregates do not spread tau pathology to the brain via the Retino-tectal projection after intraocular injection in mouse models.** Neurobiol Dis. 2022 Sep 22:105875. doi: 10.1016/j.nbd.2022.105875. Epub ahead of print. PMID: 36154878.

*L'article de recherche peut être consulté à la fin de ce manuscrit.*

#### **4.3. Partie 3 : Analyses comparatives de la protéine tau et des kinases dans l'œil par rapport au cerveau de souris Tg22/30, WT, hTau, TauKO, 5xFAD et 5xFAD Tg30**

Etant donné que les PHF-tau humains induisent une pathologie tau dans le cerveau murin lorsqu'ils sont injectés en intracérébral mais non lorsqu'ils sont injectés en intraoculaire, nous avons envisagé la possibilité que les neurones de la rétine ne possèdent pas les mêmes caractéristiques que les neurones du cerveau.

Tout d'abord, nous avons analysé l'expression et l'état de phosphorylation de la protéine tau dans l'œil par rapport au cerveau dans des modèles murins WT ou qui surexpriment la protéine tau humaine normale (hTau) ou mutée (Tg22/30).

Ensuite, nous avons analysé l'influence de la protéine amyloïde humaine mutée en présence (5xFAD Tg30) ou non (5xFAD) d'une surexpression de la protéine tau humaine mutée sur l'expression et l'état de phosphorylation de la protéine tau dans l'œil par rapport au cerveau.

Nous avons également analysé l'expression des kinases GSK3 $\beta$  et CDK5 dans les différents modèles murins précités, ces kinases sont impliquées dans la phosphorylation de la protéine tau et dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer.

Les souris analysées en immunohistochimie (IHC) ou western blotting (WB) étaient âgées de 9 à 13 mois, tout génotype confondu. Cette tranche d'âge correspond à l'âge des souris qui ont été injectées en intraoculaire (IO) au moment de leur sacrifice. Les rétines de trois souris par génotype ont été observées (à l'exception des WT et TauKO) par immunohistochimie et plusieurs coupes de rétines par souris ont été analysées. Le nombre de souris analysées en western blotting et utilisées pour les tests statistiques qui en découlent est indiqué dans la légende de la figure correspondante. Les souris de génotype Tg22 ou Tg30 ont été groupées pour les analyses statistiques afin d'augmenter le nombre de souris dans ce groupe, nommé ci-après « Tg22/30 ». Seules les souris Tg22 sont illustrées dans les images de western blotting. Les souris TauKO ont servi de contrôle négatif pour la protéine tau.

Remarque : Les immunomarquages sur des coupes histologiques de souris qui nécessitent l'utilisation d'anticorps primaires produits chez la souris et par conséquent d'anticorps secondaires anti-anticorps de souris pour visualiser la protéine d'intérêt peuvent mettre en évidence, de manière artéfactuelle, les vaisseaux sanguins (**Fig. Sup. 5**). En effet, leurs vaisseaux sanguins contiennent des immunoglobulines (anticorps) qui sont reconnues et marquées par les anticorps secondaires anti-souris, mettant en évidence, de manière indirecte, les vaisseaux sanguins. Les marquages sur les coupes analysées ont été vérifiés, si nécessaire, à plus fort grossissement pour exclure les faux positifs dû aux vaisseaux sanguins. Un exemple est illustré en figure supplémentaire 5 (**Fig. Sup. 5**) : des coupes histologiques de souris TauKO (qui n'expriment aucune protéine tau) marquées par deux anticorps qui reconnaissent le même épitope (pThr231) sur la protéine tau mais qui ont été produits chez la souris ou chez le lapin montrent ou non des vaisseaux sanguins, respectivement, sur ces coupes.

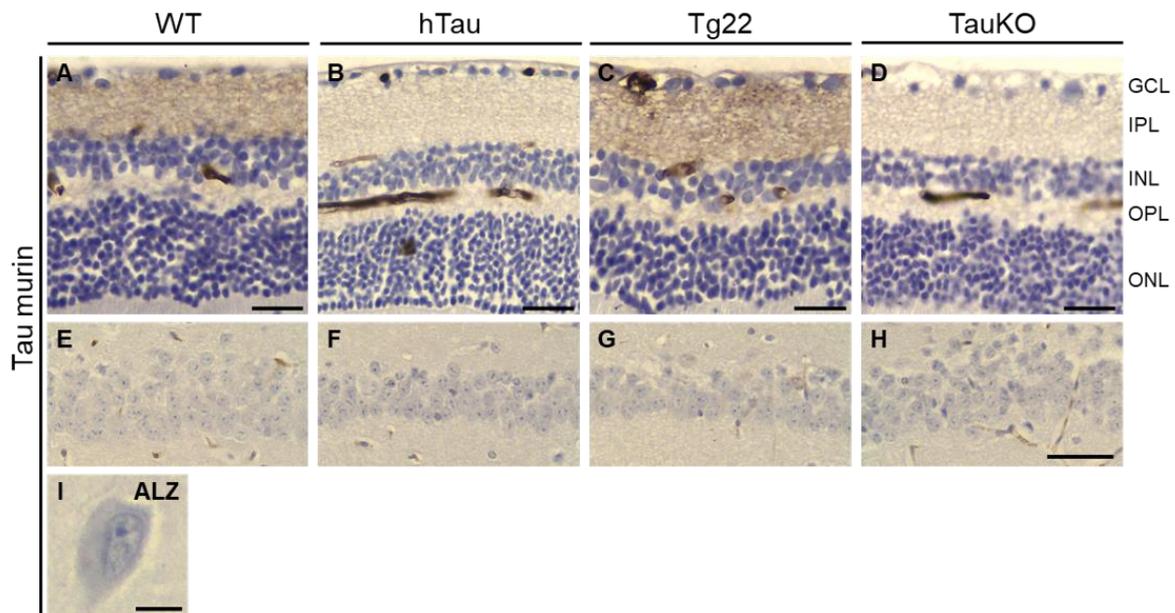
### 4.3.1. Analyses comparatives de la protéine tau et des kinases dans l'œil par rapport au cerveau dans les modèles murins Tg22/30, WT, hTau et TauKO

#### 4.3.1.1. Localisation de la protéine tau murine

Nous avons vu précédemment, au point [4.2.2.1] et **Fig. 42**, l'expression et la localisation de la protéine tau totale et de la protéine tau humaine dans les modèles murins WT, hTau, Tg22 et TauKO. Afin de compléter ces analyses, nous avons vérifié la localisation et l'expression de la protéine tau murine dans ces différents modèles.

La protéine tau murine est exprimée dans les couches plexiformes (interne et externe) de la rétine des souris WT et Tg22 et n'est pas exprimée dans la rétine des souris hTau et TauKO, comme attendu (**Fig. 54A-D**). L'expression de la protéine tau dans les couches plexiformes correspond à l'expression physiologique de la protéine tau dans les prolongements axonaux des cellules neuronales.

L'hippocampe des souris WT (**Fig. 54E**) et Tg22 (**Fig. 54G**) semblent ne pas montrer l'expression de la protéine tau murine mais il s'agit d'un artefact dû au taux d'expression physiologique de la protéine tau dans les axones. De plus, dans la rétine, nous avons une concentration des axones dans les couches plexiformes tandis que dans le cerveau, le neuropile est composé des enchevêtrements des prolongements cellulaires des neurones et des cellules gliales.



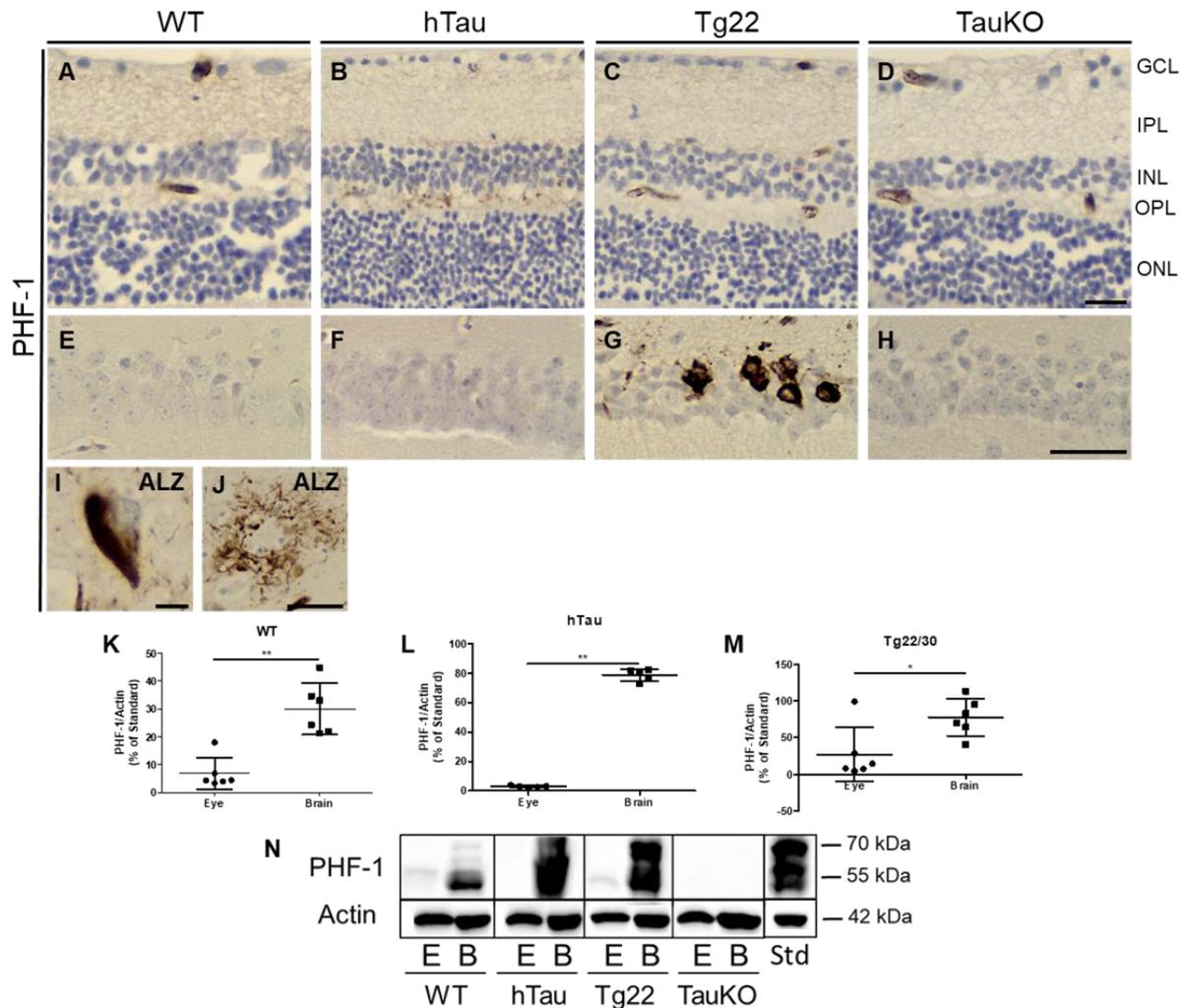
**Fig. 54<sup>12</sup> :** Localisation de la protéine tau murine dans la rétine de souris WT, hTau, Tg22 et TauKO. Immunomarcage de la rétine (A-D) et de l'hippocampe (E-H) des souris WT (A,E), hTau (B,F), Tg22 (C,G) et TauKO (D,H) avec l'anticorps anti-tau murin (mTau5). Une coupe de cerveau d'un patient atteint de la MA (ALZ) est illustrée en (I) et a été utilisée comme contrôle négatif. **GCL** : couche des cellules ganglionnaires (Ganglion Cell Layer), **IPL** : couche plexiforme interne (Inner Plexiform Layer), **INL** : couche nucléaire interne (Inner Nuclear Layer), **OPL** : couche plexiforme externe (Outer Plexiform Layer) et **ONL** : couche nucléaire externe (Outer Nuclear Layer). Barres d'échelle : A-D : 20 μm, E-H : 50 μm et I : 10 μm.

<sup>12</sup> Une mise en évidence artefactuelle des vaisseaux sanguins peut apparaître avec l'emploi d'anticorps secondaires anti-anticorps de souris, se reporter à la figure supplémentaire 5 (**Fig. Sup. 5**).

**4.3.1.2. Expression et localisation de la protéine tau phosphorylée**

La protéine tau phosphorylée sur les sérines 396 et 404 (anticorps PHF-1) n'a pas été détectée dans la rétine des souris WT, hTau, Tg22 et TauKO (**Fig. 55A-D**). L'analyse protéique par western blotting a montré un taux de phosphorylation de la protéine tau significativement plus élevé dans le cerveau comparé à l'œil des souris WT, hTau et Tg22/30 (**Fig. 55K-N**).

Dans le CA1 de la corne d'Ammon de l'hippocampe des souris Tg22, certains corps cellulaires de neurones contiennent une accumulation de protéines tau phosphorylées, comme attendu (**Fig. 55G**).



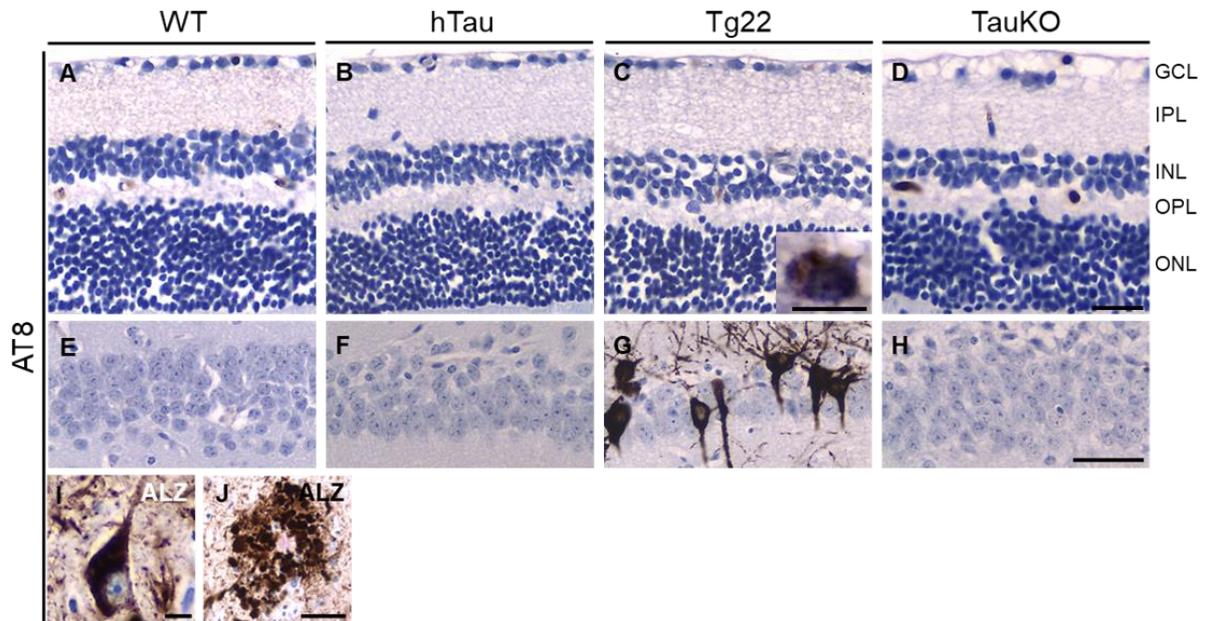
**Fig. 55 : Localisation et expression de la protéine tau phosphorylée (pSer396/404) dans la rétine de souris WT, hTau, Tg22 et TauKO.** Immunomarquage de la rétine (**A-D**) et de l'hippocampe (**E-H**) des souris WT (**A,E**), hTau (**B,F**), Tg22 (**C,G**) et TauKO (**D,H**) avec l'anticorps anti-tau phosphorylé PHF-1 (pSer396/404). Une coupe de cerveau d'un patient atteint de la MA (ALZ) est illustrée en (**I et J**) et montre un neurone dont le corps cellulaire est marqué en brun par l'anticorps anti-phospho tau (**I**) et des neurites dystrophiques (**J**). La quantification des bandes obtenues par western blotting (**N**) a montré une expression plus élevée des protéines tau phosphorylées sur les épitopes Ser396/404 dans le cerveau (« brain ») comparé à l'œil (« eye ») des souris WT (**K**), hTau (**L**) et Tg22/30 (**M**). Les résultats obtenus sont exprimés en un pourcentage par rapport à un standard (**Std**) pris comme référence et qui correspond au 100 %. Le standard utilisé est un homogénat de cerveau d'une souris Tg30. Test de Mann-Whitney (Two-Tailed), \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ .  $p = 0,0022$  (WT),  $p = 0,0079$  (hTau) et  $p = 0,0411$  (Tg22) ; WT (n=6), hTau (n=5) et Tg22/30 (n=6). Western blotting d'homogénats d'yeux (E/Eye) ou de

## Résultats

cerveau (B/Brain) de souris WT, hTau, Tg22 et TauKO avec l'anticorps anti-tau phosphorylé PHF-1 (**N**). L'actine a été utilisée comme contrôle de charge. **GCL** : couche des cellules ganglionnaires (Ganglion Cell Layer), **IPL** : couche plexiforme interne (Inner Plexiform Layer), **INL** : couche nucléaire interne (Inner Nuclear Layer), **OPL** : couche plexiforme externe (Outer Plexiform Layer) et **ONL** : couche nucléaire externe (Outer Nuclear Layer). Barres d'échelle : **A-D** : 20  $\mu\text{m}$ , **E-H et J** : 50  $\mu\text{m}$  et **I** : 10  $\mu\text{m}$ .

## Résultats

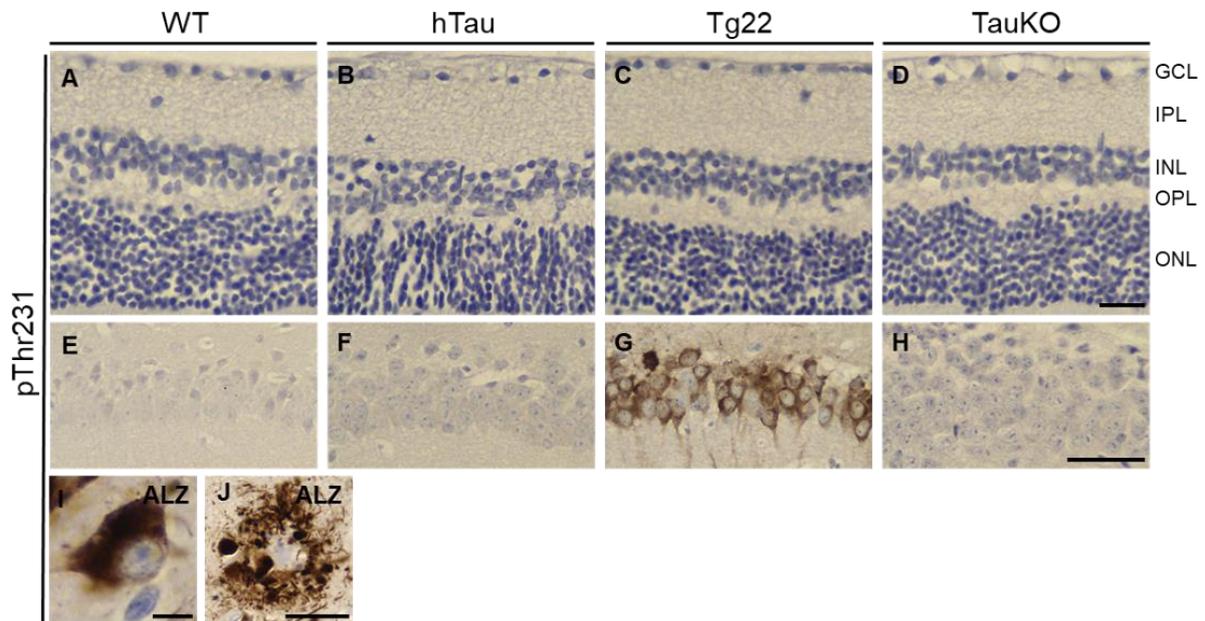
L'analyse de la phosphorylation de la protéine tau sur les épitopes pSer202/Thr305 à l'aide de l'anticorps AT8 a montré un marquage du cytoplasme des neurones de la couche des cellules ganglionnaires des souris Tg22 (**Fig. 56C**). Néanmoins le nombre de cellules positives observées était très faible. Les rétines des souris WT, hTau et TauKO n'ont montré aucune structure marquée par l'anticorps AT8 (**Fig. 56A,B,D**). Comme attendu, certains neurones de l'hippocampe des souris Tg22 ont montré un marquage positif (**Fig. 56G**).



**Fig. 56 : Localisation de la protéine tau phosphorylée (pSer202/Thr305) dans la rétine de souris WT, hTau, Tg22 et TauKO.** Immunomarcage de la rétine (A-D) et de l'hippocampe (E-H) des souris WT (A,E), hTau (B,F), Tg22 (C,G) et TauKO (D,H) avec l'anticorps anti-tau phosphorylé AT8 (pSer202/Thr305). Une coupe de cerveau d'un patient atteint de la MA (ALZ) est illustrée en (I et J) et montre un neurone dont le corps cellulaire est marqué en brun par l'anticorps anti-phospho tau (I) et des neurites dystrophiques (J). **GCL** : couche des cellules ganglionnaires (Ganglion Cell Layer), **IPL** : couche plexiforme interne (Inner Plexiform Layer), **INL** : couche nucléaire interne (Inner Nuclear Layer), **OPL** : couche plexiforme externe (Outer Plexiform Layer) et **ONL** : couche nucléaire externe (Outer Nuclear Layer). Barres d'échelle : A-D : 20 μm, E-H et J : 50 μm et petite image en C et I : 10 μm.

## Résultats

L'analyse de la protéine tau phosphorylée sur l'épitope Thr231 n'a montré aucune structure positive dans la rétine des différentes lignées murines (**Fig. 57A-D**). Les neurones de la corne d'Ammon de l'hippocampe des souris Tg22 ont montré un cytoplasme marqué par l'anticorps pThr231 (**Fig. 57G**).

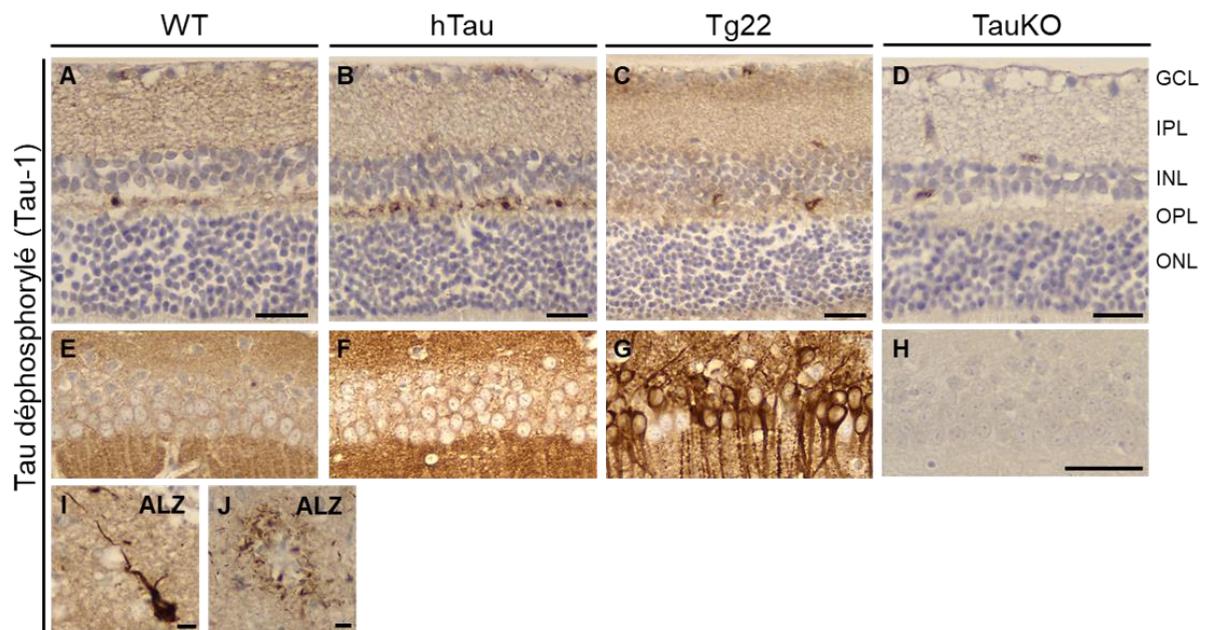


**Fig. 57 : Localisation de la protéine tau phosphorylée (pThr231) dans la rétine de souris WT, hTau, Tg22 et TauKO.** Immunomarquage de la rétine (**A-D**) et de l'hippocampe (**E-H**) des souris WT (**A,E**), hTau (**B,F**), Tg22 (**C,G**) et TauKO (**D,H**) avec l'anticorps anti-tau phosphorylé sur l'épitope Thr231. Une coupe de cerveau d'un patient atteint de la MA (ALZ) est illustrée en (**I et J**) et montre un neurone dont le corps cellulaire est marqué en brun par l'anticorps anti-phospho tau (**I**) et des neurites dystrophiques (**J**). **GCL** : couche des cellules ganglionnaires (Ganglion Cell Layer), **IPL** : couche plexiforme interne (Inner Plexiform Layer), **INL** : couche nucléaire interne (Inner Nuclear Layer), **OPL** : couche plexiforme externe (Outer Plexiform Layer) et **ONL** : couche nucléaire externe (Outer Nuclear Layer). Barres d'échelle : **A-D** : 20  $\mu$ m, **E-H et J** : 50  $\mu$ m et **I** : 10  $\mu$ m.

#### 4.3.1.3. Localisation de la protéine tau déphosphorylée dans la rétine

Après avoir évalué la phosphorylation de la protéine tau avec les anticorps PHF-1 (pSer396/404), AT8 (pSer202/thr205) et pThr231, nous avons ensuite analysé la protéine tau dans sa forme non-phosphorylée grâce à l'anticorps Tau-1.

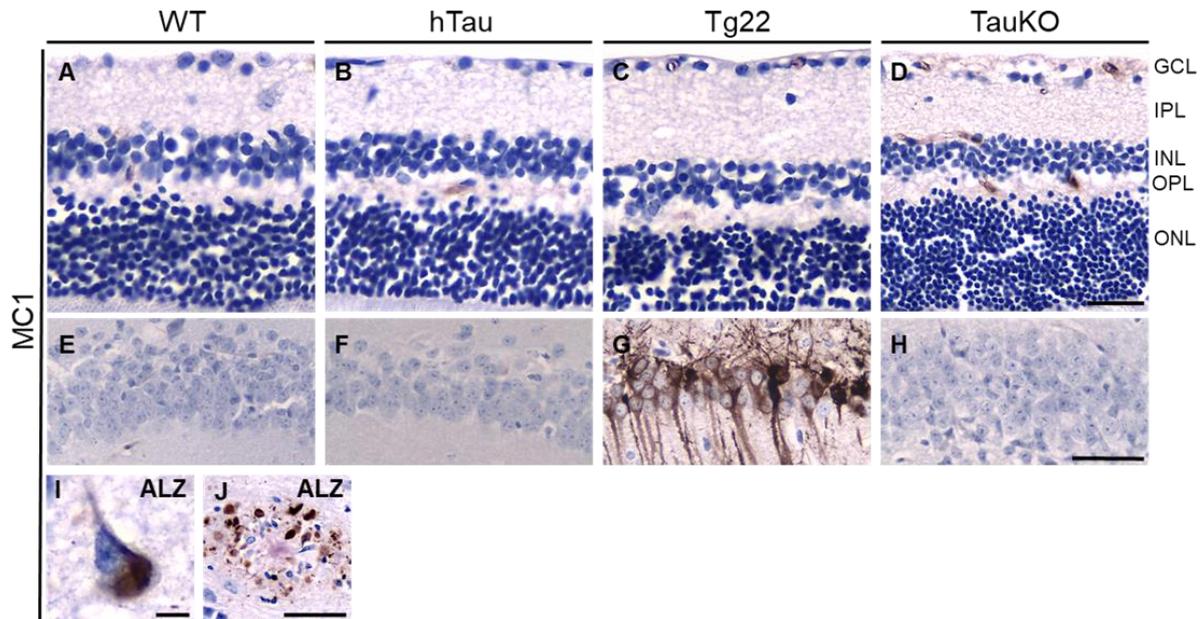
Les couches plexiformes de la rétine des souris WT, hTau et Tg22 ont été marquées par l'anticorps Tau-1 (**Fig. 58A-C**). Au niveau de l'hippocampe, la protéine tau déphosphorylée est exprimée dans le neuropile des souris WT, hTau et Tg22 (**Fig. 58E-G**). La protéine tau déphosphorylée est également observée dans le cytoplasme des neurones hippocampaux dans les souris Tg22 (**Fig. 58G**). L'accumulation des protéines tau dans le compartiment somato-dentritique est un phénomène pathologique.



**Fig. 58 :** Localisation de la protéine tau déphosphorylée dans la rétine de souris WT, hTau, Tg22 et TauKO. Immunomarquage de la rétine (**A-D**) et de l'hippocampe (**E-H**) des souris WT (**A,E**), hTau (**B,F**), Tg22 (**C,G**) et TauKO (**D,H**) avec l'anticorps anti-tau déphosphorylé Tau-1. Une coupe de cerveau d'un patient atteint de la MA (ALZ) est illustrée en (**I et J**) et montre un neurone dont le corps cellulaire est marqué en brun par l'anticorps anti-tau déphosphorylé (**I**) et des neurites dystrophiques (**J**). **GCL** : couche des cellules ganglionnaires (Ganglion Cell Layer), **IPL** : couche plexiforme interne (Inner Plexiform Layer), **INL** : couche nucléaire interne (Inner Nuclear Layer), **OPL** : couche plexiforme externe (Outer Plexiform Layer) et **ONL** : couche nucléaire externe (Outer Nuclear Layer). Barres d'échelle : **A-D** : 20  $\mu$ m, **E-H et J** : 50  $\mu$ m et **I** : 10  $\mu$ m.

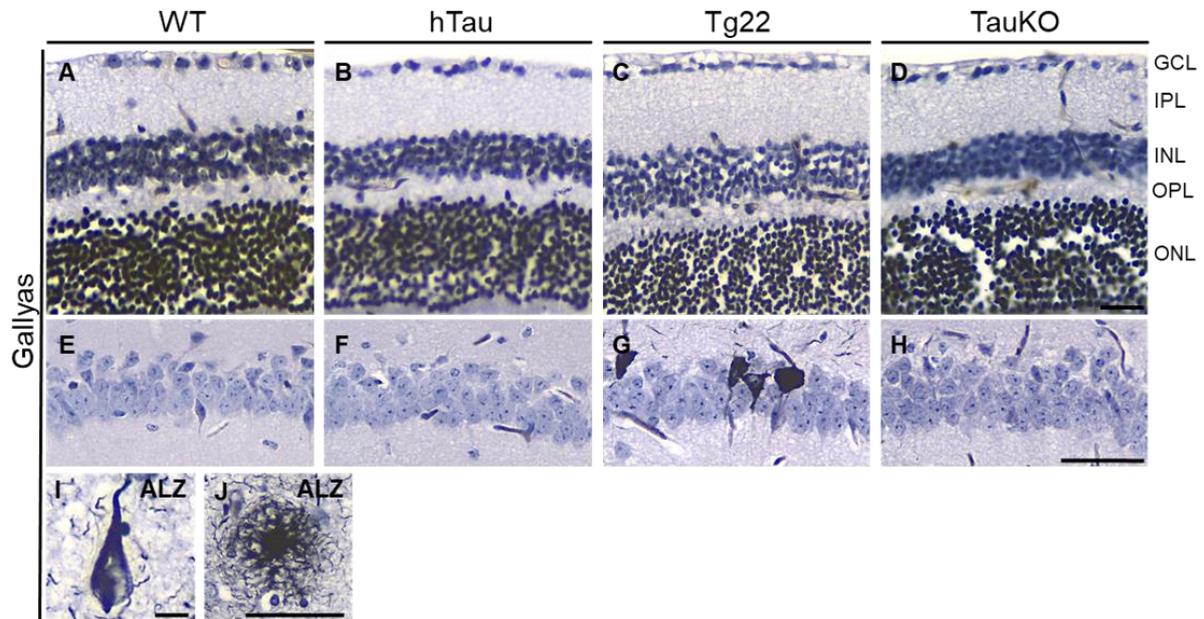
**4.3.1.4. Localisation de la protéine tau agrégée dans la rétine**

A la suite des analyses de l'état de phosphorylation de la protéine tau, nous avons recherché la protéine tau sous une conformation anormale en utilisant l'anticorps MC1. Nous n'avons observé aucune protéine tau sous une forme conformationnelle anormale dans la rétine des différentes lignées murines (**Fig. 59A-D**). Des protéines tau mises en évidence par l'anticorps MC1 peuvent être observées dans le cytoplasme des neurones pyramidaux du CA1 de l'hippocampe des souris Tg22 (**Fig. 59G**).



**Fig. 59 : Localisation de la protéine tau de conformation anormale dans la rétine de souris WT, hTau, Tg22 et TauKO.** Immunomarcage de la rétine (**A-D**) et de l'hippocampe (**E-H**) des souris WT (**A,E**), hTau (**B,F**), Tg22 (**C,G**) et TauKO (**D,H**) avec l'anticorps conformationnel anti-tau MC1. Une coupe de cerveau d'un patient atteint de la MA (ALZ) est illustrée en (**I et J**) et montre un neurone dont le corps cellulaire est marqué en brun par l'anticorps conformationnel anti-tau (**I**) et des neurites dystrophiques (**J**). **GCL** : couche des cellules ganglionnaires (Ganglion Cell Layer), **IPL** : couche plexiforme interne (Inner Plexiform Layer), **INL** : couche nucléaire interne (Inner Nuclear Layer), **OPL** : couche plexiforme externe (Outer Plexiform Layer) et **ONL** : couche nucléaire externe (Outer Nuclear Layer). Barres d'échelle : **A-D** : 20  $\mu$ m, **E-H et J** : 50  $\mu$ m et **I** : 10  $\mu$ m.

Ensuite, nous avons investigué la présence de la protéine tau sous une forme agrégée à l'aide de la coloration Gallyas qui met en évidence les PHF-tau présents dans les DNF en noir. La protéine tau agrégée n'a pas été observée dans la rétine des différents modèles murins (**Fig. 60A-D**). Quelques cellules pyramidales colorées en noir par le Gallyas sont visibles dans l'hippocampe des souris Tg22 (**Fig. 60G**).



**Fig. 60 : Localisation de la protéine tau agrégée dans la rétine de souris WT, hTau, Tg22 et TauKO.** Coloration Gallyas de la rétine (**A-D**) et de l'hippocampe (**E-H**) des souris WT (**A,E**), hTau (**B,F**), Tg22 (**C,G**) et TauKO (**D,H**). La coloration Gallyas colore en noir les protéines tau agrégées. Une coupe de cerveau d'un patient atteint de la MA (ALZ) est illustrée en (**I et J**) et montre un neurone dont le corps cellulaire est coloré en noir par la coloration Gallyas (**I**) et des neurites dystrophiques (**J**). **GCL** : couche des cellules ganglionnaires (Ganglion Cell Layer), **IPL** : couche plexiforme interne (Inner Plexiform Layer), **INL** : couche nucléaire interne (Inner Nuclear Layer), **OPL** : couche plexiforme externe (Outer Plexiform Layer) et **ONL** : couche nucléaire externe (Outer Nuclear Layer). Barres d'échelle : **A-D** : 20  $\mu$ m, **E-H** et **J** : 50  $\mu$ m et **I** : 10  $\mu$ m.

- La **protéine tau phosphorylée** sur les épitopes pSer396/404, pSer202/Thr305 ou pThr231 n'a pas été détectée par les anticorps PHF-1, AT8 et pThr231, respectivement, dans la rétine des souris WT et hTau.
- Seul un très faible nombre de cellules ganglionnaires de la rétine des souris Tg22 ont été marquées par l'anticorps AT8.
- La **protéine tau sous une forme conformationnelle anormale** n'a pas été détectée par l'anticorps MCI dans la rétine des modèles murins WT, hTau et Tg22.
- La **protéine tau sous une forme agrégée** n'a pas été détectée par la coloration Gallyas dans la rétine des souris WT, hTau et Tg22.

#### 4.3.1.5. *Expression et localisation des kinases GSK3 $\beta$ et CDK5*

Etant donné que nous n'avons pas observé la protéine tau sous une forme phosphorylée sur les épitopes pSer396/404, pSer202/Thr305 et pThr231 dans la rétine des souris WT, hTau et Tg22 à l'exception de quelques cellules ganglionnaires mises en évidence par l'anticorps AT8 dans les souris Tg22, nous avons étudié l'expression des kinases GSK3 $\beta$  et CDK5 dans la rétine de ces différents modèles murins. Ces deux kinases sont bien connues pour jouer un rôle dans la phosphorylation de la protéine tau dans des conditions physiologiques et pathologiques.

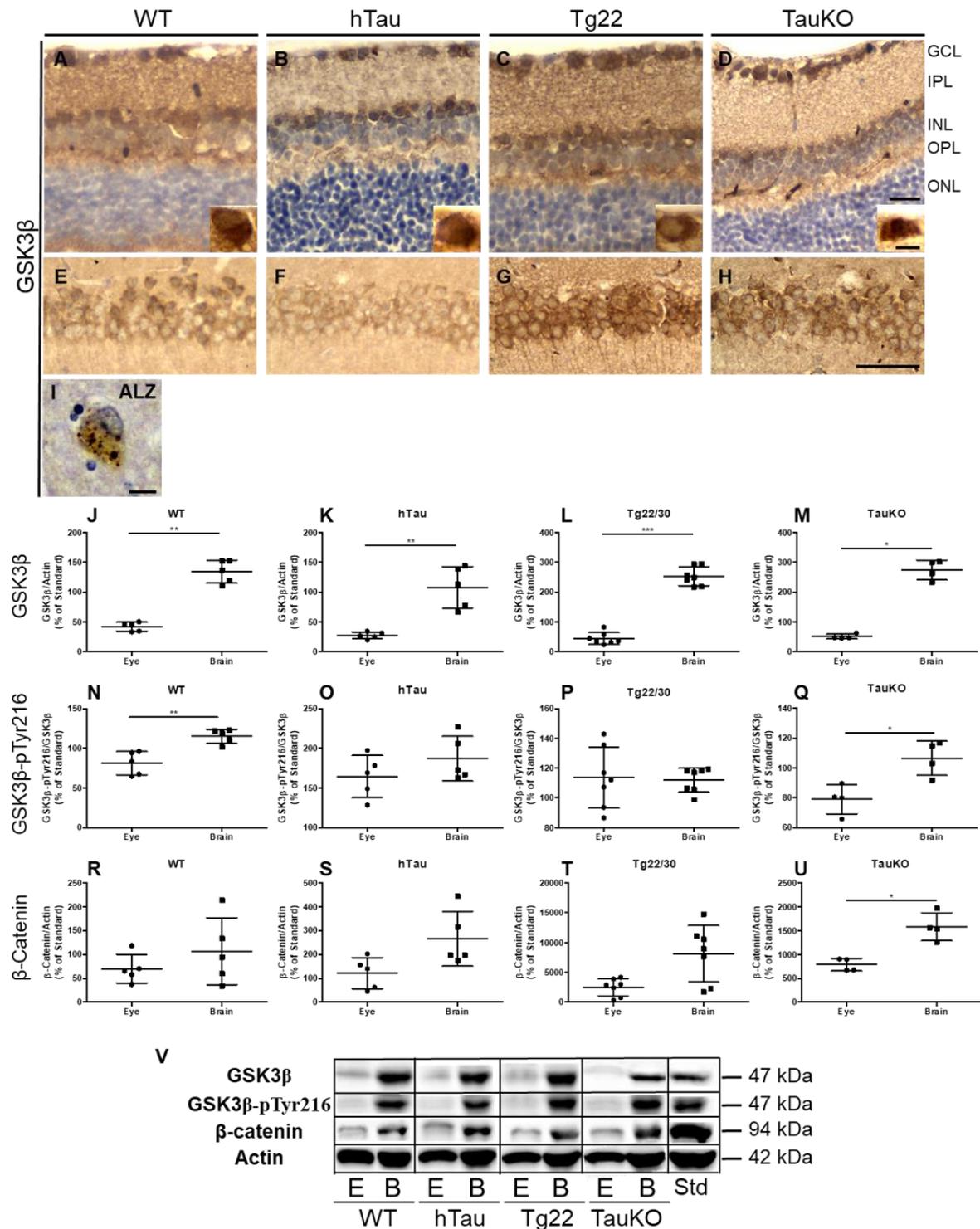
La kinase GSK3 $\beta$  a été observée dans les différentes couches de la rétine et plus particulièrement dans le cytoplasme des cellules ganglionnaires des souris WT, hTau, Tg22 et TauKO (**Fig. 61A-D**). Dans l'hippocampe de ces différentes lignées murines, la GSK3 $\beta$  est présente dans le neuropile et le compartiment somato-dendritique des neurones pyramidaux (**Fig. 61E-H**).

L'analyse protéique par western blotting a montré que le taux de la GSK3 $\beta$  est significativement supérieur dans le cerveau par rapport à l'œil des différentes lignées murines (**Fig. 61I-M**).

L'activité de la kinase a été évaluée en analysant la GSK3 $\beta$  phosphorylée sur son résidu Tyr216. La GSK3 $\beta$  est une enzyme constitutivement active et son activité augmente lorsque le résidu Tyr216 est phosphorylé. Les résultats obtenus par l'analyse densitométrique des bandes acquises par western blotting ont montré une phosphorylation de la tyrosine 216 statistiquement supérieure dans le cerveau par rapport à l'œil des souris WT (**Fig. 61N**) et TauKO (**Fig. 61Q**). Les résultats obtenus pour les souris hTau semblent montrer la même tendance (**Fig. 61O**).

Afin d'évaluer l'activité de la GSK3 $\beta$  d'une seconde manière, nous avons évalué le taux de  $\beta$ -caténine. La GSK3 $\beta$  phosphoryle la  $\beta$ -caténine qui sera par la suite dégradée par le protéasome. Le taux de  $\beta$ -caténine est donc un reflet indirect de l'activité de la kinase.

Le taux de  $\beta$ -caténine était statistiquement supérieur dans le cerveau par rapport à l'œil des souris TauKO (**Fig. 61U**) et les taux obtenus pour les souris WT, hTau et Tg22/30 (**Fig. 61R-T**) semblent suivre la même tendance.



**Fig. 61 : Localisation et expression de la kinase GSK3β dans la rétine de souris WT, hTau, Tg22 et TauKO.** Immunomarquage de la rétine (A-D) et de l'hippocampe (E-H) des souris WT (A,E), hTau (B,F), Tg22 (C,G) et TauKO (D,H) avec l'anticorps anti-GSK3β (total). Les petites images en A-D montrent la présence de la GSK3β dans le soma des cellules ganglionnaires (GCL). Une coupe de cerveau d'un patient atteint de la MA (ALZ) est illustrée en I et montre des inclusions (en brun foncé) contenant une accumulation de la kinase GSK3β dans le corps cellulaire d'un neurone. La quantification des bandes obtenues par western blotting (V) a montré une expression plus élevée de la kinase GSK3β dans le cerveau (« brain »/B) comparé à l'œil (« eye »/E) des souris WT (J), hTau (K), Tg22/30 (L) et TauKO (M). La GSK3β phosphorylée sur la Tyr216 est présente de façon significativement plus élevée

## Résultats

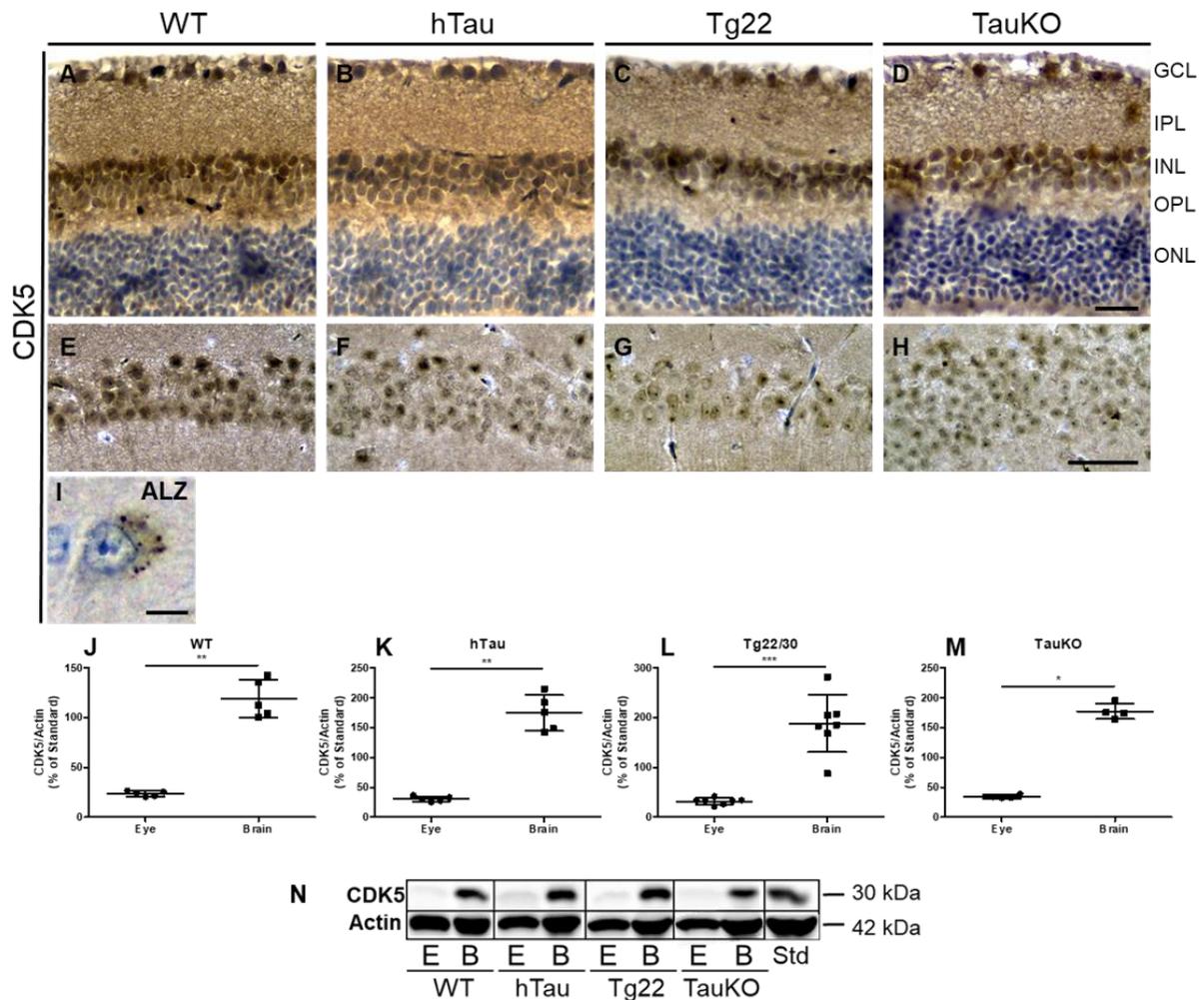
dans le cerveau (« brain »/B) par rapport à l'œil (« eye »/E) des souris WT (**N**) et TauKO (**Q**) ; l'observation des graphiques des souris hTau (**O**) et Tg22/30 (**P**) montrent la même tendance. Le taux de  $\beta$ -caténine est significativement plus élevé dans le cerveau (« brain »/B) comparé à l'œil (« eye »/E) des souris TauKO (**U**) et les souris WT (**R**), hTau (**S**) et Tg22/30 (**T**) montrent la même tendance. Les résultats obtenus sont exprimés en un pourcentage par rapport à un standard (**Std**) pris comme référence et qui correspond au 100 %. Le standard utilisé est un homogénat de cerveau d'une souris WT. Test de Mann-Whitney (Two-Tailed), \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$ . GSK3 $\beta$  :  $p = 0,0079$  (WT),  $p = 0,0079$  (hTau),  $p = 0,0006$  (Tg22) et  $p = 0,0286$  (TauKO), GSK3 $\beta$ -Tyr216 :  $p = 0,0079$  (WT),  $p = 0,4206$  (hTau),  $p = 0,9015$  (Tg22) et  $p = 0,0286$  (TauKO),  $\beta$ -caténine :  $p = 0,5476$  (WT),  $p = 0,0556$  (hTau),  $p = 0,0728$  (Tg22) et  $p = 0,0286$  (TauKO) ; WT (n=6), hTau (n=5) et Tg22 (n=6). **GCL** : couche des cellules ganglionnaires (Ganglion Cell Layer), **IPL** : couche plexiforme interne (Inner Plexiform Layer), **INL** : couche nucléaire interne (Inner Nuclear Layer), **OPL** : couche plexiforme externe (Outer Plexiform Layer) et **ONL** : couche nucléaire externe (Outer Nuclear Layer). Barres d'échelle : **A-D** : 20  $\mu\text{m}$ , **E-H** : 50  $\mu\text{m}$  et petites images en **A-D et I** : 10  $\mu\text{m}$ .

## Résultats

La kinase CDK5 est détectée dans les couches plexiformes de la rétine et dans le neuropile au niveau de l'hippocampe des souris WT, hTau, Tg22 et TauKO (**Fig. 62A-H**).

A l'instar de la GSK3 $\beta$ , l'analyse protéique par western blotting de la CDK5 a montré un taux significativement plus élevé dans le cerveau comparé à l'œil des différentes lignées murines (**Fig. 62I-L**).

Les activateurs de la CDK5, les protéines p25 et p35 n'ont pas pu être détectées dans l'œil des différentes lignées de souris en western blotting (**Fig. Sup. 7**).



**Fig. 62 :** Localisation et expression de la kinase CDK5 dans la rétine de souris WT, hTau, Tg22 et TauKO. Immunomarquage de la rétine (A-D) et de l'hippocampe (E-H) des souris WT (A,E), hTau (B,F), Tg22 (C,G) et TauKO (D,H) avec l'anticorps anti-CDK5. Une coupe de cerveau d'un patient atteint de la MA (ALZ) est illustrée en I et montre des inclusions (en brun foncé) contenant une accumulation de la kinase CDK5 dans le corps cellulaire d'un neurone. La quantification des bandes obtenues par western blotting (R) a montré une expression plus élevée de la kinase CDK5 dans le cerveau (« brain »/B) comparé à l'œil (« eye »/E) des souris WT (J), hTau (K), Tg22/30 (L) et TauKO (M). Les résultats obtenus sont exprimés en un pourcentage par rapport à un standard (Std) pris comme référence et qui correspond au 100 %. Le standard utilisé est un homogénat de cerveau d'une souris WT. Test de Mann-Whitney (Two-Tailed), \*p < 0,05 ; \*\*p < 0,01 ; \*\*\*p < 0,001. p = 0,0079 (WT), p = 0,0079 (hTau), p = 0,0006 (Tg22) et p = 0,0286 (TauKO). **GCL** : couche des cellules ganglionnaires (Ganglion Cell Layer), **IPL** : couche plexiforme interne (Inner Plexiform Layer), **INL** : couche nucléaire interne (Inner Nuclear Layer), **OPL** : couche plexiforme externe (Outer Plexiform Layer) et

## Résultats

**ONL** : couche nucléaire externe (Outer Nuclear Layer). Barres d'échelle : **A-D** : 20 µm, **E-H** : 50 µm et **I** : 10 µm.

- La **GSK3β** est présente dans les couches plexiformes et le cytoplasme des cellules ganglionnaires de la rétine des souris WT, hTau, Tg22 et TauKO.
- La **CDK5** est présente dans les couches plexiformes de la rétine des souris WT, hTau, Tg22 et TauKO.
- Le taux d'expression de la **GSK3β** et de la **CDK5** est significativement supérieur dans le cerveau par rapport à la rétine des souris WT, hTau, Tg22 et TauKO.

Un tableau récapitulatif des résultats obtenus par immunohistochimie ou par western blotting des analyses effectuées sur les souris WT, hTau, Tg22/30 et TauKO est présenté en **Tableau 9**. Un tableau récapitulatif des marquages de la protéine tau et des kinases, réalisés sur le cerveau des souris est présenté dans les **Tableau Sup. 3**, et **Tableau Sup. 4** respectivement.

		WT		hTau		Tg22		TauKO	
		IHC	WB	IHC	WB	IHC	WB	IHC	WB
Tau	Tau total	IPL, OPL	B>E	IPL, OPL	B>E	GCL, IPL, OPL	B>E	Neg	NA
	Tau humain	Neg	NA	GCL, IPL, OPL	B>E	GCL	B>E	Neg	NA
	Tau murin	IPL	-	Neg	-	IPL	-	Neg	-
	PHF-1	Neg	B>E	OPL ?	B>E	Neg	B>E	Neg	NA
	AT8	Neg	-	Neg	-	GCL	-	Neg	NA
	pThr231	Neg	-	Neg	-	Neg	-	Neg	NA
	Tau déphosphorylé	IPL, OPL	-	IPL, OPL	-	IPL, OPL	-		-
	MC1	Neg	NA	Neg	NA	Neg	NA	Neg	NA
Gallyas	Neg	NA	Neg	NA	Neg	NA	Neg	NA	
Kinases	GSK3β	GCL, IPL, OPL	B>E						
	GSK3β-pTyr216	-	B>E	-	E=B	-	E=B	-	B>E
	β-caténine	-	E=B	-	E=B	-	E=B	-	B>E
	CDK5	IPL, OPL	B>E						

**Tableau 9** : Tableau récapitulatif des résultats obtenus par immunohistochimie (IHC) et western blotting (WB) pour les analyses comparatives de la protéine tau et des kinases dans l'œil par rapport au cerveau dans les modèles murins WT, hTau, Tg22 et TauKO. Les résultats positifs en IHC sont mis en évidence en vert et les résultats négatifs sont notés « Neg ». **GCL** : couche des cellules ganglionnaires (Ganglion Cell Layer), **IPL** : couche plexiforme interne (Inner Plexiform Layer), **OPL** : couche plexiforme externe (Outer Plexiform Layer). Les résultats obtenus en WB sont résumés par les symboles « > » et « = » lorsque l'expression de la protéine d'intérêt dans le cerveau comparé à l'œil est statistiquement supérieure ou lorsqu'il n'y a pas de différence significative respectivement. **B** : cerveau (« brain » en anglais) et **E** : œil (« eye » en anglais). **NA** : non applicable. « - » : pas de données disponibles.

### En conclusion :

- ⇒ La protéine tau exprimée dans la rétine semble être peu phosphorylée et n'est pas rencontrée sous une forme conformationnelle anormale ou agrégée dans les souris WT, hTau et Tg22.
- ⇒ Les kinases GSK3β et CDK5 sont exprimées dans la rétine des souris WT, hTau, Tg22 et TauKO mais à un taux plus faible comparé au cerveau.

#### **4.3.2. Analyses comparatives de la protéine tau et des kinases dans l'œil par rapport au cerveau dans les modèles murins 5xFAD et 5xFAD Tg30**

Puisque les analyses de la protéine tau dans les modèles murins « tau », à savoir les souris hTau et Tg22/30 n'ont pas montré la protéine tau sous une forme anormale dans la rétine, nous avons ensuite étudié la protéine tau en présence de peptides amyloïdes, car plusieurs études ont démontré que les dépôts amyloïdes aggravent la pathologie tau (Héraud et al., 2014, Vergara et al., 2019).

Pour ce faire, nous avons analysé la protéine tau dans les modèles murins 5xFAD et 5xFAD Tg30 qui développent des plaques amyloïdes dans le cerveau. Les souris 5xFAD Tg30 développent, en concomitance des plaques amyloïdes, une pathologie tau.

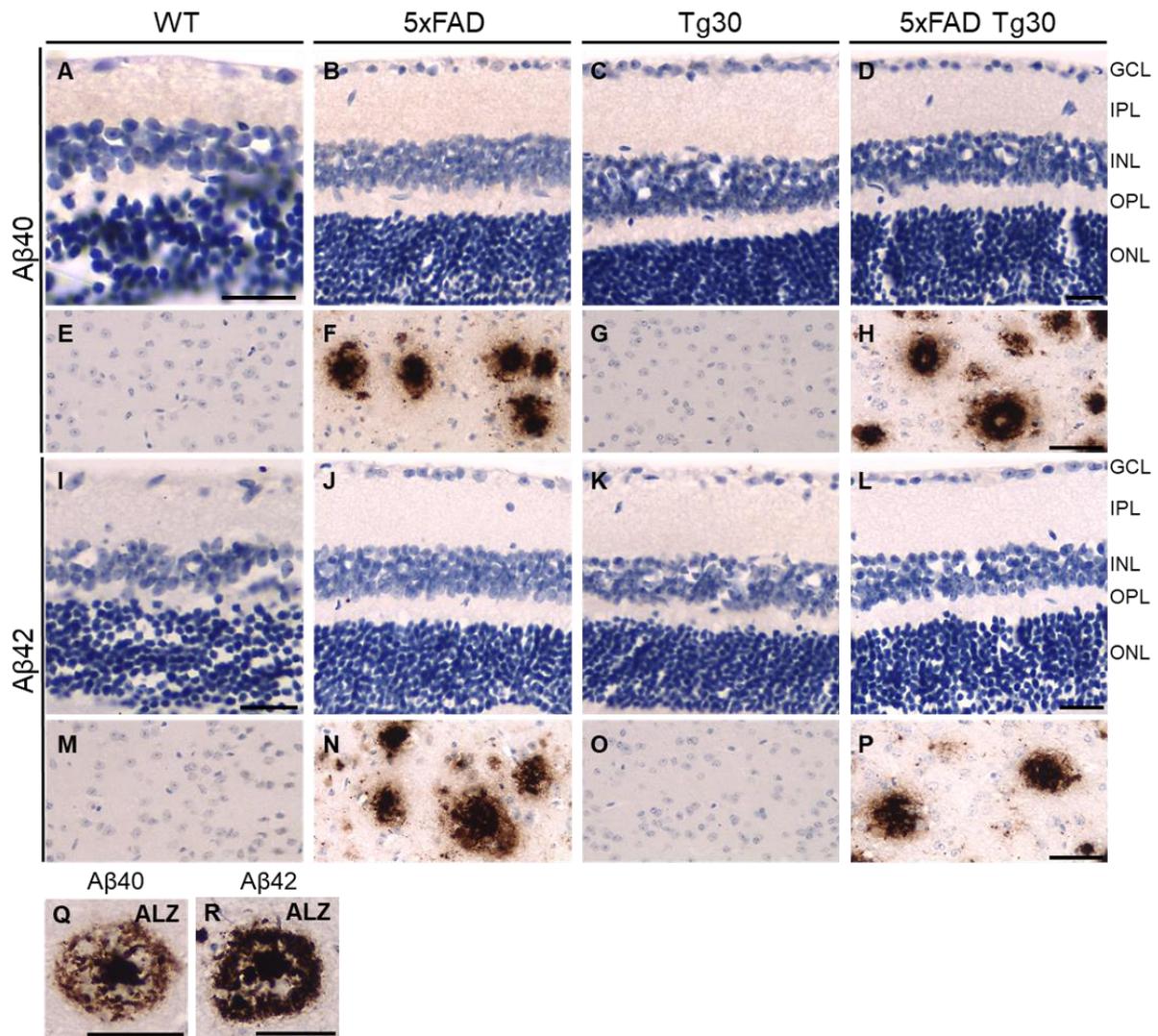
##### **4.3.2.1. Localisation des plaques amyloïdes dans la rétine**

Nous avons tout d'abord évalué la présence de dépôts amyloïdes dans la rétine des souris 5xFAD et 5xFAD Tg30 en utilisant les anticorps anti-A $\beta$ 40 ou anti-A $\beta$ 42 (**Fig. 63**).

Alors que des dépôts amyloïdes sont bien mis en évidence par les deux anticorps précités dans le cerveau des souris 5xFAD (**Fig. 63F et N**) et 5xFAD Tg30 (**Fig. 63H et P**), nous n'avons pas observé de dépôts amyloïdes dans la rétine de ces souris (**Fig. 63B,D,J,L**).

Les souris WT (**Fig. 63A,E,I,M**) et Tg30 (**Fig. 63C,G,K,O**) ont été utilisées comme contrôles négatifs pour la protéine amyloïde.

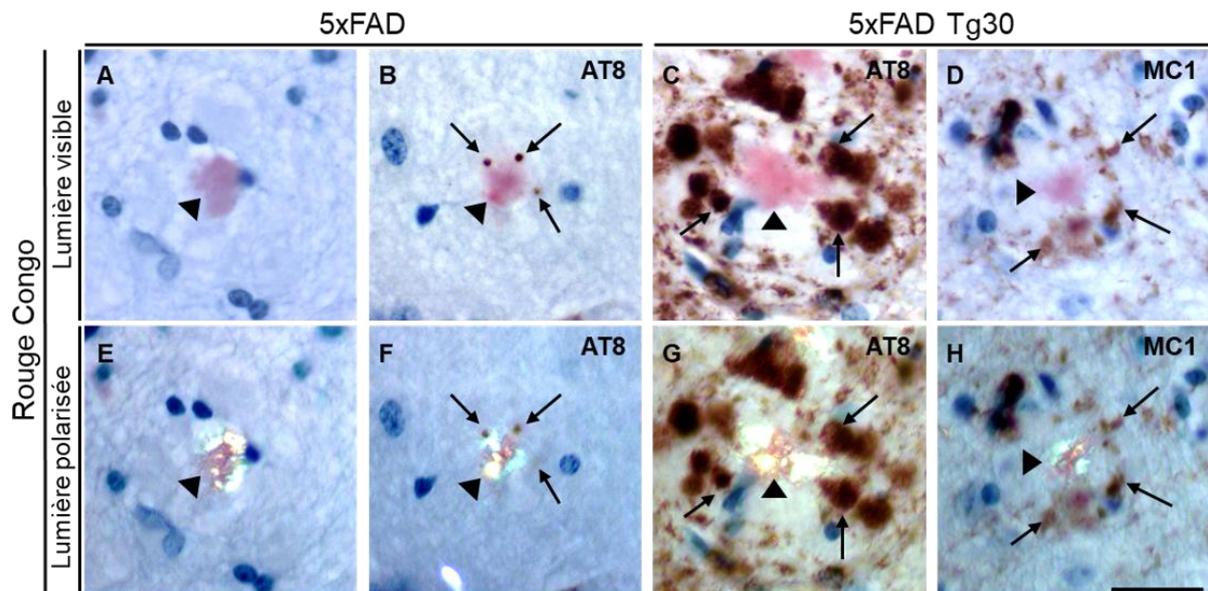
Nous avons vérifié l'expression de la protéine APP dans la rétine des souris 5xFAD et 5xFAD Tg30 par immunohistochimie et par western blotting. La protéine APP humaine a été détectée dans le cerveau des modèles murins 5xFAD et 5xFAD Tg30 mais n'a pas pu être détectée dans la rétine de ces mêmes souris (**Fig. Sup. 6I**). Il semblerait que cela soit dû à la faible expression de la protéine APP humaine dans la rétine qui n'a pas permis d'atteindre le seuil de détection du western blotting. En effet, des protéines APP humaines ont été détectées par immunohistochimie dans le corps cellulaire de quelques cellules ganglionnaires de la rétine des souris 5xFAD et 5xFAD Tg30 (**Fig. Sup. 6A et B**).



**Fig. 63 : Localisation des plaques amyloïdes A $\beta$ 40 ou A $\beta$ 42 dans la rétine de souris WT, 5xFAD, Tg30 et 5xFAD Tg30.** Immunomarquage de la rétine (A-D,I-L) et du cortex (E-H,M-P) des souris WT (A,E,I,M), 5xFAD (B,F,J,N), Tg30 (C,G,K,O) et 5xFAD Tg30 (D,H,L,P) avec l'anticorps anti-A $\beta$ 40 (A-H,Q) ou avec l'anticorps anti-A $\beta$ 42 (I-P,R) qui met en évidence les dépôts de peptides amyloïdes  $\beta$ 40 ou les dépôts de peptides amyloïdes  $\beta$ 42 respectivement. Des plaques amyloïdes sont observées dans le cortex des souris 5xFAD (F,N) et 5xFAD Tg30 (H,P) mais pas dans la rétine (B,D,J,L). La rétine (A,C,I,K) et le cortex (E,G,M,O) des souris WT (A,E,I,M) et Tg30 (C,G,K,O) ne montrent pas de plaques amyloïdes, comme attendu. Une coupe de cerveau d'un patient atteint de la MA (ALZ) est illustrée en Q et R et montre des plaques amyloïdes (en brun) marquées par les anticorps anti-A $\beta$ 40 (Q) ou anti-A $\beta$ 42 (R). **GCL** : couche des cellules ganglionnaires (Ganglion Cell Layer), **IPL** : couche plexiforme interne (Inner Plexiform Layer), **INL** : couche nucléaire interne (Inner Nuclear Layer), **OPL** : couche plexiforme externe (Outer Plexiform Layer) et **ONL** : couche nucléaire externe (Outer Nuclear Layer). Barres d'échelle : A-D,I-L : 20  $\mu$ m et E-H,M-R : 50  $\mu$ m.

## Résultats

Les dépôts amyloïdes peuvent également être mis en évidence par la coloration au Rouge Congo. Cette coloration est couramment utilisée en histologie et a la particularité de mettre en évidence les dépôts amyloïdes en rose en lumière visible et en vert-jaune en lumière polarisée (**Fig. 64**). Des neurites dystrophiques, mis en évidence ici par les anticorps AT8 (**Fig. 64B-C,F-G**) et MC1 (**Fig. 64D,H**) sont visibles autour des plaques amyloïdes dans le cerveau. L'accumulation de protéines tau anormalement phosphorylés ou dans une conformation anormale est considérable dans les souris 5xFAD Tg30 (**Fig. 64C-D,G-H**), par rapport aux souris 5xFAD (**Fig. 64B,F**), car les souris 5xFAD Tg30 expriment la protéine amyloïde mutée en présence de la protéine tau humaine mutée. Ces neurites dystrophiques qui présentent une immunoréactivité pour la protéine tau phosphorylée n'ont pas été observés dans les rétines.



**Fig. 64 :** Illustration des plaques amyloïdes à l'aide de la coloration au Rouge Congo et des neurites dystrophiques en utilisant les anticorps anti-tau AT8 et MC1 dans le cerveau de souris 5xFAD et 5xFAD Tg30. Coloration au Rouge Congo de coupes de cerveau de souris 5xFAD (A-B,E-F) ou 5xFAD Tg30 (C-D,G-H) et immunomarquage avec l'anticorps anti-tau phosphorylé AT8 (pSer202/Thr305) (B-C,F-G) ou avec l'anticorps conformationnel MC1 (D,H). La coloration au rouge Congo met en évidence les plaques amyloïdes (têtes de flèches) en rose en lumière visible (A-D) et en vert-jaune (E-H) en lumière polarisée (E-H). L'accumulation de protéines tau (flèches), mise en évidence par l'anticorps anti-tau phosphorylé AT8, est visible dans les neurites dystrophiques qui se situent autour des plaques amyloïdes (têtes de flèches) dans les souris 5xFAD (B,F) et 5xFAD Tg30 (CG). Certaines protéines tau (flèches) qui s'accumulent dans les neurites dystrophiques autour des plaques amyloïdes (têtes de flèches) sont dans une conformation anormale, illustration dans une souris 5xFAD Tg30 (D,H). Barre d'échelle : 20  $\mu$ m.

- *Aucun dépôt amyloïde n'a été détecté dans la rétine des souris 5xFAD et 5xFAD Tg30.*

#### 4.3.2.2. *Expression et localisation de la protéine tau*

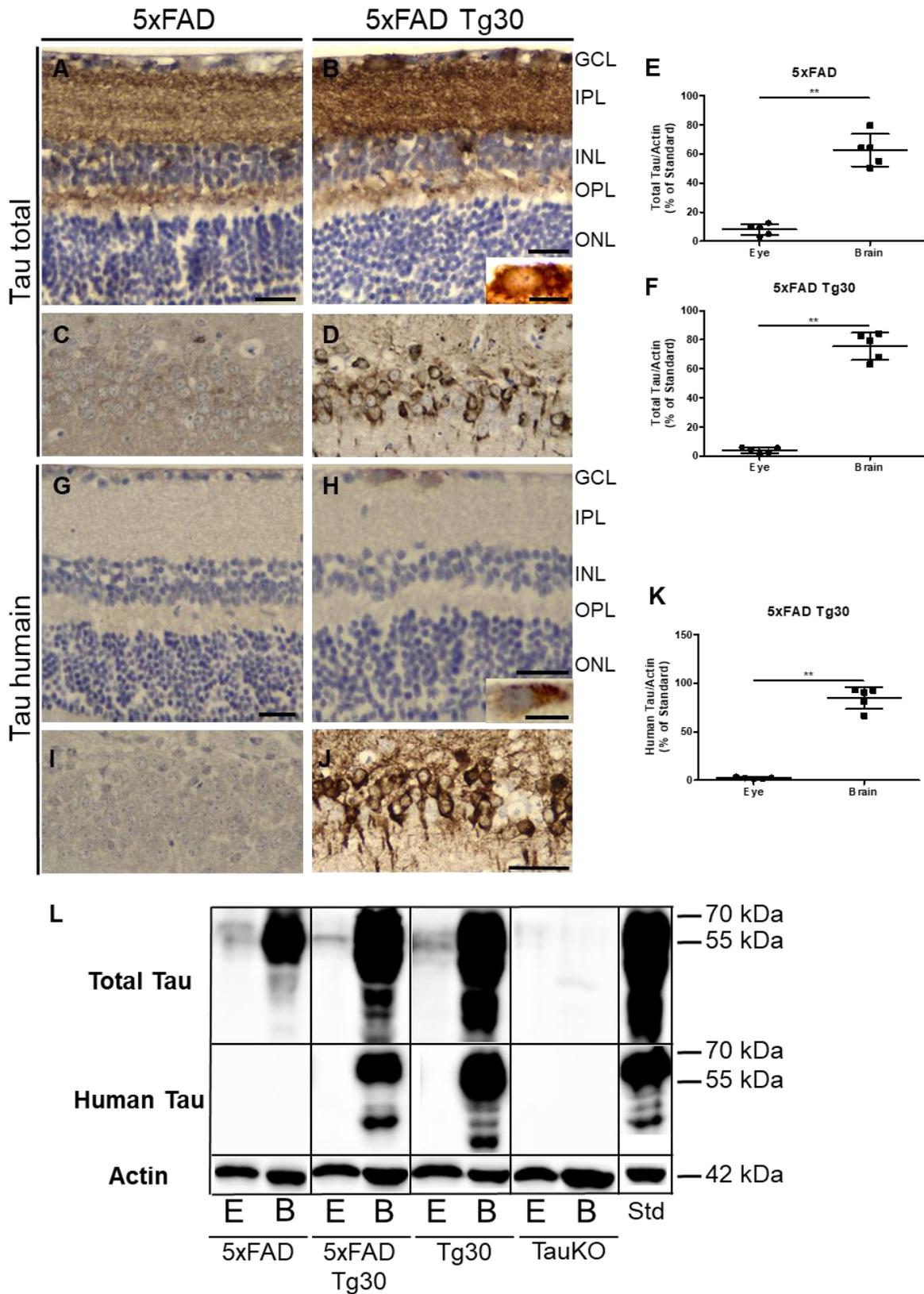
La protéine tau est exprimée dans les couches plexiformes de la rétine des souris 5xFAD (**Fig. 65A**) et 5xFAD Tg30 (**Fig. 65B**) et dans la couche des cellules ganglionnaires de la rétine des souris 5XFAD Tg30 (**Fig. 65B**).

L'analyse protéique par western blotting a montré un taux d'expression plus élevé de la protéine tau dans le cerveau par rapport à l'œil des souris 5xFAD (**Fig. 65E**) et 5xFAD Tg30 (**Fig. 65F**).

La protéine tau humaine mutée est observée dans le cytoplasme des cellules ganglionnaires de la rétine des souris 5xFAD Tg30 (**Fig. 65H**).

Le taux d'expression, analysé par western blotting a montré une expression supérieure de la protéine tau humaine dans le cerveau comparé à l'œil des souris 5xFAD Tg30 (**Fig. 65K**).

Des neurones pyramidaux de la corne d'Ammon de l'hippocampe sont mis en évidence par les anticorps anti-tau total et humain dans les souris 5xFAD Tg30 (**Fig. 65D et J**), comme attendu.



**Fig. 65 :** Localisation et expression des protéines tau dans la rétine de souris 5xFAD et 5xFAD Tg30. Immunomarquage de la rétine (A-B et G-H) et de l'hippocampe (C-D et I-J) de souris 5xFAD (A,C,G,I) et 5xFAD Tg30 (B,D,H,J) avec l'anticorps anti-tau total (A-D) ou avec l'anticorps anti-tau humain (G-J). La quantification de l'expression des protéines tau totales (E-F) ou des protéines tau humaines (K) dans les homogénats d'yeux (« eye ») et de cerveaux (« brain ») des souris 5xFAD et

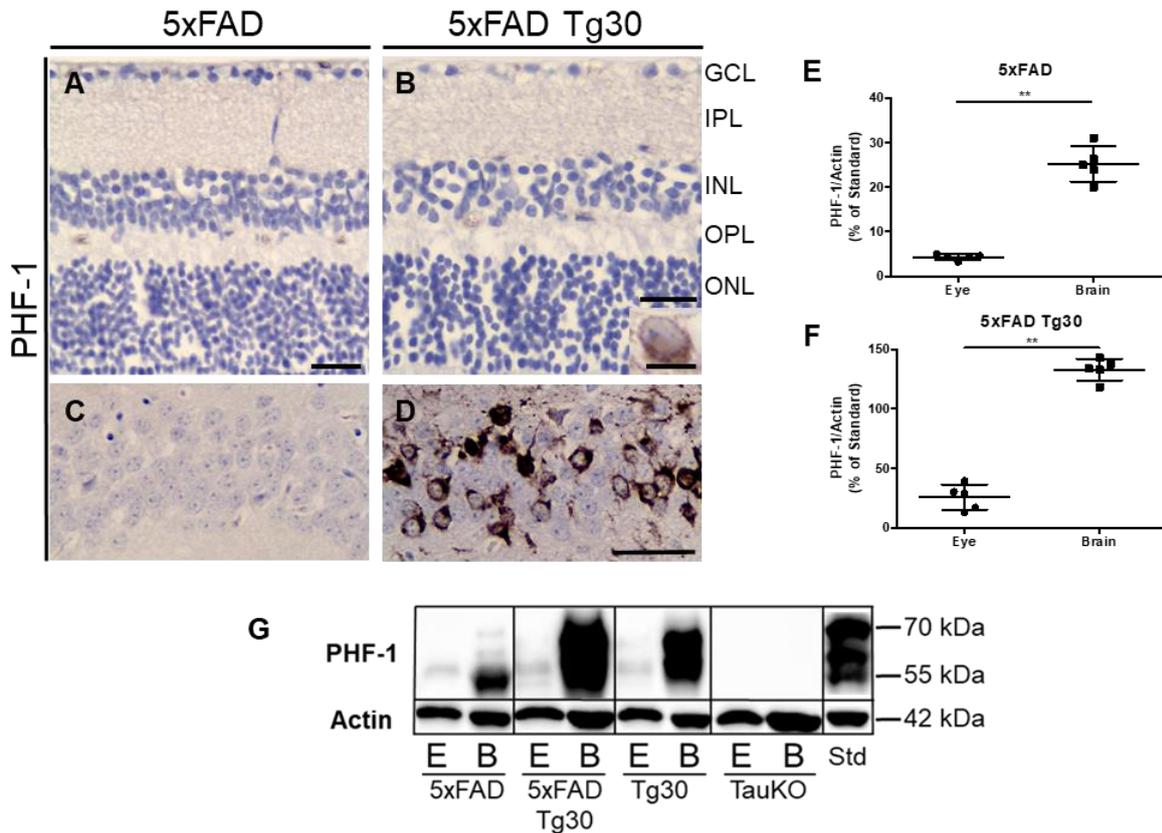
## Résultats

5xFAD Tg30 a montré un taux d'expression significativement plus élevé dans les cerveaux par rapport aux yeux des deux modèles murins. Les résultats obtenus sont exprimés en un pourcentage par rapport à un standard (**Std**) pris comme référence et qui correspond au 100 %. Le standard utilisé est un homogénat de cerveau d'une souris Tg30. Test de Mann-Whitney (Two-Tailed),  $**p < 0,01$ . Total tau :  $p = 0,0079$  (5xFAD) et  $p = 0,0079$  (5xFAD Tg30) ; tau humain :  $p = 0,0079$  (5xFAD Tg30) ; 5xFAD (n=5) et 5xFAD Tg30 (n=5). Western blotting d'homogénats d'yeux (eye/E) ou de cerveau (brain/B) de souris 5xFAD et 5xFAD Tg30 avec l'anticorps anti-tau total ou avec l'anticorps anti-tau humain (**L**). L'actine a été utilisée comme contrôle de charge. Une souris Tg30 a servi de contrôle positif pour la protéine tau et une souris TauKO a fait office de contrôle négatif pour la protéine tau. **GCL** : couche des cellules ganglionnaires (Ganglion Cell Layer), **IPL** : couche plexiforme interne (Inner Plexiform Layer), **INL** : couche nucléaire interne (Inner Nuclear Layer), **OPL** : couche plexiforme externe (Outer Plexiform Layer) et **ONL** : couche nucléaire externe (Outer Nuclear Layer). Barres d'échelle : **A,B,G et H** : 20  $\mu\text{m}$ , petites images en **B et H** : 10  $\mu\text{m}$ , **C,D,I et J** : 50  $\mu\text{m}$ .

### 4.3.2.3. Expression et localisation de la protéine tau phosphorylée

La protéine tau phosphorylée sur les épitopes Ser396/404 reconnus par l'anticorps anti-tau phosphorylé PHF-1 était présente dans le cytoplasme de quelques neurones de la couche des cellules ganglionnaires de la rétine des souris 5xFAD Tg30 (**Fig. 66B**).

La quantification des bandes protéiques obtenues par western blotting en utilisant l'anticorps PHF-1 a montré une phosphorylation plus importante de la protéine tau sur les épitopes Ser396/404 dans le cerveau par rapport à l'œil des souris 5xFAD (**Fig. 66E**) et 5xFAD Tg30 (**Fig. 66F**).



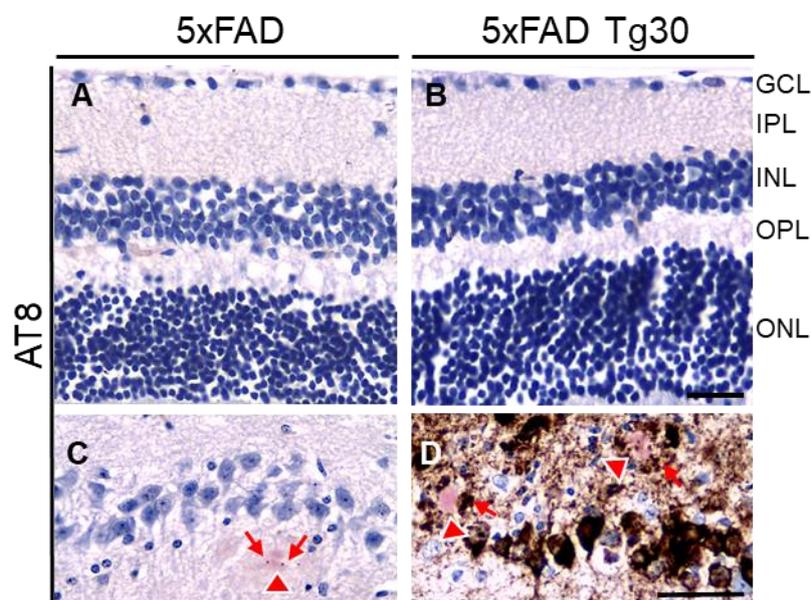
**Fig. 66 : Localisation et expression de la protéine tau phosphorylée (pSer396/404) dans la rétine de souris 5xFAD et 5xFAD Tg30.** Immunomarquage de la rétine (A-B) et de l'hippocampe (C-D) des souris 5xFAD (A,C) et 5xFAD Tg30 (B,D) avec l'anticorps anti-tau phosphorylé PHF-1 (pSer396/404). La quantification des bandes obtenues par western blotting (G) a montré une expression plus élevée des protéines tau phosphorylées sur les épitopes Ser396/404 dans le cerveau (« brain ») comparé à l'œil (« eye ») des souris 5xFAD (E) et 5xFAD Tg30 (F). Les résultats obtenus sont exprimés en un pourcentage par rapport à un standard (Std) pris comme référence et qui correspond au 100 %. Le standard utilisé est un homogénat de cerveau d'une souris Tg30. Test de Mann-Whitney (Two-Tailed), \*\* $p < 0,01$ .  $p = 0,0079$  (5xFAD) et  $p = 0,0079$  (5xFAD Tg30) ; 5xFAD (n=5) et 5xFAD Tg30 (n=5). Western blotting d'homogénats d'yeux (E/Eye) ou de cerveau (B/Brain) de souris 5xFAD et 5xFAD Tg30 avec l'anticorps anti-tau phosphorylé PHF-1 (G). L'actine a été utilisée comme contrôle de charge. Une souris Tg30 a servi de contrôle positif pour la protéine tau et une souris TauKO a fait office de contrôle négatif pour la protéine tau. **GCL** : couche des cellules ganglionnaires (Ganglion Cell Layer), **IPL** : couche plexiforme interne (Inner Plexiform Layer), **INL** : couche nucléaire interne (Inner Nuclear Layer), **OPL** : couche plexiforme externe (Outer Plexiform Layer) et **ONL** : couche nucléaire externe (Outer Nuclear Layer). Barres d'échelle : A-B : 20  $\mu$ m, petite image en B : 10  $\mu$ m et C-D : 50  $\mu$ m.

## Résultats

La phosphorylation de la protéine tau sur les épitopes Ser202/Thr305, reconnus par l'anticorps AT8, n'a montré aucune structure ou cellule positive dans la rétine des souris 5xFAD (**Fig. 67A**) et 5xFAD Tg30 (**Fig. 67B**).

De plus, une contre-coloration au Rouge Congo n'a pas montré de plaques amyloïdes dans la rétine des deux lignées murines (**Fig. 67A-B**).

Dans l'hippocampe des souris 5xFAD (**Fig. 67C**) et 5xFAD Tg30 (**Fig. 67D**), des plaques amyloïdes sont visibles en rose. Autour des plaques amyloïdes, une accumulation de protéines tau dans des neurites dystrophiques a été mise en évidence en brun avec l'anticorps anti-tau phosphorylé AT8 dans les souris 5xFAD (**Fig. 67C**) et 5xFAD Tg30 (**Fig. 67D**). L'abondance des lésions dues à la pathologie tau dans les souris 5xFAD Tg30 par rapport aux souris 5xFAD est attribuable à l'expression du transgène qui code pour la protéine tau humaine mutée dans les souris 5xFAD Tg30 et dont les souris 5xFAD sont dépourvues.

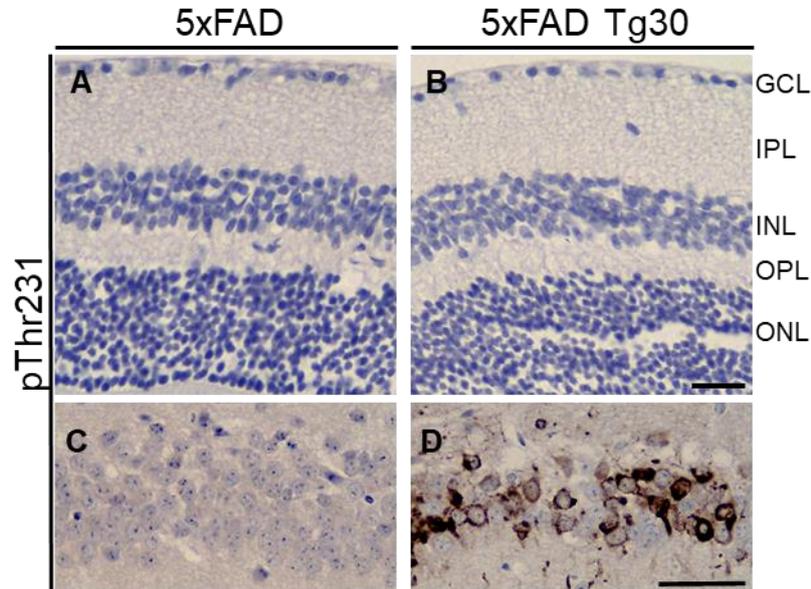


**Fig. 67 :** Localisation et expression de la protéine tau phosphorylée (pSer202/Thr305) dans la rétine de souris 5xFAD et 5xFAD Tg30. Immunomarquage de la rétine (A-B) et de l'hippocampe (C-D) des souris 5xFAD (A,C) et 5xFAD Tg30 (B,D) avec l'anticorps anti-tau phosphorylé AT8 (pSer202/Thr305) et contre-coloration au Rouge Congo. Des protéines tau marquées par l'anticorps AT8 (flèches) sont observées autour des plaques amyloïdes mises en évidence en rose par la coloration (tête de flèche) dans l'hippocampe des souris 5xFAD (C) et 5xFAD Tg30 (D) mais pas dans la rétine (A-B). GCL : couche des cellules ganglionnaires (Ganglion Cell Layer), IPL : couche plexiforme interne (Inner Plexiform Layer), INL : couche nucléaire interne (Inner Nuclear Layer), OPL : couche plexiforme externe (Outer Plexiform Layer) et ONL : couche nucléaire externe (Outer Nuclear Layer). Barres d'échelle : A-B : 20  $\mu$ m et C-D : 50  $\mu$ m.

## Résultats

La protéine tau phosphorylée sur l'épitope Thr231 n'a pas été mise en évidence dans la rétine des souris 5xFAD (**Fig. 68A**) et 5xFAD Tg30 (**Fig. 68B**).

Les neurones de la corne d'Ammon de l'hippocampe des souris 5xFAD Tg30 montrent une accumulation de la protéine tau phosphorylée à l'intérieur de leur cytoplasme (**Fig. 68D**).

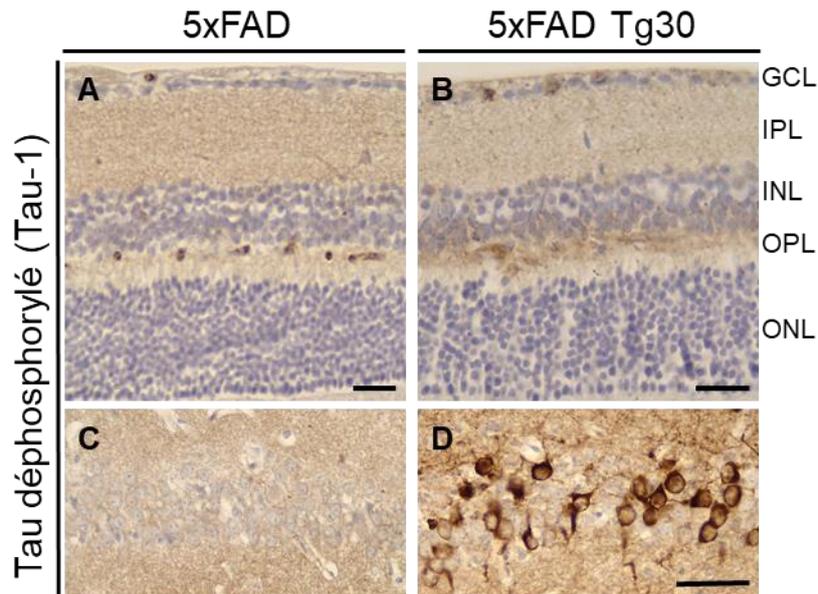


**Fig. 68 :** Localisation et expression de la protéine tau phosphorylée pThr231 dans la rétine de souris 5xFAD et 5xFAD Tg30. Immunomarquage de la rétine (A-B) et de l'hippocampe (C-D) des souris 5xFAD (A,C) et 5xFAD Tg30 (B,D) avec l'anticorps anti-tau phosphorylé pThr231. **GCL** : couche des cellules ganglionnaires (Ganglion Cell Layer), **IPL** : couche plexiforme interne (Inner Plexiform Layer), **INL** : couche nucléaire interne (Inner Nuclear Layer), **OPL** : couche plexiforme externe (Outer Plexiform Layer) et **ONL** : couche nucléaire externe (Outer Nuclear Layer). Barres d'échelle : A-B : 20  $\mu$ m et C-D : 50  $\mu$ m.

#### 4.3.2.4. Localisation de la protéine tau déphosphorylée dans la rétine

A la suite des analyses de la phosphorylation de la protéine tau, nous avons étudié la protéine tau sous sa forme déphosphorylée à l'aide de l'anticorps Tau-1 (**Fig. 69**).

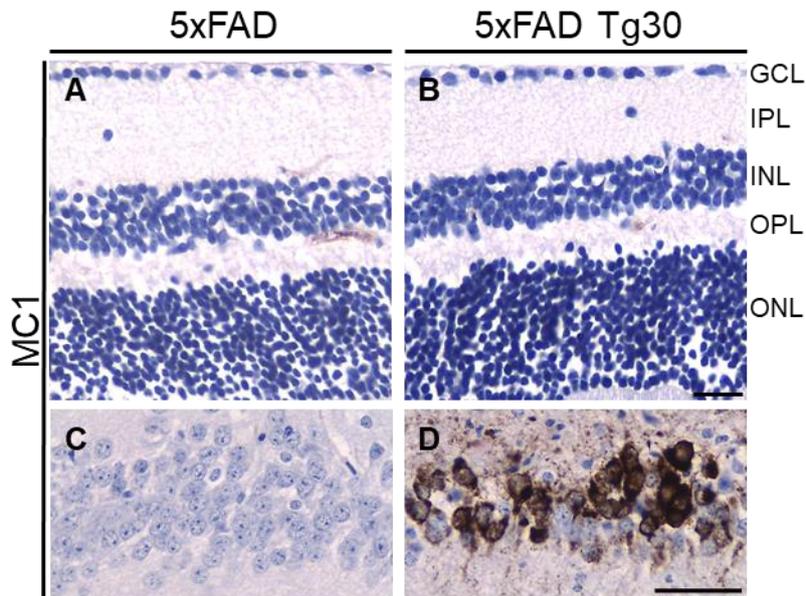
La protéine tau déphosphorylée se localise dans les couches plexiformes de la rétine des souris 5xFAD (**Fig. 69A**) et 5xFAD Tg30 (**Fig. 69B**). Les neurones pyramidaux de l'hippocampe montrent une accumulation de la protéine tau déphosphorylée à l'intérieur de leur cytoplasme (**Fig. 69D**) tandis qu'elle est exprimée dans le neuropile des souris 5xFAD (**Fig. 69C**).



**Fig. 69** : Localisation et expression de la protéine tau déphosphorylée dans la rétine de souris 5xFAD et 5xFAD Tg30. Immunomarcage de la rétine (A-B) et de l'hippocampe (C-D) des souris 5xFAD (A,C) et 5xFAD Tg30 (B,D) avec l'anticorps anti-tau déphosphorylé Tau-1. **GCL** : couche des cellules ganglionnaires (Ganglion Cell Layer), **IPL** : couche plexiforme interne (Inner Plexiform Layer), **INL** : couche nucléaire interne (Inner Nuclear Layer), **OPL** : couche plexiforme externe (Outer Plexiform Layer) et **ONL** : couche nucléaire externe (Outer Nuclear Layer). Barres d'échelle : **A-B** : 20 µm et **C-D** : 50 µm.

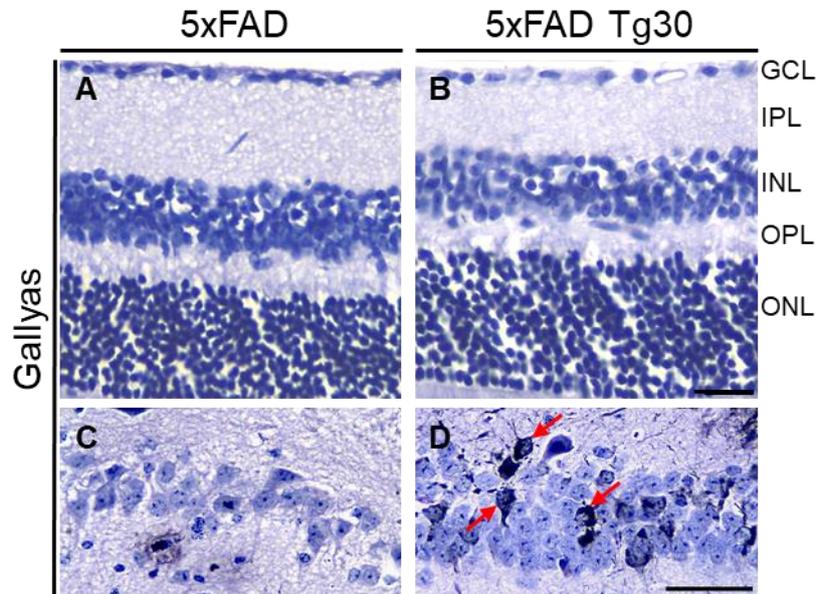
**4.3.2.5. Localisation de la protéine tau agrégée dans la rétine**

Ensuite, nous avons recherché la protéine tau sous une conformation anormale à l'aide de l'anticorps conformationnel anti-tau MC1 dans la rétine. Nous n'avons pas observé de marquage dans la rétine des cellules 5xFAD (**Fig. 70A**) et 5xFAD Tg30 (**Fig. 70B**). Contrairement à la rétine, les neurones de la corne d'Ammon de l'hippocampe des souris 5xFAD Tg30 contiennent des protéines tau de conformation anormale (**Fig. 70D**).



**Fig. 70 : Localisation et expression de la protéine tau de conformation anormale dans la rétine de souris 5xFAD et 5xFAD Tg30.** Immunomarcage de la rétine (A-B) et de l'hippocampe (C-D) des souris 5xFAD (A,C) et 5xFAD Tg30 (B,D) avec l'anticorps anti-tau conformationnel MC1. **GCL** : couche des cellules ganglionnaires (Ganglion Cell Layer), **IPL** : couche plexiforme interne (Inner Plexiform Layer), **INL** : couche nucléaire interne (Inner Nuclear Layer), **OPL** : couche plexiforme externe (Outer Plexiform Layer) et **ONL** : couche nucléaire externe (Outer Nuclear Layer). Barres d'échelle : A-B : 20 µm et C-D : 50 µm.

Nous avons également exploré la présence de la protéine tau sous une forme agrégée en utilisant la coloration Gallyas. Nous n'avons observé aucune structure ou cellule colorée au Gallyas dans la rétine des souris 5xFAD (**Fig. 71A**) et 5xFAD Tg30 (**Fig. 71B**). A l'opposé de la rétine, les neurones hippocampaux des souris 5xFAD Tg30 contiennent des protéines tau agrégées, mises en évidence en noir sur les coupes histologiques (**Fig. 71D**).



**Fig. 71 : Localisation de la protéine tau agrégée dans la rétine de souris 5xFAD et 5xFAD Tg30.** Coloration Gallyas de la rétine (**A-B**) et de l'hippocampe (**C-D**) des souris 5xFAD (**A,C**) et 5xFAD Tg30 (**B,D**). La coloration Gallyas colore en noir les protéines tau agrégées. **GCL** : couche des cellules ganglionnaires (Ganglion Cell Layer), **IPL** : couche plexiforme interne (Inner Plexiform Layer), **INL** : couche nucléaire interne (Inner Nuclear Layer), **OPL** : couche plexiforme externe (Outer Plexiform Layer) et **ONL** : couche nucléaire externe (Outer Nuclear Layer). Barres d'échelle : **A-B** : 20  $\mu$ m et **C-D** : 50  $\mu$ m.

- *La protéine tau est exprimée dans la rétine des souris 5xFAD et 5xFAD Tg30 mais à un taux plus faible comparé au cerveau.*
- *La protéine tau humaine est exprimée dans la rétine des souris 5xFAD Tg30 mais à un taux plus faible comparé au cerveau.*
- *La protéine tau phosphorylée sur les épitopes pSer396/404, pSer202/Thr305 ou pThr231 n'a pas été détectée par les anticorps PHF-1, AT8 et pThr231, respectivement, dans la rétine des souris 5xFAD.*
- *Seul un très faible nombre de cellules ganglionnaires de la rétine des souris 5xFAD Tg30 ont été marquées par l'anticorps PHF-1.*
- *La protéine tau sous une forme conformationnelle anormale n'a pas été détectée par l'anticorps MCI dans la rétine des modèles murins 5xFAD et 5xFAD Tg30.*
- *La protéine tau sous une forme agrégée n'a pas été détectée par la coloration Gallyas dans la rétine des souris 5xFAD et 5xFAD Tg30.*

#### 4.3.2.6. *Expression et localisation de la kinase GSK3 $\beta$*

Après l'analyse de la protéine tau, nous avons investigué l'expression des kinases GSK3 $\beta$  et CDK5 dans l'œil des souris 5xFAD et 5xFAD Tg30.

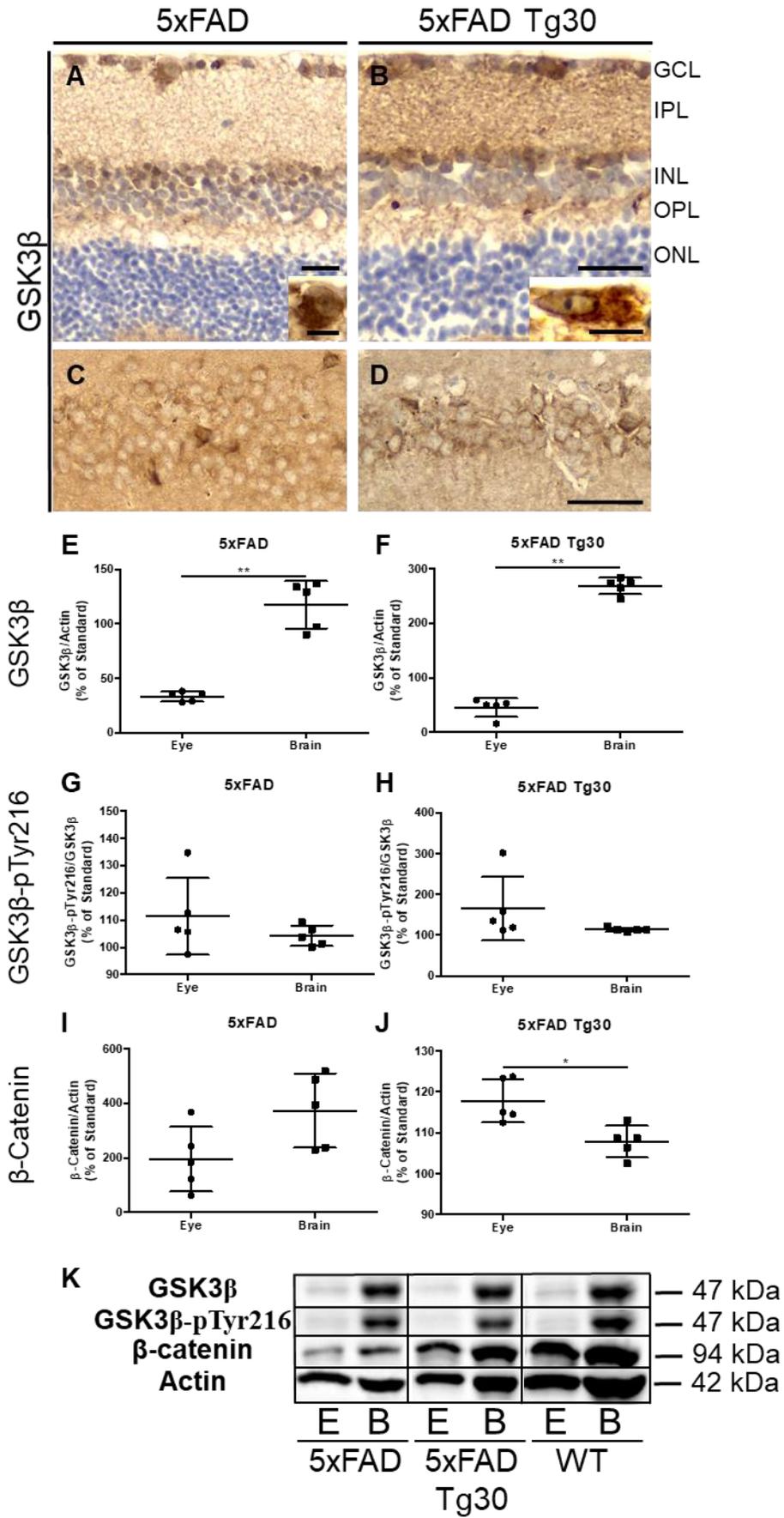
Tout d'abord nous avons analysé la kinase GSK3 $\beta$ . Cette dernière est exprimée dans les couches plexiformes et dans le compartiment somato-dendritique des cellules ganglionnaires de la rétine des souris 5xFAD (**Fig. 72A**) et 5xFAD Tg30 (**Fig. 72B**).

Dans l'hippocampe des souris 5xFAD (**Fig. 72C**) et 5xFAD Tg30 (**Fig. 72D**), nous avons observé une expression de la GSK3 $\beta$  dans le neuropile.

Le taux d'expression de la GSK3 $\beta$ , analysé par western blotting, a montré qu'il était supérieur dans le cerveau comparé à l'œil des souris 5xFAD (**Fig. 72E**) et 5xFAD Tg30 (**Fig. 72F**).

L'activité de la kinase, analysée par le taux de phosphorylation de la GSK3 $\beta$  sur son résidu Tyr216 n'a pas mis en évidence de différence entre le cerveau et l'œil des souris 5xFAD (**Fig. 72G**) et 5xFAD Tg30 (**Fig. 72H**).

L'activité de la kinase a également été évaluée, de manière indirecte, en analysant le taux de  $\beta$ -caténine. Celui-ci est similaire dans l'œil et le cerveau des souris 5xFAD (**Fig. 72I**) tandis qu'il est plus élevé dans l'œil par rapport au cerveau des souris 5xFAD Tg30 (**Fig. 72J**).

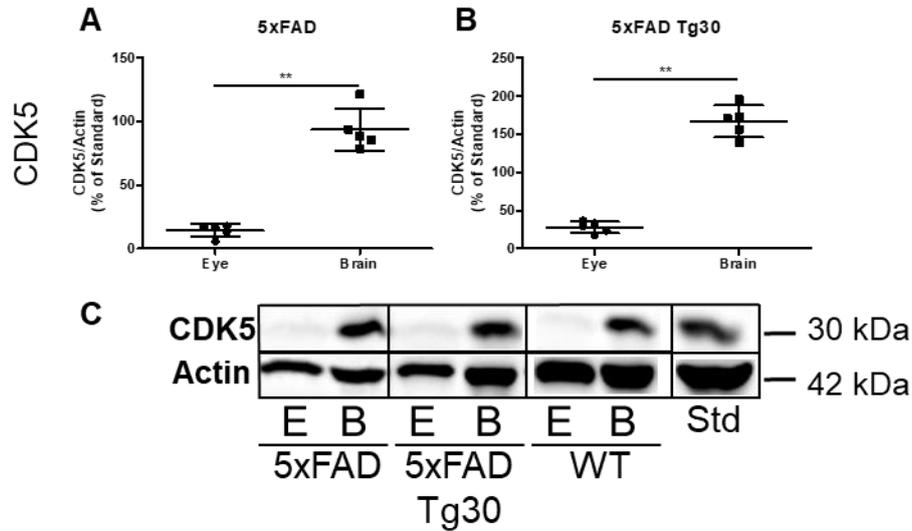


**Fig. 72 : Localisation et expression de la kinase GSK3 $\beta$  dans la rétine de souris 5xFAD et 5xFAD Tg30.** Immunomarquage de la rétine (**A-B**) et de l'hippocampe (**C-D**) des souris 5xFAD (**A,C**) et 5xFAD Tg30 (**B,D**) avec l'anticorps anti-GSK3 $\beta$  (total). Les petites images en **A et B** montrent la présence de la GSK3 $\beta$  dans le soma des cellules ganglionnaires (GCL). La quantification des bandes obtenues par western blotting (**K**) a montré une expression plus élevée de la kinase GSK3 $\beta$  dans le cerveau (« brain »/B) comparé à l'œil (« eye »/E) des souris 5xFAD (**E**) et 5xFAD Tg30 (**F**). La GSK3 $\beta$  phosphorylée sur la Tyr216 est présente de façon équivalente dans le cerveau (« brain »/B) par rapport à l'œil (« eye »/E) des souris 5xFAD (**G**) et 5xFAD Tg30 (**H**). Le taux de  $\beta$ -caténine est similaire dans le cerveau par rapport à l'œil des souris (**I**) 5xFAD et est significativement plus élevé dans l'œil par rapport au cerveau des souris 5xFAD Tg30 (**J**). Western blotting d'homogénats d'yeux (E/Eye) ou de cerveau (B/Brain) de souris 5xFAD, 5xFAD Tg30 et WT avec l'anticorps anti-GSK3 $\beta$ , anti-pTyr216-GSK3 $\beta$  ou anti- $\beta$ -caténine (**J**). L'actine a été utilisée comme contrôle de charge. Les bandes obtenues dans les souris WT sont illustrées à titre de comparaison. Les résultats obtenus sont exprimés en un pourcentage par rapport à un standard (**Std**) pris comme référence et qui correspond au 100 %. Le standard utilisé est un homogénat de cerveau d'une souris WT. Test de Mann-Whitney (Two-Tailed), \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ . GSK3 $\beta$  :  $p = 0,0079$  (5xFAD) et  $p = 0,0079$  (5xFAD Tg30), GSK3 $\beta$ -Tyr216 :  $p = 0,5476$  (5xFAD) et  $p = 0,1508$  (5xFAD Tg30),  $\beta$ -caténine :  $p = 0,0952$  (5xFAD) et  $p = 0,0159$  (5xFAD Tg30) ; 5xFAD (n=5) et 5xFAD Tg30 (n=5). **GCL** : couche des cellules ganglionnaires (Ganglion Cell Layer), **IPL** : couche plexiforme interne (Inner Plexiform Layer), **INL** : couche nucléaire interne (Inner Nuclear Layer), **OPL** : couche plexiforme externe (Outer Plexiform Layer) et **ONL** : couche nucléaire externe (Outer Nuclear Layer). Barres d'échelle : **A-B** : 20  $\mu\text{m}$ , petites images en **A et B** : 10  $\mu\text{m}$  **H et C-D** : 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.3.2.7. Expression de la kinase CDK5

Nous avons ensuite analysé la kinase CDK5. La quantification des bandes obtenues en western blotting a montré que le taux d'expression de la kinase est significativement plus élevé dans le cerveau par rapport à l'œil des souris 5xFAD (**Fig. 73A**) et 5xFAD Tg30 (**Fig. 73B**).

Les activateurs de la CDK5, les protéines p25 et p35 n'ont pas pu être détectées dans l'œil des différentes lignées de souris en western blotting (**Fig. Sup. 7**).



**Fig. 73 :** Expression de la kinase CDK5 dans la rétine de souris 5xFAD et 5xFAD Tg30. La quantification des bandes obtenues par western blotting (C) a montré une expression plus élevée de la kinase CDK5 dans le cerveau (« brain »/B) comparé à l'œil (« eye »/E) des souris 5xFAD (A) et 5xFAD Tg30 (B). Les résultats obtenus sont exprimés en un pourcentage par rapport à un standard (Std) pris comme référence et qui correspond au 100 %. Le standard utilisé est un homogénat de cerveau d'une souris WT. Test de Mann-Whitney (Two-Tailed), \*\* $p < 0,01$ .  $p = 0,0079$  (5xFAD) et  $p = 0,0079$  (5xFAD Tg30) ; 5xFAD (n=5) et 5xFAD Tg30 (n=5). Western blotting d'homogénats d'yeux (E/Eye) ou de cerveau (B/Brain) de souris 5xFAD, 5xFAD Tg30 et WT avec l'anticorps anti-CDK5 (C). L'actine a été utilisée comme contrôle de charge. Les bandes obtenues dans les souris WT sont illustrées à titre de comparaison.

- La *GSK3β* est présente dans les couches plexiformes et le cytoplasme des cellules ganglionnaires de la rétine des souris 5xFAD et 5xFAD Tg30.
- Le taux d'expression de la *GSK3β* et de la *CDK5* est significativement supérieur dans le cerveau par rapport à la rétine des souris 5xFAD et 5xFAD Tg30.

## Résultats

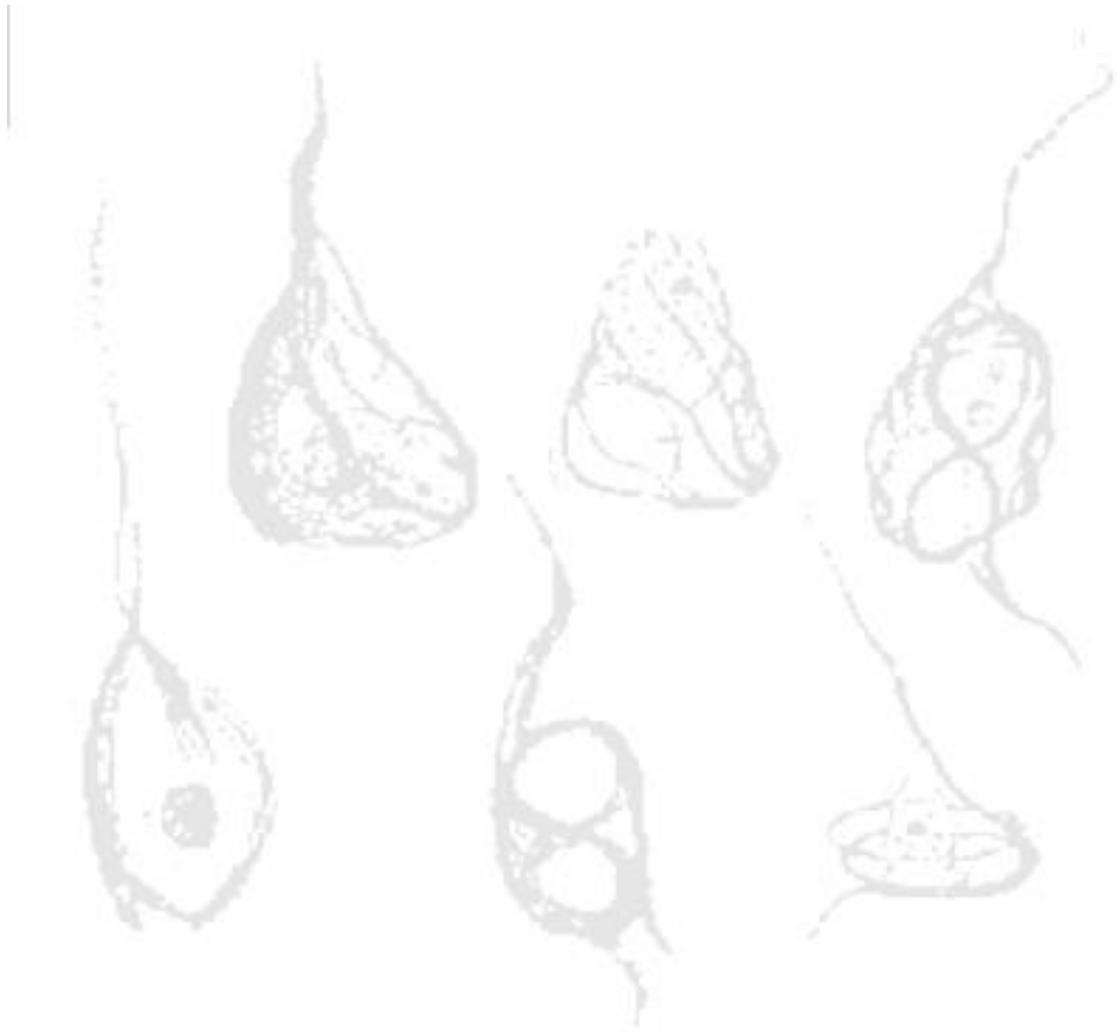
Un tableau récapitulatif des résultats obtenus par immunohistochimie ou par western blotting des analyses effectuées sur les souris 5xFAD et 5xFAD Tg30 est présenté en **Tableau 10**. Des tableaux récapitulatifs des marquages de la protéine tau, des kinases et de la protéine amyloïde, réalisés sur le cerveau des souris sont présentés dans les **Tableau Sup. 3**, **Tableau Sup. 4** et **Tableau Sup. 5** respectivement.

		5xFAD		5xFAD Tg30	
		IHC	WB	IHC	WB
<i>Amyloïde</i>	<b>Aβ40</b>	Neg	-	Neg	-
	<b>Aβ42</b>	Neg	-	Neg	-
	<b>Rouge Congo</b>	Neg	NA	Neg	NA
<i>Tau</i>	<b>Tau total</b>	IPL, OPL	B>E	GCL, IPL, OPL	B>E
	<b>Tau humain</b>	Neg	NA	GCL	B>E
	<b>PHF-1</b>	Neg	B>E	GCL	B>E
	<b>AT8</b>	Neg	-	Neg	-
	<b>pThr231</b>	Neg	-	Neg	-
	<b>Tau déphosphorylé</b>	IPL, OPL	-	IPL, OPL	-
	<b>MC1</b>	Neg	NA	Neg	NA
<b>Gallyas</b>	Neg	NA	Neg	NA	
<i>Kinases</i>	<b>GSK3β</b>	GCL, IPL, OPL	B>E	GCL, IPL, OPL	B>E
	<b>GSK3β-pTyr216</b>	-	E=B	-	E=B
	<b>β-caténine</b>	-	E=B	-	E>B
	<b>CDK5</b>	-	B>E	-	B>E

**Tableau 10 :** Tableau récapitulatif des résultats obtenus par immunohistochimie (IHC) et western blotting (WB) pour les analyses comparatives de la protéine tau et des kinases dans l'œil par rapport au cerveau dans les modèles murins 5xFAD et 5xFAD Tg30. Les résultats positifs en IHC sont mis en évidence en vert et les résultats négatifs sont notés « Neg ». **GCL** : couche des cellules ganglionnaires (Ganglion Cell Layer), **IPL** : couche plexiforme interne (Inner Plexiform Layer), **OPL** : couche plexiforme externe (Outer Plexiform Layer). Les résultats obtenus en WB sont résumés par les symboles « > » et « = » lorsque l'expression de la protéine d'intérêt dans le cerveau comparé à l'œil est statistiquement supérieure ou lorsqu'il n'y a pas de différence significative respectivement. **B** : cerveau (« brain » en anglais) et **E** : œil (« eye » en anglais). **NA** : non applicable. « - » : pas de données disponibles

### En conclusion :

- ⇒ *Aucun dépôt amyloïde n'a été observé dans la rétine des souris 5xFAD et 5xFAD Tg30.*
- ⇒ *La protéine tau exprimée dans la rétine semble être peu phosphorylée et n'est pas rencontrée sous une forme conformationnelle anormale ou agrégée dans les souris 5xFAD et 5xFAD Tg30.*
- ⇒ *Les kinases GSK3β et CDK5 sont exprimées dans la rétine des souris 5xFAD et 5xFAD Tg30 mais à un taux plus faible comparé au cerveau.*



# *Discussion*



## 5. Discussion

La maladie d'Alzheimer est la cause la plus fréquente de démence et représente un défi pour les soins de santé dans nos sociétés vieillissantes. Dans cette maladie, des lésions intraneuronales, appelées dégénérescences fibrillaires, sont caractérisées par une accumulation, une conformation (repliement) et une agrégation anormale de protéines tau qui conduisent à un dysfonctionnement des neurones aboutissant à des troubles cognitifs.

De plus en plus d'études semblent démontrer que la protéine tau partage des propriétés de nucléation et de propagation avec la protéine prion. Ces propriétés de type prion ont été dénommées « prion-like ». Bien que, à l'inverse des protéines prions qui sont transmissibles entre individus et parfois entre différentes espèces, aucune preuve ne montre que la protéine tau soit infectieuse. Néanmoins, cette possibilité ne doit pas être ignorée et requiert des expérimentations supplémentaires pour écarter ou non cette possibilité.

L'injection intrapéritonéale d'homogénats de cerveaux de souris transgéniques qui surexpriment une protéine tau humaine mutée (P301S) dans des souris de même génotype âgées de trois mois et analysées neuf mois plus tard a montré une augmentation des cellules positives au Gallyas dans le tronc cérébral et le néocortex (Clavaguera et al., 2014). Mis à part cette étude, peu d'informations sont disponibles sur les voies de transmission extracérébrales possibles pour la pathologie tau.

Afin d'évaluer le caractère infectieux de la protéine tau, nous avons procédé à des injections périphériques de protéines PHF-tau, isolées du cerveau d'un patient décédé de la maladie d'Alzheimer dans des souris sauvages et transgéniques afin d'estimer les risques liés aux transfusions sanguines et aux chirurgies oculaires.

### **5.1. L'injection intravasculaire de protéines PHF-tau accroît la neuroinflammation et les pathologies amyloïde et tau dans des souris transgéniques 5xFAD**

L'injection intravasculaire de protéines PHF-tau isolées d'un cerveau d'un patient décédé de la MA a induit une neuroinflammation à long-terme, mise en évidence par une augmentation de la microgliose et de l'astrogliose, et a provoqué une augmentation de la pathologie amyloïde associée à une amplification de la pathologie tau dans le cerveau des souris 5xFAD.

Précédemment, des études sur les effets d'une immunisation active sur la pathologie tau à l'aide d'injections périphériques répétées et d'adjuvants, en sous-cutané, de différents peptides tau (Rozenstein-Tsalkovich et al., 2013, Boimel et al., 2010) ou de PHF-tau isolés de cerveaux Alzheimer (Ando et al., 2014) et de protéines tau recombinantes en IP (Rosenmann et al., 2006) dans des souris WT (Rosenmann et al., 2006, Rozenstein-Tsalkovich et al., 2013) ou transgéniques (qui développent une pathologie tau) (Boimel et al., 2010, Rozenstein-Tsalkovich et al., 2013, Ando et al., 2014) ont montré la présence (Rosenmann et al., 2006, Rozenstein-Tsalkovich et al., 2013) ou une absence de neuroinflammation (Boimel et al., 2010, Ando et al., 2014) à la suite des injections. La production d'anticorps dirigés contre les protéines tau injectées a été observée par l'ensemble de ces études (Rosenmann et al., 2006, Boimel et al., 2010, Rozenstein-Tsalkovich et al., 2013, Ando et al., 2014). La pathologie tau était diminuée après la vaccination dans les souris transgéniques (Boimel et al., 2010, Ando et al., 2014). Dans notre étude, nous avons observé, après une injection intravasculaire unique de PHF-tau en l'absence d'adjuvants, une augmentation de la neuroinflammation dans le gyrus denté des souris transgéniques 5xFAD sans la production d'anticorps anti-tau, ce qui suggère que la microgliose et l'astrogliose observées ne résultent pas d'une réponse humorale. La neuroinflammation produite par l'injection de lipopolysaccharides (LPS) dans le cerveau est exacerbée dans les souris transgéniques pour l'APP comparée aux souris WT (Herber et al., 2004). Les marqueurs d'activation gliale, étudiés sur une période de 28 jours, diminuent ensuite progressivement (Herber et al., 2004). Nous avons, dans notre étude, observé une neuroinflammation six mois après l'injection intravasculaire de PHF-tau, ce qui suggère que l'augmentation des réponses gliales n'est pas due à une réponse inflammatoire non-spécifique et transitoire. De plus, l'augmentation des cellules microgliales et des astrocytes a été observée uniquement dans les souris 5xFAD injectées avec les PHF-tau et non dans les souris 5xFAD injectées avec une fraction contrôle, indiquant que la neuroinflammation est provoquée par les PHF-tau. Aussi, la neuroinflammation n'a pas été observée dans les souris WT injectées avec des PHF-tau, nous supposons, dès lors, que la perméabilité augmentée de la barrière hémato-encéphalique dans les souris 5xFAD, comme nous l'avons confirmé en détectant des immunoglobulines extravasées dans le tissu cérébral, facilite l'entrée des protéines PHF-tau injectées en IV dans le cerveau de ces souris 5xFAD.

Nous avons également observé que l'injection intravasculaire de PHF-tau augmentait les dépôts amyloïdes dans les souris 5xFAD. Le rôle de l'inflammation cérébrale dans la formation des plaques amyloïdes n'est pas encore complètement élucidé étant donné que des modèles murins sauvages ou transgéniques développant une pathologie amyloïde, dont la réponse inflammatoire innée est provoquée par l'injection de LPS montre une augmentation (Lee et al., 2008) ou une réduction des plaques amyloïdes (DiCarlo et al., 2001) ou ne montre qu'un effet transitoire sur les dépôts amyloïdes (Herber et al., 2004). Néanmoins, il semblerait que l'injection périphérique de LPS (Lee et al., 2008), par rapport à l'injection intracérébrale

(DiCarlo et al., 2001, Herber et al., 2004), provoque une inflammation systémique qui donne lieu à la formation des plaques amyloïdes. La neuroinflammation importante observée dans le gyrus denté des souris 5xFAD injectées avec des PHF-tau pourrait être responsable de l'augmentation des plaques amyloïdes. En effet, les cellules microgliales joueraient un rôle dans le développement des plaques amyloïdes. Les cellules microgliales sont localisées autour des plaques amyloïdes (Wegiel and Wisniewski, 1990, Baik et al., 2016) et en phagocytant les fibres amyloïdes seraient responsables de la formation initiale des plaques (Spangenberg et al., 2019) et de leur développement (Baik et al., 2016). A contrario, (Wegiel and Wisniewski, 1990) suggèrent que les cellules microgliales ne phagocytent pas les fibres amyloïdes mais sont responsables de leur production. De plus, la déplétion des cellules microgliales à l'aide d'un inhibiteur (Spangenberg et al., 2019) ou l'utilisation d'un anti-inflammatoire qui diminue la proportion de cellules microgliales activées et d'astrocytes réactifs (Aytan et al., 2016) dans les souris 5xFAD montre une diminution des plaques amyloïdes, ce qui indique que les cellules gliales peuvent affecter la formation de la pathologie amyloïde. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que l'augmentation des plaques amyloïdes soit initialement responsable de l'augmentation de l'astroglie et de la microglie que nous avons observées dans les souris 5xFAD injectées avec les PHF-tau et localisées autour des dépôts amyloïdes.

Une précédente étude a montré que des protéines tau humaines sécrétées qui ont été ajoutées dans le milieu de culture de neurones corticaux entraîne une production accrue de peptides A $\beta$  (Bright et al., 2015). Ces résultats soutiennent nos observations *in vivo* et sont en faveur de notre hypothèse qui postule que les PHF-tau injectés en intravasculaire, qui sont entrés dans le cerveau par la BHE altérée des 5xFAD, peuvent être responsables de la pathologie amyloïde exacerbée qui a été observée dans ces souris.

Nous avons observé une augmentation des protéines tau anormalement phosphorylées et de conformation anormale dans les neurites dystrophiques qui entourent les plaques amyloïdes dans les souris 5xFAD injectées avec les PHF-tau par rapport aux souris 5xFAD injectées avec une fraction contrôle. Par conséquent, cela suggère que l'accroissement de la pathologie amyloïde observée dans les souris 5xFAD injectées avec les PHF-tau a conduit à la hausse de la phosphorylation de la protéine tau dans ces neurites dystrophiques entourant les dépôts amyloïdes. De fait, plusieurs études ont montré que les protéines amyloïdes intensifient la pathologie tau. Des lignées de souris qui co-expriment une protéine tau humaine mutée et une protéine APP humaine mutée (Lewis et al., 2001, Bolmont et al., 2007, Terwel et al., 2008), en parallèle (Oddo et al., 2003, Héraud et al., 2014) ou non d'une protéine PS1 humaine mutée montrent une exacerbation de la pathologie tau. L'injection intracérébrale de peptides amyloïdes synthétiques (Götz et al., 2001) ou issus d'homogénats de cerveaux de souris APP (Bolmont et al., 2007) dans des souris exprimant une protéine tau humaine mutée provoquent une pathologie tau importante. Néanmoins, par rapport à notre étude, des mécanismes différents d'interactions entre les protéines tau et amyloïde doivent être impliqués dans ces modèles car dans ceux-ci, la pathologie tau se développe de manière spontanée à la suite de l'expression du transgène qui code pour une protéine tau humaine mutée. Par conséquent, la pathologie tau est aggravée mais pas induite par les protéines  $\beta$ -amyloïdes dans ces modèles expérimentaux. Dans notre étude, l'amplification de la pathologie tau observée dans les neurites dystrophiques pourrait avoir été provoquée par l'importante neuroinflammation, comme suggéré par d'autres équipes (Asai et al., 2015, Maphis et al., 2015). Ainsi, la déplétion de la microglie diminue drastiquement la propagation de la pathologie tau dans des modèles murins (Asai et al., 2015)

## Discussion

et à l'inverse, l'absence de la protéine tau protège contre l'inflammation responsable d'une neurotoxicité (Maphis et al., 2015).

Les protéines PHF-tau injectées dans l'hippocampe (He et al., 2018) ou le cortex somatosensoriel (Vergara et al., 2019) de souris 5xFAD provoquent l'accumulation de protéines tau hyperphosphorylées (AT8 positives) mais non agrégées (Gallyas négatives) dans les neurites dystrophiques qui entourent les plaques amyloïdes et une propagation de la pathologie tau. Ces mêmes observations ont été obtenues dans notre étude avec l'injection intravasculaire de PHF-tau dans des souris 5xFAD. Néanmoins, nous n'avons pas constaté la présence d'inclusions de protéines tau dans les neurones des souris injectées en intravasculaire avec des PHF-tau, à l'inverse des observations obtenues après l'injection intracérébrale de PHF-tau (He et al., 2018). Nous ne pouvons cependant pas écarter que la formation d'inclusions de protéines tau à l'intérieur des neurones puisse être observée après un temps d'incubation plus long étant donné que des agrégats de protéines tau peuvent se développer spontanément dans des souris transgéniques APP/PS1 âgées (Metaxas et al., 2019). De plus, l'absence d'inclusions de protéines tau dans les neurones des souris 5xFAD après l'injection intraveineuse de PHF-tau n'est pas spécifiquement attribuable à la voie d'inoculation puisque l'injection intracérébrale de PHF-tau dans des souris de même génotype ne montre pas non plus d'accumulation de protéines tau dans le soma des cellules neuronales (Vergara et al., 2019). De plus, il semblerait que la présence des plaques amyloïdes favorise l'accumulation de protéines tau hyperphosphorylées dans les neurites plutôt que dans le soma des neurones après une injection intracérébrale de PHF-tau dans des souris 5xFAD, tandis que la faible présence de dépôts amyloïdes chez de jeunes souris 5xFAD montre une abondance de DNF comparé aux neurites dystrophiques (He et al., 2018). Un temps d'incubation plus long pourrait également favoriser la formation de DNF après une injection intravasculaire de PHF-tau car la formation de DNF après une injection intracérébrale de PHF-tau dans des souris 5xFAD est observée à partir de six mois post-injection (les DNF sont absentes après trois mois d'incubation) (He et al., 2018).

En conclusion, nous avons montré dans cette étude qu'une injection intravasculaire unique de protéines PHF-tau isolées d'un cerveau de patient décédé de la maladie d'Alzheimer était suffisante pour induire une neuroinflammation à long-terme et une augmentation des dépôts amyloïdes et de la pathologie tau associée dans les souris 5xFAD qui développent des plaques amyloïdes et qui possèdent une perméabilité plus élevée de la BHE.

Les protéines tau ont été détectées dans le sang à l'aide de techniques sensibles (Zetterberg et al., 2013, Chiu et al., 2017, Tatebe et al., 2017, Fossati et al., 2019, Lue et al., 2019) et notre étude suggère que les produits sanguins contenant des protéines tau modifiées pourraient jouer un rôle potentiel en modulant le développement des pathologies observées dans la MA dans le cerveau d'individus âgés qui présentent une BHE plus perméable. Notre étude, réalisée dans un modèle murin fournit une information importante sur le risque relatif de la MA par la voie extracérébrale, qui est médicalement pertinente, compte tenu de la large utilisation des produits sanguins.

Plusieurs limites dans notre étude devront toutefois être abordées dans des études futures, notamment la confirmation de nos résultats dans des cohortes plus importantes afin de prendre en compte les variabilités de la voie d'administration. Le rôle de la BHE devra également être soumise à des examens supplémentaires. Des études comparatives

additionnelles sur les effets des injections intraveineuses et intracérébrales apporteraient des informations sur l'efficacité relative de ces voies dans le développement de la pathologie tau.

### **5.2. L'injection intraoculaire de protéines PHF-tau ne propage pas de pathologie tau vers le cerveau par la voie rétino-tectale dans des souris WT, hTau et Tg22**

Les dégénérescences neurofibrillaires, composées d'une accumulation de protéines tau hyperphosphorylées dans le soma et les neurites des cellules neuronales, se propagent progressivement entre des régions cérébrales qui sont synaptiquement connectées.

Des études précédentes ont démontré que l'injection intracérébrale, de protéines tau pathologiques isolées de cerveaux humains, dans différents modèles de souris pouvait induire la nucléation, qui provoque l'agrégation de protéines tau normales (Clavaguera et al., 2013, Audouard et al., 2016, Vergara et al., 2019). Ces résultats expérimentaux suggèrent que les protéines tau pathologiques possèdent certaines propriétés autrefois associées uniquement aux protéines prions. Les protéines prions peuvent se propager par la voie rétino-tectale après des greffes de cornée (Duffy et al., 1974, Heckmann et al., 1997) ou de sclère (Mehta and Franks, 2002) ou lors d'injection intraoculaire de prions dans des modèles expérimentaux (Fraser, 1982). Les protéines prions pathologiques (PrP<sup>Sc</sup>) ont été observées dans les couches plexiformes de la rétine de patients décédés de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (Head et al., 2003, Head et al., 2005) et l'injection intracérébrale d'homogénats d'yeux de sujets atteints de la CJD dans des primates non-humains a montré une transmission de la maladie (Brown et al., 1994). Pour évaluer les capacités de nucléation et de propagation des protéines tau pathologiques (PHF-tau) à travers la voie rétino-tectale, nous avons analysé la formation et la propagation de la pathologie tau dans la rétine et les aires cérébrales associées au système visuel dans différents modèles murins qui expriment des protéines tau murines et/ou humaines, après une injection intraoculaire de PHF-tau isolés d'un cerveau atteint de la MA.

Nous avons d'abord validé notre méthode d'injection intraoculaire en utilisant la sous-unité B de la toxine du choléra qui a été rapidement transportée de la rétine aux aires cérébrales connectées : le corps genouillé latéral et le colliculus supérieur, comme précédemment décrit dans la littérature (Angelucci et al., 1996).

Ensuite, nous avons observé l'internalisation des PHF-tau injectés dans les cellules ganglionnaires de la rétine six heures après l'injection. Dans une étude récente utilisant les mêmes temps d'analyses que la nôtre, des fibrilles tronquées K18 composées de protéines tau humaines mutées recombinantes (résidus 244-372 de l'isoforme 2N4R portant la mutation P301L) n'ont pas été internalisées par la rétine après leur injection intravitréenne dans des souris sauvages (Veys et al., 2021). Cette divergence avec nos résultats pourrait s'expliquer par la nature du matériel injecté. En effet, (Veys et al., 2021) ont utilisé des protéines tau recombinantes K18 tandis que nous avons injectés des protéines PHF-tau isolées d'un cerveau atteint de la MA. Les PHF-tau possèdent les modifications post-traductionnelles retrouvées dans la MA telles qu'une phosphorylation et une conformation anormales qui peuvent jouer un rôle important dans leurs capacités, non seulement de former des agrégats, mais aussi à être internalisées par les cellules. Effectivement, il semblerait que la phosphorylation des épitopes Ser202 et Thr205, reconnus par l'anticorps AT8 en combinaison avec l'épitope Ser208 entraînent l'agrégation de la protéine tau (Despres et al., 2017) et la déphosphorylation *in vitro* de protéines tau anormalement phosphorylées et hyperphosphorylées isolées de cerveaux atteints de la MA inhibe leur auto-assemblage en PHF (Alonso et al., 2001). Aussi, des

## Discussion

protéines tau recombinantes hyperphosphorylées par la GSK3 $\beta$  sont internalisées dix fois plus facilement dans des cellules en culture par rapport aux protéines tau peu phosphorylées (Wauters et al., 2016). Par conséquent, ces observations suggèrent que l'absence d'internalisation des protéines tau K18 par les cellules de la rétine pourrait être dû au manque de phosphorylation, et potentiellement d'autres modifications post-traductionnelles de ces peptides recombinants.

Malgré l'internalisation des PHF-tau par les cellules ganglionnaires de la rétine, nous n'avons pas observé l'agrégation des protéines tau endogènes exprimées par ces cellules, que ce soient des protéines tau murines sauvages (souris WT), des protéines tau humaines sauvages (souris hTau) ou des protéines tau humaines mutées prédisposées à l'agrégation (souris Tg22). Une étude antérieure a montré que l'expression de la protéine tau humaine par rapport à l'expression de la protéine tau murine dans une lignée murine accélère de manière significative la propagation de la pathologie tau après une injection intracérébrale de protéines tau extraites de cerveaux de patients atteints de la MA (Saito et al., 2019). Selon ces observations, la protéine tau humaine pourrait posséder des capacités de nucléation plus importantes que la protéine tau murine. Cependant, nous n'avons pas détecté l'agrégation de la protéine tau dans les cellules ganglionnaires de la rétine qui expriment une protéine tau humaine. L'absence de nucléation de la protéine tau dans les cellules rétinienne pourrait s'expliquer par les caractéristiques biochimiques et conformationnelles des PHF-tau utilisés dans notre étude. Bien que, les capacités de nucléation et de propagation du matériel injecté ont été démontrées dans différentes études (Audouard et al., 2016, Vergara et al., 2019) et dans la nôtre par l'injection intracérébrale de PHF-tau qui entraînent l'agrégation de la protéine tau murine. Nos résultats suggèrent donc que l'absence d'agrégation des protéines tau dans la rétine n'est pas due au manque de capacités de nucléation des PHF-tau injectés mais est plutôt due à une résistance des cellules rétinienne face au développement d'une pathologie tau. En effet, les protéines tau peuvent s'accumuler dans le corps cellulaire des cellules ganglionnaires de la rétine de patients atteints de la MA mais n'ont jamais été observées sous une forme agrégée (Schön et al., 2012, den Haan et al., 2018), ce qui soutient l'hypothèse que ces cellules sont résistantes à la nucléation et à l'agrégation de la protéine tau.

Au contraire de ce qui a été observé pour les protéines prions dans la maladie de Creutzfeldt-Jakob, la présence de la pathologie tau n'a jamais été, à notre connaissance, décrite dans la cornée ou la sclère de sujets atteints de la MA. Néanmoins, les protéines tau phosphorylées ont été détectées dans la cornée de souris transgéniques (Zhao et al., 2013) et plus spécifiquement dans les très nombreux axones qui innervent la cornée (Li et al., 2022). Par conséquent, la greffe de cornée pourrait être à risque dû à la présence des protéines tau phosphorylées dans ce tissu oculaire. La transplantation de tissu rétinien n'est pas une procédure médicale qui existe de nos jours. Cependant, les protéines tau phosphorylées ont été détectées dans les larmes (Gijs et al., 2021) et dans l'humeur vitrée (Wright et al., 2019), ce qui indique que tous les tissus oculaires pourraient potentiellement être contaminés par des protéines tau pathologiques. Les chirurgies oculaires pourraient donc présenter un risque de transmission de la pathologie tau de l'œil vers le cerveau par la voie rétinio-tectale, après l'internalisation des protéines tau pathologiques par les cellules ganglionnaires de la rétine comme nous l'avons observé dans cette étude.

Notre analyse comparative du taux d'expression de la protéine tau dans l'œil par rapport au cerveau a montré une expression moindre dans l'œil dans les différents modèles murins

## Discussion

utilisés dans cette étude. La cinétique d'agrégation de la protéine tau pourrait être dépendante de la concentration en protéines tau exprimées par un tissu, ce qui pourrait expliquer la résistance des cellules ganglionnaires de la rétine à la nucléation de la protéine tau. Effectivement, une expression augmentée de la protéine tau favorise son agrégation dans des modèles murins transgéniques et dans les tauopathies humaines. Par exemple, la duplication du gène MAPT qui augmente le taux d'expression de la protéine tau provoque la formation d'une pathologie tau et un phénotype clinique de type MA (Le Guennec et al., 2017). Cette constatation est également retrouvée avec les protéines prions. Une lignée de souris transgéniques qui possèdent plus de soixante copies d'un transgène qui code pour une protéine prion cellulaire et inoculées avec des protéines prions pathologiques homologues ont une période d'incubation avant la survenue de la maladie très réduite (48 jours) tandis que les souris transgéniques qui possèdent peu de copies du transgène ont une période d'incubation plus longue (277 jours) (Prusiner et al., 1990). Ces observations démontrent une relation inverse entre le taux d'expression de la protéine prion et la survenue de la maladie après l'inoculation de protéines prions pathologiques homologues. Les protéines prions se propagent rapidement par rapport aux protéines tau (Vasili et al., 2019), probablement parce que la protéine prion est une protéine ancrée dans la membrane plasmique par une glycolipide (Puig et al., 2014) tandis que la protéine tau est intracellulaire. Contrairement à ce qui a été observé pour les protéines prions dans des études antérieures (Fraser, 1982, Kimberlin and Walker, 1986, Brandner et al., 1996), nous n'avons pas observé la propagation d'une pathologie tau de l'œil vers le cerveau dans les différents modèles murins étudiés après six mois d'incubation. La pathologie tau n'a pas été observée au niveau des deux relais synaptiques de la voie rétino-tectale : le corps genouillé latéral et le colliculus supérieur, dans les souris WT et hTau. L'absence de propagation de la pathologie tau n'est pas attribuable à des perturbations du transport axonal dans les souris transgéniques qui surexpriment la protéine tau puisqu'il a été démontré que l'absence ou la surexpression de la protéine tau n'affecte pas le transport axonal dans les cellules ganglionnaires de la rétine (Yuan et al., 2008). La pathologie tau est présente dans les deux relais du système visuel dans les souris Tg22 mais n'était pas quantitativement différente entre les souris injectées avec des PHF-tau ou avec une fraction contrôle, ce qui suggère que la pathologie tau quantifiée est inhérente au phénotype de ces souris qui expriment une protéine tau mutée sensible à l'agrégation sous le contrôle du promoteur Thy1.2.

Nous ne pouvons pas exclure que des temps d'incubation plus long pourraient conduire à une propagation et à une agrégation de la protéine tau. Aussi, nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse qu'une autre forme pathologique de la protéine tau, telle que des oligomères, pourrait être plus compétente pour induire l'agrégation de la protéine tau et sa propagation dans le système visuel.

La neuroinflammation, caractérisée par des astrocytes réactifs et des cellules microgliales activées est un phénomène qui apparaît avant la dégénérescence des neurones dans la maladie d'Alzheimer et dans les maladies à prions (Betmouni et al., 1996, Eikelenboom et al., 2002). Les résultats des immunomarquages n'ont pas montré (qualitativement) d'activation des astrocytes ou des cellules microgliales dans la rétine des souris WT, hTau, Tg22 et TauKO injectées avec la fraction contrôle ou avec des PHF-tau. Seules quelques cellules microgliales ont été observées dans les couches plexiformes de la rétine, où elles résident en conditions physiologiques (Madeira et al., 2015). Les astrocytes dans la rétine sont majoritairement localisés dans la couche des fibres nerveuses rétinienne et leur présence est corrélée avec celle des vaisseaux sanguins (Vecino et al., 2016). Cependant, les astrocytes sont absents de la

couche des fibres nerveuses rétiniennes lorsque cette dernière est particulièrement fine et la densité des astrocytes varie en fonction de leur localisation dans la rétine (Vecino et al., 2016), ce qui peut expliquer l'absence de marquage GFAP observé dans la rétine des souris étudiées qui n'a pas mis en évidence les astrocytes présents en conditions normales dans la rétine.

La neuroinflammation a également été étudiée dans le colliculus supérieur, le relais visuel qui reçoit la majorité des afférences du nerf optique chez la souris. L'évaluation qualitative à l'aide des anticorps anti-Iba1 et GFAP n'a pas montré d'activation microgliale et astrocytaire dans les différents génotypes injectés avec la fraction contrôle ou les PHF-tau. Par conséquent, les PHF-tau injectés en intraoculaire ne semblent pas induire une neuroinflammation dans les différents génotypes murins.

En conclusion, nous avons, pour la première fois, mis en évidence que les protéines tau pathologiques isolées d'un cerveau atteint de la MA pouvaient être internalisées par les cellules ganglionnaires de la rétine après leur injection en intraoculaire. Nous n'avons pas démontré une transmission de la pathologie tau au cerveau après une contamination oculaire dans nos différents modèles murins. Nous ne pouvons néanmoins éliminer le risque d'une transmission par la voie rétino-tectale chez l'humain étant donné que des temps d'incubation plus long sont possibles même si nos résultats suggèrent qu'une chirurgie oculaire n'est pas un risque majeur de transmission de la pathologie tau.

### **5.3. La protéine tau dans la rétine est peu phosphorylée par rapport au cerveau et n'a pas été observée sous une conformation anormale ou agrégée**

L'injection intraoculaire de PHF dans des souris sauvages et transgéniques n'a pas induit la propagation de la protéine tau à travers le système visuel. Par conséquent, nous avons exploré plus en détails l'expression de la protéine tau et de kinases impliquées dans la phosphorylation de la protéine dans la rétine. En effet, les neurones rétiniens pourraient posséder des caractéristiques différentes par rapport aux neurones du cerveau qui les rendraient plus résistants à la nucléation de la protéine tau par des protéines tau pathologiques.

Dans la rétine, les protéines tau ont des fonctions similaires à celles rencontrées dans le cerveau telles que la stabilisation des microtubules et la régulation du transport axonal (Ho et al., 2012b) mais sont aussi impliquées dans le développement de l'axone pendant la différenciation des cellules ganglionnaires de la rétine (Wang et al., 2000, Lieven et al., 2007) et dans la plasticité visuelle chez la souris adulte (Rodriguez et al., 2020). Les protéines tau sont principalement exprimées sous une forme déphosphorylée dans toutes les couches de la rétine humaine (Löffler et al., 1995, Leger et al., 2011). Dans la MA, les protéines tau sont hyperphosphorylées dans toutes les couches de la rétine, à l'exception de la couche nucléaire externe (CNE/ONL) (Löffler et al., 1995, Schön et al., 2012, den Haan et al., 2018, Grimaldi et al., 2018) mais ne sont jamais sous une forme fibrillaire (den Haan et al., 2018) ou agrégée (Schön et al., 2012). De plus, les structures typiques formées par les protéines tau dans le cerveau atteint de la MA (DNF et plaques neuritiques) ne sont pas retrouvées dans la rétine (den Haan et al., 2018).

Les résultats obtenus à la suite des analyses comparatives entre la rétine et le cerveau, des pathologies tau et amyloïde, de la neuroinflammation et de l'expression des kinases, dans les modèles murins hTau, Tg22, 5xFAD et 5xFAD Tg30 sont discutés ci-après.

### 5.3.1. Souris hTau

La rétine des souris hTau a montré une expression de la protéine tau humaine dans les couches plexiformes de la rétine (CPI/IPL et CPE/OPL) et dans les cellules ganglionnaires. Cependant, cette expression est plus faible dans la rétine par rapport au cerveau comme l'ont montré les analyses par western blotting. Les analyses de l'état de phosphorylation par immunohistochimie de la protéine tau ont montré une absence de phosphorylation sur les épitopes Ser202/Thr305 reconnus par l'anticorps AT8 et sur l'épitope Thr231 et une phosphorylation variable des épitopes Ser396/Ser404 reconnus par l'anticorps PHF-1 dans la couche plexiforme externe (CPE/OPL). Nos résultats divergent de ceux reportés par (Rodriguez et al., 2018) qui montrent par immunofluorescence une expression de la protéine tau phosphorylée (AT8) dans toutes les couches de la rétine des souris hTau. Néanmoins, dans notre étude, nous avons confirmé l'absence de phosphorylation en utilisant l'anticorps Tau-1 qui reconnaît la protéine tau sous une forme déphosphorylée. Les auteurs (Rodriguez et al., 2018) reportent également une expression plus élevée de la protéine tau phosphorylée (PHF-1) dans la rétine par rapport au cerveau, analysée par western blotting, ce qui est en contradiction avec nos résultats.

### 5.3.2. Souris Tg22/30

Les souris transgéniques Tg22 et Tg30 surexpriment l'isoforme 1N4R de la protéine tau humaine mutée (P301S/G272V) en présence de la protéine tau murine endogène et développent une pathologie tau dans le cerveau. L'analyse de la rétine a montré une expression du transgène dans le corps cellulaire des cellules ganglionnaires de la rétine à l'aide d'un anticorps anti-tau humain tandis que le tau murin est majoritairement exprimé dans la couche plexiforme interne. L'équipe de (Gasparini et al., 2011) a également montré une expression de la protéine tau dans une large proportion de cellules ganglionnaires de la rétine de souris transgéniques P301S. Néanmoins, la méthodologie utilisée est différente de la nôtre. En effet, les auteurs (Gasparini et al., 2011) ont travaillé d'une part sur des coupes en cryostat (fixées au paraformaldéhyde) et d'autre part ils ont réalisé un démasquage des antigènes en utilisant les micro-ondes avant d'utiliser un anticorps anti-tau humain, ce qui suggère qu'il faut rester prudent quant aux interprétations des résultats obtenus en fonction de la méthodologie employée. Les taux de tau total et de tau humain sont significativement plus élevés dans le cerveau comparé à la rétine. Seul l'épitope Ser202/Thr305 reconnu par l'anticorps AT8 a été mis en évidence dans les cellules ganglionnaires de la rétine, ce qui est en accord avec les résultats des équipes de (Gasparini et al., 2011, Schön et al., 2012) qui ont observé un marquage AT8 dans les cellules ganglionnaires de la rétine de souris transgéniques homozygotes P301S. Notons toutefois que les souris hétérozygotes P301S présentaient une pathologie tau beaucoup moins développée que les souris homozygotes P301S (Schön et al., 2012), ce qui pourrait expliquer le faible nombre de cellules marquées par l'anticorps AT8 dans notre étude, qui a utilisé des souris hétérozygotes pour le transgène P301S/G272V. Des différences interindividuelles dans les souris pourraient également expliquer le peu de cellules positives à l'anticorps AT8. Effectivement, lors d'une étude, seules deux rétines humaines sur dix ont montré un marquage AT8 (Grimaldi et al., 2019). Bien sûr, la variabilité entre les individus est bien plus élevée dans l'espèce humaine que dans une lignée transgénique murine. A l'inverse de l'étude de (Gasparini et al., 2011) qui a montré par immunofluorescence des cellules marquées par les anticorps AT-180 (pThr231) et PHF-1 dans la rétine de souris P301S, nous n'avons pas observé par IHC de cellules positives dans la rétine des souris transgéniques Tg22. L'évaluation qualitative de leur

WB (Gasparini et al., 2011) montre des bandes protéiques révélées par l'anticorps PHF-1 dans l'œil et le cerveau de souris WT et transgéniques P301S similaires à celles que nous avons obtenues pour les souris WT et Tg22. Plus surprenant, l'équipe de (Gasparini et al., 2011) a détecté des bandes protéiques avec l'anticorps AT8 dans l'œil des souris WT. Nous avons également observé ce résultat (*non montré dans ce projet*). Toutefois, nous avons aussi détecté ce signal dans l'œil d'une souris TauKO qui n'exprime aucune protéine tau tandis que le cerveau de cette même souris était négatif, comme attendu. Par conséquent, il semblerait que la spécificité de l'anticorps AT8 ne soit pas optimale dans la rétine comparé au tissu cérébral. La protéine tau n'a jamais été reconnue par l'anticorps conformationnel MC1 ou coloré au Gallyas qui met en évidence les formes agrégées de la protéine.

Dans la MA, les astrocytes ont une expression plus élevée de la protéine GFAP dans le cerveau (Beach and McGeer, 1988) et la rétine (Blanks et al., 1996), ce qui indique leur activation. L'analyse de la neuroinflammation dans la rétine des souris Tg22 a été réalisée à l'aide de l'anticorps anti-GFAP. Nous n'avons pas détecté de cellules positives dans la rétine des souris transgéniques, contrairement à certaines études qui ont montré une activation des astrocytes et des cellules de Müller<sup>13</sup> dans des modèles murins triple transgéniques qui expriment des protéines APP, PS1 et Tau mutées (Edwards et al., 2014, Grimaldi et al., 2018).

### 5.3.3. Souris 5xFAD

La détection des plaques amyloïdes dans l'œil humain donne des résultats équivoques. En effet, certaines études ont montré la présence de plaques amyloïdes dans l'œil humain (Koronyo-Hamaoui et al., 2011, La Morgia et al., 2016, Koronyo et al., 2017) tandis que d'autres n'ont pas détecté de dépôts amyloïdes (Schön et al., 2012, Ho et al., 2014, Williams et al., 2017).

Les plaques amyloïdes dans la rétine de souris transgéniques ont été mises en évidence dans différents modèles murins qui surexpriment une protéine amyloïde mutée (Alexandrov et al., 2011, Parnell et al., 2012). Ces résultats ne sont pas incompatibles avec les nôtres, qui ne montraient pas la présence de plaques amyloïdes dans la rétine des souris 5xFAD. En effet, les dépôts amyloïdes semblent rares dans la rétine et leur faible taille n'est pas comparable aux plaques observées dans le cerveau de ces souris. Ainsi, l'étude de (Lim et al., 2020) montre une présence de dépôts amyloïdes dans quatre animaux (5xFAD) sur six analysés avec seulement 1,4 % des coupes en paraffine positives à l'anticorps anti-A $\beta$ . L'analyse de la rétine entière (« whole-mount retina <sup>14</sup>») montre également très peu de dépôts amyloïdes à l'aide d'un anticorps anti-A $\beta$ 42 (Zhang et al., 2021b). L'analyse protéique par ELISA des rétines et des cerveaux de souris 5xFAD a montré une concentration significativement plus importante des protéines A $\beta$ 42 insolubles dans le cerveau par rapport à la rétine, ce qui pourrait expliquer la rareté des dépôts amyloïdes observés en IHC (Lim et al., 2020). Ainsi, le taux de peptides A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42, mesuré par ELISA, est 15 fois supérieure dans la rétine par rapport au cerveau de souris 5xFAD et de manière surprenante, le modèle 5xFAD est celui qui se rapproche le plus, lorsqu'il est comparé à d'autres modèles transgéniques amyloïdes, du taux mesuré dans les échantillons humains avec un taux d'A $\beta$ 40/42 10 fois supérieur dans le cerveau comparé à l'œil

---

<sup>13</sup> Les cellules de Müller sont des cellules gliales présentes dans la rétine des vertébrés qui expriment, comme les astrocytes, la protéine GFAP. Les noyaux des cellules de Müller sont situés dans la couche nucléaire interne et leurs prolongements cytoplasmiques s'étendent à travers toutes les couches de la rétine.

<sup>14</sup> Cette technique récupère, par dissection de l'œil, l'entièreté de la rétine qui est mise à plat par des incisions dans celle-ci et permet l'analyse en 2D ou en 3D.

(Alexandrov et al., 2011). De plus, nous avons employé ici les méthodes immunohistologiques classiques pour détecter les plaques amyloïdes qui ont mis, comme attendu, celles-ci en évidence dans le cerveau des souris étudiées. Ces derniers résultats sont en accord avec l'étude de (Williams et al., 2017) qui n'a pas réussi à détecter les plaques amyloïdes dans la rétine mais bien dans le cerveau de sujets atteints de la MA à l'aide de méthodes classiques de détection des plaques amyloïdes par immunohistochimie sur des coupes en paraffine. Nous avons également analysé les rétines en utilisant la coloration au rouge Congo qui a confirmé l'absence de dépôts amyloïdes dans la rétine des souris étudiées. Néanmoins, Habiba et son équipe (Habiba et al., 2020) ont pu détecter des dépôts amyloïdes à l'aide de la même coloration dans la rétine interne (GCL,IPL,INL) avec toutefois une intensité moindre de la biréfringence verte observée en lumière polarisée. Aussi, il semblerait que l'absence de plaques amyloïdes ne soit pas due au manque d'expression du promoteur Thy.1 utilisé dans la construction des transgènes, qui codent pour la protéine APP humaine, car il a été démontré que ce promoteur est bien exprimé dans les cellules ganglionnaires de la rétine murine (Barnstable and Dräger, 1984, Leung et al., 2008, Raymond et al., 2008). Cependant, nous n'avons pu démontrer la présence de la protéine APP humaine que dans de très rares cellules ganglionnaires de la rétine. Ce faible niveau d'expression expliquerait l'absence de plaques amyloïdes dans la rétine de nos modèles murins 5xFAD. Par conséquent, il semblerait que les plaques amyloïdes dans l'œil ne se développent pas comme celles observées dans le cerveau et que les méthodes employées pour les détecter doivent être suffisamment sensibles.

L'analyse de l'expression de la protéine tau dans l'œil a montré un marquage des couches plexiformes de la rétine avec un anticorps anti-tau et cette expression est statistiquement plus élevée dans le cerveau comparé à l'œil, ce qui est similaire à ce qui a été observé pour l'ensemble des génotypes étudiés. La protéine tau est sous une forme déphosphorylée dans les couches plexiformes et n'a pas été observée sous une forme phosphorylée en utilisant différents anticorps anti-tau phosphorylé (PHF-1, AT8 et pThr231). La protéine tau n'a pas été détectée sous une conformation anormale (MC1) ou agrégée (Gallyas). L'analyse protéique a néanmoins montré une phosphorylation plus importante de l'épitope Ser396/Ser404 (PHF-1) dans le cerveau comparé à l'œil.

### **5.3.4. Souris 5xFAD Tg30**

Les souris transgéniques 5xFAD Tg30 résultent d'un croisement entre les lignées 5xFAD et Tg30. De manière similaire aux souris transgéniques 5xFAD, nous n'avons pas observé de dépôts amyloïdes dans la rétine des souris 5xFAD Tg30.

Dans le cerveau de ces souris, nous avons pu observer une aggravation de la pathologie tau en présence de la pathologie amyloïde. Dans la rétine, nous avons observé une faible proportion de cellules rétinienne marquées avec l'anticorps PHF-1 tandis que les marquages avec les anticorps AT8 et pThr231 se sont révélés négatifs suggérant que la pathologie tau ne se développe pas même en présence de la pathologie amyloïde. De manière intéressante, l'équipe de (Chiasseu et al., 2017) a montré par WB une phosphorylation sur les épitopes Ser202/pThr305 (AT8) qui diminue avec l'âge tandis que la phosphorylation sur les épitopes Ser396/Ser404 (PHF-1) reste similaire sur la période étudiée (à 3 et 6 mois d'âge) dans des souris triple transgéniques (PS1(M146V)/APP<sup>swe</sup>/MAPT(P301L)), ce qui suggère que l'âge de la souris lié ou non à la progression de la pathologie tau est un facteur qui module les sites phosphorylés sur la protéine tau. Dans notre étude, nous avons étudié des souris âgées de 9 à 13 mois (tous génotypes confondus), ce qui pourrait expliquer le marquage négatif pour AT8

## Discussion

et le marquage positif pour PHF-1. De plus, à l'instar des auteurs (Chiasseu et al., 2017), nous n'avons pas détecté la protéine tau sous une conformation anormale en utilisant l'anticorps MC1 dans la rétine de nos souris.

*Les kinases GSK3 $\beta$  et CDK5 sont exprimées dans la rétine des différents modèles murins avec toutefois un taux d'expression moindre par rapport au cerveau :*

A la suite des résultats qui ont montré peu de phosphorylation sur la protéine tau dans la rétine, nous avons investigué l'expression des kinases GSK3 $\beta$  et CDK5 qui sont connues pour être impliquées dans la phosphorylation de la protéine tau en conditions physiologiques et pathologiques. Notamment, il a été démontré que l'activité de ces deux kinases est augmentée dans le cerveau de patients atteints de la MA (Patrick et al., 1999, Leroy et al., 2007b). A l'instar de (Kumar et al., 2010), nous avons détecté par western blotting la GSK3 $\beta$  dans l'œil des souris et dans l'ensemble des génotypes étudiés (WT, hTau, Tg22/30, 5xFAD et 5xFAD Tg30), l'expression de la kinase était significativement plus élevée dans le cerveau par rapport à l'œil. Nous avons observé, par immunohistochimie, la kinase dans la couche des cellules ganglionnaires et dans les couches plexiformes de la rétine. De manière similaire, une étude a montré, par immunofluorescence, l'expression de l'isoforme  $\alpha$  de la GSK3 dans toutes les couches de la rétine de souris sauvages (WT) avec une intensité plus élevée de la fluorescence dans la couche des cellules ganglionnaires (Sahaboglu et al., 2020). Aussi, la GSK3 $\beta$  a été observée dans les couches plexiformes de la rétine de rats (Pérezleón et al., 2013). L'activité de la kinase a été évaluée par le taux de phosphorylation de son résidu Tyr216 et par le taux de  $\beta$ -caténine présente dans l'œil et le cerveau des souris. La phosphorylation de l'épitope Tyr216 augmente, en effet, l'activité de la kinase et le taux de  $\beta$ -caténine est un reflet de l'activité de la GSK3 $\beta$  qui phosphoryle ce substrat qui sera alors dégradé par le protéasome. Par exemple, l'inhibition de la GSK3 $\beta$  augmente le taux intracellulaire en  $\beta$ -caténine (Doble and Woodgett, 2003). Nos résultats ont montré une activité égale ou augmentée de la GSK3 $\beta$  dans le cerveau par rapport à l'œil. De manière analogue à la GSK3 $\beta$ , nous avons constaté une expression plus élevée de la CDK5 dans le cerveau comparé à l'œil dans les différents génotypes étudiés et l'immunohistochimie nous a permis de visualiser la kinase dans les couches plexiformes de la rétine. Nous n'avons pas pu évaluer l'activité de la CDK5, à l'aide de ses protéines activatrices p25 et p35, par western blotting car nous n'avons pas été en mesure de les détecter dans la rétine. Notons que nous avons chargé l'homogénat d'un seul œil par puits dans le gel du western blot. Par conséquent, nous n'avons peut-être pas atteint le seuil de sensibilité de la technique et il serait recommandé de réunir plusieurs homogénats d'yeux pour évaluer le taux des protéines activatrices de la CDK5 dans de futures expériences. La CDK5 et son activateur p35 ont été précédemment mis en évidence, par western blotting, dans la rétine de rats sauvages (WT) (Chen et al., 2011).

La faible phosphorylation de la protéine tau observée dans l'œil ne semble donc pas être la conséquence de l'absence des kinases GSK3 $\beta$  et CDK5 ou d'un manque de leur activité. Néanmoins, des expériences supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats préliminaires et pour étudier également l'expression et l'activité de phosphatases.

En conclusion, dans l'ensemble des génotypes étudiés (WT, hTau, Tg22/30, 5xFAD et 5xFAD Tg30), la protéine tau est exprimée dans la rétine mais dans une proportion moindre comparé au cerveau. La protéine tau est peu phosphorylée, seules quelques cellules ganglionnaires de la rétine ont montré un marquage somatique dans les souris Tg22 et 5xFAD

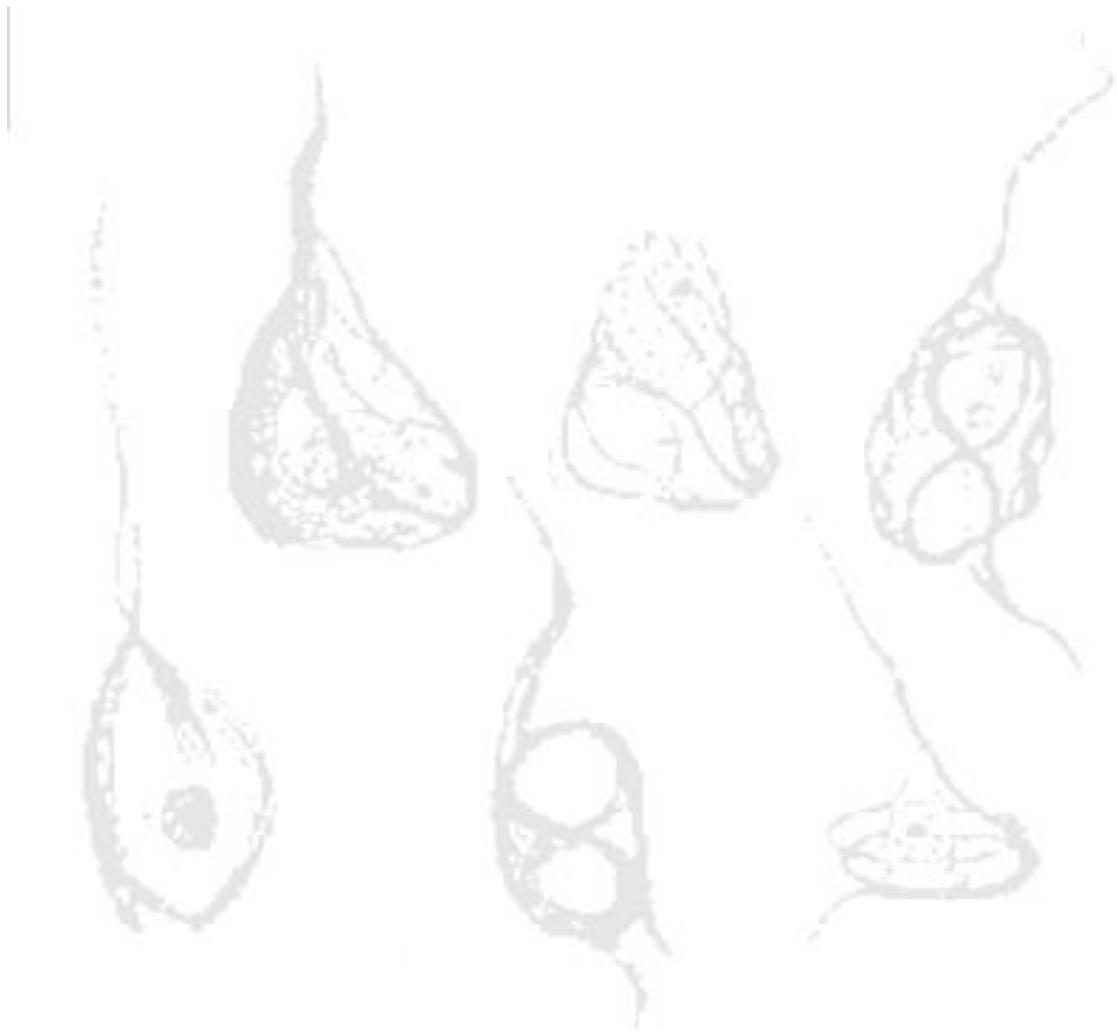
## Discussion

Tg30 en utilisant les anticorps AT8 et PHF-1 respectivement. De plus, ces protéines tau phosphorylées sont probablement les protéines tau humaines mutées exprimées par ces lignées murines compte tenu de la mise en évidence de l'expression de la protéine tau humaine dans le corps cellulaire des cellules ganglionnaires de la rétine. La protéine tau murine est quant à elle exprimée dans la couche plexiforme interne (CPI/IPL) comme observé dans la rétine des souris Tg22. Ces observations sont cohérentes avec les modèles murins Tg22 et 5xFAD Tg30 qui développent une pathologie tau dans le cerveau. Néanmoins, contrairement au cerveau, la protéine tau n'a jamais été observée sous une conformation anormale (MC1) ou agrégée (Gallyas). Notons également que le marquage AT8 a été observé dans la rétine des souris Tg22 et que le marquage PHF-1 a été détecté dans la rétine des souris 5xFAD Tg30, ce qui pourrait refléter l'évolution des épitopes phosphorylés dans la MA. En effet, le marquage AT8 est considéré comme un marqueur plus précoce de la pathologie tau que le marquage PHF-1 (Moloney et al., 2021) et le modèle murin 5xFAD Tg30 développent des lésions liées à la pathologie tau comparativement plus importantes par rapport aux souris Tg22.

Bien sûr, notre étude comporte certaines limitations telles que le nombre de souris et le nombre de coupes analysées. En effet, la surface étudiée en utilisant des coupes en paraffine ne permet pas d'observer l'entièreté de la rétine, on pourrait par conséquent passer à côté des structures marquées. Néanmoins, l'analyse de l'ensemble du tissu rétinale (« whole-mount retina ») ne permet pas de distinguer les différentes couches de la rétine.

Toutefois, nos résultats suggèrent que les neurones de la rétine sont moins susceptibles de développer les pathologies tau et amyloïdes que les neurones du cerveau. Une étude a ainsi montré que l'expression génique est différente entre la rétine et le cerveau (Hackam et al., 2004), ce qui pourrait conduire à l'identification de cibles potentielles qui permettent aux cellules rétinaires de résister au développement d'une pathologie tau.





# *Perspectives*



## 6. Perspectives

### 6.1. Analyses de la pathologie tau dans l'œil et les relais visuels cérébraux à la suite d'une injection intraoculaire de PHF-tau humains dans des souris transgéniques pour la protéine tau humaine normale (hTau) ou mutée (Tg22) après des délais d'incubation supérieures à six mois

Tout d'abord, une plus large cohorte de souris serait nécessaire afin de confirmer les résultats obtenus sur les injections intravasculaires et intraoculaires. Néanmoins, nos résultats suggèrent une implication des PHF-tau dans l'exacerbation des pathologies (amyloïde, tau et inflammation) observées dans le cerveau des souris 5xFAD après une injection intravasculaire. Les souris sauvages (WT) et transgéniques (hTau et Tg22) n'ont pas montré le développement d'une pathologie tau dans l'œil et dans les relais cérébraux du système visuel six mois après l'injection intraoculaire de PHF-tau, ce qui rend la transmission de la pathologie tau *via* les relais optiques peu probable. Néanmoins, des études supplémentaires avec des délais plus longs seraient nécessaire pour exclure le risque d'une contamination iatrogène de la protéine tau pathologique lors de procédures médicales qui concernent l'œil.

### 6.2. Etudes des capacités de nucléation des PHF-tau isolés de cerveaux de patients décédés de la MA et des protéines tau pathologiques présentes dans l'œil de souris transgéniques et de cas humains *in vitro* et *in vivo*

Les maladies à prions, bien que causées par une conformation anormale d'une seule protéine, sont caractérisées par différentes souches (« strains » en anglais) ou variants qui engendrent une diversité entre-autres de symptômes, de temps d'incubation, de lésions histologiques et de distribution neuroanatomique de ces lésions entre espèces et entre les individus d'une même espèce (Parchi et al., 2012). De même, il a été démontré *in vitro* (Sanders et al., 2014) et *in vivo* que la protéine tau pathologique existait également sous différentes souches. *In vivo*, différentes souches de protéines tau isolées de cerveaux humains qui ont été injectées dans le cerveau de souris ont généré la tauopathie dont elles étaient issues (Clavaguera et al., 2013, Sanders et al., 2014). Les modifications post-traductionnelles seraient notamment un élément qui modulerait les différentes conformations de la protéine tau retrouvées dans les tauopathies (Arakhamia et al., 2020). De plus, au sein de la maladie d'Alzheimer, il existerait également différentes souches responsables de la variété de phénotypes observés entre les patients (Dujardin et al., 2020).

Aussi, la similitude de structure primaire entre la protéine prion pathologique et la protéine prion endogène de l'hôte est primordiale. Effectivement, des divergences minimales dans la séquence des acides aminés a un impact important sur la transmission entre individus.

A l'instar des protéines prions, les protéines tau pathologiques ne possèdent pas la même efficacité en termes de nucléation et de propagation. Par conséquent, il serait intéressant d'examiner les propriétés de nucléation des PHF-tau isolés de différents patients décédés de la MA et des protéines tau pathologiques présentes dans l'œil de souris transgéniques et de cas humains *in vitro* et *in vivo*.

*In vitro*, les capacités de nucléation des protéines tau pathologiques peuvent être évaluées par les cellules FRET (Holmes et al., 2014), déjà employées dans ce projet de recherche. Aussi, les propriétés de nucléation pourraient être analysées par des tests qui

mesurent le taux de réplication de protéines normales dans une conformation anormale en présence de protéines pathologiques homologues. Il existe le test de PMCA (Protein Misfolding Cyclic Amplification) (Saborio et al., 2001, Bélondrade et al., 2021) et le test très sensible de RT-QuIC (Real-Time Quaking-Induced Conversion) (Atarashi et al., 2008). A l'instar de l'étude de (Orrù et al., 2018) qui a examiné l'activité de nucléation des protéines prions dans les différentes parties des yeux de patients décédés de la forme sporadique de la CJD à l'aide du test RT-QuIC, nous pourrions utiliser ce test pour évaluer les capacités de nucléation des protéines tau pathologiques dans l'œil de souris transgéniques et de cas humains atteints de la MA. De manière intéressante, les auteurs ont trouvé que l'activité de nucléation la plus élevée des protéines prions se trouvait dans la rétine par rapport aux autres constituants de l'œil (Orrù et al., 2018). La méthode d'amplification RT-QuIC a permis de détecter dans le liquide cébro-spinal (LCS) des protéines tau pathologiques qui possèdent des capacités de nucléation chez des patients atteints de la maladie de Pick (Saijo et al., 2017) ou de la CBD (Saijo et al., 2020). La méthode a également montré son efficacité sur des homogénats de cerveaux de patients décédés de la MA (Kraus et al., 2019, Metrick et al., 2020, Tennant et al., 2020) ou de souris transgéniques qui surexpriment une protéine tau humaine mutée (P301S) (Tennant et al., 2020). La technique de PMCA s'est aussi révélée efficace pour amplifier des fibrilles de tau présentes dans des homogénats de cerveaux atteints de la MA (Meyer et al., 2014).

*In vivo*, les capacités de nucléation des protéines tau pathologiques présentes dans l'œil pourraient être évaluées en injectant des homogénats d'yeux ou de rétines dans le cerveau de souris sauvages et/ou transgéniques. Ainsi, l'injection intracérébrale d'homogénats d'yeux humains porteurs de la CJD dans des primates non-humains a induit la maladie dans 80 % des animaux inoculés (Brown et al., 1994). Aussi, différents échantillons de PHF-tau (de patients différents) pourraient être injectés en intravasculaire ou en intraoculaire afin d'évaluer leurs propriétés de nucléation dans des modèles murins.

### **6.3. Etudes des prédispositions génétiques de la MA (APOE) sur la transmission et la survenue d'une pathologie tau à la suite d'une contamination iatrogène**

De plus, les variabilités interindividuelles telles que des prédispositions génétiques peuvent favoriser la survenue des protéinopathies. En effet, dans les encéphalopathies spongiformes, autre nom pour désigner les maladies à prions, il existe des polymorphismes au niveau du gène PRNP (qui code pour la protéine prion) qui influence fortement la susceptibilité de développer une maladie à prions. Plus particulièrement, l'expression homozygote pour la méthionine au niveau du codon 129, qui encode une méthionine ou une valine, prédispose au développement de la maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique (CJD) (Palmer et al., 1991) ou acquise (Collinge et al., 1991). A l'inverse, les porteurs homozygotes pour la valine sont virtuellement protégés de la CJD. Bien qu'aucun polymorphisme dans le gène MAPT n'a été identifié comme un facteur de risque ou protecteur, il existe d'autres facteurs de risque génétiques dans la MA. Ainsi, les individus porteurs homozygotes des allèles E4 sont huit fois plus susceptibles de développer la MA par rapport aux porteurs de l'allèle E3 (qui est le plus répandu dans la population) (Corder et al., 1993). A l'inverse, l'allèle E2 est considéré comme un élément protecteur (Liu et al., 2013). Des modèles murins transgéniques qui expriment la protéine APOE4 humaine et une protéine tau humaine mutée (P301S) montrent un taux plus élevé de protéines tau dans le cerveau avec une redistribution plus grande des protéines tau dans le compartiment somato-dendritique, une atrophie cérébrale et une neuroinflammation plus importante en comparaison avec les souris qui expriment l'allèle E2 ou E3 (Shi et al., 2017).

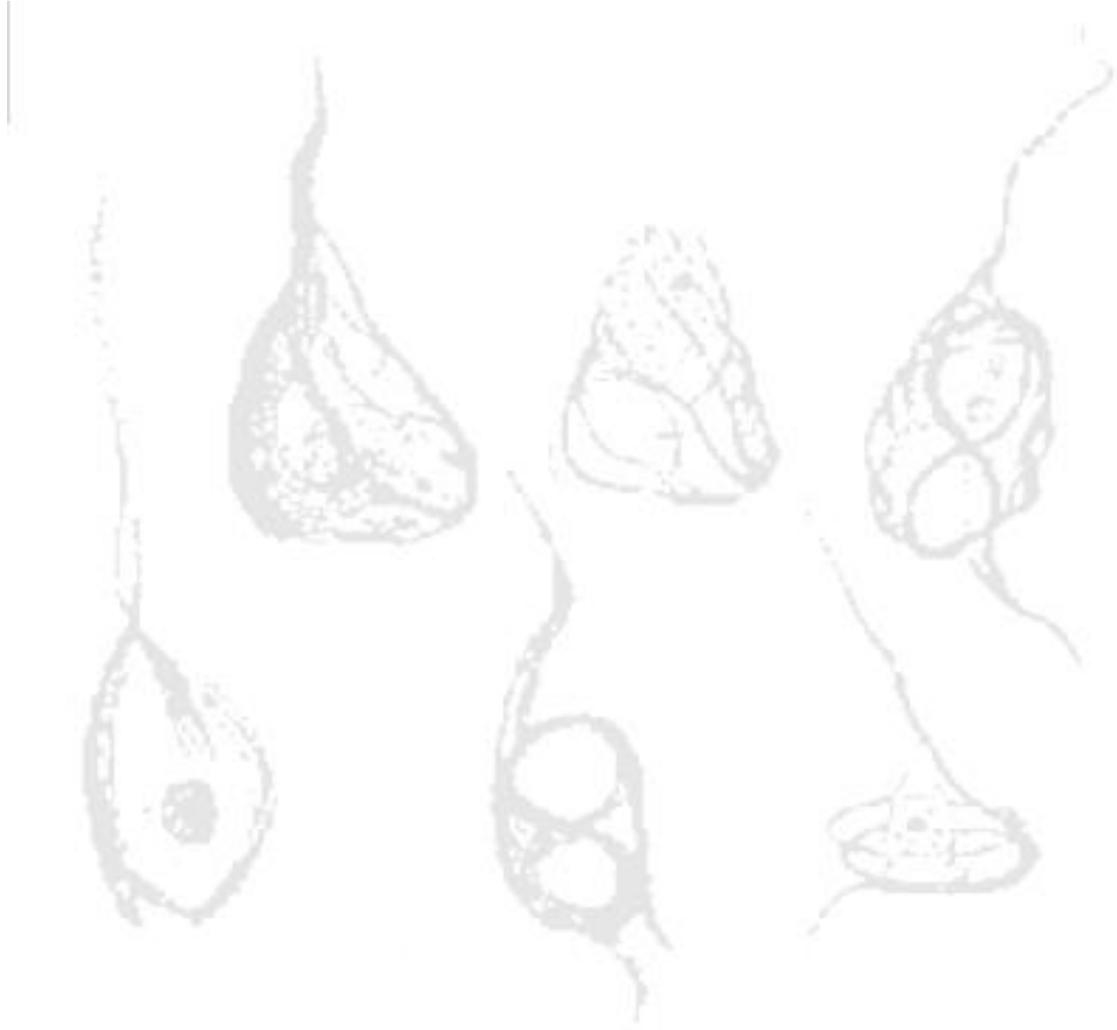
En conséquence, des injections intracérébrales et périphériques de PHF-tau humains dans des souris transgéniques qui expriment les allèles humains E2, E3 ou E4 permettraient d'étudier les effets de prédispositions génétiques dans la transmission et la survenue d'une pathologie tau.

#### **6.4. Etudes des propriétés de résistance à l'induction d'une pathologie tau dans la rétine de souris sauvages (WT) et transgéniques**

Nous proposons également de poursuivre les études comparatives des caractéristiques et des propriétés qui semblent conférer aux neurones de la rétine une résistance à l'induction d'une pathologie tau par rapport aux neurones cérébraux. La compréhension de ces mécanismes de résistance pourrait permettre de moduler les mécanismes des neurones cérébraux dits « vulnérables » au développement d'une pathologie tau afin de les protéger de celle-ci dans la maladie d'Alzheimer et dans d'autres tauopathies. Ces mécanismes de résistance pourraient notamment impliquer des kinases et des phosphatases ou des systèmes de dégradation des protéines tels que le protéasome ou l'autophagie. D'une part, des études *in vitro* et *in vivo* sur les effets d'une surexpression ou d'une suppression de l'activité des enzymes sur le développement d'une pathologie tau pourraient amener certaines réponses sur leur implication. Par exemple, le croisement d'une lignée transgénique inductible pour la GSK3 $\beta$  avec une lignée murine transgénique qui développe une pathologie tau (telle que la lignée Tg22 utilisée dans ce projet) permettrait d'évaluer l'influence de la kinase, en modulant son activité, dans le développement d'une pathologie tau dans les cellules ganglionnaires de la rétine. D'autre part, les systèmes de dégradation des protéines apparaissent dysfonctionnels dans la MA (Oddo, 2008), ces systèmes étant peut-être modulés de façon différente dans la rétine. Une étude a, en effet, montré que le taux d'immunoprotéasome est deux fois plus important dans la rétine par rapport au cerveau (Ferrington et al., 2008) et un mauvais fonctionnement du protéasome entraîne des dégénérescences rétinienne (Lobanova et al., 2018). Les protéines impliquées dans l'autophagie sont également fortement exprimées dans la rétine et leurs défaillances sont observées dans des maladies dégénératives de l'œil (Mitter et al., 2012, Villarejo-Zori et al., 2021).

Il est également intéressant de noter que l'accumulation de protéines prions dans les cellules ganglionnaires de la rétine est dépendante de la souche de protéines prions (Lambert et al., 2021). Aussi, d'autres cellules de la rétine pourraient être impliquées dans les mécanismes de résistance à la formation d'une pathologie tau. En effet, plusieurs études ont montré que les lésions dues aux protéines prions dans le cerveau ou dans la rétine requièrent différentes cellules qui expriment la protéine prion, ce qui suggère la présence de mécanismes pathologiques différents dans ces deux tissus (Chesebro et al., 2005, Kercher et al., 2004, Kercher et al., 2007). Une étude a également suggéré que la protéine tau possédait une toxicité différente dans la rétine ou le cerveau (Rodriguez et al., 2018). Afin d'étendre les résultats que nous avons obtenus d'une part, par immunohistochimie sur des coupes histologiques en paraffine, nous pourrions réaliser des analyses histologiques sur des rétines entières (« whole mount »). D'autre part, pour augmenter la sensibilité en western blotting, nous conseillons de mélanger (« pooler ») plusieurs rétines pour détecter les protéines tau. Les taux d'ARNm des protéines tau et amyloïde pourraient également être mesurés pour évaluer l'expression de ces protéines dans la rétine. Aussi, des explants de rétine (Magnani et al., 2007) de différentes lignées murines pourraient être réalisés en vue d'analyser *ex vivo* les caractéristiques des cellules oculaires.

Notons également que dans le système visuel, les cellules ganglionnaires ne semblent pas être les seuls neurones à être résistants au développement d'une pathologie tau. En effet, les neurones du corps genouillé latéral (CGL) sont parmi les plus résistants à la formation de DNF et la dégénérescence de cette zone cérébrale est rare dans la MA (Katz and Rimmer, 1989, Dugger et al., 2011). A l'inverse, le colliculus supérieur, qui reçoit seulement 10 % des fibres du nerf optique, développe de nombreuses plaques amyloïdes (Iseki et al., 1989) et de nombreuses DNF (Leuba and Saini, 1995). En ce qui concerne le cortex visuel primaire, la présence de DNF est observée chez environ 25 % des patients atteints de la MA et 70 % d'entre-eux présentent des plaques amyloïdes dans cette région (Armstrong, 2009). Néanmoins, une autre étude a montré que seulement 2 % des neurones dans le cortex visuel primaire présentaient des DNF contre 10 % dans le cortex visuel secondaire (Salobar-García et al., 2016). Par conséquent, les neurones de la voie visuelle primaire (voie rétinogéniculocorticale) semblent être moins vulnérables à la formation de DNF et représentent une opportunité pour comprendre les mécanismes qui rendent certains neurones plus vulnérables et d'autres plus résistants à développer une pathologie tau.

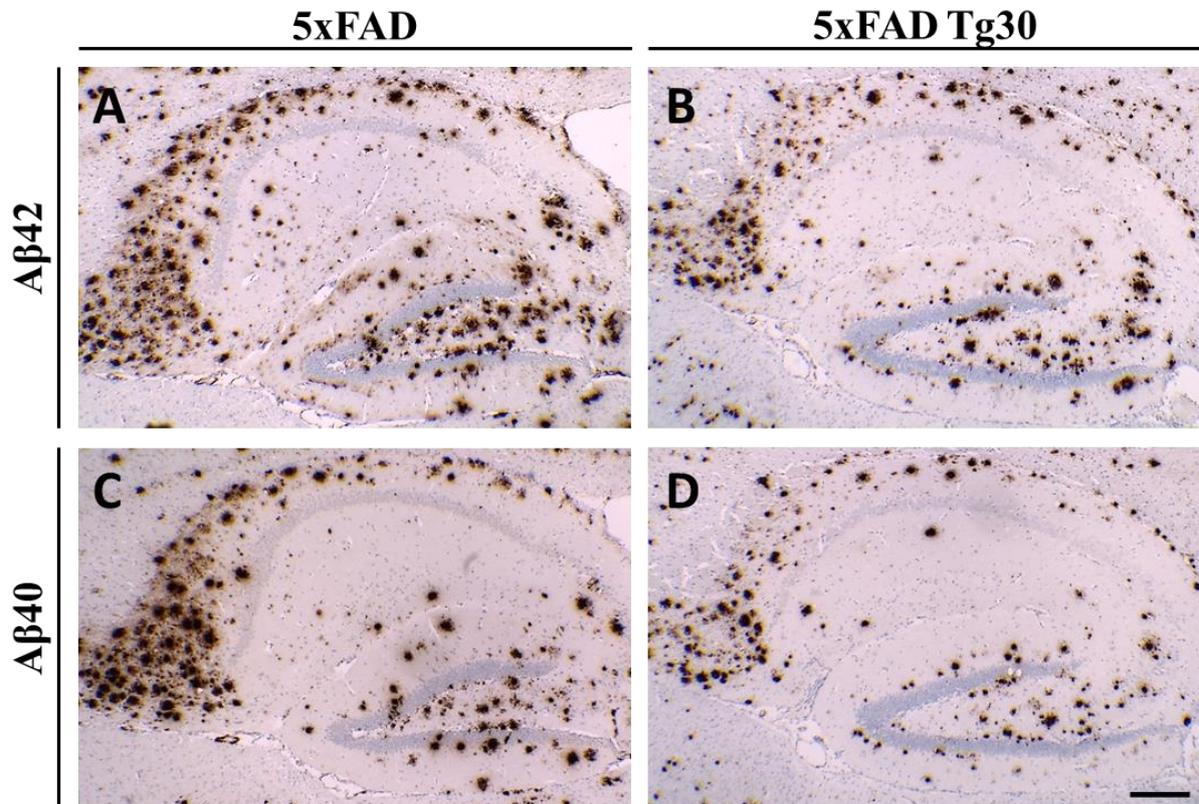


# *Annexes*

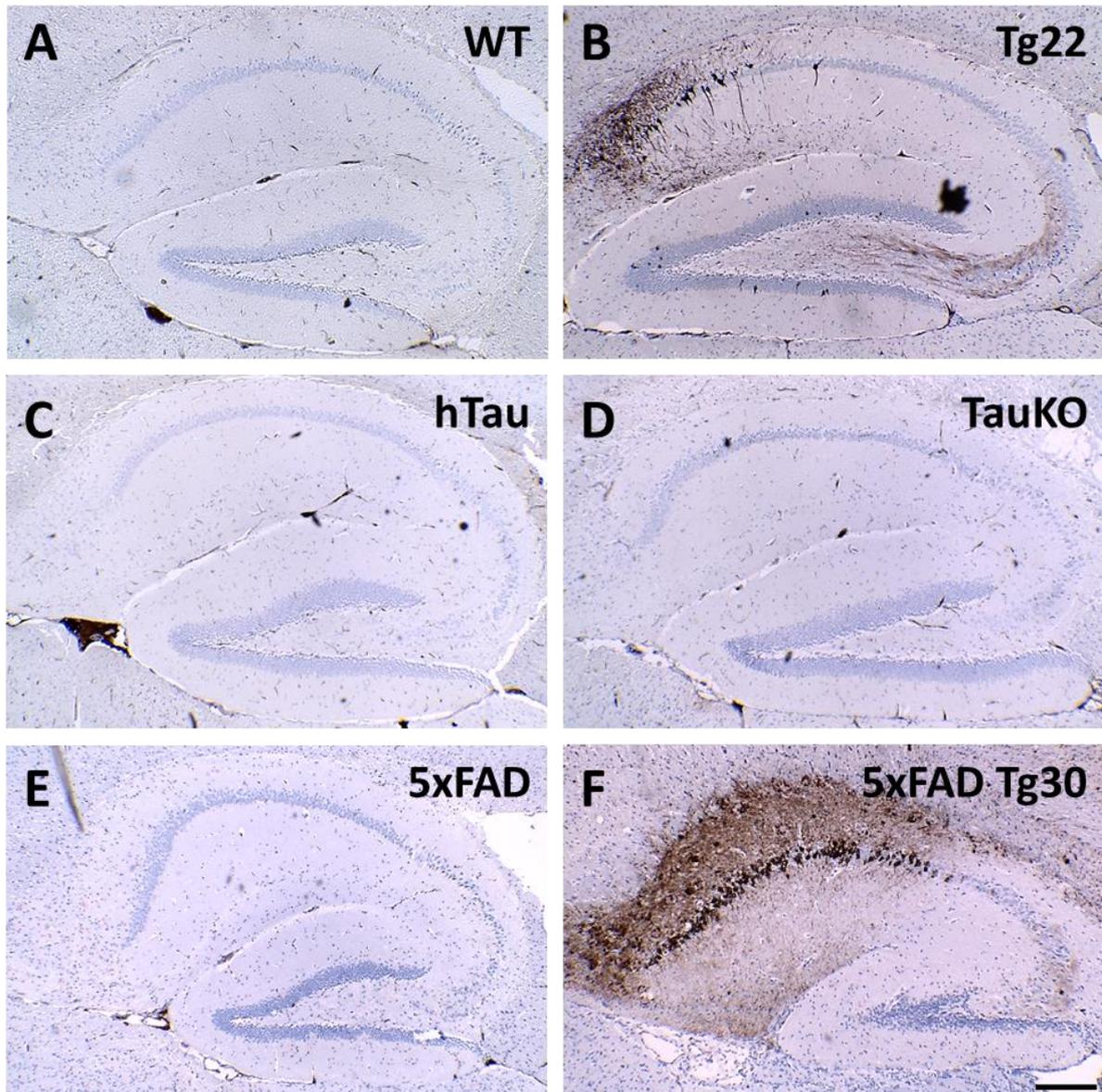


7. Annexes

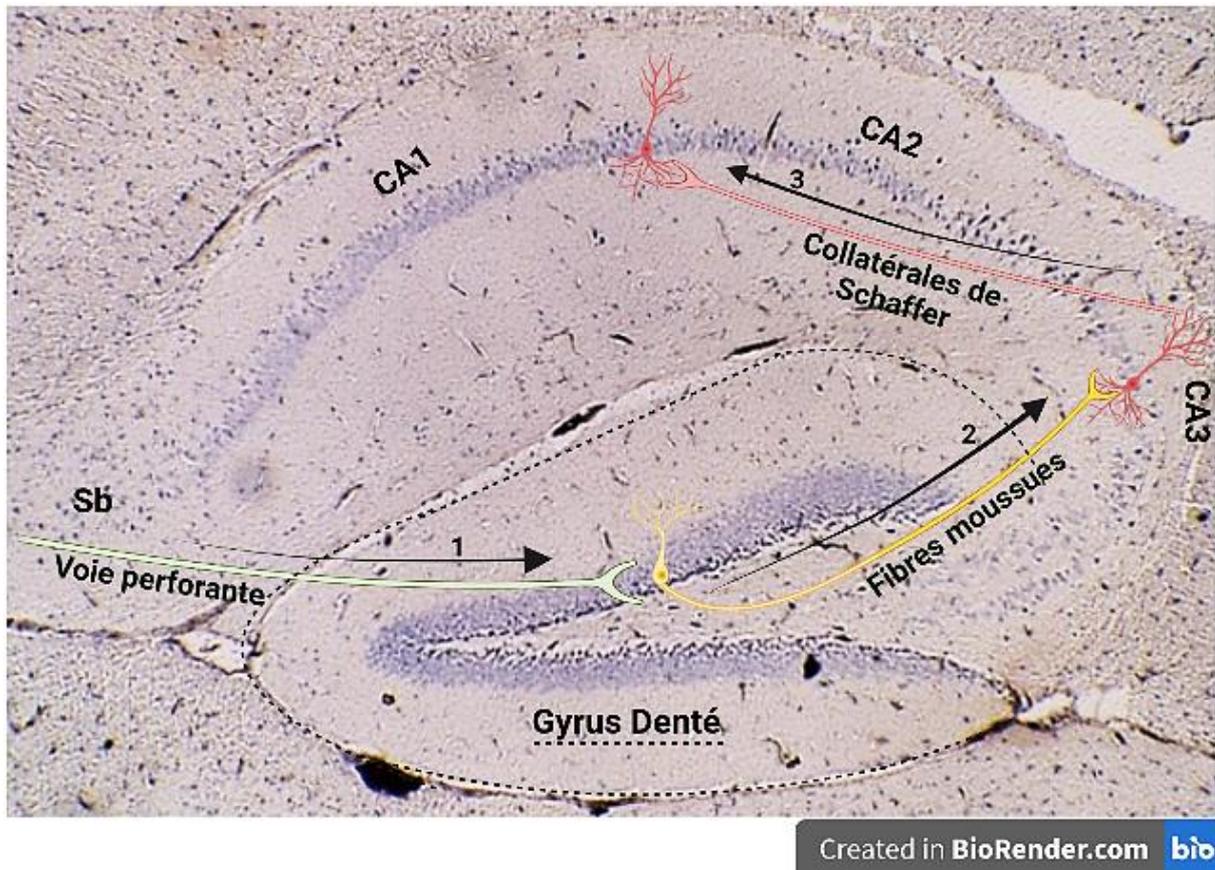
## 7.1. Figures supplémentaires



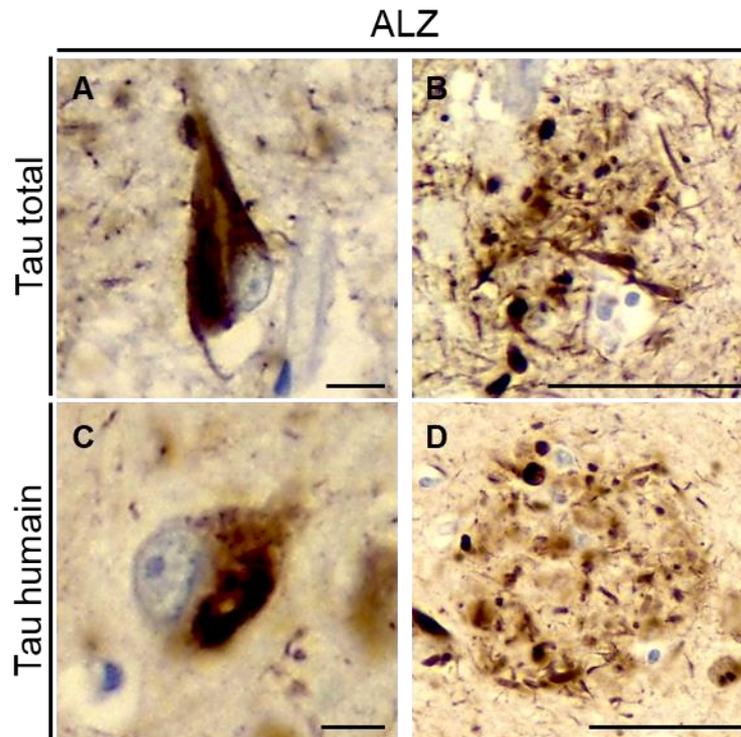
**Fig. Sup. 1** : Illustration de la pathologie amyloïde au niveau de l'hippocampe de souris transgéniques 5xFAD et 5xFAD Tg30 âgées entre 9 et 13 mois à l'aide des anticorps anti-A $\beta$ 42 et anti-A $\beta$ 40. Immunomarquage de l'hippocampe de souris 5xFAD (A et C) et 5xFAD Tg30 (B et D) avec les anticorps anti-A $\beta$ 42 (A et B) et anti-A $\beta$ 40 (C et D). Les plaques amyloïdes sont visibles en brun. Elles apparaissent dès deux mois d'âge dans le subiculum (et dans la couche V du cortex, non visible sur ces coupes) puis se développent progressivement avec l'âge dans tout l'hippocampe et le cortex des souris 5xFAD et 5xFAD Tg30 qui expriment des protéines APP et PS1 humaines mutées. Barre d'échelle : 200  $\mu$ m.



**Fig. Sup. 2 :** Illustration de la pathologie tau au niveau de l'hippocampe de souris sauvages (WT) et transgéniques Tg22, hTau, TauKO, 5xFAD et 5xFAD Tg30 âgées entre 9 et 13 mois à l'aide de l'anticorps AT8 qui reconnaît la protéine tau phosphorylée sur les épitopes Ser202/Thr305. Immunomarquage de l'hippocampe de souris WT (A), Tg22 (B), hTau (C), TauKO (D), 5xFAD (E) et 5xFAD Tg30 (F) avec l'anticorps anti-tau phosphorylé AT8 (A-F). L'anticorps AT8 est utilisé couramment pour l'examen anatomopathologique *post-mortem* du cerveau qui permet de poser le diagnostic définitif de la maladie d'Alzheimer. La protéine tau phosphorylée est visible en brun dans les souris Tg22 (B) et 5xFAD Tg30 (F) qui expriment une protéine tau humaine mutée. La pathologie tau est fortement présente dans la région CA1 de la corne d'Ammon de l'hippocampe dans les deux génotypes précités (B et F) et est également visible dans les fibres moussues dans les souris Tg22 (B). Les souris WT (A) et 5xFAD (E) qui expriment des protéines tau murines normales et les souris hTau (C) qui expriment des protéines tau humaines normales en l'absence des protéines tau murines ne développent pas de pathologie tau. Les souris TauKO (D) n'expriment aucune protéine tau et ont été utilisées comme contrôle négatif pour la protéine tau. Barre d'échelle : 200  $\mu\text{m}$ .



**Fig. Sup. 3 :** Schéma d'une coupe d'hippocampe d'une souris sauvage (WT) illustrant les différentes régions et le circuit trisynaptique. Les informations qui proviennent du cortex cérébral passent par trois relais synaptiques dans l'hippocampe qui forment le circuit trisynaptique. (1) Les axones provenant du cortex entorhinal forment la **voie perforante** (car ils traversent le subiculum (**Sb**)) et se connectent aux cellules granulaires du **gyrus denté**. (2) Les cellules granulaires envoient leurs axones, appelés les **fibres moussues**, sur les neurones pyramidaux de la région CA3 de la corne d'Ammon (**CA3**). (3) Les axones des cellules pyramidales du CA3, qui forment les **collatérales de Schaffer**, se projettent sur les neurones pyramidaux de la région CA1 de la corne d'Ammon (**CA1**). Le subiculum (**Sb**) est une région de transition de l'hippocampe entre le cortex entorhinal et la région CA1 de la corne d'Ammon (**CA1**). Photo obtenue au laboratoire et schéma créé à l'aide de BioRender.com.



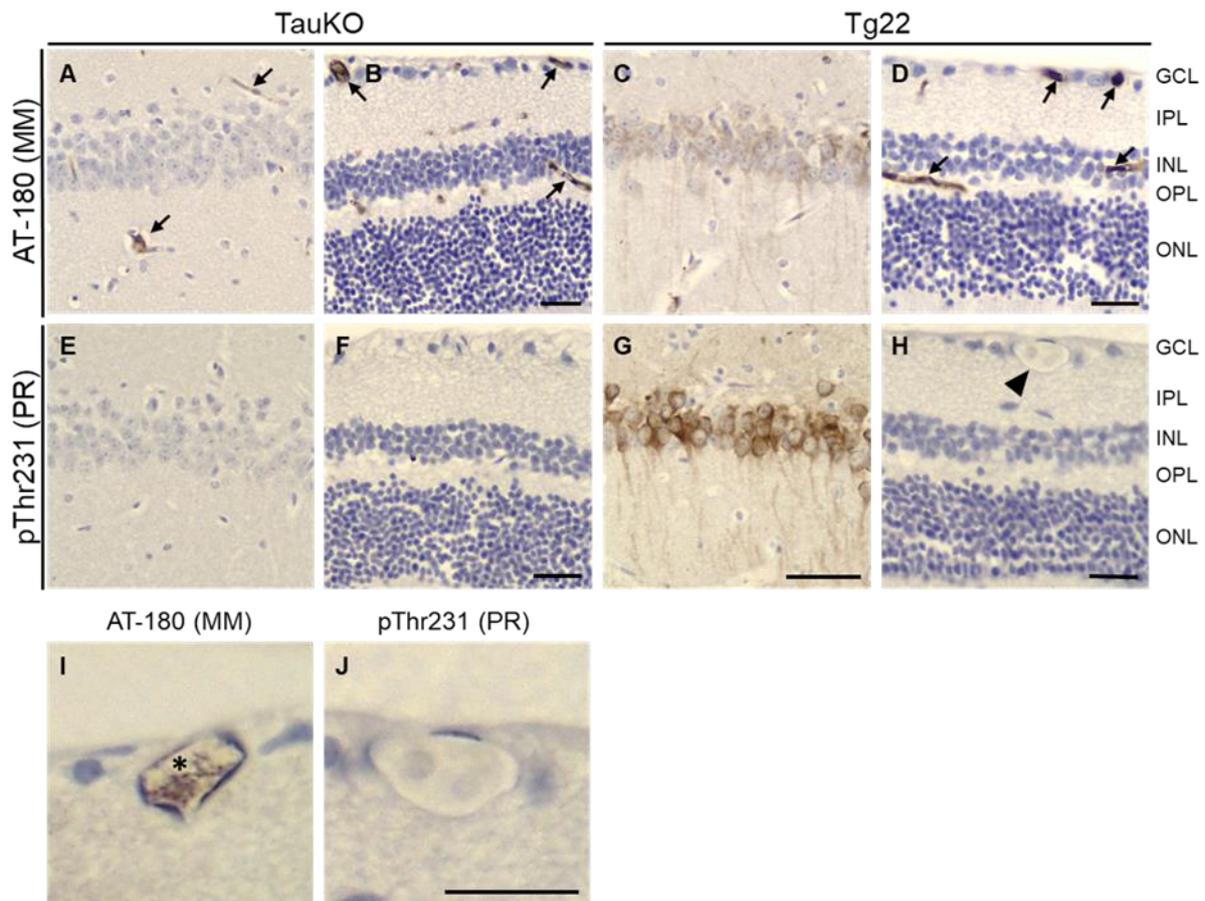
**Fig. Sup. 4 :** Illustration de la pathologie tau sur une coupe de cerveau d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer (ALZ). Immunomarquage d'un cerveau humain avec l'anticorps anti-tau total (A-B) ou anti-tau humain (C-D) qui montre un neurone dont le corps cellulaire est marqué en brun par l'anticorps anti-tau total (A) ou l'anticorps anti-tau humain (C) et des neurites dystrophiques mis en évidence en brun par l'anticorps anti-tau total (B) ou anti-tau humain (D). Barres d'échelle : A,C : 10  $\mu$ m et B,D : 50  $\mu$ m.

	PHF-1	AT8	AT-180	MC1
AD	0,5476	1,0000	0,6905	0,6905
CTL	0,4857	0,6857	0,8857	1,0000

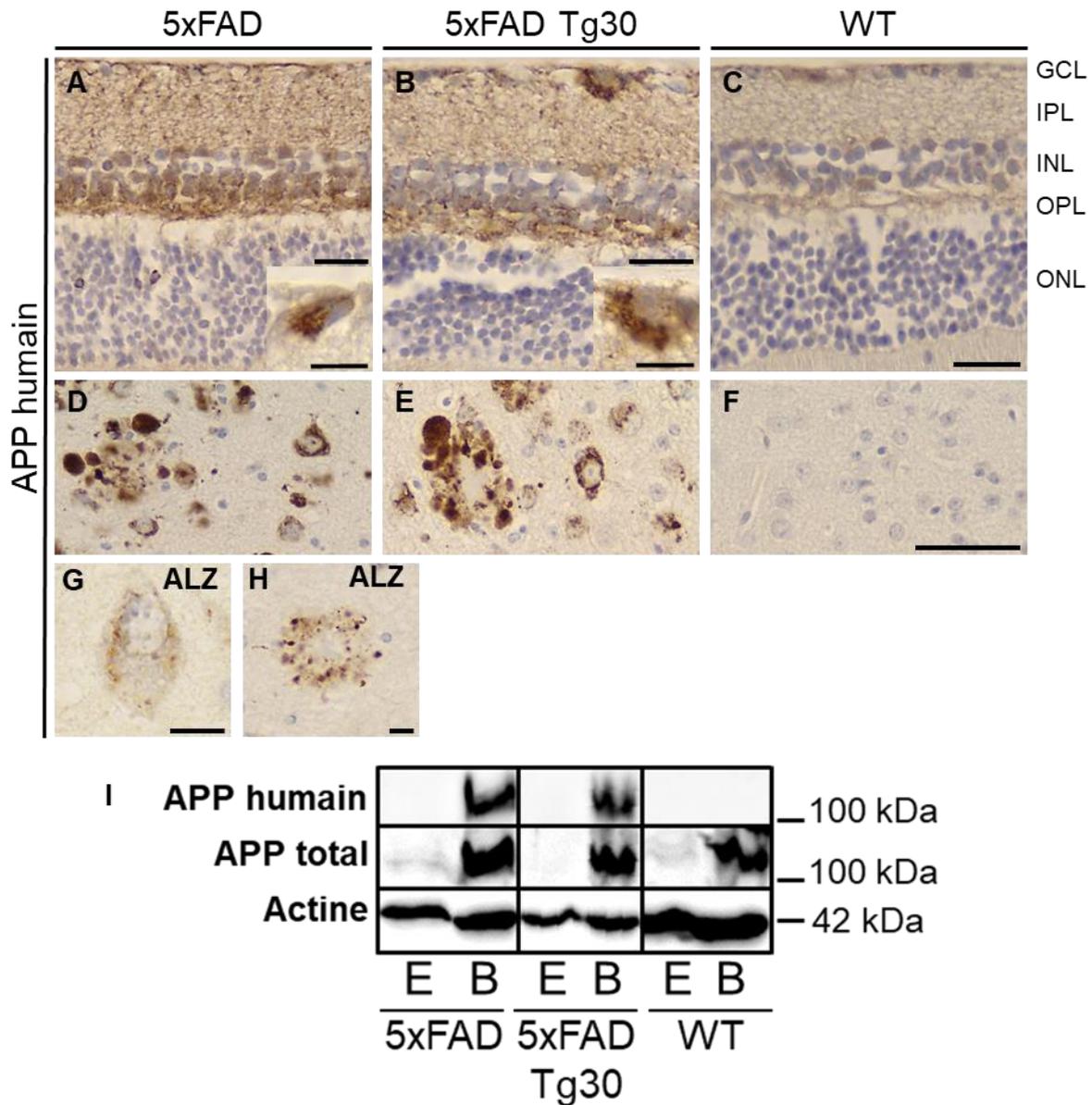
**Tableau Sup. 1 :** Tableau récapitulatif des p-valeurs obtenues lors de la comparaison entre les densités du côté contralatéral et les densités du côté ipsilatéral chez des souris injectées avec une fraction sarkosyl AD ou CTL. Tests de Mann-Whitney (Two-Tailed). AD (n = 5) et CTL (n = 4).

	PHF-1	AT8	AT-180	MC1
Contralatéral	1,0000	0,7302	0,1400	1,0000
Ipsilatéral	0,9048	0,9048	0,2857	0,7302

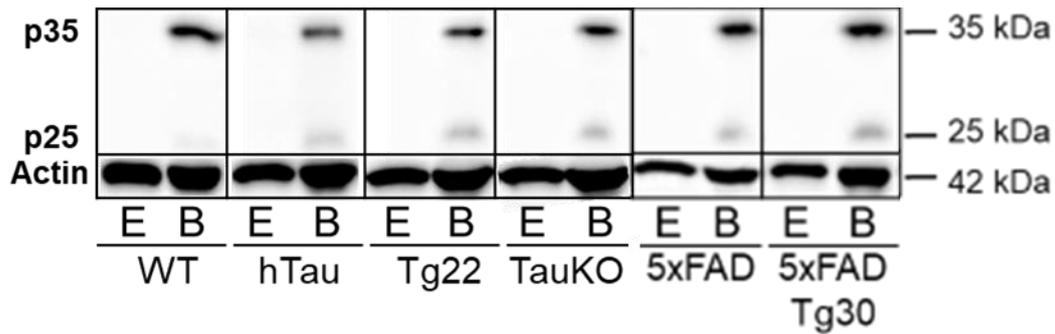
**Tableau Sup. 2 :** Tableau récapitulatif des p-valeurs obtenues lors de la comparaison entre les densités des souris injectées avec une fraction AD et des souris injectées avec une fraction CTL dans le côté contralatéral ou ipsilatéral. Tests de Mann-Whitney (Two-Tailed). AD (n = 5) et CTL (n = 4).



**Fig. Sup. 5 : Illustration de la mise en évidence artéfactuelle des vaisseaux sanguins sur des coupes histologiques de souris par l'utilisation d'anticorps secondaires anti-souris.** Immunomarquage de l'hippocampe (A,C,E,G) et de la rétine (B,D,F,H-J) de souris TauKO (A-B,E-F,I) et Tg22 (C-D,G-H,J) avec les anticorps AT-180 (A-D, I) et pThr231 (E-H, J). L'utilisation d'un anticorps primaire produit chez la souris tel que AT-180 (MM), qui reconnaît l'épitope pThr231, nécessite l'utilisation d'un anticorps secondaire anti-anticorps de souris pour mettre en évidence la protéine d'intérêt. Mais ce dernier reconnaît également les immunoglobulines (anticorps) murines présentes dans le sang à l'intérieur des vaisseaux sanguins (montrés par des **flèches** sur les images A-B,D et par l'**astérisque** sur l'image I). Tandis que l'utilisation d'un anticorps primaire, qui reconnaît le même épitope (pThr231), produit chez le lapin (PR) et qui demande l'utilisation d'un anticorps secondaire anti-anticorps de lapin permet d'éviter cet artefact (E-H,J). La **tête de flèche** (H) montre un vaisseau sanguin qui n'est pas immunomarcqué. L'image (J) montre le vaisseau sanguin de l'image (H) à plus fort grossissement. Le génotype TauKO a été utilisé comme contrôle négatif pour les anticorps anti-tau et le génotype Tg22 a été employé comme contrôle positif (C,G). MM : « Mouse monoclonal » (Anticorps monoclonal murin), PR : « Poly Rabbit » (Anticorps polyclonal de lapin). GCL : couche des cellules ganglionnaires (Ganglion Cell Layer), IPL : couche plexiforme interne (Inner Plexiform Layer), INL : couche nucléaire interne (Inner Nuclear Layer), OPL : couche plexiforme externe (Outer Plexiform Layer) et ONL : couche nucléaire externe (Outer Nuclear Layer). Barres d'échelle : A,C,E,G : 50  $\mu$ m et B,D,F, H-J : 20  $\mu$ m.



**Fig. Sup. 6 : Localisation et expression des protéines APP dans la rétine de souris 5xFAD et 5xFAD Tg30.** Immunomarquage de la rétine (A-C) et du cortex (D-F) de souris 5xFAD (A,D), 5xFAD Tg30 (B,E) et WT (C-F) avec l'anticorps anti-APP humain (3H5). Une coupe de cerveau d'un patient atteint de la MA (ALZ) est illustrée en (G et H) et montre un neurone dont le corps cellulaire contient des granulations marquées par l'anticorps anti-APP humain (G) et des neurites dystrophiques (H). Western blotting d'homogénats d'yeux (E/Eye) ou de cerveaux (B/Brain) de souris 5xFAD, 5xFAD Tg30 et WT avec l'anticorps anti-APP humain (3H5) ou l'anticorps anti-APP total (humain et murin) (BR15) (I). L'actine a été utilisée comme contrôle de charge. La souris WT a servi de contrôle négatif pour la protéine APP humaine. **GCL** : couche des cellules ganglionnaires (Ganglion Cell Layer), **IPL** : couche plexiforme interne (Inner Plexiform Layer), **INL** : couche nucléaire interne (Inner Nuclear Layer), **OPL** : couche plexiforme externe (Outer Plexiform Layer) et **ONL** : couche nucléaire externe (Outer Nuclear Layer). Barres d'échelle : A-C : 20  $\mu$ m, D-F : 50  $\mu$ m, petites images en A-B et G-H : 10  $\mu$ m.



**Fig. Sup. 7 :** Expression des activateurs p35 et p25 de la kinase CDK5 dans la rétine et le cerveau de souris WT, hTau, Tg22, TauKO, 5xFAD et 5xFAD Tg30. Western blotting d'homogénats d'yeux (E/eye) ou de cerveaux (B/Brain) de souris WT, hTau, Tg22, TauKO, 5xFAD et 5xFAD Tg30 avec l'anticorps anti-p35. L'actine a été utilisée comme contrôle de charge.

		WT	hTau	Tg22	TauKO	5xFAD	5xFAD Tg30
<i>Tau</i>	Tau total	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos
	Tau humain	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos
	Tau murin	Neg	Neg	Neg	Neg	-	-
	PHF-1	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos
	AT8	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos
	pThr231	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos
	Tau déphosphorylé	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos
	Gallyas	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos

**Tableau Sup. 3 :** Tableau récapitulatif des résultats obtenus par immunohistochimie sur les neurones pyramidaux de la corne d'Ammon de l'hippocampe au niveau du CA1 avec les anticorps anti-tau ou à l'aide de la coloration Gallyas. Immunomarquage des corps cellulaires des neurones hippocampaux. Neg : négatif, pas de marquage des corps cellulaires. Pos : positif, marquage des corps cellulaires. « - » : pas de données disponibles.

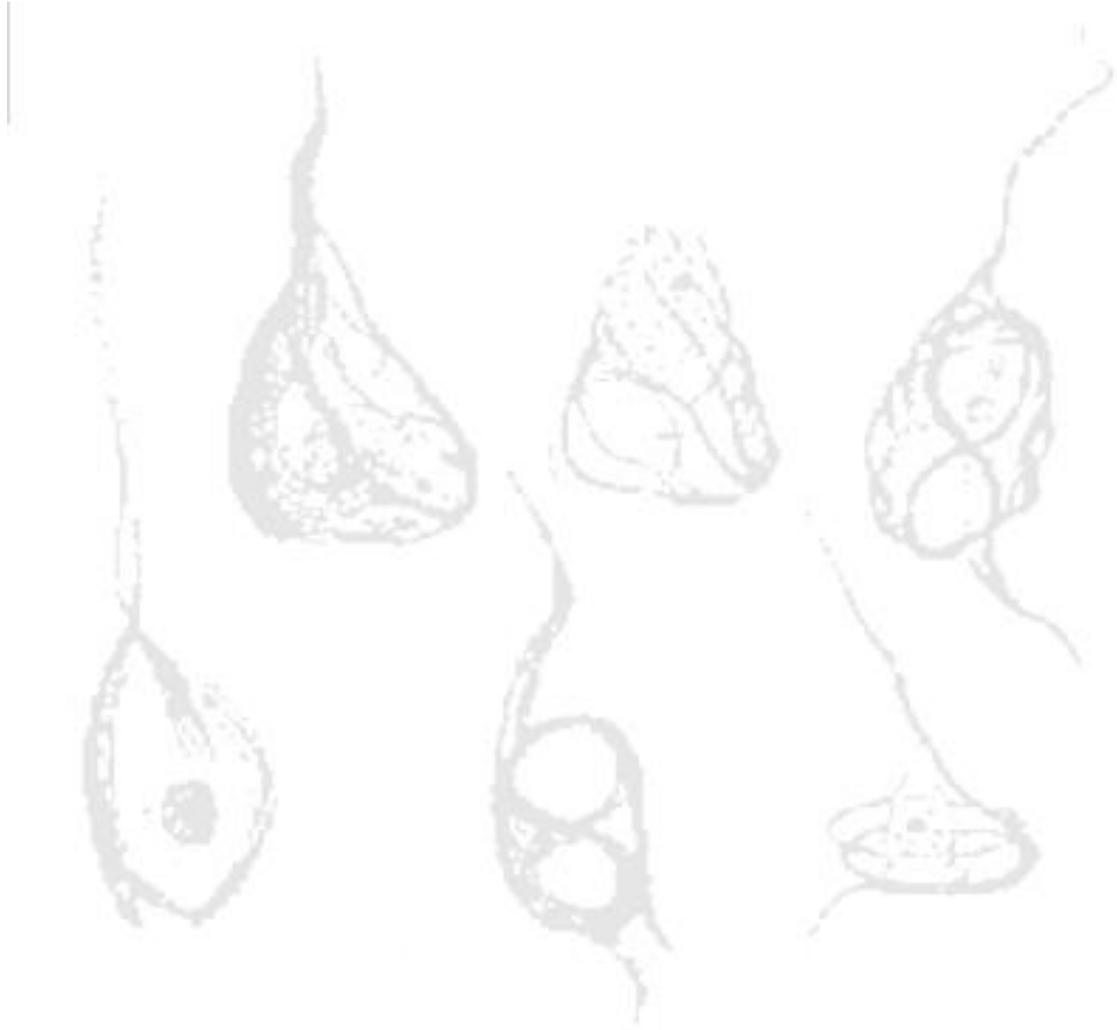
		WT	hTau	Tg22	TauKO	5xFAD	5xFAD Tg30
<i>Kinases</i>	GSK3 $\beta$	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
	CDK5	Neg	Neg	Neg	Neg	-	-

**Tableau Sup. 4 :** Tableau récapitulatif des résultats obtenus par immunohistochimie sur les neurones pyramidaux de la corne d'Ammon de l'hippocampe au niveau du CA1 avec les anticorps anti-GSK3 $\beta$  ou anti-CDK5. Immunomarquage des corps cellulaires des neurones hippocampaux. Neg : négatif, pas de marquage des corps cellulaires. Pos : positif, marquage des corps cellulaires. « - » : pas de données disponibles.

		WT	hTau	Tg22	TauKO	5xFAD	5xFAD Tg30
<i>Amyloïde</i>	A $\beta$ 40	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos
	A $\beta$ 42	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos
	Rouge Congo	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos

**Tableau Sup. 5 :** Tableau récapitulatif des résultats obtenus par immunohistochimie avec les anticorps anti-amyloïde ou à l'aide de la coloration au Rouge Congo du cortex cérébral. Immunomarquage du cortex cérébral. Neg : négatif, pas de marquage du cortex. Pos : positif, marquage du cortex.





# *Bibliographie*



**8. Références bibliographiques**

- AGUZZI, A. 2009. Cell biology: Beyond the prion principle. *Nature*, 459.
- AGUZZI, A., SIGURDSON, C. & HEIKENWAELDER, M. 2008. Molecular mechanisms of prion pathogenesis. *Annual review of pathology*, 3.
- 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 Neuropathol*, 127, 667-83.
- ALAFUZOFF, I., IQBAL, K., FRIDEN, H., ADOLFSSON, R. & WINBLAD, B. 1987. Histopathological criteria for progressive dementia disorders: clinical-pathological correlation and classification by multivariate data analysis. *Acta neuropathologica*, 74.
- ALEXANDROV, P., POGUE, A., BHATTACHARJEE, S. & LUKIW, W. 2011. Retinal amyloid peptides and complement factor H in transgenic models of Alzheimer's disease. *Neuroreport*, 22.
- ALONSO, A., GRUNDKE-IQBAL, I., BARRA, H. & IQBAL, K. 1997. Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94.
- ALONSO, A., ZAIDI, T., NOVAK, M., GRUNDKE-IQBAL, I. & IQBAL, K. 2001. Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 6923-8.
- ALONSO ADEL, C., MEDERLYOVA, A., NOVAK, M., GRUNDKE-IQBAL, I. & IQBAL, K. 2004. Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations. *The Journal of biological chemistry*, 279.
- ALZFORUM. <https://www.alzforum.org/research-models> [Online]. [Accessed].
- ALZHEIMER, A. 1907. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde.: Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtlich Medizin.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION 2021. 2021 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 17.
- ANDO, K., KABOVA, A., STYGELBOUT, V., LEROY, K., HERAUD, C., FRÉDÉRIC, C., SUAIN, V., YILMAZ, Z., AUTHELET, M., DEDECKER, R., POTIER, M. C., DUYCKAERTS, C. & BRION, J. P. 2014. Vaccination with Sarkosyl insoluble PHF-tau decrease neurofibrillary tangles formation in aged tau transgenic mouse model: a pilot study. *J Alzheimers Dis*, 40 Suppl 1, S135-45.
- ANDORFER, C., ACKER, C. M., KRESS, Y., HOF, P. R., DUFF, K. & DAVIES, P. 2005. Cell-Cycle Reentry and Cell Death in Transgenic Mice Expressing Nonmutant Human Tau Isoforms. *J Neurosci*, 25, 5446-54.
- ANDORFER, C., KRESS, Y., ESPINOZA, M., DE SILVA, R., TUCKER, K. L., BARDE, Y. A., DUFF, K. & DAVIES, P. 2003. Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *J Neurochem*, 86, 582-90.
- ANGELUCCI, A., CLASCA, F. & SUR, M. 1996. Anterograde axonal tracing with the subunit B of cholera toxin: a highly sensitive immunohistochemical protocol for revealing fine axonal morphology in adult and neonatal brains. *J Neurosci Methods*, 65, 101-12.
- ARAKHAMIA, T., LEE, C., CARLOMAGNO, Y., DUONG, D., KUNDINGER, S., WANG, K., WILLIAMS, D., DETURE, M., DICKSON, D., COOK, C., SEYFRIED, N.,

- PETRUCELLI, L. & FITZPATRICK, A. 2020. Posttranslational Modifications Mediate the Structural Diversity of Tauopathy Strains. *Cell*, 180.
- ARASTOO, M., LOFTHOUSE, R., PENNY, L., HARRINGTON, C., PORTER, A., WISCHIK, C. & PALLIYIL, S. 2020. Current Progress and Future Directions for Tau-Based Fluid Biomarker Diagnostics in Alzheimer's Disease. *International journal of molecular sciences*, 21.
- ARENDR, T., STIELER, J., STRIJKSTRA, A., HUT, R., RÜDIGER, J., VAN DER ZEE, E., HARKANY, T., HOLZER, M. & HÄRTIG, W. 2003. Reversible paired helical filament-like phosphorylation of tau is an adaptive process associated with neuronal plasticity in hibernating animals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23.
- ARMSTRONG, R. A. 2009. Alzheimer's Disease and the Eye☆. *J Optom.*
- ARNOLD, S., HYMAN, B., FLORY, J., DAMASIO, A. & VAN HOESEN, G. 1991. The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 1.
- ARRIAGADA, P., GROWDON, J., HEDLEY-WHYTE, E. & HYMAN, B. 1992. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*, 42.
- 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.
- ATARASHI, R., WILHAM, J., CHRISTENSEN, L., HUGHSON, A., MOORE, R., JOHNSON, L., ONWUBIKO, H., PRIOLA, S. & CAUGHEY, B. 2008. Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking. *Nature methods*, 5.
- AUDOUARD, E., HOUBEN, S., MASARACCHIA, C., YILMAZ, Z., SUAIN, V., AUTHELET, M., DE DECKER, R., BUÉE, L., BOOM, A., LEROY, K., ANDO, K. & BRION, J. P. 2016. High-Molecular-Weight Paired Helical Filaments from Alzheimer Brain Induces Seeding of Wild-Type Mouse Tau into an Argyrophilic 4R Tau Pathology in Vivo. *Am J Pathol*, 186, 2709-22.
- AYTAN, N., CHOI, J., CARRERAS, I., BRINKMANN, V., KOWALL, N., JENKINS, B. & DEDEOGLU, A. 2016. Fingolimod modulates multiple neuroinflammatory markers in a mouse model of Alzheimer's disease. *Scientific reports*, 6.
- BAIK, S., KANG, S., SON, S. & MOOK-JUNG, I. 2016. Microglia contributes to plaque growth by cell death due to uptake of amyloid  $\beta$  in the brain of Alzheimer's disease mouse model. *Glia*, 64.
- BANCHER, C., BRUNNER, C., LASSMANN, H., BUDKA, H., JELLINGER, K., WICHE, G., SEITELBERGER, F., GRUNDKE-IQBAL, I., IQBAL, K. & WISNIEWSKI, H. 1989. Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain research*, 477.
- BANCHER, C., GRUNDKE-IQBAL, I., IQBAL, K., FRIED, V. A., SMITH, H. T. & WISNIEWSKI, H. M. 1991. Abnormal phosphorylation of tau precedes ubiquitination in neurofibrillary pathology of Alzheimer disease. *Brain Research*, 539, 11-18.
- BARAGE, S. & SONAWANE, K. 2015. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*, 52.
- BARGHORN, S., ZHENG-FISCHHÖFER, Q., ACKMANN, M., BIERNAT, J., VON BERGEN, M., MANDELKOW, E. & MANDELKOW, E. 2000. Structure, microtubule

## Bibliographie

- interactions, and paired helical filament aggregation by tau mutants of frontotemporal dementias. *Biochemistry*, 39.
- BARNSTABLE, C. & DRÄGER, U. 1984. Thy-1 antigen: a ganglion cell specific marker in rodent retina. *Neuroscience*, 11.
- BATARSEH, Y., BHARATE, S., KUMAR, V., KUMAR, A., VISHWAKARMA, R., BHARATE, S. & KADDOUMI, A. 2017. Crocus sativus Extract Tightens the Blood-Brain Barrier, Reduces Amyloid  $\beta$  Load and Related Toxicity in 5XFAD Mice. *ACS chemical neuroscience*, 8.
- BAUMANN, K., MANDELKOW, E., BIERNAT, J., PIWNICA-WORMS, H. & MANDELKOW, E. 1993. Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS letters*, 336.
- BEACH, T. & MCGEER, E. 1988. Lamina-specific arrangement of astrocytic gliosis and senile plaques in Alzheimer's disease visual cortex. *Brain research*, 463.
- BEEKES, M., MCBRIDE, P. & BALDAUF, E. 1998. Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *The Journal of general virology*, 79 ( Pt 3).
- BENNETT, R., DEVOS, S., DUJARDIN, S., CORJUC, B., GOR, R., GONZALEZ, J., ROE, A., FROSCHE, M., PITSTICK, R., CARLSON, G. & HYMAN, B. 2017. Enhanced Tau Aggregation in the Presence of Amyloid  $\beta$ . *The American journal of pathology*, 187.
- BERNOULLI, C., SIEGFRIED, J., BAUMGARTNER, G., REGLI, F., RABINOWICZ, T., GAJDUSEK, D. & GIBBS, C. 1977. Danger of accidental person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by surgery. *Lancet (London, England)*, 1.
- BERRIMAN, J., SERPELL, L., OBERG, K., FINK, A., GOEDERT, M. & CROWTHER, R. 2003. Tau filaments from human brain and from in vitro assembly of recombinant protein show cross-beta structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100.
- BETMOUNI, S., PERRY, V. & GORDON, J. 1996. Evidence for an early inflammatory response in the central nervous system of mice with scrapie. *Neuroscience*, 74.
- BICKEBÖLLER, H., CAMPION, D., BRICE, A., AMOUYEL, P., HANNEQUIN, D., DIDIERJEAN, O., PENET, C., MARTIN, C., PÉREZ-TUR, J., MICHON, A., DUBOIS, B., LEDOZE, F., THOMAS-ANTERION, C., PASQUIER, F., PUEL, M., DEMONET, J., MOREAUD, O., BABRON, M., MEULIEN, D., GUEZ, D., CHARTIER-HARLIN, M., FREBOURG, T., AGID, Y., MARTINEZ, M. & CLERGET-DARPOUX, F. 1997. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: genotype-specific risks by age and sex. *American journal of human genetics*, 60.
- BINDER, L., FRANKFURTER, A. & REBHUN, L. 1985. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *The Journal of cell biology*, 101.
- BLANKS, J., HINTON, D., SADUN, A. & MILLER, C. 1989. Retinal ganglion cell degeneration in Alzheimer's disease. *Brain research*, 501.
- BLANKS, J., SCHMIDT, S., TORIGOE, Y., PORRELLO, K., HINTON, D. & BLANKS, R. 1996. Retinal pathology in Alzheimer's disease. II. Regional neuron loss and glial changes in GCL. *Neurobiology of aging*, 17.
- BOIMEL, M., GRIGORIADIS, N., LOURBOPOULOS, A., HABER, E., ABRAMSKY, O. & ROSENMAN, H. 2010. Efficacy and safety of immunization with phosphorylated tau against neurofibrillary tangles in mice. *Experimental neurology*, 224.
- BOLMONT, T., CLAVAGUERA, F., MEYER-LUEHMANN, M., HERZIG, M., RADDE, R., STAUFENBIEL, M., LEWIS, J., HUTTON, M., TOLNAY, M. & JUCKER, M. 2007. Induction of tau pathology by intracerebral infusion of amyloid-beta -containing brain extract and by amyloid-beta deposition in APP x Tau transgenic mice. *The American journal of pathology*, 171.

## Bibliographie

- BRAAK, E., BRAAK, H. & MANDELKOW, E. M. 1994. A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol*, 87, 554-67.
- BRAAK, H. & BRAAK, E. 1988. Neuropil threads occur in dendrites of tangle-bearing nerve cells. *Neuropathology and applied neurobiology*, 14.
- BRAAK, H. & BRAAK, E. 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, 82, 239-59.
- BRAAK, H. & DEL TREDICI, K. 2011. The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. *Acta neuropathologica*, 121.
- BRAAK, H., THAL, D., GHEBREMEDHIN, E. & DEL TREDICI, K. 2011. Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 70.
- BRANDNER, S., RAEBER, A., SAILER, A., BLÄTTLER, T., FISCHER, M., WEISSMANN, C. & AGUZZI, A. 1996. Normal host prion protein (PrP<sup>C</sup>) is required for scrapie spread within the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93.
- 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.
- BRETTEVILLE, A., MARCOUILLER, F., JULIEN, C., EL KHOURY, N., PETRY, F., POITRAS, I., MOUGINOT, D., LÉVESQUE, G., HÉBERT, S. & PLANEL, E. 2012. Hypothermia-induced hyperphosphorylation: a new model to study tau kinase inhibitors. *Scientific reports*, 2.
- 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.
- BRION, J., PASSAREIRO, H., NUNEZ, J. & FLAMENT-DURAND, J. 1985. Mise en évidence immunologique de la protéine tau au niveau des lésions de dégénérescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer. *ArchBiol (Brux)*, 95, 229-235.
- BRION, J. P., HANGER, D. P., COUCK, A. M. & ANDERTON, B. H. 1991. A68 proteins in Alzheimer's disease are composed of several tau isoforms in a phosphorylated state which affects their electrophoretic mobilities. *Biochem J*, 279 ( Pt 3), 831-6.
- BROUWERS, N., SLEEGERS, K. & VAN BROECKHOVEN, C. 2008. Molecular genetics of Alzheimer's disease: an update. *Annals of medicine*, 40.
- BROWN, P. 1988. Human growth hormone therapy and Creutzfeldt-Jakob disease: a drama in three acts. *Pediatrics*, 81.
- BROWN, P., BRANDEL, J., SATO, T., NAKAMURA, Y., MACKENZIE, J., WILL, R., LADOGANA, A., POCCHIARI, M., LESCHEK, E. & SCHONBERGER, L. 2012. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease, final assessment. *Emerging infectious diseases*, 18.
- BROWN, P., GIBBS, C., RODGERS-JOHNSON, P., ASHER, D., SULIMA, M., BACOTE, A., GOLDFARB, L. & GAJDUSEK, D. 1994. Human spongiform encephalopathy: the National Institutes of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Annals of neurology*, 35.
- BUCHHAVE, P., MINTHON, L., ZETTERBERG, H., WALLIN, A., BLENNOW, K. & HANSSON, O. 2012. Cerebrospinal fluid levels of  $\beta$ -amyloid 1-42, but not of tau, are fully changed already 5 to 10 years before the onset of Alzheimer dementia. *Archives of general psychiatry*, 69.
- BUEE, L., BUSSIERE, T., BUEE-SCHERRER, V., DELACOURTE, A. & HOF, P. R. 2000. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev*, 33, 95-130.

## Bibliographie

- BUÉE-SCHERRER, V., CONDAMINES, O., MOURTON-GILLES, C., JAKES, R., GOEDERT, M., PAU, B. & DELACOURTE, A. 1996. AD2, a phosphorylation-dependent monoclonal antibody directed against tau proteins found in Alzheimer's disease. *Brain research. Molecular brain research*, 39.
- BÉLONDRADE, M., NICOT, S., MAYRAN, C., BRUYERE-OSTELLS, L., ALMELA, F., DI BARI, M., LEVAVASSEUR, E., WATTS, J., FOURNIER-WIRTH, C., LEHMANN, S., HAÏK, S., NONNO, R. & BOUGARD, D. 2021. Sensitive protein misfolding cyclic amplification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease prions is strongly seed and substrate dependent. *Scientific reports*, 11.
- CALSOLARO, V. & EDISON, P. 2016. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 12.
- CHARTIER-HARLIN, M., PARFITT, M., LEGRAIN, S., PÉREZ-TUR, J., BROUSSEAU, T., EVANS, A., BERR, C., VIDAL, O., ROQUES, P. & GOURLET, V. 1994. Apolipoprotein E, epsilon 4 allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset forms of Alzheimer's disease: analysis of the 19q13.2 chromosomal region. *Human molecular genetics*, 3.
- CHEN, J., MIAO, Y., WANG, X. & WANG, Z. 2011. Elevation of p-NR2A(S1232) by Cdk5/p35 contributes to retinal ganglion cell apoptosis in a rat experimental glaucoma model. *Neurobiology of disease*, 43.
- CHESEBRO, B., RACE, R. & KERCHER, L. 2005. Scrapie pathogenesis in brain and retina: effects of prion protein expression in neurons and astrocytes. *Journal of neurovirology*, 11.
- CHIASSEU, M., ALARCON-MARTINEZ, L., BELFORTE, N., QUINTERO, H., DOTIGNY, F., DESTROISMAISONS, L., VANDE VELDE, C., PANAYI, F., LOUIS, C. & DI POLO, A. 2017. Tau accumulation in the retina promotes early neuronal dysfunction and precedes brain pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*.
- CHIDLOW, G., WOOD, J., MANAVIS, J., FINNIE, J. & CASSON, R. 2017. Investigations into Retinal Pathology in the Early Stages of a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 56.
- CHIU, K., LAU, W., YEUNG, S., CHANG, R. & SO, K. 2008. Retrograde labeling of retinal ganglion cells by application of fluoro-gold on the surface of superior colliculus. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- CHIU, M., CHEN, Y., CHEN, T., YANG, S., YANG, F., TSENG, T., CHIEH, J., CHEN, J., TZEN, K., HUA, M. & HORNG, H. 2014. Plasma tau as a window to the brain-negative associations with brain volume and memory function in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Human brain mapping*, 35.
- CHIU, M., FAN, L., CHEN, T., CHEN, Y., CHIEH, J. & HORNG, H. 2017. Plasma Tau Levels in Cognitively Normal Middle-Aged and Older Adults. *Frontiers in aging neuroscience*, 9.
- CHO, J. & JOHNSON, G. 2003. Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates tau at both primed and unprimed sites. Differential impact on microtubule binding. *The Journal of biological chemistry*, 278.
- CHO, J. & JOHNSON, G. 2004. Primed phosphorylation of tau at Thr231 by glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) plays a critical role in regulating tau's ability to bind and stabilize microtubules. *Journal of neurochemistry*, 88.
- CHOI, S., AID, S., CARACCILO, L., MINAMI, S., NIKURA, T., MATSUOKA, Y., TURNER, R., MATTSON, M. & BOSETTI, F. 2013. Cyclooxygenase-1 inhibition

## Bibliographie

- reduces amyloid pathology and improves memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 124.
- CHUNG, S. 2009. Aberrant phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *BMB reports*, 42.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- 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. *Nat Cell Biol*, 11, 909-13.
- CLAVAGUERA, F., HENCH, J., LAVENIR, I., SCHWEIGHAUSER, G., FRANK, S., GOEDERT, M. & TOLNAY, M. 2014. Peripheral administration of tau aggregates triggers intracerebral tauopathy in transgenic mice. *Acta Neuropathol*, 127, 299-301.
- CLEVELAND, D., HWO, S. & KIRSCHNER, M. 1977. Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *Journal of molecular biology*, 116.
- COLIN, M., DUJARDIN, S., SCHRAEN-MASCHKE, S., MENO-TETANG, G., DUYCKAERTS, C., COURADE, J. P. & BUEE, L. 2020. From the prion-like propagation hypothesis to therapeutic strategies of anti-tau immunotherapy. *Acta Neuropathol*, 139, 3-25.
- COLLINGE, J., PALMER, M. & DRYDEN, A. 1991. Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet (London, England)*, 337.
- CORDER, E., SAUNDERS, A., STRITTMATTER, W., SCHMECHEL, D., GASKELL, P., SMALL, G., ROSES, A., HAINES, J. & PERICAK-VANCE, M. 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.
- COUCHIE, D., MAVILIA, C., GEORGIEFF, I., LIEM, R., SHELANSKI, M. & NUNEZ, J. 1992. Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89.
- CROWTHER, R. 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.
- CROWTHER, R. & WISCHIK, C. 1985. Image reconstruction of the Alzheimer paired helical filament. *The EMBO journal*, 4.
- CRUTS, M., THEUNS, J. & VAN BROECKHOVEN, C. 2012. Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. *Human mutation*, 33.
- 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. *J Cell Sci*, 114, 1179-87.
- DELAÈRE, P., DUYCKAERTS, C., HE, Y., PIETTE, F. & HAUW, J. 1991. Subtypes and differential laminar distributions of beta A4 deposits in Alzheimer's disease: relationship with the intellectual status of 26 cases. *Acta neuropathologica*, 81.
- DEN HAAN, J., MORREMA, T. H. J., VERBRAAK, F. D., DE BOER, J. F., SCHELTENS, P., ROZEMULLER, A. J., BERGEN, A. A. B., BOUWMAN, F. H. & HOOZEMANS, J. J. 2018. Amyloid-beta and phosphorylated tau in post-mortem Alzheimer's disease retinas. *Acta Neuropathol Commun*, 6, 147.

## Bibliographie

- DESPRES, C., BYRNE, C., QI, H., CANTRELLE, F. X., HUVENT, I., CHAMBRAUD, B., BAULIEU, E. E., JACQUOT, Y., LANDRIEU, I., LIPPENS, G. & SMET-NOCCA, C. 2017. Identification of the Tau phosphorylation pattern that drives its aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, 9080-9085.
- DICARLO, G., WILCOCK, D., HENDERSON, D., GORDON, M. & MORGAN, D. 2001. Intrahippocampal LPS injections reduce Abeta load in APP+PS1 transgenic mice. *Neurobiology of aging*, 22.
- DICKSON, D., FARLO, J., DAVIES, P., CRYSTAL, H., FULD, P. & YEN, S. 1988. Alzheimer's disease. A double-labeling immunohistochemical study of senile plaques. *The American journal of pathology*, 132.
- DOBLE, B. W. & WOODGETT, J. R. 2003. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci*, 116, 1175-86.
- DORSEY, K., ZOU, S., SCHONBERGER, L., SULLIVAN, M., KESSLER, D., NOTARI, E., FANG, C. & DODD, R. 2009. Lack of evidence of transfusion transmission of Creutzfeldt-Jakob disease in a US surveillance study. *Transfusion*, 49.
- DUARA, R., LOEWENSTEIN, D., POTTER, E., APPEL, J., GREIG, M., URS, R., SHEN, Q., RAJ, A., SMALL, B., BARKER, W., SCHOFIELD, E., WU, Y. & POTTER, H. 2008. Medial temporal lobe atrophy on MRI scans and the diagnosis of Alzheimer disease. *Neurology*, 71.
- DUBOIS, B., FELDMAN, H., JACOVA, C., DEKOSKY, S., BARBERGER-GATEAU, P., CUMMINGS, J., DELACOURTE, A., GALASKO, D., GAUTHIER, S., JICHA, G., MEGURO, K., O'BRIEN, J., PASQUIER, F., ROBERT, P., ROSSOR, M., SALLOWAY, S., STERN, Y., VISSER, P. & SCHELTENS, P. 2007. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *The Lancet. Neurology*, 6.
- DUFF, K., KNIGHT, H., REFOLO, L. M., SANDERS, S., YU, X., PICCIANO, M., MALESTER, B., HUTTON, M., ADAMSON, J., GOEDERT, M., BURKI, K. & DAVIES, P. 2000. Characterization of pathology in transgenic mice over-expressing human genomic and cDNA tau transgenes. *Neurobiol Dis*, 7, 87-98.
- DUFFY, P., WOLF, J., COLLINS, G., DEVOE, A. G., STREETEN, B. & COWEN, D. 1974. Letter: Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med*, 290, 692-3.
- DUGGER, B., TU, M., MURRAY, M. & DICKSON, D. 2011. Disease specificity and pathologic progression of tau pathology in brainstem nuclei of Alzheimer's disease and progressive supranuclear palsy. *Neuroscience letters*, 491.
- DUJARDIN, S., COMMINS, C., LATHUILIERE, A., BEEREPOOT, P., FERNANDES, A., KAMATH, T., DE LOS SANTOS, M., KLINKSTEIN, N., CORJUC, D., CORJUC, B., DOOLEY, P., VIODE, A., OAKLEY, D., MOORE, B., MULLIN, K., JEAN-GILLES, D., CLARK, R., ATCHISON, K., MOORE, R., CHIBNIK, L., TANZI, R., FROSCHE, M., SERRANO-POZO, A., ELWOOD, F., STEEN, J., KENNEDY, M. & HYMAN, B. 2020. Tau molecular diversity contributes to clinical heterogeneity in Alzheimer's disease. *Nature medicine*, 26.
- DUTESCU, R., LI, Q., CROWSTON, J., MASTERS, C., BAIRD, P. & CULVENOR, J. 2009. Amyloid precursor protein processing and retinal pathology in mouse models of Alzheimer's disease. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 247.
- DUYCKAERTS, C., BRION, J., HAUW, J. & FLAMENT-DURAND, J. 1987. Quantitative assessment of the density of neurofibrillary tangles and senile plaques in senile dementia of the Alzheimer type. Comparison of immunocytochemistry with a specific antibody and Bodian's protargol method. *Acta neuropathologica*, 73.

## Bibliographie

- DUYCKAERTS, C., HAUW, J., BASTENAIRE, F., PIETTE, F., POULAIN, C., RAINARD, V., JAVOY-AGID, F. & BERTHAUX, P. 1986. Laminar distribution of neocortical senile plaques in senile dementia of the Alzheimer type. *Acta neuropathologica*, 70.
- DUYCKAERTS, C., SAZDOVITCH, V., ANDO, K., SEILHEAN, D., PRIVAT, N., YILMAZ, Z., PECKEU, L., AMAR, E., COMOY, E., MACESKI, A., LEHMANN, S., BRION, J., BRANDEL, J. & 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 Abeta pathology. *Acta neuropathologica*, 135.
- DUYCKAERTS, C., UCHIHARA, T., SEILHEAN, D., HE, Y. & HAUW, J. 1997. Dissociation of Alzheimer type pathology in a disconnected piece of cortex. *Acta neuropathologica*, 93.
- EDGREN, G., HJALGRIM, H., ROSTGAARD, K., LAMBERT, P., WIKMAN, A., NORDA, R., TITLESTAD, K., ERIKSTRUP, C., ULLUM, H., MELBYE, M., BUSCH, M. & NYRÉN, O. 2016. Transmission of Neurodegenerative Disorders Through Blood Transfusion: A Cohort Study. *Annals of internal medicine*, 165.
- EDWARDS, M., RODRÍGUEZ, J., GUTIERREZ-LANZA, R., YATES, J., VERKHRATSKY, A. & LUTTY, G. 2014. Retinal macroglia changes in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Experimental eye research*, 127.
- EIKELENBOOM, P., BATE, C., VAN GOOL, W., HOOZEMANS, J., ROZEMULLER, J., VEERHUIS, R. & WILLIAMS, A. 2002. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and prion disease. *Glia*, 40.
- ENGMANN, O. & GIESE, K. 2009. Crosstalk between Cdk5 and GSK3beta: Implications for Alzheimer's Disease. *Frontiers in molecular neuroscience*, 2.
- ESCARTIN, C., GALEA, E., LAKATOS, A., O'CALLAGHAN, J., PETZOLD, G., SERRANO-POZO, A., STEINHÄUSER, C., VOLTERRA, A., CARMIGNOTO, G., AGARWAL, A., ALLEN, N., ARAQUE, A., BARBEITO, L., BARZILAI, A., BERGLES, D., BONVENTO, G., BUTT, A., CHEN, W., COHEN-SALMON, M., CUNNINGHAM, C., DENEEN, B., DE STROOPER, B., DÍAZ-CASTRO, B., FARINA, C., FREEMAN, M., GALLO, V., GOLDMAN, J., GOLDMAN, S., GÖTZ, M., GUTIÉRREZ, A., HAYDON, P., HEILAND, D., HOL, E., HOLT, M., IINO, M., KASTANENKA, K., KETTENMANN, H., KHAKH, B., KOIZUMI, S., LEE, C., LIDDELOW, S., MACVICAR, B., MAGISTRETTI, P., MESSING, A., MISHRA, A., MOLOFSKY, A., MURAI, K., NORRIS, C., OKADA, S., OLIET, S., OLIVEIRA, J., PANATIER, A., PARPURA, V., PEKNA, M., PEKNY, M., PELLERIN, L., PEREA, G., PÉREZ-NIEVAS, B., PFRIEGER, F., POSKANZER, K., QUINTANA, F., RANSOHOFF, R., RIQUELME-PEREZ, M., ROBEL, S., ROSE, C., ROTHSTEIN, J., ROUACH, N., ROWITCH, D., SEMYANOV, A., SIRKO, S., SONTHEIMER, H., SWANSON, R., VITORICA, J., WANNER, I., WOOD, L., WU, J., ZHENG, B., ZIMMER, E., ZOREC, R., SOFRONIEW, M. & VERKHRATSKY, A. 2021. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nature neuroscience*, 24.
- 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. *J Biol Chem*.
- FAN, Y. & HUO, J. 2021. A1/A2 astrocytes in central nervous system injuries and diseases: Angels or devils? *Neurochemistry international*, 148.
- FERRINGTON, D., HUSSONG, S., ROEHRICH, H., KAPPAHN, R., KAVANAUGH, S., HEUSS, N. & GREGERSON, D. 2008. Immunoproteasome responds to injury in the retina and brain. *Journal of neurochemistry*, 106.

## Bibliographie

- FITZPATRICK, A., FALCON, B., HE, S., MURZIN, A., MURSHUDOV, G., GARRINGER, H., CROWTHER, R., GHETTI, B., GOEDERT, M. & SCHERES, S. 2017. Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature*, 547.
- FORRESTER, J. & PETERS, A. 1967. Nerve fibres in optic nerve of rat. *Nature*, 214.
- FOSSATI, S., RAMOS CEJUDO, J., DEBURE, L., PIRRAGLIA, E., SONE, J., LI, Y., CHEN, J., BUTLER, T., ZETTERBERG, H., BLENNOW, K. & DE LEON, M. 2019. Plasma tau complements CSF tau and P-tau in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia (Amsterdam, Netherlands)*, 11.
- FRANKLIN, K. B. J. & PAXINOS, G. 2008. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*.
- FRASER, H. 1982. Neuronal spread of scrapie agent and targeting of lesions within the retino-tectal pathway. *Nature*, 295, 149-50.
- FROST, B., JACKS, R. L. & DIAMOND, M. I. 2009. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem*, 284, 12845-52.
- FURMAN, J., HOLMES, B. & DIAMOND, M. 2015. Sensitive Detection of Proteopathic Seeding Activity with FRET Flow Cytometry. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- GALLYAS, F. 1971. Silver staining of Alzheimer's neurofibrillary changes by means of physical development. *Acta Morphol Acad Sci Hung*, 19, 1-8.
- GASPARINI, L., CROWTHER, R., MARTIN, K., BERG, N., COLEMAN, M., GOEDERT, M. & SPILLANTINI, M. 2011. Tau inclusions in retinal ganglion cells of human P301S tau transgenic mice: effects on axonal viability. *Neurobiology of aging*, 32.
- GHETTI, B., OBLAK, A., BOEVE, B., JOHNSON, K., DICKERSON, B. & GOEDERT, M. 2015. Invited review: Frontotemporal dementia caused by microtubule-associated protein tau gene (MAPT) mutations: a chameleon for neuropathology and neuroimaging. *Neuropathology and applied neurobiology*, 41.
- GIANNAKOPOULOS, P., HERRMANN, F., BUSSIÈRE, T., BOURAS, C., KÖVARI, E., PERL, D., MORRISON, J., GOLD, G. & HOF, P. 2003. Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology*, 60.
- GIBBS, C. J., ASHER, D. M., KOBRINE, A., AMYX, H. L., SULIMA, M. P. & GAJDUSEK, D. C. 1994. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease to a chimpanzee by electrodes contaminated during neurosurgery. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 57, 757-8.
- GIJS, M., RAMAKERS, I., VISSER, P., VERHEY, F., VAN DE WAARENBURG, M., SCHALKWIJK, C., NUIJTS, R. & WEBERS, C. 2021. Association of tear fluid amyloid and tau levels with disease severity and neurodegeneration. *Scientific reports*, 11.
- GLATZEL, M., HEPPNER, F., ALBERS, K. & AGUZZI, A. 2001. Sympathetic innervation of lymphoreticular organs is rate limiting for prion neuroinvasion. *Neuron*, 31.
- GLENNER, G. & WONG, C. 1984. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 120.
- GOATE, A., CHARTIER-HARLIN, M., 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.
- GOEDERT, M. 2015. NEURODEGENERATION. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled A $\beta$ , tau, and  $\alpha$ -synuclein. *Science*, 349, 1255555.
- 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.

## Bibliographie

- GOEDERT, M., SATUMTIRA, S., JAKES, R., SMITH, M., KAMIBAYASHI, C., WHITE, C. & SONTAG, E. 2000. Reduced binding of protein phosphatase 2A to tau protein with frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 mutations. *Journal of neurochemistry*, 75.
- GOEDERT, M., SPILLANTINI, M. & CROWTHER, R. 1992a. Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89.
- GOEDERT, M., SPILLANTINI, M., JAKES, R., RUTHERFORD, D. & CROWTHER, R. 1989a. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*, 3.
- GOEDERT, M., SPILLANTINI, M., POTIER, M., ULRICH, J. & CROWTHER, R. 1989b. Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *The EMBO journal*, 8.
- GOEDERT, M., SPILLANTINI, M. G., CAIRNS, N. J. & CROWTHER, R. A. 1992b. Tau proteins of alzheimer paired helical filaments: Abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron*, 8, 159-168.
- GONG, C., SHAIKH, S., WANG, J., ZAIDI, T., GRUNDKE-IQBAL, I. & IQBAL, K. 1995. Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. *Journal of neurochemistry*, 65.
- GONG, C., SINGH, T., GRUNDKE-IQBAL, I. & IQBAL, K. 1993. Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *Journal of neurochemistry*, 61.
- GORDON, S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nature reviews. Immunology*, 3.
- GREENBERG, S., BACSKAI, B., HERNANDEZ-GUILLAMON, M., PRUZIN, J., SPERLING, R. & VAN VELUW, S. 2020. Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease - one peptide, two pathways. *Nature reviews. Neurology*, 16.
- GRIMALDI, A., BRIGHI, C., PERUZZI, G., RAGOZZINO, D., BONANNI, V., LIMATOLA, C., RUOCCO, G. & DI ANGELANTONIO, S. 2018. Inflammation, neurodegeneration and protein aggregation in the retina as ocular biomarkers for Alzheimer's disease in the 3xTg-AD mouse model. *Cell Death Dis.*
- GRIMALDI, A., PEDICONI, N., OIENI, F., PIZZARELLI, R., ROSITO, M., GIUBETTINI, M., SANTINI, T., LIMATOLA, C., RUOCCO, G., RAGOZZINO, D. & DI ANGELANTONIO, S. 2019. Neuroinflammatory Processes, A1 Astrocyte Activation and Protein Aggregation in the Retina of Alzheimer's Disease Patients, Possible Biomarkers for Early Diagnosis. *Frontiers in neuroscience*, 13.
- GROVER, A., ENGLAND, E., BAKER, M., SAHARA, N., ADAMSON, J., GRANGER, B., HOULDEN, H., PASSANT, U., YEN, S., DETURE, M. & HUTTON, M. 2003. A novel tau mutation in exon 9 (1260V) causes a four-repeat tauopathy. *Experimental neurology*, 184.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 4913-7.
- 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. 2016. Unique pathological tau conformers from Alzheimer's brains transmit tau pathology in nontransgenic mice. *J Exp Med*, 213, 2635-2654.
- GUO, Y., HUANG, Y., SHEN, X., CHEN, S., HU, H., WANG, Z., TAN, L. & YU, J. 2021. Characterization of Alzheimer's tau biomarker discordance using plasma, CSF, and PET. *Alzheimer's research & therapy*, 13.

## Bibliographie

- GUPTA, N., FONG, J., ANG, L. & YÜCEL, Y. 2008. Retinal tau pathology in human glaucomas. *Canadian journal of ophthalmology. Journal canadien d'ophtalmologie*, 43.
- GUPTA, N. & YÜCEL, Y. 2007. Glaucoma as a neurodegenerative disease. *Current opinion in ophthalmology*, 18.
- GÖTZ, J., CHEN, F., VAN DORPE, J. & NITSCH, R. 2001. Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science (New York, N.Y.)*, 293.
- HABIBA, U., MERLIN, S., LIM, J., WONG, V., NGUYEN, C., MORLEY, J., BUI, B. & TAYEBI, M. 2020. Age-Specific Retinal and Cerebral Immunodetection of Amyloid- $\beta$  Plaques and Oligomers in a Rodent Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 76.
- HACKAM, A., QIAN, J., LIU, D., GUNATILAKA, T., FARKAS, R., CHOWERS, I., KAGEYAMA, M., PARMIGIANI, G. & ZACK, D. 2004. Comparative gene expression analysis of murine retina and brain. *Molecular vision*, 10.
- HAMPEL, H., MESULAM, M., CUELLO, A., FARLOW, M., GIACOBINI, E., GROSSBERG, G., KHACHATURIAN, A., VERGALLO, A., CAVEDO, E., SNYDER, P. & KHACHATURIAN, Z. 2018. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain : a journal of neurology*, 141.
- HANGER, D. P. 2020. Table of Tau Phosphorylation Sites. Available online : [https://docs.google.com/spreadsheets/d/1hGYs1ZcupmTnbB7n6qs1r\\_WVTXHt1O7NBLyKBN7EQUQ/edit#gid=0](https://docs.google.com/spreadsheets/d/1hGYs1ZcupmTnbB7n6qs1r_WVTXHt1O7NBLyKBN7EQUQ/edit#gid=0).
- HANSEN, D., HANSON, J. & SHENG, M. 2018. Microglia in Alzheimer's disease. *The Journal of cell biology*, 217.
- HARADA, A., OGUCHI, K., OKABE, S., KUNO, J., TERADA, S., OHSHIMA, T., SATO-YOSHITAKE, R., TAKEI, Y., NODA, T. & HIROKAWA, N. 1994. Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature*, 369, 488-91.
- HARDY, J. & HIGGINS, G. 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science (New York, N.Y.)*, 256.
- HARTZ, A., BAUER, B., SOLDNER, E., WOLF, A., BOY, S., BACKHAUS, R., MIHALJEVIC, I., BOGDAHN, U., KLÜNEMANN, H., SCHUIERER, G. & SCHLACHETZKI, F. 2012. Amyloid- $\beta$  contributes to blood-brain barrier leakage in transgenic human amyloid precursor protein mice and in humans with cerebral amyloid angiopathy. *Stroke*, 43.
- HASEGAWA, M., SMITH, M. & GOEDERT, M. 1998. Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly. *FEBS letters*, 437.
- HE, Z., GUO, J., MCBRIDE, J., NARASIMHAN, S., KIM, H., CHANGOLKAR, L., ZHANG, B., GATHAGAN, R., YUE, C., DENGLER, C., STIEBER, A., NITLA, M., COULTER, D., ABEL, T., BRUNDEN, K., TROJANOWSKI, J. & LEE, V. 2018. Amyloid- $\beta$  plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation. *Nature medicine*, 24.
- HEAD, M. W., NORTHCOTT, V., RENNISON, K., RITCHIE, D., MCCARDLE, L., BUNN, T. J., MCLENNAN, N. F., IRONSIDE, J. W., TULLO, A. B. & BONSHK, R. E. 2003. Prion protein accumulation in eyes of patients with sporadic and variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44, 342-6.
- HEAD, M. W., PEDEN, A. H., YULL, H. M., RITCHIE, D. L., BONSHK, R. E., TULLO, A. B. & IRONSIDE, J. W. 2005. Abnormal prion protein in the retina of the most commonly occurring subtype of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Br J Ophthalmol*.

## Bibliographie

- HEBERT, L., SCHERR, P., BECKETT, L., ALBERT, M., PILGRIM, D., CHOWN, M., FUNKENSTEIN, H. & EVANS, D. 1995. Age-specific incidence of Alzheimer's disease in a community population. *JAMA*, 273.
- HECKMANN, J. G., LANG, C. J., PETRUCH, F., DRUSCHKY, A., ERB, C., BROWN, P. & NEUNDORFER, B. 1997. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease via a corneal transplant. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 63, 388-90.
- HEDGES, T., PEREZ GALVES, R., SPEIGELMAN, D., BARBAS, N., PELI, E. & YARDLEY, C. 1996. Retinal nerve fiber layer abnormalities in Alzheimer's disease. *Acta ophthalmologica Scandinavica*, 74.
- HEICKLEN-KLEIN, A. & GINZBURG, I. 2000. Tau promoter confers neuronal specificity and binds Sp1 and AP-2. *Journal of neurochemistry*, 75.
- HELLMICH, M., PANT, H., WADA, E. & BATTEY, J. 1992. Neuronal cdc2-like kinase: a cdc2-related protein kinase with predominantly neuronal expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89.
- HERBER, D., ROTH, L., WILSON, D., WILSON, N., MASON, J., MORGAN, D. & GORDON, M. 2004. Time-dependent reduction in A $\beta$  levels after intracranial LPS administration in APP transgenic mice. *Experimental neurology*, 190.
- HERNANDEZ, F., LUCAS, J. J. & AVILA, J. 2013. GSK3 and tau: two convergence points in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 33 Suppl 1, S141-4.
- HIGUCHI, M., LEE, V. & TROJANOWSKI, J. 2002. Tau and axonopathy in neurodegenerative disorders. *Neuromolecular medicine*, 2.
- HINTON, D., SADUN, A., BLANKS, J. & MILLER, C. 1986. Optic-nerve degeneration in Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine*, 315.
- HISANAGA, S. & SAITO, T. 2003. The regulation of cyclin-dependent kinase 5 activity through the metabolism of p35 or p39 Cdk5 activator. *Neuro-Signals*, 12.
- HO, C., TRONCOSO, J., KNOX, D., STARK, W. & EBERHART, C. 2014. Beta-amyloid, phospho-tau and alpha-synuclein deposits similar to those in the brain are not identified in the eyes of Alzheimer's and Parkinson's disease patients. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 24.
- HO, T., VESSEY, K., CAPPAL, R., DINET, V., MASCARELLI, F., CICCOTOSTO, G. & FLETCHER, E. 2012a. Amyloid precursor protein is required for normal function of the rod and cone pathways in the mouse retina. *PloS one*, 7.
- HO, W. L., LEUNG, Y., TSANG, A. W. T., SO, K. F., CHIU, K. & CHANG, R. C. C. 2012b. Review: Tauopathy in the retina and optic nerve: does it shadow pathological changes in the brain? *Mol Vis*.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, E4376-85.
- HONG, M., ZHUKAREVA, V., VOGELSBERG-RAGAGLIA, V., WSZOLEK, Z., REED, L., MILLER, B., GESCHWIND, D., BIRD, T., MCKEEL, D., GOATE, A., MORRIS, J., WILHELMSSEN, K., SCHELLENBERG, G., TROJANOWSKI, J. & LEE, V. 1998. Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science (New York, N.Y.)*, 282.
- HOUBEN, S., LEROY, K., ANDO, K., YILMAZ, Z., WIDOMSKI, C., BUÉE, L. & BRION, J. 2019. Genetic ablation of tau in postnatal neurons rescues decreased adult hippocampal neurogenesis in a tauopathy model. *Neurobiology of disease*, 127.
- HOULDEN, H., BAKER, M., MORRIS, H., MACDONALD, N., PICKERING-BROWN, S., ADAMSON, J., LEES, A., ROSSOR, M., QUINN, N., KERTESZ, A., KHAN, M., HARDY, J., LANTOS, P., ST GEORGE-HYSLOP, P., MUNOZ, D., MANN, D.,

## Bibliographie

- LANG, A., BERGERON, C., BIGIO, E., LITVAN, I., BHATIA, K., DICKSON, D., WOOD, N. & HUTTON, M. 2001. Corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy share a common tau haplotype. *Neurology*, 56.
- HOWARD, R., MCSHANE, R., LINDESAY, J., RITCHIE, C., BALDWIN, A., BARBER, R., BURNS, A., DENING, T., FINDLAY, D., HOLMES, C., HUGHES, A., JACOBY, R., JONES, R., JONES, R., MCKEITH, I., MACHAROUTHU, A., O'BRIEN, J., PASSMORE, P., SHEEHAN, B., JUSZCZAK, E., KATONA, C., HILLS, R., KNAPP, M., BALLARD, C., BROWN, R., BANERJEE, S., ONIONS, C., GRIFFIN, M., ADAMS, J., GRAY, R., JOHNSON, T., BENTHAM, P. & PHILLIPS, P. 2012. Donepezil and memantine for moderate-to-severe Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine*, 366.
- HU, W., ZHANG, X., TUNG, Y. C., XIE, S., LIU, F. & IQBAL, K. 2016. Hyperphosphorylation determines both the spread and the morphology of tau pathology. *Alzheimers Dement*, 12, 1066-1077.
- HUGHES, K., NIKOLAKAKI, E., PLYTE, S., TOTTY, N. & WOODGETT, J. 1993. Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *The EMBO journal*, 12.
- HURTADO, D., MOLINA-PORCEL, L., IBA, M., ABOAGYE, A., PAUL, S., TROJANOWSKI, J. & LEE, V. 2010. A{beta} accelerates the spatiotemporal progression of tau pathology and augments tau amyloidosis in an Alzheimer mouse model. *The American journal of pathology*, 177.
- HUTTON, M., LENDON, C., 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., STEVENS, M., DE GRAAFF, E., WAUTERS, E., VAN BAREN, J., HILLEBRAND, M., JOOSSE, M., KWON, J., NOWOTNY, P., CHE, L., NORTON, J., MORRIS, J., REED, L., TROJANOWSKI, J., BASUN, H., LANNFELT, L., NEYSTAT, M., FAHN, S., DARK, F., TANNENBERG, T., DODD, P., HAYWARD, N., KWOK, J., SCHOFIELD, P., ANDREADIS, A., SNOWDEN, J., CRAUFURD, D., NEARY, D., OWEN, F., OOSTRA, B., HARDY, J., GOATE, A., VAN SWIETEN, J., MANN, D., LYNCH, T. & HEUTINK, P. 1998. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*, 393.
- HYE, A., KERR, F., ARCHER, N., FOY, C., POPPE, M., BROWN, R., HAMILTON, G., POWELL, J., ANDERTON, B. & LOVESTONE, S. 2005. Glycogen synthase kinase-3 is increased in white cells early in Alzheimer's disease. *Neuroscience letters*, 373.
- HYMAN, B. & GOMEZ-ISLA, T. 1994. Alzheimer's disease is a laminar, regional, and neural system specific disease, not a global brain disease. *Neurobiology of aging*, 15.
- HÉRAUD, C., GOUFAK, D., ANDO, K., LEROY, K., SUAIN, V., YILMAZ, Z., DE DECKER, R., AUTHELET, M., LAPORTE, V., OCTAVE, J. N. & BRION, J. P. 2014. Increased misfolding and truncation of tau in APP/PS1/tau transgenic mice compared to mutant tau mice. *Neurobiol Dis*, 62, 100-12.
- IBA, M., GUO, J., MCBRIDE, J., ZHANG, B., TROJANOWSKI, J. & LEE, V. 2013. Synthetic tau fibrils mediate transmission of neurofibrillary tangles in a transgenic mouse model of Alzheimer's-like tauopathy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33.
- IMAHORI, K. & UCHIDA, T. 1997. Physiology and pathology of tau protein kinases in relation to Alzheimer's disease. *J Biochem*, 121, 179-88.
- IMAI, Y., IBATA, I., ITO, D., OHSAWA, K. & KOHSAKA, S. 1996. A novel gene *ibal* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein

## Bibliographie

- expressed in a monocytic lineage. *Biochemical and biophysical research communications*, 224.
- IQBAL, K., GRUNDKE-IQBAL, I., ZAIDI, T., MERZ, P., WEN, G., SHAIKH, S., WISNIEWSKI, H., ALAFUZOFF, I. & WINBLAD, B. 1986. Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)*, 2.
- IRWIN, D., LEE, V. & TROJANOWSKI, J. 2013. Parkinson's disease dementia: convergence of  $\alpha$ -synuclein, tau and amyloid- $\beta$  pathologies. *Nature reviews. Neuroscience*, 14.
- ISEKI, E., MATSUSHITA, M., KOSAKA, K., KONDO, H., ISHII, T. & AMANO, N. 1989. Distribution and morphology of brain stem plaques in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*, 78.
- ISHIGURO, K., OMORI, A., TAKAMATSU, M., SATO, K., ARIOKA, M., UCHIDA, T. & IMAHORI, K. 1992a. Phosphorylation sites on tau by tau protein kinase I, a bovine derived kinase generating an epitope of paired helical filaments. *Neuroscience letters*, 148.
- ISHIGURO, K., SHIRATSUCHI, A., SATO, S., OMORI, A., ARIOKA, M., KOBAYASHI, S., UCHIDA, T. & IMAHORI, K. 1993. Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett*, 325, 167-72.
- ISHIGURO, K., TAKAMATSU, M., TOMIZAWA, K., OMORI, A., TAKAHASHI, M., ARIOKA, M., UCHIDA, T. & IMAHORI, K. 1992b. Tau protein kinase I converts normal tau protein into A68-like component of paired helical filaments. *The Journal of biological chemistry*, 267.
- IWATSUBO, T., ODAKA, A., SUZUKI, N., MIZUSAWA, H., NUKINA, N. & IHARA, Y. 1994. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron*, 13.
- JAYADEV, S., LEVERENZ, J., STEINBART, E., STAHL, J., KLUNK, W., YU, C. & BIRD, T. 2010. Alzheimer's disease phenotypes and genotypes associated with mutations in presenilin 2. *Brain : a journal of neurology*, 133.
- JEGANATHAN, S., VON BERGEN, M., BRUTLACH, H., STEINHOFF, H. & MANDELKOW, E. 2006. Global hairpin folding of tau in solution. *Biochemistry*, 45.
- JHO, Y., ZHULINA, E., KIM, M. & PINCUS, P. 2010. Monte carlo simulations of tau proteins: effect of phosphorylation. *Biophysical journal*, 99.
- 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. *J Neurosci Res*, 48, 128-32.
- KADAVATH, H., JAREMKO, M., JAREMKO, Ł., BIERNAT, J., MANDELKOW, E. & ZWECKSTETTER, M. 2015. Folding of the Tau Protein on Microtubules. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 54.
- KARCH, C. & GOATE, A. 2015. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biological psychiatry*, 77.
- KATSINELOS, T., ZEITLER, M., DIMOU, E., KARAKATSANI, A., MULLER, 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 Rep*, 23, 2039-2055.
- KATZ, B. & RIMMER, S. 1989. Ophthalmologic manifestations of Alzheimer's disease. *Surv Ophthalmol*, 34, 31-43.
- KECK, S., NITSCH, R., GRUNE, T. & ULLRICH, O. 2003. Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 85.

## Bibliographie

- KELLEHER, R. & SHEN, J. 2017. Presenilin-1 mutations and Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114.
- KENKHUIS, B., SOMARAKIS, A., KLEINDOUWEL, L., VAN ROON-MOM, W., HÖLLT, T. & VAN DER WEERD, L. 2022. Co-expression patterns of microglia markers Iba1, TMEM119 and P2RY12 in Alzheimer's disease. *Neurobiology of disease*, 167.
- KERCHER, L., FAVARA, C., CHAN, C., RACE, R. & CHESEBRO, B. 2004. Differences in scrapie-induced pathology of the retina and brain in transgenic mice that express hamster prion protein in neurons, astrocytes, or multiple cell types. *The American journal of pathology*, 165.
- KERCHER, L., FAVARA, C., STRIEBEL, J., LACASSE, R. & CHESEBRO, B. 2007. Prion protein expression differences in microglia and astroglia influence scrapie-induced neurodegeneration in the retina and brain of transgenic mice. *Journal of virology*, 81.
- KEREN-SHAUL, H., SPINRAD, A., WEINER, A., MATCOVITCH-NATAN, O., DVIR-SZTERNFELD, R., ULLAND, T., DAVID, E., BARUCH, K., LARA-ASTAISO, D., TOTH, B., ITZKOVITZ, S., COLONNA, M., SCHWARTZ, M. & AMIT, I. 2017. A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell*, 169.
- KFOURY, N., HOLMES, B. B., JIANG, H., HOLTZMAN, D. M. & DIAMOND, M. I. 2012. Trans-cellular propagation of Tau aggregation by fibrillar species. *J Biol Chem*, 287, 19440-51.
- KIDD, M. 1963. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature*, 197.
- KIMBERLIN, R. & WALKER, C. 1986. Pathogenesis of scrapie (strain 263K) in hamsters infected intracerebrally, intraperitoneally or intraocularly. *The Journal of general virology*, 67 ( Pt 2).
- KIMURA, T., ISHIGURO, K. & HISANAGA, S. 2014. Physiological and pathological phosphorylation of tau by Cdk5. *Frontiers in molecular neuroscience*, 7.
- KOOK, S., HONG, H., MOON, M., HA, C., CHANG, S. & MOOK-JUNG, I. 2012. A $\beta_{1-42}$ -RAGE interaction disrupts tight junctions of the blood-brain barrier via Ca<sup>2+</sup>-calcineurin signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32.
- KOOK, S., SEOK HONG, H., MOON, M. & MOOK-JUNG, I. 2013. Disruption of blood-brain barrier in Alzheimer disease pathogenesis. *Tissue barriers*, 1.
- KORONYO, Y., BIGGS, D., BARRON, E., BOYER, D., PEARLMAN, J., AU, W., KILE, S., BLANCO, A., FUCHS, D., ASHFAQ, A., FRAUTSCHY, S., COLE, G., MILLER, C., HINTON, D., VERDOONER, S., BLACK, K. & KORONYO-HAMAOU, M. 2017. Retinal amyloid pathology and proof-of-concept imaging trial in Alzheimer's disease. *JCI insight*, 2.
- KORONYO-HAMAOU, M., KORONYO, Y., LJUBIMOV, A., MILLER, C., KO, M., BLACK, K., SCHWARTZ, M. & FARKAS, D. 2011. Identification of amyloid plaques in retinas from Alzheimer's patients and noninvasive in vivo optical imaging of retinal plaques in a mouse model. *NeuroImage*, 54 Suppl 1.
- KOSIK, K., JOACHIM, C. & SELKOE, D. 1986. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83.
- KOSIK, K., ORECCHIO, L., BAKALIS, S. & NEVE, R. 1989. Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron*, 2.
- KOSIK, K., ROGERS, J. & KOWALL, N. 1987. Senile plaques are located between apical dendritic clusters. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 46.

## Bibliographie

- KOVACS, D., FAUSETT, H., PAGE, K., KIM, T., MOIR, R., MERRIAM, D., HOLLISTER, R., HALLMARK, O., MANCINI, R., FELSENSTEIN, K., HYMAN, B., TANZI, R. & WASCO, W. 1996. Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nature medicine*, 2.
- KRAUS, A., SAIJO, E., METRICK, M., NEWELL, K., SIGURDSON, C., ZANUSSO, G., GHETTI, B. & CAUGHEY, B. 2019. Seeding selectivity and ultrasensitive detection of tau aggregate conformers of Alzheimer disease. *Acta neuropathologica*, 137.
- KSIEZAK-REDING, H., BINDER, L. I. & YEN, S. H. 1990. Alzheimer disease proteins (A68) share epitopes with tau but show distinct biochemical properties. *J Neurosci Res*, 25, 420-30.
- KUCHIBHOTLA, K., WEGMANN, S., KOPEIKINA, K., HAWKES, J., RUDINSKIY, N., ANDERMANN, M., SPIRES-JONES, T., BACSKAI, B. & HYMAN, B. 2014. Neurofibrillary tangle-bearing neurons are functionally integrated in cortical circuits in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111.
- KUMAR, A., HOU, X., LEE, C., LI, Y., MAMINISHKIS, A., TANG, Z., ZHANG, F., LANGER, H., ARJUNAN, P., DONG, L., WU, Z., ZHU, L., WANG, L., MIN, W., COLOSI, P., CHAVAKIS, T. & LI, X. 2010. Platelet-derived growth factor-DD targeting arrests pathological angiogenesis by modulating glycogen synthase kinase-3beta phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 285.
- KUPFER, C., CHUMBLEY, L. & DOWNER, J. 1967. Quantitative histology of optic nerve, optic tract and lateral geniculate nucleus of man. *Journal of anatomy*, 101.
- LA MORGIA, C., ROSS-CISNEROS, F., KORONYO, Y., HANNIBAL, J., GALLASSI, R., CANTALUPO, G., SAMBATI, L., PAN, B., TOZER, K., BARBONI, P., PROVINI, F., AVANZINI, P., CARBONELLI, M., PELOSI, A., CHUI, H., LIGUORI, R., BARUZZI, A., KORONYO-HAMAOU, M., SADUN, A. & CARELLI, V. 2016. Melanopsin retinal ganglion cell loss in Alzheimer disease. *Annals of neurology*, 79.
- LADOGANA, A., PUOPOLO, M., CROES, E., BUDKA, H., JARIUS, C., COLLINS, S., KLUG, G., SUTCLIFFE, T., GIULIVI, A., ALPEROVITCH, A., DELASNERIE-LAUPRETRE, N., BRANDEL, J., POSER, S., KRETZSCHMAR, H., RIETVELD, I., MITROVA, E., CUESTA JDE, P., MARTINEZ-MARTIN, P., GLATZEL, M., AGUZZI, A., KNIGHT, R., WARD, H., POCCHIARI, M., VAN DUIJN, C., WILL, R. & ZERR, I. 2005. Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia, and Canada. *Neurology*, 64.
- LAMBERT, Z., GREENLEE, J., CASSMANN, E. & WEST GREENLEE, M. 2021. Differential Accumulation of Misfolded Prion Strains in Natural Hosts of Prion Diseases. *Viruses*, 13.
- LE GUENNEC, K., QUENEZ, O., NICOLAS, G., WALLON, D., ROUSSEAU, S., RICHARD, A., ALEXANDER, J., PASCHOU, P., CHARBONNIER, C., BELLENGUEZ, C., GRENIER-BOLEY, B., LECHNER, D., BIHOREAU, M., OLASO, R., BOLAND, A., MEYER, V., DELEUZE, J., AMOUYEL, P., MUNTER, H., BOURQUE, G., LATHROP, M., FREBOURG, T., REDON, R., LETENNEUR, L., DARTIGUES, J., MARTINAUD, O., KALEV, O., MEHRABIAN, S., TRAYKOV, L., STRÖBEL, T., LE BER, I., CAROPPO, P., EPELBAUM, S., JONVEAUX, T., PASQUIER, F., ROLLIN-SILLAIRE, A., GÉNIN, E., GUYANT-MARÉCHAL, L., KOVACS, G., LAMBERT, J., HANNEQUIN, D., CAMPION, D. & ROVELET-LECRUX, A. 2017. 17q21.31 duplication causes prominent tau-related dementia with increased MAPT expression. *Molecular psychiatry*, 22.

## Bibliographie

- LEE, J., LEE, Y., YUK, D., CHOI, D., BAN, S., OH, K. & HONG, J. 2008. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. *Journal of neuroinflammation*, 5.
- LEE, V., BALIN, B., OTVOS, L. & TROJANOWSKI, J. 1991. A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science (New York, N.Y.)*, 251.
- LEGER, F., FERNAGUT, P., CANRON, M., LÉONI, S., VITAL, C., TISON, F., BEZARD, E. & VITAL, A. 2011. Protein aggregation in the aging retina. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 70.
- LEROY, K., BRETTEVILLE, A., SCHINDOWSKI, K., GILISSEN, E., AUTHELET, M., DE DECKER, R., YILMAZ, Z., BUÉE, L. & BRION, J. P. 2007a. Early axonopathy preceding neurofibrillary tangles in mutant tau transgenic mice. *Am J Pathol*, 171, 976-92.
- LEROY, K., YILMAZ, Z. & BRION, J. P. 2007b. Increased level of active GSK-3beta in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 33, 43-55.
- LEUBA, G. & SAINI, K. 1995. Pathology of subcortical visual centres in relation to cortical degeneration in Alzheimer's disease. *Neuropathology and applied neurobiology*, 21.
- LEUNG, C., LINDSEY, J., CROWSTON, J., JU, W., LIU, Q., BARTSCH, D. & WEINREB, R. 2008. In vivo imaging of murine retinal ganglion cells. *Journal of neuroscience methods*, 168.
- LEVKOVITCH-VERBIN, H. 2004. Animal models of optic nerve diseases. *Eye (London, England)*, 18.
- LEVY-LAHAD, E., POORKAJ, P., WANG, K., FU, Y., OSHIMA, J., MULLIGAN, J. & SCHELLENBERG, G. 1996. Genomic structure and expression of STM2, the chromosome 1 familial Alzheimer disease gene. *Genomics*, 34.
- LEWIS, J., DICKSON, D., LIN, W., CHISHOLM, L., CORRAL, A., JONES, G., YEN, S., SAHARA, N., SKIPPER, L., YAGER, D., ECKMAN, C., HARDY, J., HUTTON, M. & MCGOWAN, E. 2001. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science (New York, N.Y.)*, 293.
- LI, L., SHI, R., GU, J., TUNG, Y., ZHOU, Y., ZHOU, D., WU, R., CHU, D., JIN, N., DENG, K., XU, J., GONG, C., IQBAL, K. & LIU, F. 2021. Alzheimer's disease brain contains tau fractions with differential prion-like activities. *Acta neuropathologica communications*, 9.
- LI, S., SHI, S., LUO, B., XIA, F., HA, Y., MERKLEY, K., MOTAMEDI, M., ZHANG, W. & LIU, H. 2022. Tauopathy induces degeneration and impairs regeneration of sensory nerves in the cornea. *Experimental eye research*, 215.
- LI, T., HAWKES, C., QURESHI, H. Y., KAR, S. & PAUDEL, H. K. 2006. Cyclin-dependent protein kinase 5 primes microtubule-associated protein tau site-specifically for glycogen synthase kinase 3beta. *Biochemistry*, 45, 3134-45.
- LI, T. & PAUDEL, H. 2006. Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates Alzheimer's disease-specific Ser396 of microtubule-associated protein tau by a sequential mechanism. *Biochemistry*, 45.
- LI, X., KUMAR, Y., ZEMPEL, H., MANDELKOW, E., BIERNAT, J. & MANDELKOW, E. 2011. Novel diffusion barrier for axonal retention of Tau in neurons and its failure in neurodegeneration. *The EMBO journal*, 30.
- LIDDELOW, S., GUTTENPLAN, K., CLARKE, L., BENNETT, F., BOHLEN, C., SCHIRMER, L., BENNETT, M., MÜNCH, A., CHUNG, W., PETERSON, T., WILTON, D., FROUIN, A., NAPIER, B., PANICKER, N., KUMAR, M., BUCKWALTER, M., ROWITCH, D., DAWSON, V., DAWSON, T., STEVENS, B. &

## Bibliographie

- BARRES, B. 2017. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541.
- LIEVEN, C., MILLET, L., HOEGGER, M. & LEVIN, L. 2007. Induction of axon and dendrite formation during early RGC-5 cell differentiation. *Experimental eye research*, 85.
- LIM, J., LI, Q., HE, Z., VINGRYS, A., CHINNERY, H., MULLEN, J., BUI, B. & NGUYEN, C. 2020. Retinal Functional and Structural Changes in the 5xFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Frontiers in neuroscience*, 14.
- LIN, S., HSU, W., LIN, C., LIN, C., YEH, H. & KAO, C. 2019. Association of Transfusion With Risks of Dementia or Alzheimer's Disease: A Population-Based Cohort Study. *Frontiers in psychiatry*, 10.
- LIU, B., RASOOL, S., YANG, Z., GLABE, C., SCHREIBER, S., GE, J. & TAN, Z. 2009. Amyloid-peptide vaccinations reduce  $\beta$ -amyloid plaques but exacerbate vascular deposition and inflammation in the retina of Alzheimer's transgenic mice. *The American journal of pathology*, 175.
- LIU, C., LIU, C., KANEKIYO, T., XU, H. & BU, G. 2013. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nature reviews. Neurology*, 9.
- LLEWELYN, C., HEWITT, P., KNIGHT, R., AMAR, K., COUSENS, S., MACKENZIE, J. & WILL, R. 2004. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet (London, England)*, 363.
- LOBANOVA, E., FINKELSTEIN, S., LI, J., TRAVIS, A., HAO, Y., KLINGEBORN, M., SKIBA, N., DESHAIES, R. & ARSHAVSKY, V. 2018. Increased proteasomal activity supports photoreceptor survival in inherited retinal degeneration. *Nature communications*, 9.
- LUE, L., PAI, M., CHEN, T., HU, C., HUANG, L., LIN, W., WU, C., JENG, J., BLENNOW, K., SABBAGH, M., YAN, S., WANG, P., YANG, S., HATSUTA, H., MORIMOTO, S., TAKEDA, A., ITOH, Y., LIU, J., XIE, H. & CHIU, M. 2019. Age-Dependent Relationship Between Plasma A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 and Total Tau Levels in Cognitively Normal Subjects. *Frontiers in aging neuroscience*, 11.
- LUNA-MUÑOZ, J., HARRINGTON, C. R., WISCHIK, C. M., FLORES-RODRÍGUEZ, P., AVILA, J. S., ZAMUDIO, S. R., CRUZ, F. D. L., MENA, R. L., MERAZ-RÍOS, M. A. & FLORAN-GARDUÑO, B. 2013. Phosphorylation of Tau Protein Associated as a Protective Mechanism in the Presence of Toxic, C-Terminally Truncated Tau in Alzheimer's Disease.
- LÖFFLER, K., EDWARD, D. & TSO, M. 1995. Immunoreactivity against tau, amyloid precursor protein, and beta-amyloid in the human retina. *Investigative ophthalmology & visual science*, 36.
- MADEIRA, M., BOIA, R., SANTOS, P., AMBRÓSIO, A. & SANTIAGO, A. 2015. Contribution of microglia-mediated neuroinflammation to retinal degenerative diseases. *Mediators of inflammation*, 2015.
- MAGNANI, E., FAN, J., GASPARINI, L., GOLDING, M., WILLIAMS, M., SCHIAVO, G., GOEDERT, M., AMOS, L. & SPILLANTINI, M. 2007. Interaction of tau protein with the dynactin complex. *The EMBO journal*, 26.
- MANN, D., BROWN, A., WILKS, D. & DAVIES, C. 1989. Immunocytochemical and lectin histochemical studies of plaques and tangles in Down's syndrome patients at different ages. *Progress in clinical and biological research*, 317.
- MAPHIS, N., XU, G., KOKIKO-COCHRAN, O., CARDONA, A., RANSOHOFF, R., LAMB, B. & BHASKAR, K. 2015. Loss of tau rescues inflammation-mediated neurodegeneration. *Frontiers in neuroscience*, 9.
- MARTIN, L., LATYPOVA, X. & TERRO, F. 2011. Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochemistry international*, 58.

- MCGEER, P. & MCGEER, E. 2007. NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiology of aging*, 28.
- MCKHANN, G., DRACHMAN, D., FOLSTEIN, M., KATZMAN, R., PRICE, D. & STADLAN, E. 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, 34.
- MEDA, L., CASSATELLA, M., SZENDREI, G., OTVOS, L., BARON, P., VILLALBA, M., FERRARI, D. & ROSSI, F. 1995. Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature*, 374.
- MEHTA, J. S. & FRANKS, W. A. 2002. The sclera, the prion, and the ophthalmologist. *Br J Ophthalmol*.
- METAXAS, A., THYGESEN, C., KEMPF, S., ANZALONE, M., VAITHEESWARAN, R., PETERSEN, S., LANDAU, A., AUDRAIN, H., TEELING, J., DARVESH, S., BROOKS, D., LARSEN, M. & FINSEN, B. 2019. Ageing and amyloidosis underlie the molecular and pathological alterations of tau in a mouse model of familial Alzheimer's disease. *Scientific reports*, 9.
- METRICK, M., FERREIRA, N., SAIJO, E., KRAUS, A., NEWELL, K., ZANUSSO, G., VENDRUSCOLO, M., GHETTI, B. & CAUGHEY, B. 2020. A single ultrasensitive assay for detection and discrimination of tau aggregates of Alzheimer and Pick diseases. *Acta neuropathologica communications*, 8.
- MEYER, V., DINKEL, P., RICKMAN HAGER, E. & MARGITTAI, M. 2014. Amplification of Tau fibrils from minute quantities of seeds. *Biochemistry*, 53.
- MILDENBERGER, W., STIFTER, S. & GRETER, M. 2022. Diversity and function of brain-associated macrophages. *Current opinion in immunology*, 76.
- MIRRA, S., MURRELL, J., GEARING, M., SPILLANTINI, M., GOEDERT, M., CROWTHER, R., LEVEY, A., JONES, R., GREEN, J., SHOFFNER, J., WAINER, B., SCHMIDT, M., TROJANOWSKI, J. & GHETTI, B. 1999. Tau pathology in a family with dementia and a P301L mutation in tau. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 58.
- MITTER, S., RAO, H., QI, X., CAI, J., SUGRUE, A., DUNN, W., GRANT, M. & BOULTON, M. 2012. Autophagy in the retina: a potential role in age-related macular degeneration. *Advances in experimental medicine and biology*, 723.
- MOLESWORTH, A., MACKENZIE, J., EVERINGTON, D., KNIGHT, R. & WILL, R. 2011. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and risk of blood transfusion in the United Kingdom. *Transfusion*, 51.
- MOLONEY, C., LOWE, V. & MURRAY, M. 2021. Visualization of neurofibrillary tangle maturity in Alzheimer's disease: A clinicopathologic perspective for biomarker research. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 17.
- MONTAGNE, A., BARNES, S. R., SWEENEY, M. D., HALLIDAY, M. R., SAGARE, A. P., ZHAO, Z., TOGA, A. W., JACOBS, R. E., LIU, C. Y., AMEZCUA, L., HARRINGTON, M. G., CHUI, H. C., LAW, M. & ZLOKOVIC, B. V. 2015. Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron*, 85, 296-302.
- MORALES, I., GUZMÁN-MARTÍNEZ, L., CERDA-TRONCOSO, C., FARÍAS, G. & MACCIONI, R. 2014. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8.
- MORRIS, J. 2005. Early-stage and preclinical Alzheimer disease. *Alzheimer disease and associated disorders*, 19.
- MORSCH, R., SIMON, W. & COLEMAN, P. 1999. Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 58.

## Bibliographie

- MOSCOSO, A., GROTHE, M., ASHTON, N., KARIKARI, T., RODRIGUEZ, J., SNELLMAN, A., SUÁREZ-CALVET, M., ZETTERBERG, H., BLENNOW, K. & SCHÖLL, M. 2021. Time course of phosphorylated-tau181 in blood across the Alzheimer's disease spectrum. *Brain : a journal of neurology*, 144.
- MUDHER, A., COLIN, M., DUJARDIN, S., MEDINA, M., DEWACHTER, I., ALAVI NAINI, S. M., MANDELKOW, E. M., MANDELKOW, E., BUEE, L., GOEDERT, M. & BRION, J. P. 2017. What is the evidence that tau pathology spreads through prion-like propagation? *Acta Neuropathol Commun*, 5, 99.
- MULLAN, M., CRAWFORD, F., AXELMAN, K., HOULDEN, H., LILIUS, L., WINBLAD, B. & LANNFELT, L. 1992. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nature genetics*, 1.
- MUNOZ, D. & WANG, D. 1992. Tangle-associated neuritic clusters. A new lesion in Alzheimer's disease and aging suggests that aggregates of dystrophic neurites are not necessarily associated with beta/A4. *The American journal of pathology*, 140.
- NACHARAJU, P., LEWIS, J., EASSON, C., YEN, S., HACKETT, J., HUTTON, M. & YEN, S. 1999. Accelerated filament formation from tau protein with specific FTDP-17 missense mutations. *FEBS letters*, 447.
- NAGELE, R., D'ANDREA, M., LEE, H., VENKATARAMAN, V. & WANG, H. 2003. Astrocytes accumulate A beta 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain research*, 971.
- NARASIMHAN, S., GUO, J., CHANGOLKAR, L., STIEBER, A., MCBRIDE, J., SILVA, L., HE, Z., ZHANG, B., GATHAGAN, R., TROJANOWSKI, J. & LEE, V. 2017. Pathological Tau Strains from Human Brains Recapitulate the Diversity of Tauopathies in Nontransgenic Mouse Brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 37.
- NEVE, R., HARRIS, P., KOSIK, K., KURNIT, D. & DONLON, T. 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.
- NING, A., CUI, J., TO, E., ASHE, K. & MATSUBARA, J. 2008. Amyloid-beta deposits lead to retinal degeneration in a mouse model of Alzheimer disease. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49.
- O'MEARA, E., KUKULL, W., SCHELLENBERG, G., BOWEN, J., MCCORMICK, W., TERI, L., PFANSCHMIDT, M., THOMPSON, J. & LARSON, E. 1997. Alzheimer's disease and history of blood transfusion by apolipoprotein-E genotype. *Neuroepidemiology*, 16.
- OAKLEY, H., COLE, S., LOGAN, S., MAUS, E., SHAO, P., CRAFT, J., GUILLOZET-BONGAARTS, A., OHNO, M., DISTERHOFT, J., VAN ELDIK, L., BERRY, R. & VASSAR, R. 2006. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26.
- ODDO, S. 2008. The ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *Journal of cellular and molecular medicine*, 12.
- ODDO, S., CACCAMO, A., SHEPHERD, J., MURPHY, M., GOLDE, T., KAYED, R., METHERATE, R., MATTSON, M., AKBARI, Y. & LAFERLA, F. 2003. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39.
- ORRÙ, C., SOLDAU, K., CORDANO, C., LLIBRE-GUERRA, J., GREEN, A., SANCHEZ, H., GROVEMAN, B., EDLAND, S., SAFAR, J., LIN, J., CAUGHEY, B.,

## Bibliographie

- GESCHWIND, M. & SIGURDSON, C. 2018. Prion Seeds Distribute throughout the Eyes of Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease Patients. *mBio*, 9.
- PALMER, M., DRYDEN, A., HUGHES, J. & COLLINGE, J. 1991. Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature*, 352.
- PAN, K., BALDWIN, M., NGUYEN, J., GASSET, M., SERBAN, A., GROTH, D., MEHLHORN, I., HUANG, Z., FLETTERICK, R. & COHEN, F. 1993. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90.
- PAOLICELLI, R., SIERRA, A., STEVENS, B., TREMBLAY, M., AGUZZI, A., AJAMI, B., AMIT, I., AUDINAT, E., BECHMANN, I., BENNETT, M., BENNETT, F., BESSIS, A., BIBER, K., BILBO, S., BLURTON-JONES, M., BODDEKE, E., BRITES, D., BRÔNE, B., BROWN, G., BUTOVSKY, O., CARSON, M., CASTELLANO, B., COLONNA, M., COWLEY, S., CUNNINGHAM, C., DAVALOS, D., DE JAGER, P., DE STROOPER, B., DENES, A., EGGEN, B., EYO, U., GALEA, E., GAREL, S., GINHOUX, F., GLASS, C., GOKCE, O., GOMEZ-NICOLA, D., GONZÁLEZ, B., GORDON, S., GRAEBER, M., GREENHALGH, A., GRESSENS, P., GRETER, M., GUTMANN, D., HAASS, C., HENEKA, M., HEPPNER, F., HONG, S., HUME, D., JUNG, S., KETTENMANN, H., KIPNIS, J., KOYAMA, R., LEMKE, G., LYNCH, M., MAJEWSKA, A., MALCANGIO, M., MALM, T., MANCUSO, R., MASUDA, T., MATTEOLI, M., MCCOLL, B., MIRON, V., MOLOFSKY, A., MONJE, M., MRACSKO, E., NADJAR, A., NEHER, J., NENISKYTE, U., NEUMANN, H., NODA, M., PENG, B., PERI, F., PERRY, V., POPOVICH, P., PRIDANS, C., PRILLER, J., PRINZ, M., RAGOZZINO, D., RANSOHOFF, R., SALTER, M., SCHAEFER, A., SCHAFER, D., SCHWARTZ, M., SIMONS, M., SMITH, C., STREIT, W., TAY, T., TSAI, L., VERKHRATSKY, A., VON BERNHARDI, R., WAKE, H., WITTAMER, V., WOLF, S., WU, L. & WYSS-CORAY, T. 2022. Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron*, 110.
- PARCHI, P., DE BONI, L., SAVERIONI, D., COHEN, M., FERRER, I., GAMBETTI, P., GELPI, E., GIACCONE, G., HAUW, J., HÖFTBERGER, R., IRONSIDE, J., JANSEN, C., KOVACS, G., ROZEMULLER, A., SEILHEAN, D., TAGLIAVINI, F., GIESE, A. & KRETZSCHMAR, H. 2012. Consensus classification of human prion disease histotypes allows reliable identification of molecular subtypes: an inter-rater study among surveillance centres in Europe and USA. *Acta neuropathologica*, 124.
- PARNELL, M., GUO, L., ABDI, M. & CORDEIRO, M. 2012. Ocular manifestations of Alzheimer's disease in animal models. *International journal of Alzheimer's disease*, 2012.
- PATRICK, G., ZHOU, P., KWON, Y., HOWLEY, P. & TSAI, L. 1998. p35, the neuronal-specific activator of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *The Journal of biological chemistry*, 273.
- PATRICK, G., ZUKERBERG, L., NIKOLIC, M., DE LA MONTE, S., DIKKES, P. & TSAI, L. 1999. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature*, 402.
- PEREA, J., BOLÓS, M. & AVILA, J. 2020. Microglia in Alzheimer's Disease in the Context of Tau Pathology. *Biomolecules*, 10.
- PEREZ, S., LUMAYAG, S., KOVACS, B., MUFSON, E. & XU, S. 2009. Beta-amyloid deposition and functional impairment in the retina of the APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>DeltaE9</sup> transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50.

## Bibliographie

- PERRY, G., FRIEDMAN, R., SHAW, G. & CHAU, V. 1987. Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84.
- PERRY, G., KAWAI, M., TABATON, M., ONORATO, M., MULVIHILL, P., RICHEY, P., MORANDI, A., CONNOLLY, J. & GAMBETTI, P. 1991. Neuropil threads of Alzheimer's disease show a marked alteration of the normal cytoskeleton. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 11.
- PERRY, V. & COWEY, A. 1984. Retinal ganglion cells that project to the superior colliculus and pretectum in the macaque monkey. *Neuroscience*, 12.
- PINI, L., PIEVANI, M., BOCCHETTA, M., ALTOMARE, D., BOSCO, P., CAVEDO, E., GALLUZZI, S., MARIZZONI, M. & FRISONI, G. 2016. Brain atrophy in Alzheimer's Disease and aging. *Ageing research reviews*, 30.
- PLANEL, E., RICHTER, K., NOLAN, C., FINLEY, J., LIU, L., WEN, Y., KRISHNAMURTHY, P., HERMAN, M., WANG, L., SCHACHTER, J., NELSON, R., LAU, L. & DUFF, K. 2007. Anesthesia leads to tau hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27.
- POIRIER, J., DAVIGNON, J., BOUTHILLIER, D., KOGAN, S., BERTRAND, P. & GAUTHIER, S. 1993. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)*, 342.
- POOLER, A., POLYDORO, M., MAURY, E., NICHOLLS, S., REDDY, S., WEGMANN, S., WILLIAM, C., SAQRAN, L., CAGSAL-GETKIN, O., PITSTICK, R., BEIER, D., CARLSON, G., SPIRES-JONES, T. & HYMAN, B. 2015. Amyloid accelerates tau propagation and toxicity in a model of early Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica communications*, 3.
- POORKAJ, P., KAS, A., D'SOUZA, I., ZHOU, Y., PHAM, Q., STONE, M., OLSON, M. & SCHELLENBERG, G. 2001. A genomic sequence analysis of the mouse and human microtubule-associated protein tau. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*, 12.
- PRINCE, M. J., WIMO, A., GUERCHET, M. M., ALI, G. C., WU, Y. T. & PRINA, M. 2015. **World alzheimer report 2015 - the global impact of dementia: an analysis of prevalence, incidence, cost and trends.**
- PRINZ, M., HEIKENWALDER, M., JUNGT, T., SCHWARZ, P., GLATZEL, M., HEPPNER, F., FU, Y., LIPP, M. & AGUZZI, A. 2003. Positioning of follicular dendritic cells within the spleen controls prion neuroinvasion. *Nature*, 425.
- PROBST, A., BASLER, V., BRON, B. & ULRICH, J. 1983. Neuritic plaques in senile dementia of Alzheimer type: a Golgi analysis in the hippocampal region. *Brain research*, 268.
- PRUSINER, S. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science (New York, N.Y.)*, 216.
- PRUSINER, S., SCOTT, M., FOSTER, D., PAN, K., GROTH, D., MIRENDA, C., TORCHIA, M., YANG, S., SERBAN, D. & CARLSON, G. 1990. Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*, 63.
- PUIG, B., ALTMEPPEN, H. & GLATZEL, M. 2014. The GPI-anchoring of PrP: implications in sorting and pathogenesis. *Prion*, 8.
- PUOPOLO, M., LADOGANA, A., VETRUGNO, V. & POCCHIARI, M. 2011. Transmission of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion: risk factor or possible biases. *Transfusion*, 51.

## Bibliographie

- PÉREZLEÓN, J., OSORIO-PAZ, I., FRANCOIS, L. & SALCEDA, R. 2013. Immunohistochemical localization of glycogen synthase and GSK3 $\beta$ : control of glycogen content in retina. *Neurochemical research*, 38.
- QIAN, W., SHI, J., YIN, X., IQBAL, K., GRUNDKE-IQBAL, I., GONG, C. & LIU, F. 2010. PP2A regulates tau phosphorylation directly and also indirectly via activating GSK-3 $\beta$ . *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 19.
- RANSOHOFF, R. 2016. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nature neuroscience*, 19.
- RAYMOND, I., VILA, A., HUYNH, U. & BRECHA, N. 2008. Cyan fluorescent protein expression in ganglion and amacrine cells in a thy1-CFP transgenic mouse retina. *Molecular vision*, 14.
- REISBERG, B., DOODY, R., STÖFFLER, A., SCHMITT, F., FERRIS, S. & MÖBIUS, H. 2003. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine*, 348.
- RIES, M. & SASTRE, M. 2016. Mechanisms of A $\beta$  Clearance and Degradation by Glial Cells. *Frontiers in aging neuroscience*, 8.
- RISTORI, E., DONNINI, S. & ZICHE, M. 2020. New Insights Into Blood-Brain Barrier Maintenance: The Homeostatic Role of  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein in Cerebral Vasculature. *Frontiers in physiology*, 11.
- RIZZU, P., JOOSSE, M., RAVID, R., HOOGEVEEN, A., KAMPHORST, W., VAN SWIETEN, J., WILLEMSSEN, R. & HEUTINK, P. 2000. Mutation-dependent aggregation of tau protein and its selective depletion from the soluble fraction in brain of P301L FTDP-17 patients. *Human molecular genetics*, 9.
- RODRIGUEZ, L., JOLY, S., ZINE-EDDINE, F., MDZOMBA, J. & PERNET, V. 2020. Tau modulates visual plasticity in adult and old mice. *Neurobiology of aging*, 95.
- RODRIGUEZ, L., MDZOMBA, J. B., JOLY, S., BOUDREAU-LAPRISE, M., PLANEL, E. & PERNET, V. 2018. Human Tau Expression Does Not Induce Mouse Retina Neurodegeneration, Suggesting Differential Toxicity of Tau in Brain vs. Retinal Neurons. *Front Mol Neurosci*, 11.
- ROGAEV, E., SHERRINGTON, R., WU, C., LEVESQUE, G., LIANG, Y., ROGAEVA, E., IKEDA, M., HOLMAN, K., LIN, C., LUKIW, W., DE JONG, P., FRASER, P., ROMMENS, J. & ST GEORGE-HYSLOP, P. 1997. Analysis of the 5' sequence, genomic structure, and alternative splicing of the presenilin-1 gene (PSEN1) associated with early onset Alzheimer disease. *Genomics*, 40.
- ROMAUS-SANJURJO, D., REGUEIRO, U., LÓPEZ-LÓPEZ, M., VÁZQUEZ-VÁZQUEZ, L., OURO, A., LEMA, I. & SOBRINO, T. 2022. Alzheimer's Disease Seen through the Eye: Ocular Alterations and Neurodegeneration. *International journal of molecular sciences*, 23.
- ROSENBERG, G. 2014. Blood-Brain Barrier Permeability in Aging and Alzheimer's Disease. *J Prev Alzheimers Dis*, 1, 138-9.
- ROSENMANN, H., GRIGORIADIS, N., KARUSSIS, D., BOIMEL, M., TOULOUMI, O., OVADIA, H. & ABRAMSKY, O. 2006. Tauopathy-like abnormalities and neurologic deficits in mice immunized with neuronal tau protein. *Archives of neurology*, 63.
- ROZENSTEIN-TSALKOVICH, L., GRIGORIADIS, N., LOURBOPOULOS, A., NOUSIOPOULOU, E., KASSIS, I., ABRAMSKY, O., KARUSSIS, D. & ROSENMANN, H. 2013. Repeated immunization of mice with phosphorylated-tau peptides causes neuroinflammation. *Experimental neurology*, 248.
- S-JUAN, P., WARD, H., DE SILVA, R., KNIGHT, R. & WILL, R. 2004. Ophthalmic surgery and Creutzfeldt-Jakob disease. *The British journal of ophthalmology*, 88.

## Bibliographie

- SABORIO, G., PERMANNE, B. & SOTO, C. 2001. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*, 411.
- SAHABOGLU, A., MIRANDA, M., CANJUGA, D., AVCI-ADALI, M., SAVYTSKA, N., SECER, E., FERIA-PLIEGO, J., KAYIK, G. & DURDAGI, S. 2020. Drug repurposing studies of PARP inhibitors as a new therapy for inherited retinal degeneration. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 77.
- SAIJO, E., GHETTI, B., ZANUSSO, G., OBLAK, A., FURMAN, J., DIAMOND, M., 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.
- SAIJO, E., METRICK, M., KOGA, S., PARCHI, P., LITVAN, I., SPINA, S., BOXER, A., ROJAS, J., GALASKO, D., KRAUS, A., ROSSI, M., NEWELL, K., ZANUSSO, G., GRINBERG, L., SEELEY, W., GHETTI, B., DICKSON, D. & CAUGHEY, B. 2020. 4-Repeat tau seeds and templating subtypes as brain and CSF biomarkers of frontotemporal lobar degeneration. *Acta neuropathologica*, 139.
- SAITO, T., MIHIRA, N., MATSUBA, Y., SASAGURI, H., HASHIMOTO, S., NARASIMHAN, S., ZHANG, B., MURAYAMA, S., HIGUCHI, M., LEE, V. M. Y., TROJANOWSKI, J. Q. & SAIDO, T. C. 2019. Humanization of the entire murine. *J Biol Chem*, 294, 12754-12765.
- SALOBRAR-GARCÍA, E., RAMÍREZ, A. I., HOZ, R. D., ROJAS, P., SALAZAR, J., ROJAS, B., YUBERO, R., GIL, P. & RAMÍREZ, A. T. J. M. 2016. The Impact of the Eye in Dementia: The Eye and its Role in Diagnosis and Follow-up.
- 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, 1271-1288.
- SASTRE, M., DEWACHTER, I., LANDRETH, G., WILLSON, T., KLOCKGETHER, T., VAN LEUVEN, F. & HENEKA, M. 2003. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists modulate immunostimulated processing of amyloid precursor protein through regulation of beta-secretase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23.
- SAUNDERS, A., STRITTMATTER, W., SCHMECHEL, D., GEORGE-HYSLOP, P., PERICAK-VANCE, M., JOO, S., ROSI, B., GUSELLA, J., CRAPPER-MACLACHLAN, D. & ALBERTS, M. 1993. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*, 43.
- SCHECKEL, C. & AGUZZI, A. 2018. Prions, prionoids and protein misfolding disorders. *Nature reviews. Genetics*, 19.
- SCHINDOWSKI, K., BRETTEVILLE, A., LEROY, K., BÉGAR, S., BRION, J. P., HAMDANE, M. & BUÉE, L. 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.
- SCHÖN, C., HOFFMANN, N. A., OCHS, S. M., BURGOLD, S., FILSER, S., STEINBACH, S., SEELIGER, M. W., ARZBERGER, T., GOEDERT, M., KRETZSCHMAR, H. A., SCHMIDT, B. & HERMS, J. 2012. Long-Term In Vivo Imaging of Fibrillar Tau in the Retina of P301S Transgenic Mice. *PLoS One*.
- SENGILLO, J., WINKLER, E., WALKER, C., SULLIVAN, J., JOHNSON, M. & ZLOKOVIC, B. 2013. Deficiency in mural vascular cells coincides with blood-brain barrier disruption in Alzheimer's disease. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 23.

## Bibliographie

- SENGUPTA, A., WU, Q., GRUNDKE-IQBAL, I., IQBAL, K. & SINGH, T. 1997. Potentiation of GSK-3-catalyzed Alzheimer-like phosphorylation of human tau by cdk5. *Molecular and cellular biochemistry*, 167.
- SERRANO-POZO, A., DAS, S. & HYMAN, B. 2021. APOE and Alzheimer's disease: advances in genetics, pathophysiology, and therapeutic approaches. *The Lancet. Neurology*, 20.
- SHERRINGTON, R., FROELICH, S., SORBI, S., CAMPION, D., CHI, H., ROGAEVA, E., LEVESQUE, G., ROGAEV, E., LIN, C., LIANG, Y., IKEDA, M., MAR, L., BRICE, A., AGID, Y., PERCY, M., CLERGET-DARPOUX, F., PIACENTINI, S., MARCON, G., NACMIAS, B., AMADUCCI, L., FREBOURG, T., LANNFELT, L., ROMMENS, J. & ST GEORGE-HYSLOP, P. 1996. Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant. *Human molecular genetics*, 5.
- SHI, Y., YAMADA, K., LIDDELOW, S., SMITH, S., ZHAO, L., LUO, W., TSAI, R., SPINA, S., GRINBERG, L., ROJAS, J., GALLARDO, G., WANG, K., ROH, J., ROBINSON, G., FINN, M., JIANG, H., SULLIVAN, P., BAUFELD, C., WOOD, M., SUTPHEN, C., MCCUE, L., XIONG, C., DEL-AGUILA, J., MORRIS, J., CRUCHAGA, C., FAGAN, A., MILLER, B., BOXER, A., SEELEY, W., BUTOVSKY, O., BARRES, B., PAUL, S. & HOLTZMAN, D. 2017. ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. *Nature*, 549.
- SKEIE, J., TSANG, S. & MAHAJAN, V. 2011. Evisceration of mouse vitreous and retina for proteomic analyses. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- SOFRONIEW, M. V. & VINTERS, H. V. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 119, 7-35.
- SONTAG, J. & SONTAG, E. 2014. Protein phosphatase 2A dysfunction in Alzheimer's disease. *Frontiers in molecular neuroscience*, 7.
- SPANGENBERG, E., SEVERSON, P., HOHSFIELD, L., CRAPSER, J., ZHANG, J., BURTON, E., ZHANG, Y., SPEVAK, W., LIN, J., PHAN, N., HABETS, G., RYMAR, A., TSANG, G., WALTERS, J., NESPI, M., SINGH, P., BROOME, S., IBRAHIM, P., ZHANG, C., BOLLAG, G., WEST, B. & GREEN, K. 2019. Sustained microglial depletion with CSF1R inhibitor impairs parenchymal plaque development in an Alzheimer's disease model. *Nature communications*, 10.
- SPERLING, R., MORMINO, E. & JOHNSON, K. 2014. The evolution of preclinical Alzheimer's disease: implications for prevention trials. *Neuron*, 84.
- SPILLANTINI, M., GOEDERT, M., CROWTHER, R., MURRELL, J., FARLOW, M. & GHETTI, B. 1997. Familial multiple system tauopathy with presenile dementia: a disease with abundant neuronal and glial tau filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94.
- SPIRES-JONES, T. L., ATTEMS, J. & THAL, D. R. 2017. Interactions of pathological proteins in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol*, 134, 187-205.
- STRANG, K., GOLDE, T. & GIASSON, B. 2019. MAPT mutations, tauopathy, and mechanisms of neurodegeneration. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 99.
- STRITTMATTER, W., SAUNDERS, A., SCHMECHEL, D., PERICAK-VANCE, M., ENGHILD, J., SALVESEN, G. & ROSES, A. 1993. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90.
- SU, J., CUMMINGS, B. & COTMAN, C. 1993. Identification and distribution of axonal dystrophic neurites in Alzheimer's disease. *Brain research*, 625.

## Bibliographie

- SUZUKI, T., NISHIYAMA, K., MURAYAMA, S., YAMAMOTO, A., SATO, S., KANAZAWA, I. & SAKAKI, Y. 1996. Regional and cellular presenilin 1 gene expression in human and rat tissues. *Biochemical and biophysical research communications*, 219.
- 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. *Nat Commun*, 6, 8490.
- TAPIA-ROJAS, C., CABEZAS-OPAZO, F., DEATON, C., VERGARA, E., JOHNSON, G. & QUINTANILLA, R. 2019. It's all about tau. *Progress in neurobiology*, 175.
- TARASOFF-CONWAY, J., CARARE, R., OSORIO, R., GLODZIK, L., BUTLER, T., FIEREMANS, E., AXEL, L., RUSINEK, H., NICHOLSON, C., ZLOKOVIC, B., FRANGIONE, B., BLENNOW, K., MÉNARD, J., ZETTERBERG, H., WISNIEWSKI, T. & DE LEON, M. 2015. Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nature reviews. Neurology*, 11.
- TATEBE, H., KASAI, T., OHMACHI, 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.
- TENNANT, J., HENDERSON, D., WISNIEWSKI, T. & HOOVER, E. 2020. RT-QuIC detection of tauopathies using full-length tau substrates. *Prion*, 14.
- TERWEL, D., MUYLLAERT, D., DEWACHTER, I., BORGHGRAEF, P., CROES, S., DEVIJVER, H. & VAN LEUVEN, F. 2008. Amyloid activates GSK-3beta to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice. *Am J Pathol*, 172, 786-98.
- THAL, D., 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.
- THIJSSSEN, E., LA JOIE, R., STROM, A., FONSECA, C., IACCARINO, L., WOLF, A., SPINA, S., ALLEN, I., COBIGO, Y., HEUER, H., VANDEVREDE, L., PROCTOR, N., LAGO, A., BAKER, S., SIVASANKARAN, R., KIELOCH, A., KINHIKAR, A., YU, L., VALENTIN, M., JEROMIN, A., ZETTERBERG, H., HANSSON, O., MATTSSON-CARLGREN, N., GRAHAM, D., BLENNOW, K., KRAMER, J., GRINBERG, L., SEELEY, W., ROSEN, H., BOEVE, B., MILLER, B., TEUNISSEN, C., RABINOVICI, G., ROJAS, J., DAGE, J. & BOXER, A. 2021. Plasma phosphorylated tau 217 and phosphorylated tau 181 as biomarkers in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration: a retrospective diagnostic performance study. *The Lancet. Neurology*, 20.
- TSENG, H., ZHOU, Y., SHEN, Y. & TSAI, L. 2002. A survey of Cdk5 activator p35 and p25 levels in Alzheimer's disease brains. *FEBS letters*, 523.
- TUCKER, K. L., MEYER, M. & BARDE, Y. A. 2001. Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nat Neurosci*, 4, 29-37.
- URWIN, P., MACKENZIE, J., LLEWELYN, C., WILL, R. & HEWITT, P. 2016. Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion: updated results of the UK Transfusion Medicine Epidemiology Review Study. *Vox sanguinis*, 110.
- 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.
- VAN DE HAAR, H. J., BURGMANS, S., JANSEN, J. F., VAN OSCH, M. J., VAN BUCHEM, M. A., MULLER, M., HOFMAN, P. A., VERHEY, F. R. & BACKES, W. H. 2016.

## Bibliographie

- Blood-Brain Barrier Leakage in Patients with Early Alzheimer Disease. *Radiology*, 281, 527-535.
- VAN DER FLIER, W., VAN STRAATEN, E., BARKHOF, F., FERRO, J., PANTONI, L., BASILE, A., INZITARI, D., ERKINJUNTTI, T., WAHLUND, L., ROSTRUP, E., SCHMIDT, R., FAZEKAS, F. & SCHELTENS, P. 2005. Medial temporal lobe atrophy and white matter hyperintensities are associated with mild cognitive deficits in non-disabled elderly people: the LADIS study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 76.
- VANDEN DRIES, V., STYGELBOUT, V., PIERROT, N., YILMAZ, Z., SUAIN, V., DE DECKER, R., BUÉE, L., OCTAVE, J. N., BRION, J. P. & LEROY, K. 2017. Amyloid precursor protein reduction enhances the formation of neurofibrillary tangles in a mutant tau transgenic mouse model. *Neurobiol Aging*, 55, 202-212.
- VARNUM, M. & IKEZU, T. 2012. The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease brain. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*, 60.
- VASILIS, E., DOMINGUEZ-MEIJIDE, A. & OUTEIRO, T. 2019. Spreading of  $\alpha$ -Synuclein and Tau: A Systematic Comparison of the Mechanisms Involved. *Frontiers in molecular neuroscience*, 12.
- VECINO, E., RODRIGUEZ, F., RUZAFÁ, N., PEREIRO, X. & SHARMA, S. 2016. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Progress in retinal and eye research*, 51.
- VENKATESH, A., MA, S., LANGELLOTTO, F., GAO, G. & PUNZO, C. 2013. Retinal gene delivery by rAAV and DNA electroporation. *Curr Protoc Microbiol*, Chapter 14, Unit 14D.4.
- VERGARA, C., HOUBEN, S., SUAIN, V., YILMAZ, Z., DE DECKER, R., VANDEN DRIES, V., BOOM, A., MANSOUR, S., LEROY, K., ANDO, K. & BRION, J. 2019. Amyloid- $\beta$  pathology enhances pathological fibrillary tau seeding induced by Alzheimer PHF in vivo. *Acta neuropathologica*, 137.
- VEYS, L., VAN HOUCKE, J., AERTS, J., VAN POTTENBERGE, S., MAHIEU, M., COENS, A., MELKI, R., MOECHARS, D., DE MUYNCK, L. & DE GROEF, L. 2021. Absence of Uptake and Prion-Like Spreading of Alpha-Synuclein and Tau After Intravitreal Injection of Preformed Fibrils. *Frontiers in aging neuroscience*, 12.
- VILLAREJO-ZORI, B., JIMÉNEZ-LOYGORRI, J., ZAPATA-MUÑOZ, J., BELL, K. & BOYA, P. 2021. New insights into the role of autophagy in retinal and eye diseases. *Molecular aspects of medicine*, 82.
- VON BERGEN, M., BARGHORN, S., LI, L., MARX, A., BIERNAT, J., MANDELKOW, E. & MANDELKOW, E. 2001. Mutations of tau protein in frontotemporal dementia promote aggregation of paired helical filaments by enhancing local beta-structure. *The Journal of biological chemistry*, 276.
- VON BERGEN, M., FRIEDHOFF, P., BIERNAT, J., HEBERLE, J., MANDELKOW, E. & MANDELKOW, E. 2000. Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97.
- WANG, J. Z., GRUNDKE-IQBAL, I. & IQBAL, K. 2007. Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur J Neurosci*, 25, 59-68.
- WANG, S., GAN, L., MARTIN, S. & KLEIN, W. 2000. Abnormal polarization and axon outgrowth in retinal ganglion cells lacking the POU-domain transcription factor Brn-3b. *Molecular and cellular neurosciences*, 16.

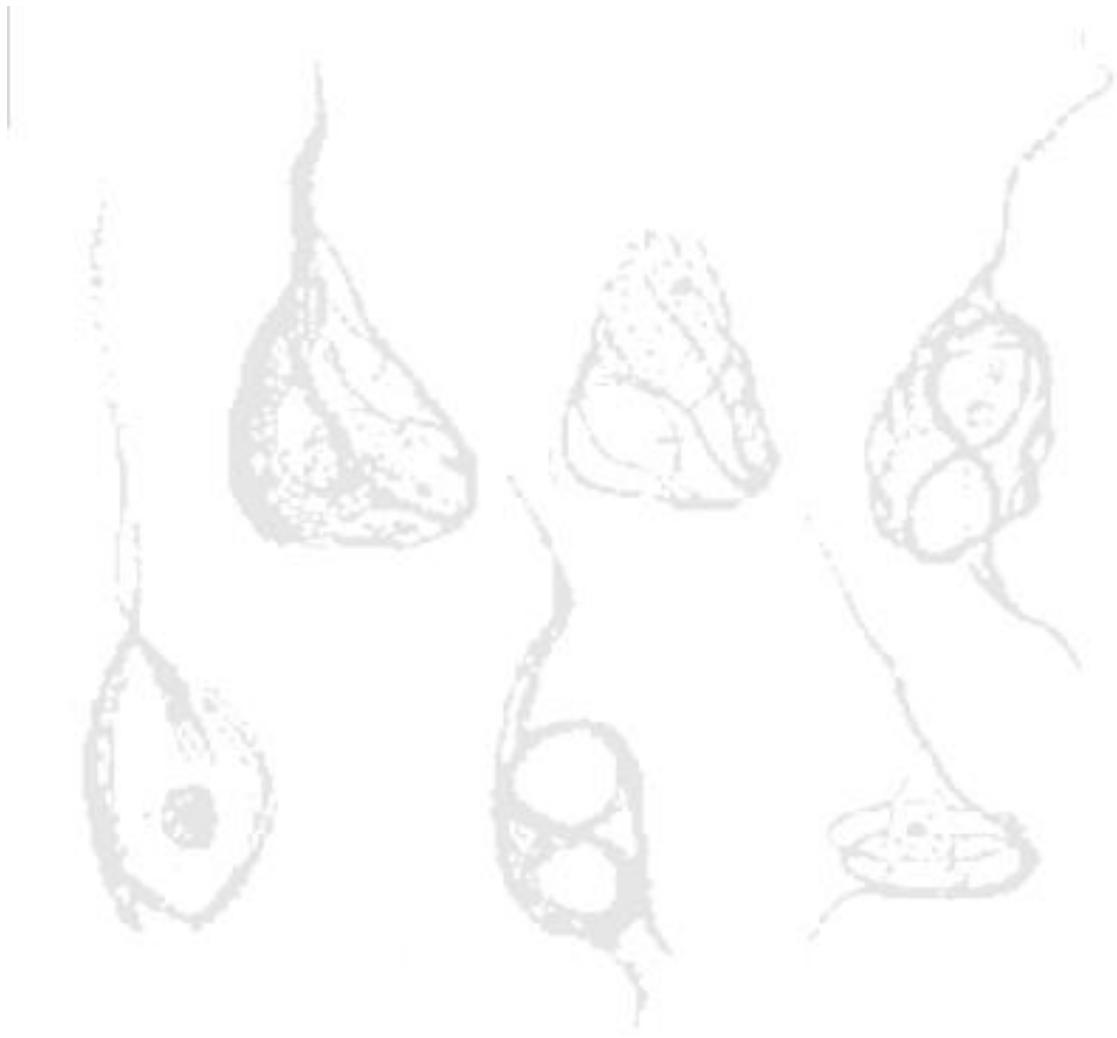
## Bibliographie

- WANG, Y., LOOMIS, P., ZINKOWSKI, R. & BINDER, L. 1993. A novel tau transcript in cultured human neuroblastoma cells expressing nuclear tau. *The Journal of cell biology*, 121.
- WAUTERS, M., WATTIEZ, R. & RIS, L. 2016. Internalization of the Extracellular Full-Length Tau Inside Neuro2A and Cortical Cells Is Enhanced by Phosphorylation. *Biomolecules*.
- WEGIEL, J. & WISNIEWSKI, H. 1990. The complex of microglial cells and amyloid star in three-dimensional reconstruction. *Acta neuropathologica*, 81.
- WEINGARTEN, M. D., LOCKWOOD, A. H., HWO, S. Y. & KIRSCHNER, M. W. 1975. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 1858-62.
- WHITTINGTON, R., BRETTEVILLE, A., DICKLER, M. & PLANEL, E. 2013. Anesthesia and tau pathology. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 47.
- WILL, R. & MATTHEWS, W. 1982. Evidence for case-to-case transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 45.
- WILLIAMS, E., MCGUONE, D., FROSCH, M., HYMAN, B., LAVER, N. & STEMMER-RACHAMIMOV, A. 2017. Absence of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes in Eyes of Subjects With Alzheimer Disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 76.
- WISCHIK, C., NOVAK, M., EDWARDS, P., KLUG, A., TICHELAR, W. & CROWTHER, R. 1988. Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85.
- WISNIEWSKI, H., VORBRODT, A. & WEGIEL, J. 1997. Amyloid angiopathy and blood-brain barrier changes in Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 826.
- WOOD, J., MIRRA, S., POLLOCK, N. & BINDER, L. 1986. Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83.
- WOSTYN, P., AUDENAERT, K. & DE DEYN, P. 2009. Alzheimer's disease and glaucoma: is there a causal relationship? *The British journal of ophthalmology*, 93.
- WRIGHT, L., STEIN, T., JUN, G., CHUNG, J., MCCONNELL, K., FIORELLO, M., SIEGEL, N., NESS, S., XIA, W., TURNER, K. & SUBRAMANIAN, M. 2019. Association of Cognitive Function with Amyloid- $\beta$  and Tau Proteins in the Vitreous Humor. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 68.
- WROE, S., PAL, S., SIDDIQUE, D., HYARE, H., MACFARLANE, R., JOINER, S., LINEHAN, J., BRANDNER, S., WADSWORTH, J., HEWITT, P. & COLLINGE, J. 2006. Clinical presentation and pre-mortem diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease associated with blood transfusion: a case report. *Lancet (London, England)*, 368.
- YAGISHITA, S., ITOH, Y., NAN, W. & AMANO, N. 1981. Reappraisal of the fine structure of Alzheimer's neurofibrillary tangles. *Acta neuropathologica*, 54.
- YAMAGUCHI, H., ISHIGURO, K., UCHIDA, T., TAKASHIMA, A., LEMERE, C. & IMAHORI, K. 1996. Preferential labeling of Alzheimer neurofibrillary tangles with antisera for tau protein kinase (TPK) I/glycogen synthase kinase-3 beta and cyclin-dependent kinase 5, a component of TPK II. *Acta neuropathologica*, 92.
- YAMAZAKI, Y., SHINOHARA, M., SHINOHARA, M., YAMAZAKI, A., MURRAY, M., LIESINGER, A., HECKMAN, M., LESSER, E., PARISI, J., PETERSEN, R., DICKSON, D., KANEKIYO, T. & BU, G. 2019. Selective loss of cortical endothelial

## Bibliographie

- tight junction proteins during Alzheimer's disease progression. *Brain : a journal of neurology*, 142.
- YANG, C., CHIU, M., CHEN, T., CHANG, H., LIU, B. & YANG, S. 2018. Assay of Plasma Phosphorylated Tau Protein (Threonine 181) and Total Tau Protein in Early-Stage Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 61.
- YANG, S., CHIU, M., CHEN, T. & HORNG, H. 2017. Detection of Plasma Biomarkers Using Immunomagnetic Reduction: A Promising Method for the Early Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Neurology and therapy*, 6.
- YARDENI, T., ECKHAUS, M., MORRIS, H. D., HUIZING, M. & HOOGSTRATEN-MILLER, S. 2011. Retro-orbital injections in mice. *Lab Anim (NY)*, 40, 155-60.
- YOSHIDA, H., CROWTHER, R. & GOEDERT, M. 2002. Functional effects of tau gene mutations deltaN296 and N296H. *Journal of neurochemistry*, 80.
- YU, Y., RUN, X., LIANG, Z., LI, Y., LIU, F., LIU, Y., IQBAL, K., GRUNDKE-IQBAL, I. & GONG, C. 2009. Developmental regulation of tau phosphorylation, tau kinases, and tau phosphatases. *Journal of neurochemistry*, 108.
- YUAN, A., KUMAR, A., PETERHOFF, C., DUFF, K. & NIXON, R. 2008. Axonal transport rates in vivo are unaffected by tau deletion or overexpression in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28.
- ZETTERBERG, H., WILSON, D., ANDREASSON, U., MINTHON, L., BLENNOW, K., RANDALL, J. & HANSSON, O. 2013. Plasma tau levels in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*, 5, 9.
- ZHANG, H., CAO, Y., MA, L., WEI, Y. & LI, H. 2021a. Possible Mechanisms of Tau Spread and Toxicity in Alzheimer's Disease. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9.
- ZHANG, M., ZHONG, L., HAN, X., XIONG, G., XU, D., ZHANG, S., CHENG, H., CHIU, K. & XU, Y. 2021b. Brain and Retinal Abnormalities in the 5xFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease at Early Stages. *Frontiers in neuroscience*, 15.
- ZHAO, H., CHANG, R., CHE, H., WANG, J., YANG, L., FANG, W., XIA, Y., LI, N., MA, Q. & WANG, X. 2013. Hyperphosphorylation of tau protein by calpain regulation in retina of Alzheimer's disease transgenic mouse. *Neuroscience letters*, 551.





# *Articles*





# Intravenous Injection of PHF-Tau Proteins From Alzheimer Brain Exacerbates Neuroinflammation, Amyloid Beta, and Tau Pathologies in 5XFAD Transgenic Mice

Sarah Houben<sup>1†</sup>, Marie-Ange de Fisenne<sup>1†</sup>, Kunie Ando<sup>1</sup>, Virginie Vanden Dries<sup>1</sup>, Luc Poncelet<sup>2</sup>, Zehra Yilmaz<sup>1</sup>, Salwa Mansour<sup>1</sup>, Robert De Decker<sup>1</sup>, Jean-Pierre Brion<sup>1</sup> and Karelle Leroy<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Histology, Neuroanatomy and Neuropathology, Faculty of Medicine, ULB Neuroscience Institute, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium, <sup>2</sup>Laboratory of Anatomy, Biomechanics and Organogenesis, Faculty of Medicine, ULB Neuroscience Institute, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Javier Egea,  
Princess University Hospital, Spain

### Reviewed by:

Eva Carro,  
Research Institute Hospital October  
12, Spain  
Isidre Ferrer,  
University of Barcelona, Spain  
Sonia Do Carmo,  
McGill University, Canada

### \*Correspondence:

Karelle Leroy  
kleroy@ulb.ac.be

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work

**Received:** 24 March 2020

**Accepted:** 20 May 2020

**Published:** 14 July 2020

### Citation:

Houben S, de Fisenne M-A, Ando K, Vanden Dries V, Poncelet L, Yilmaz Z, Mansour S, De Decker R, Brion J-P and Leroy K (2020) Intravenous Injection of PHF-Tau Proteins From Alzheimer Brain Exacerbates Neuroinflammation, Amyloid Beta, and Tau Pathologies in 5XFAD Transgenic Mice. *Front. Mol. Neurosci.* 13:106. doi: 10.3389/fnmol.2020.00106

Alzheimer's disease (AD) is characterized by the accumulation in the brain of intraneuronal aggregates of abnormally and hyperphosphorylated tau proteins and of extracellular deposits of amyloid- $\beta$  surrounded by dystrophic neurites. Numerous experimental models have shown that tau pathology develops in the brain after intracerebral injection of brain homogenates or pathological tau [paired helical filaments (PHF)-tau] from AD brains. Further investigations are however necessary to identify or exclude potential extracerebral routes of tau pathology transmission, e.g., through the intravascular route. In this study, we have analyzed the effect of intravenous injection of PHF-tau proteins from AD brains on the formation of tau and amyloid pathologies in the brain of wild-type (WT) mice and of 5XFAD mice (an amyloid model). We observed that 5XFAD mice with a disrupted blood-brain barrier showed increased plaque-associated astrogliosis, microgliosis, and increased deposits of A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 after intravenous injection of PHF-tau proteins. In addition, an increased phosphotau immunoreactivity was observed in plaque-associated dystrophic neurites. These results suggest that blood products contaminated by PHF-tau proteins could potentially induce an exacerbation of neuroinflammation and AD pathologies.

**Keywords:** tau, neurofibrillary tangles, amyloid, plaque, intravenous, blood transfusion

## INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by two neuropathological lesions called neurofibrillary tangles (NFT) and senile plaques. NFT are composed of abnormally and hyperphosphorylated tau proteins that form aggregates in neurons as paired helical filaments (PHF; Brion et al., 1985; Grundke-Iqbal et al., 1986; Buée et al., 2000). The cognitive deficits are highly correlated to the abundance of NFT in the brain of AD subjects (Nelson et al., 2012). Senile plaques are composed of extracellular deposits of the

amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ ) surrounded by dystrophic neurites containing abnormally phosphorylated tau proteins. A $\beta$  is produced by the proteolytic cleavage of the amyloid precursor protein (APP; Glenner and Wong, 1984; Kang et al., 1987).

Experimental models have demonstrated that tau pathology propagates in the brain after exposure to pathological tau in a prion-like manner by recruiting endogenous tau (Mudher et al., 2017). Indeed, the seeding of endogenous murine or human tau has been observed in the brain after intracerebral injection of brain homogenates or PHF-tau proteins from AD brain tissues in wild-type (WT) and in tau transgenic mice (Clavaguera et al., 2013, 2014; Audouard et al., 2016).

Further investigations are necessary to identify potential extracerebral routes of tau pathology transmission as it was suggested for some prion diseases. Indeed, cases of iatrogenic Creutzfeldt–Jakob’s disease (CJD) have been induced by the use of contaminated growth hormone derived from cadaver with undiagnosed CJD infections and by transfusion of blood products (Brown, 1988; Llewelyn et al., 2004; Wroe et al., 2006; Brown et al., 2012). In some cases of iatrogenic CJD, tau pathology was observed in the brain of patients after exposure to cadaver-derived human growth hormone, suggesting that tau pathology could develop through an extracerebral iatrogenic transmission (Duyckaerts et al., 2018). The role of the intravascular system as a potential extracerebral route for transmission of tau pathology is not clearly elucidated as studies showed no association or an increased risk for AD after blood transfusion in cohort studies (O’Meara et al., 1997; Edgren et al., 2016; Lin et al., 2019). The presence of phosphorylated tau proteins has however been demonstrated in the plasma of normal subjects (Yang et al., 2018). Plasma tau protein was detected already in young individuals and the concentration of plasma tau proteins increased with age in cognitively normal subjects (Chiu et al., 2017; Lue et al., 2019). Moreover, the permeability of the blood–brain barrier has been reported to be increased with age in the hippocampus of healthy individuals (Montagne et al., 2015) and in AD (Rosenberg, 2014; van de Haar et al., 2016), suggesting that aged individuals with compromised blood–brain barrier might be more susceptible to passage of plasma tau proteins in the brain and potential seeding of a tau pathology. The presence of an amyloid- $\beta$  pathology in the brain might also facilitate the seeding of a tau pathology, since recent studies have shown that amyloid increases tau seeding after intracerebral injection of PHF-tau proteins from AD brain (He et al., 2018; Vergara et al., 2019). To investigate experimentally a potential role of the intravascular route in the development of a tau pathology in a model with compromised blood–brain barrier and amyloid- $\beta$  pathology, we have analyzed amyloid and tau pathologies after intravenous injection of PHF-tau proteins from AD brain in WT and 5XFAD mice. 5XFAD mice, an animal model of AD amyloidosis expressing human mutated APP and Presenilin 1 (PS1), develops amyloid plaques in the brain at 3 months of age (Oakley et al., 2006) and show a higher permeability of the blood–brain barrier (Kook et al., 2012, 2013; Batarseh et al., 2017). This higher permeability in 5XFAD mice is due to the presence

of A $\beta$ 42, which induces a disruption of tight junctions in brain capillaries and has also been observed in AD brains (Wisniewski et al., 1997; Kook et al., 2012, 2013; Batarseh et al., 2017; Yamazaki et al., 2019). We observed that a single intravascular injection of PHF-tau proteins induced a long-term inflammatory response in 5XFAD mice, an increased amyloid- $\beta$  burden and increased tau immunoreactivity in plaque-associated dystrophic neurites.

## MATERIALS AND METHODS

### Human Brain Tissue

Human brain tissue samples were taken at autopsy from a demented patient clinically diagnosed as having AD (60 years old, female, postmortem delay of 24 h) or from a nondemented control subject (67 years old, male, postmortem delay of 24 h). Tissue samples were fixed with formalin 10% and embedded in paraffin for neuropathological examination or were kept at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The neuropathological examination confirmed the presence of NFT and amyloid plaques in this AD case (Braak stage VI, Thal stage 4) and their absence in the control case. This study on postmortem brain tissue was performed in compliance and following approval of the Ethical Committee of the Medical School of the Free University of Brussels.

### Preparation of Human Sarkosyl-Insoluble PHF-Tau Fraction

Sarkosyl fractionation of human brain tissue was performed as previously described (Brion et al., 1991; Frederick et al., 2015). Frozen frontal cortex (0.5 g) from AD and control cases was homogenized in 10 volumes of ice-cold PHF-extraction buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.8 M NaCl, 1 mM EDTA, and 10% sucrose]. The homogenate was centrifuged at  $15,000\times g$  for 20 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . N-lauroylsarcosine sodium salt (L-5125; Sigma-Aldrich) was added to the supernatant to reach a final concentration of 1% (w/v). The lysate was incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with a mild agitation followed by an ultracentrifugation at  $180,000\times g$  for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The sarkosyl soluble supernatant was removed and the sarkosyl-insoluble pellet, containing PHF, was gently rinsed and re-suspended in 0.25 ml of PBS by vigorous pipetting. The protein concentration was determined by Bradford protein assay (Bio-Rad). These Sarkosyl fractions were aliquoted and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Negative Staining of Tau Filaments by Transmission Electron Microscopy

The Sarkosyl-insoluble material was ultrastructurally characterized by transmission electron microscopy. This material was adsorbed on formvar-carbon-coated EM grids and negatively stained with potassium phosphotungstate as reported before (Brion et al., 1991; Poncelet et al., 2019) and observed with a Zeiss EM 809T at 80 kV. The average length of sarkosyl-insoluble filaments was measured on 200 filaments, using the ImageJ software.

## Animals

The 5XFAD heterozygote mice contain five familial AD mutations for APP (K670N/M671L, I716V, V717I) and for PS1 (M146L, L286V; Oakley et al., 2006). Mutants APP and PS1 transgene expression is driven by the mouse Thy1 promoter. Genotyping was performed by PCR amplifications of DNA extracted from tail, using previously described primers for human APP (Oakley et al., 2006; Leroy et al., 2012). Only female heterozygote animals were used in the present study; non-transgenic littermates were used as WT controls. Tg30 mice express 1N4R human tau mutated on G272V/P301S under the control of a Thy.1 promoter (Schindowski et al., 2006; Leroy et al., 2007). Brain sections of these mice were used as positive control for anti-human or pathological tau immunolabelings.

## Intravenous Injection of Sarkosyl Fractions

Three-month-old WT and 5XFAD female mice were not treated (not injected group: WT mice,  $n = 3$ ; 5XFAD mice,  $n = 3$ ) or treated by injection in the orbital venous plexus of 10  $\mu$ g proteins of sarkosyl fraction isolated from control frontal cortex (CTL injected group: WT mice,  $n = 3$ ; 5XFAD mice,  $n = 3$ ) or sarkosyl fraction isolated from AD frontal cortex (AD injected group: WT mice,  $n = 3$ ; 5XFAD mice,  $n = 3$ ). Six months after injection, mice were anesthetized with a solution of xylazine (5% v/v; Rompun, Bayer) and ketamine hydrochloride (10% v/v; Nimatek) in physiological saline by i.p. injection (100 ml/10 g of body weight, final dose, 10 mg/kg xylazine, and 100 mg/kg ketamine) and the blood was retrieved by intracardiac puncture and allowed to coagulate. Tubes containing coagulated blood was centrifuged at 1000 $\times$   $g$  for 10 min at room temperature. The supernatant corresponding to serum was retrieved. Brains were fixed in 10% formaldehyde and embedded in paraffin. All studies on animals were performed in compliance and following approval of the Ethical committee for the care and use of laboratory animals of the Medical School of the Free University of Brussels.

## Western Blotting

The protein assay was performed with the Bradford method (Biorad). Sarkosyl-insoluble fractions from control or AD frontal cortex were heated in Laemmli buffer at 100°C for 5 min and were analyzed by Western blotting, with anti-total tau B19, anti-phosphotau PHF-1, and anti-amyloid antibodies. Fractions (5  $\mu$ g/lane) were run in 10% Tris-glycine SDS-PAGE gels and transferred on nitrocellulose membranes (Leroy et al., 2000). The nitrocellulose sheets were blocked in semifat dry milk [10% (w/v) in Tris-buffered saline] for 1 h at room temperature and incubated overnight with primary antibodies, followed by anti-rabbit or anti-mouse immunoglobulins conjugated to peroxidase. Finally, the membranes were incubated in pico substrate (Pierce). The ECL signal was captured using a Fusion SOLO 4S system equipped with a DARQ-7 camera and the fusion-capt software (Vilber-Lourmat).

## Antibodies and Immunohistochemistry

The characteristics of all primary antibodies used in this study are summarized in **Supplementary Table S1**.

Tissue sections (7  $\mu$ m of thickness) were deparaffined and incubated in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to inhibit endogenous peroxidase. Sections were rinsed in water and then incubated with a blocking solution [10% normal rabbit serum in TBS (Tris 0.01 M, NaCl 0.15 M, pH 7.4)]. After this incubation, sections were incubated overnight with the primary antibody solution and then incubated with anti-mouse or anti-rabbit antibodies conjugated to biotin (Vector) followed by the ABC complex (Vector). Sections were revealed with a peroxidase substrate, a solution of diaminobenzidine as a chromogen (DAKO). Sections immunolabeled with anti-amyloid antibodies were pre-treated with 99% formic acid (Stygelbout et al., 2014). Tissue sections were stained with hematoxylin, Thioflavin T, Gallyas staining, or DAPI for histological examination as previously described (Ando et al., 2011; Leroy et al., 2012; Poncelet et al., 2019).

For detection of immunoglobulin extravasation, sections were incubated directly with anti-mouse antibody conjugated to biotin (Vector) followed by the ABC complex (Vector) without primary antibody. Sections were revealed with a peroxidase substrate, a solution of diaminobenzidine as a chromogen.

## Quantification of Labeling

Mouse brain sections were labeled with the corresponding antibody or stained and examined with an Axioplan microscope (Carl Zeiss). Digital images covering all the dentate gyrus of the hippocampus were acquired with a 2.5 $\times$  objective lens, an Axiocam Hrc camera, and the Axiovision software (Carl Zeiss). The total surface of the dentate gyrus was measured using manual selection and the labeled area in the dentate gyrus was determined with the ImageJ software (NIH) by detecting positive pixels using image thresholding, as reported previously (Héraud et al., 2014; Vanden Dries et al., 2017; Houben et al., 2019).

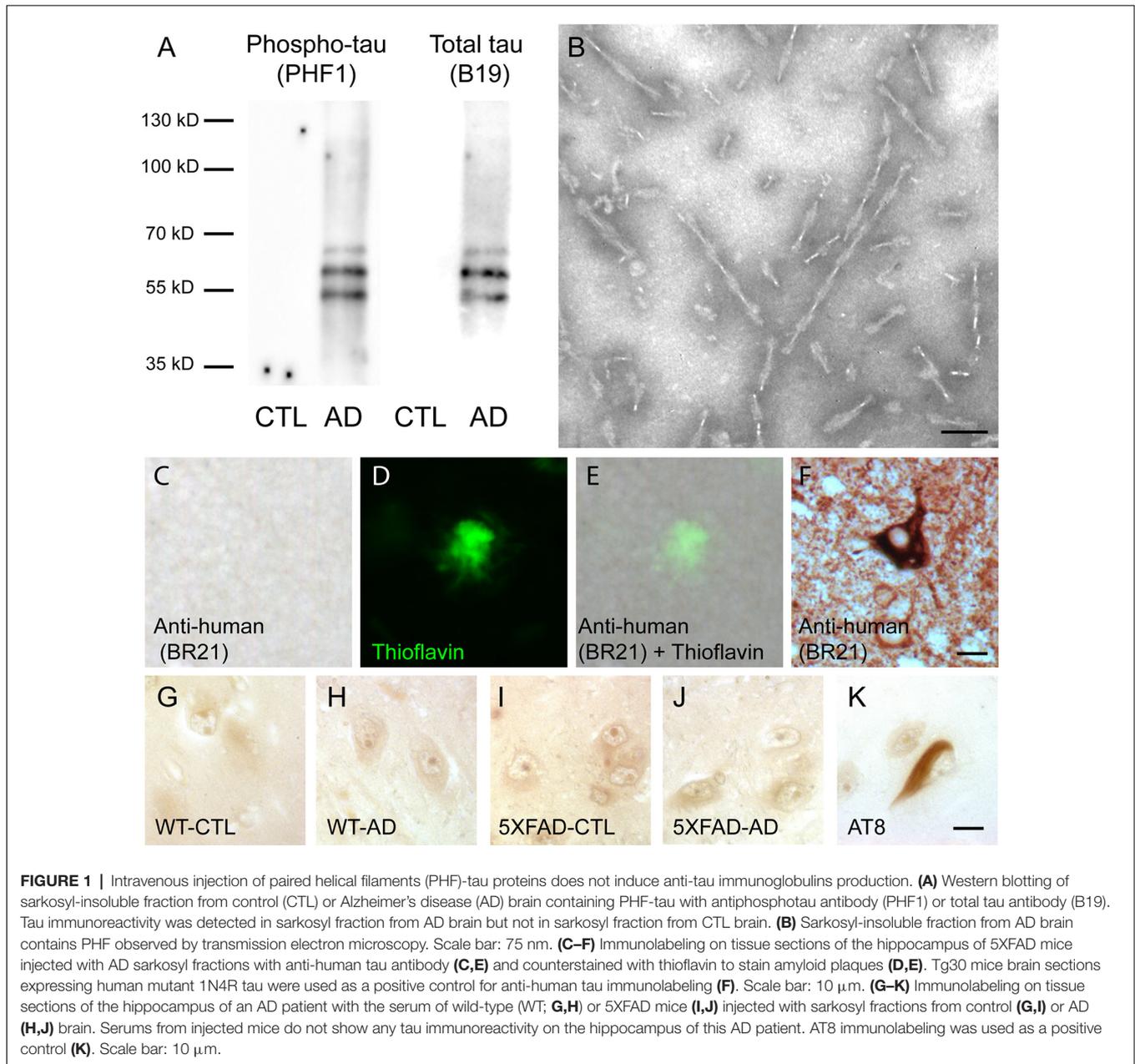
## Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using Prism 7 software (GraphPad Software). Statistical comparisons were performed using one-way or two-way ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison Test as noted in figure legends. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.

## RESULTS

### Characterization of Sarkosyl-Insoluble Fraction From Human Brain

The presence of tau in sarkosyl fractions from control or AD brains that were used for injection was analyzed by Western blotting with anti-phosphotau (PHF1) and anti-total tau antibodies (**Figure 1A**). We detected phosphorylated tau proteins (PHF-tau proteins) as three major bands as previously described in AD sarkosyl fractions (Goedert et al., 1992). These bands were absent in sarkosyl fractions from control subjects. The presence of tau filaments in the form of PHF in sarkosyl fractions from AD brain was confirmed by negative staining by electron microscopy (**Figure 1B**). The PHF had an average length of  $165.9 \pm 7.6$  nm (mean  $\pm$  SEM). We also analyzed the sarkosyl fractions for the presence



of amyloid- $\beta$  by Western blotting with the 6E10 antibody. Amyloid- $\beta$  was not detected in sarkosyl fractions (data not shown).

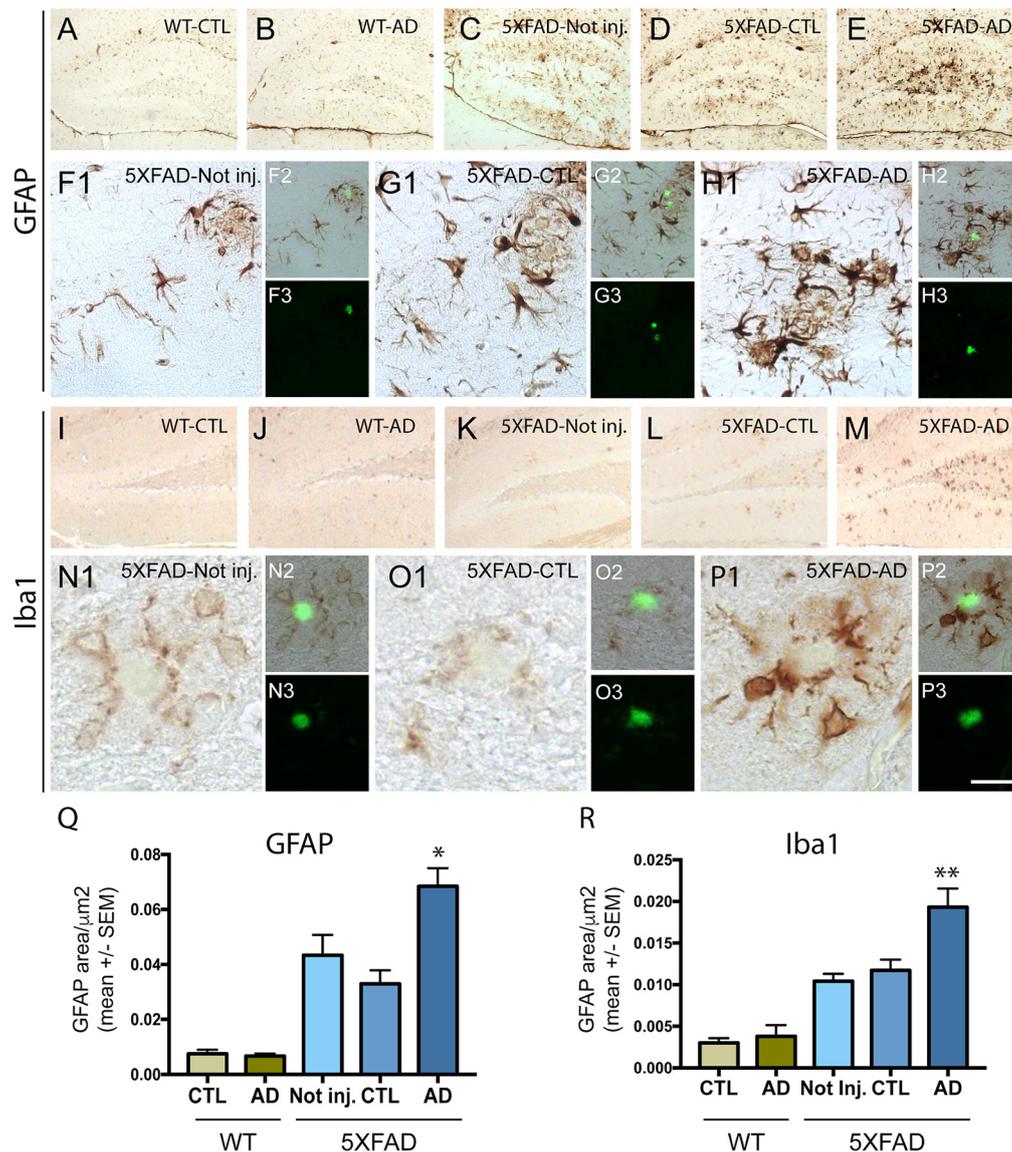
### Single Intravenous Injection of PHF-Tau Proteins Does Not Induce the Production of Anti-tau Antibodies in WT and 5XFAD Injected Mice

In order to test for the presence of anti-tau antibodies in the serum of intravenously injected mice, we labeled brain sections of AD brains with serums of control or AD injected mice using them as primary antibodies. Tau immunoreactivity was

not detected on AD brain sections labeled with serum of WT or 5XFAD injected mice (**Figures 1G-J**), whereas NFT were detected with AT8 anti-phosphotau antibody on an adjacent section of AD brain (**Figure 1K**).

### Intravenous Injection of PHF-Tau Proteins Increases Astrocytic and Microglial Immunoreactivity in 5XFAD Mice Brain

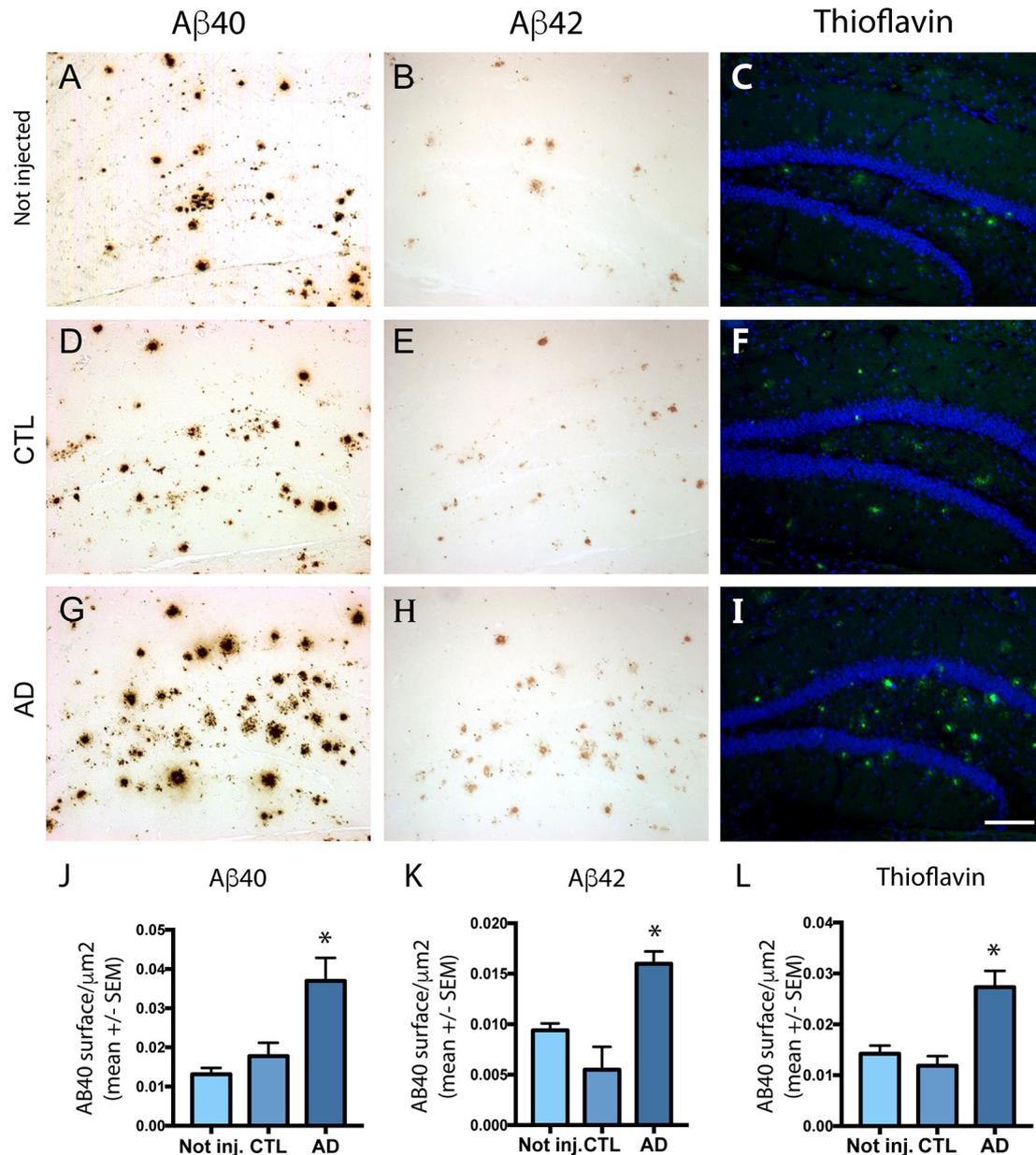
To understand the effect of intravenous injection of PHF-tau into WT and 5XFAD mice, we first investigated glial activation by immunohistochemistry using anti-GFAP (an astrocytic marker) and anti-iba1 (microglial or macrophage



**FIGURE 2** | Neuroinflammation is increased in 5XFAD mice after injection of PHF-tau proteins from AD brain. (A–H3): Immunolabelling with anti-GFAP antibody on the dentate gyrus of WT mice (A,B) and 5XFAD mice (C–H3) not injected (C and F1–3) or injected with sarkosyl fractions from control (A,D and G1–3) or AD brain (B,E and H1–3). Pictures (F1,G1 and H1) are higher magnifications of the dentate gyrus illustrated in (C,D and E), respectively. Sections were counterstained with Thioflavin T (F3,G3 and H3) and showed localization of astrocytic cells (F1,G1,H1) around amyloid deposits (in green in figures F2,G2 and H2). (I–P3) Immunolabelling with anti-Iba1 antibody on the dentate gyrus of WT mice (I and J) and 5XFAD mice (K–P3) not injected (K and N1–3) or injected with sarkosyl fractions from control (I,L and O1–3) or AD brain (J,M and P1–3). Pictures (N1,O1 and P1) are higher magnifications of the dentate gyrus illustrated in (K,L and M), respectively. Sections were counterstained with Thioflavin T (N3,O3 and P3) and showed localization of microglial cells around amyloid deposits (in green in figures N2,O2 and P2). Scale bars: (A–E,I–M): 250 μm and (F1–H1,N1–P1): 40 μm, N2/3-P2/3: 80 μm. (Q,R) Quantification of GFAP (Q) and Iba1 (R) immunostainings in the dentate gyrus of WT and 5XFAD mice not injected or injected with sarkosyl fractions from control or AD brain. 5XFAD mice injected with sarkosyl fractions from AD brain showed a significant increase of the GFAP (Q) or the Iba1 (R) immunolabelling compared to control or AD injected WT mice or compared to 5XFAD mice not injected or injected with control fraction (Two way anova, Tukey post-test, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ). No significant differences were observed in WT mice injected with sarkosyl fractions from control or AD brain or in 5XFAD mice not injected or injected with sarkosyl fractions from control brain.

marker) antibodies (Figure 2). A prominent astrocytosis and microgliosis were observed in the dentate gyrus of 5XFAD mice injected with AD sarkosyl fractions (Figures 2E,H,M,P) and significantly increased compared to WT mice injected with control or AD sarkosyl fractions, or even compared

to 5XFAD not injected or injected with control sarkosyl fraction (Figures 2Q,R). The reactive astrocytes and microglial cells were mainly localized around amyloid plaques in 5XFAD mice injected with PHF-tau proteins from AD (Figures 2H,P).



**FIGURE 3 |** Effect of intravenous injection of PHF-tau proteins from AD brain on the formation of amyloid plaques. Immunolabeling of the dentate gyrus of 5XFAD mice not injected (**A–C**) or injected with sarkosyl fractions from control (**D–F**) and AD brain (**G–I**) with anti-Aβ40 (**A,D,G**), anti-Aβ42 (**B,E,H**) antibodies and with Thioflavin T staining (**C,F,I**). Quantification of Aβ40, Aβ42, and Thioflavin T immunostaining showed a significant increase in 5XFAD mice injected with sarkosyl fraction from AD brain compared to 5XFAD mice not injected or injected with control fraction (**J–L**; one-way ANOVA, Tukey post-test, \* $p < 0.05$ ). Slides were counterstained with DAPI in pictures (**C,F,I**). Scale bar: 200 μm.

### Intravenous Injection of PHF-Tau Proteins Exacerbates Amyloid Plaque Burden

To analyze the effect of intravenous injection of PHF-tau proteins on amyloid plaque formation, we quantified by immunohistochemistry the load of amyloid plaques in non-injected or injected 5XFAD mice with antibodies to Aβ40 and to Aβ42 and with thioflavin staining (Figure 3). The mean area covered by Aβ40 (Figures 3A,D,G)

and Aβ42 (Figures 3B,E,H) positive plaques was significantly increased in the dentate gyrus of 5XFAD mice injected with AD sarkosyl fraction compared to 5XFAD mice not injected or injected with control fraction (Figures 3J,K). The increase of amyloid plaque burden in 5XFAD mice injected with AD sarkosyl fraction was also observed when using thioflavin T staining (Figures 3C,F,I,L).

## Effect of Intravenous Injection of PHF-Tau Proteins on the Development of Tau Pathology

We next investigated the effect of intravenous injection of PHF-tau proteins on the formation of tau pathology in the brain of injected mice. We never detected accumulation of phosphorylated tau in WT mice injected with control or AD sarkosyl fractions (data not shown). The presence of phosphorylated and conformationally modified tau was detected with pThr231, AT8, and MC1 antibodies in dystrophic neurites surrounding amyloid plaques in 5XFAD mice injected with control or AD fractions (Figure 4). However, the mean area covered by anti-phosphotau and anti-conformational tau immunoreactivity in these dystrophic neurites was significantly increased in 5XFAD mice injected with AD sarkosyl fraction compared to 5XFAD mice not injected or injected with control sarkosyl fraction (Figures 4J–L).

The increased tau immunoreactivity in plaque-associated dystrophic neurites was not detected by the anti-human tau antibody (Figures 1C–E) in 5XFAD-AD injected mice (Figures 1C–E) indicating that this increased tau immunoreactivity was not due to the accumulation of human tau (injected 3 months before) in the dystrophic neurites surrounding plaques. Human tau was detected by the anti-human tau antibody in mice expressing human mutant 1N4R tau (Figure 1F).

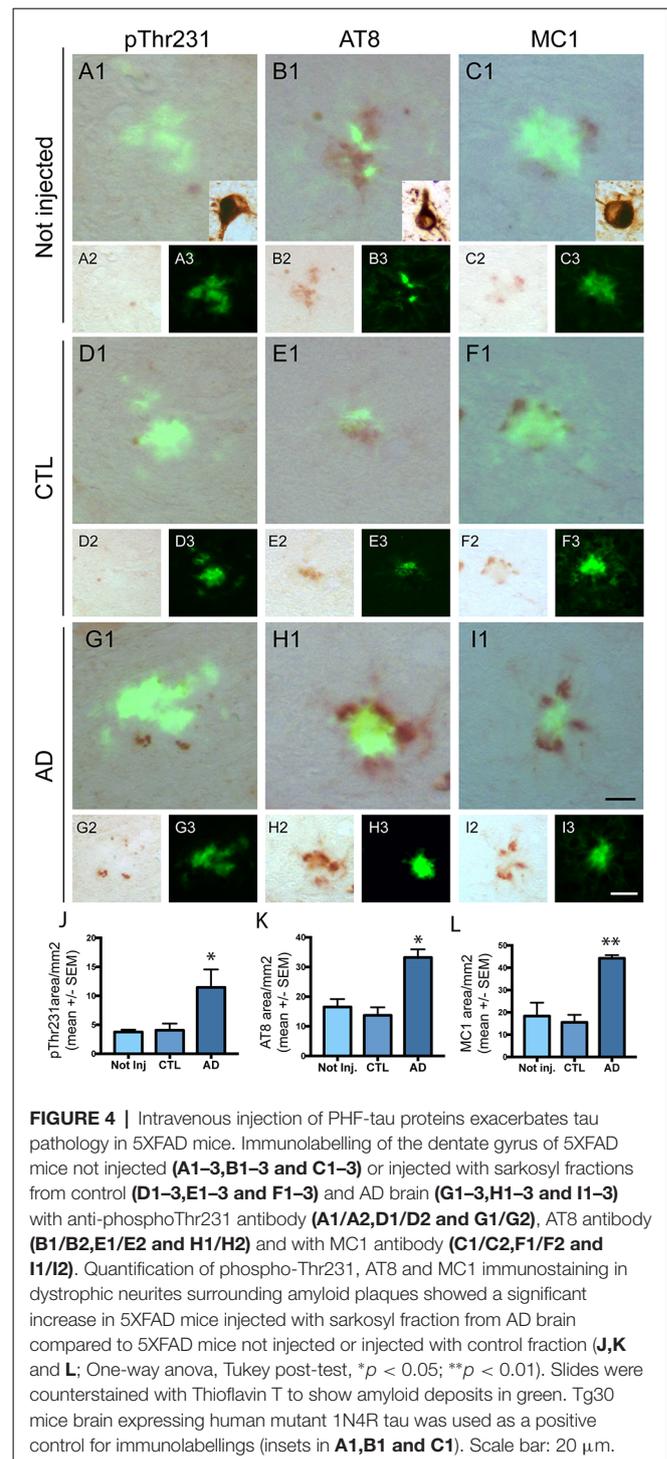
Only phosphorylated tau was present in plaque-associated dystrophic neurites as tau aggregates were not detected by Gallyas staining in these structures. NFT were not observed in 5XFAD mice injected with control or AD sarkosyl fractions whereas they were detected in neurons of mice expressing human mutant 1N4R tau (Figure 4, insets in Figures 4A1, B1, and C1).

## The Permeability of the Blood–Brain Barrier Is Increased in the Brain of 5XFAD Mice

Surprisingly, the effect of intravenous injection of AD PHF-tau proteins on neuroinflammation and on amyloid or tau pathology was only observed in 5XFAD brain and not in WT brain. Previous studies have shown that the blood–brain barrier has a higher permeability in the brains of 5XFAD mice, suggesting that PHF-tau proteins could enter more easily in 5XFAD brain than in WT brain (Kook et al., 2012; Batarseh et al., 2017). To confirm this observation in our mouse model, we analyzed the presence of mouse immunoglobulins around blood vessels in WT and in 5XFAD mice brains. We observed a diffuse immunoreactivity for mouse immunoglobulins around blood vessels in 5XFAD brain (arrows in Supplementary Figure S1B) but not in WT brain (Supplementary Figure S1A), indicating that the blood–brain barrier had a higher permeability in 5XFAD mice, leading to the extravasation of mouse immunoglobulins.

## DISCUSSION

In this study, we show that a single intravenous injection of PHF-tau proteins induces a long-term neuroinflammation



(as evidenced by increased astrogliosis and microgliosis) and increases amyloid- $\beta$  and associated tau pathology in the brain of 5XFAD mice and is already apparent in the small cohort of mice analyzed in this study. In previous studies, WT (Rozenstein-Tsalkovich et al., 2013) and tau transgenic mice (Boimel et al., 2010; Rozenstein-Tsalkovich et al., 2013; Selenica et al., 2014) have been treated by subcutaneous or intraperitoneal injection of

tau peptides or recombinant human tau proteins with adjuvants to study the effect of an active immunization protocol with repeated injections on tau pathology. An increased or a decreased neuroinflammation and the presence of anti-tau antibodies in their serum was observed in these immunized mice and a reduction of tau pathology was reported by this immunotherapy approach. After a single intravenous injection of native PHF-tau proteins from AD brains (in the absence of adjuvants), we observed an increased neuroinflammation in the dentate gyrus of 5XFAD mice in absence of anti-tau antibodies in their serum, suggesting that the observed neuroinflammation did not result from an immune reaction due to the generation of anti-tau antibodies. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide treatment stayed for a longer time in the brain of APP transgenic mice than in WT mice but neuroinflammation decreased after a few days in their brain (Herber et al., 2004). In our AD injected 5XFAD mice, neuroinflammation was still present 6 months after injection, suggesting that the increased neuroinflammation observed in these mice is not just due to a non-specific, transient inflammatory reaction induced by the injection of PHF-tau proteins. Moreover, this increased neuroinflammation was observed only in AD injected 5XFAD mice and not in the control injected 5XFAD mice, indicating that this increased neuroinflammation is due to PHF-tau protein injection. We hypothesize that the increased neuroinflammation was observed in AD injected 5XFAD mice and not in CTL 5XFAD mice or in AD injected WT mice because of a combined effect of the presence of PHF-tau proteins in the injected material and of the disruption of the blood-brain barrier in 5XFAD mice as we confirmed by demonstrating an extravasation of immunoglobulins in the latter mice, implying potentially a more easy access of intravenously injected PHF-tau proteins to the brain tissue in 5XFAD mice.

An interesting finding of this study is that intravenous injection of PHF-tau proteins from AD brains increased amyloid- $\beta$  burden in 5XFAD mice. The role of neuroinflammation in the formation of amyloid plaques is not yet clearly understood as mouse models in which neuroinflammation was induced by activator of the immune system (such as lipopolysaccharides) showed unmodified, increased, or even reduced amyloid plaque formation (DiCarlo et al., 2001; Herber et al., 2004; Lee et al., 2008). The important neuroinflammation present in the dentate gyrus of 5XFAD mice injected with PHF-tau proteins could be responsible for the increased amyloid plaque burden in this area, since microglial cells have been suggested to be involved in the production of amyloid- $\beta$  (Wegiel and Wisniewski, 1990; Baik et al., 2016; Spangenberg et al., 2019) and could thus be directly responsible for the increased amyloid burden observed in AD injected 5XFAD mice. Moreover, treatment of 5XFAD mice with fingolimod, an anti-inflammatory drug, induced a reduction of gliosis but also a reduction of the amyloid load, indicating that gliosis can affect the formation of amyloid (Aytan et al., 2016). However, we cannot discard the possibility that the increased amyloid burden is primarily responsible for the increased astrogliosis and microgliosis that we have observed in our AD injected 5XFAD mice since reactive

astrocytes and microglial cells were mainly localized around amyloid deposits.

A previous study showed that extracellular human tau proteins added in the medium of primary cultures of neurons increases the production of amyloid- $\beta$  (Bright et al., 2015). The latter result supports our *in vivo* observation and is compatible with the hypothesis that intravenously injected PHF-tau proteins entering into the brain through increased blood-brain barrier permeability could induce the increased amyloid burden observed in 5XFAD injected mice.

Interestingly, the accumulation of abnormally phosphorylated and conformationally modified tau was increased in dystrophic neurites surrounding amyloid deposits in PHF-tau injected 5XFAD mice compared to control injected 5XFAD mice. It can be speculated that the increased amyloid burden observed in AD injected 5XFAD mice led to the increased tau phosphorylation in plaque-associated dystrophic neurites. Numerous studies have shown that amyloid exacerbates tau pathology in tau transgenic mice expressing mutant APP/PS1 or by stereotaxic injection of amyloid in the brain of tau mice but, compared to the present study, different mechanisms of tau-amyloid interactions are involved in these models (Lewis et al., 2001; Oddo et al., 2003; Bolmont et al., 2007; Terwel et al., 2008; Héraud et al., 2014). Indeed, tau pathology developed spontaneously due to the genetically derived expression of human mutant tau and tau pathology was enhanced, but not induced, by amyloid- $\beta$  in these previous models. A role for the increased neuroinflammation in the increase of tau pathology in plaque-associated dystrophic neurites is also possible, as suggested by other observations linking neuroinflammation and tau pathology (Asai et al., 2015; Maphis et al., 2015).

The development of a tau pathology in the brain has been described after intraperitoneal (Clavaguera et al., 2014) injection of brain homogenates or PHF-tau proteins from AD brain tissue. Besides this study, few information are available about extracerebral route of tau pathology transmission. Intracerebral injection of PHF in previous studies induced the formation of Gallyas and phosphotau positive fibrillary tau inclusions mainly as grains, neuropil threads, and glial inclusions (He et al., 2018; Vergara et al., 2019). In 5XFAD mice, an accumulation of phosphorylated tau in dystrophic neurites surrounding amyloid plaques was observed after injection of PHF-tau proteins from AD brains but without detection of tau aggregates in these dystrophic neurites (Vergara et al., 2019). In our study, the accumulation of phosphorylated tau in dystrophic neurites surrounding amyloid plaques and the absence of tau aggregates in these dystrophic neurites are in agreement with observations made in intracerebrally injected 5XFAD mice. However, a difference between intravenous and intracerebral injection of PHF-tau proteins is the absence of formation of tau inclusions in neurons or glial cells in our intravenous injection study. We cannot discard the hypothesis that tau inclusions could be present in our intravenous injected mice after longer incubation periods as tau aggregates developed spontaneously in APP/PS1 mice at older age as reported in a recent study (Metaxas et al., 2019). However, the absence of pericaryal tangles

formation in 5XFAD mice after intravenous injection was not specifically due to the inoculation pathway as such pericaryal tangle was not observed in 5XFAD mice after intracerebral injection of pathological tau proteins from AD brains (Vergara et al., 2019).

## CONCLUSION

We show in this study that a single intravenous injection of PHF-tau proteins from AD brain was sufficient to induce a long-standing neuroinflammation in 5XFAD mice with documented effects on amyloid burden and associated tau pathology. Tau proteins have been detected in the blood using sensitive methods (Zetterberg et al., 2013; Chiu et al., 2017; Tatebe et al., 2017; Fossati et al., 2019; Lue et al., 2019), and our study suggests that blood products containing modified tau proteins might have a potential role in modulating the development of AD pathologies in the brain of elderly people in which the blood–brain barrier permeability is increased with aging. This study in an animal model thus provides important information about the relative AD risk of the extracerebral route that is medically relevant considering the wide use of blood products.

Several limitations of the present study will need however to be addressed in future studies, including confirmation of the results in larger cohorts to take into account variabilities with the administration route and additional assessment of the role of the blood–brain barrier. Additional direct comparative studies of the effects of intravenous and intracerebral inoculation experiments will be informative for assessing the relative efficiency of extra- and intracerebral routes in the development of tau pathology.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## ETHICS STATEMENT

This study on postmortem brain tissue was performed in compliance and following review and approval of the Ethical

## REFERENCES

- Ando, K., Leroy, K., Heraud, C., Yilmaz, Z., Authalet, M., Suain, V., et al. (2011). Accelerated human mutant tau aggregation by knocking out murine tau in a transgenic mouse model. *Am. J. Pathol.* 178, 803–816. doi: 10.1016/j.ajpath.2010.10.034
- Asai, H., Ikezu, S., Tsunoda, S., Medalla, M., Luebke, J., Haydar, T., et al. (2015). Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat. Neurosci.* 18, 1584–1593. doi: 10.1038/nn.4132
- Audouard, E., Houben, S., Masaracchia, C., Yilmaz, Z., Suain, V., Authalet, M., et al. (2016). High-molecular-weight paired helical filaments from alzheimer brain induces seeding of wild-type mouse tau into an argyrophilic 4R tau pathology *in vivo*. *Am. J. Pathol.* 186, 2709–2722. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.06.008
- Aytan, N., Choi, J. K., Carreras, I., Brinkmann, V., Kowall, N. W., Jenkins, B. G., et al. (2016). Fingolimod modulates multiple neuroinflammatory markers in

Committee of the Medical School of the Free University of Brussels. All studies on animals were performed in compliance and following approval of the Ethical committee for the care and use of laboratory animals of the Medical School of the Free University of Brussels.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

SH and M-AF are both first authors since they contributed equally to the work. M-AF, VV, ZY, SM, and RD performed the experiments. M-AF, SH, and KL collected the samples and analyzed the data. J-PB, KA, and LP read and edited the final manuscript. KL designed and supervised the study. SH, M-AF, and KL wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## FUNDING

KL was supported by the Genicot Fund, by the Hope in Head Fund (Rotary), and by the Fonds pour l'encouragement de la recherche (ULB). J-PB was supported by grants from the Belgian Fonds de la Recherche Scientifique Médicale (T.0023.15), the Fund Aline (King Baudouin Foundation and Foundation for Alzheimer Research, FRA/SAO).

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Peter Davies for providing PHF1 and MC1 antibodies.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2020.00106/full#supplementary-material>.

**FIGURE S1** | Extravasation of immunoglobulins was detected in 5XFAD mice brain. **(A,B)** Detection of mouse immunoglobulins in the brain of WT **(A)** and 5XFAD mice **(B)**. A diffuse immunostaining (arrows) is observed around blood vessels (star) in 5XFAD mice whereas no immunoglobulin extravasation was detected in WT mice around blood vessel (star). Scale bar: 50  $\mu$ m.

- a mouse model of Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* 6:24939. doi: 10.1038/srep24939
- Baik, S. H., Kang, S., Son, S. M., and Mook-Jung, I. (2016). Microglia contributes to plaque growth by cell death due to uptake of amyloid  $\beta$  in the brain of Alzheimer's disease mouse model. *Glia* 64, 2274–2290. doi: 10.1002/glia.23074
- Batarseh, Y. S., Bharate, S. S., Kumar, V., Kumar, A., Vishwakarma, R. A., Bharate, S. B., et al. (2017). Crocus sativus extract tightens the blood-brain barrier, reduces amyloid  $\beta$  load and related toxicity in 5XFAD mice. *ACS Chem. Neurosci.* 8, 1756–1766. doi: 10.1021/acscchemneuro.7b00101
- Boimel, M., Grigoriadis, N., Loubopoulos, A., Haber, E., Abramsky, O., and Rosenmann, H. (2010). Efficacy and safety of immunization with phosphorylated tau against neurofibrillary tangles in mice. *Exp. Neurol.* 224, 472–485. doi: 10.1016/j.expneurol.2010.05.010
- Bolmont, T., Clavaguera, F., Meyer-Luehmann, M., Herzog, M. C., Radde, R., Staufenbiel, M., et al. (2007). Induction of tau pathology by intracerebral

- infusion of amyloid- $\beta$ -containing brain extract and by amyloid- $\beta$  deposition in APP x Tau transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 171, 2012–2020. doi: 10.2353/ajpath.2007.070403
- Bright, J., Hussain, S., Dang, V., Wright, S., Cooper, B., Byun, T., et al. (2015). Human secreted tau increases amyloid- $\beta$  production. *Neurobiol. Aging* 36, 693–709. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.007
- Brion, J. P., Hanger, D. P., Bruce, M. T., Couck, A. M., Flament-Durand, J., and Anderton, B. H. (1991). Tau in Alzheimer neurofibrillary tangles. N- and C-terminal regions are differentially associated with paired helical filaments and the location of a putative abnormal phosphorylation site. *Biochem. J.* 273, 127–133. doi: 10.1042/bj2730127
- Brion, J. P., Passareiro, H., Nunez, J., and Flament-Durand, J. (1985). Mise en évidence immunologique de la protéine tau au niveau des lésions de dégénérescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer. *Arch. Biol.* 95, 229–235.
- Brown, P. (1988). Human growth hormone therapy and Creutzfeldt-Jakob disease: a drama in three acts. *Pediatrics* 81, 85–92. doi: 10.1212/wnl.38.7.1135
- Brown, P., Brandel, J. P., Sato, T., Nakamura, Y., MacKenzie, J., Will, R. G., et al. (2012). Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease, final assessment. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 901–907. doi: 10.3201/eid1806.120116
- Buée, L., Bussière, T., Buée-Scherer, V., Delacourte, A., and Hof, P. R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Rev.* 33, 95–130. doi: 10.1016/s0165-0173(00)00019-9
- Chiu, M. J., Fan, L. Y., Chen, T. F., Chen, Y. F., Chieh, J. J., and Horng, H. E. (2017). Plasma tau levels in cognitively normal middle-aged and older adults. *Front. Aging Neurosci.* 9:51. doi: 10.3389/fnagi.2017.00051
- Clavaguera, F., Akatsu, H., Fraser, G., Crowther, R. A., Frank, S., Hench, J., et al. (2013). Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 110, 9535–9540. doi: 10.1073/pnas.1301175110
- Clavaguera, F., Hench, J., Lavenir, I., Schweighauser, G., Frank, S., Goedert, M., et al. (2014). Peripheral administration of tau aggregates triggers intracerebral tauopathy in transgenic mice. *Acta Neuropathol.* 127, 299–301. doi: 10.1007/s00401-013-1231-5
- DiCarlo, G., Wilcock, D., Henderson, D., Gordon, M., and Morgan, D. (2001). Intrahippocampal LPS injections reduce A $\beta$  load in APP+PS1 transgenic mice. *Neurobiol. Aging* 22, 1007–1012. doi: 10.1016/s0197-4580(01)00292-5
- Duyckaerts, C., Sazdovitch, V., Ando, K., Seilhean, D., Privat, N., Yilmaz, Z., et al. (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 A $\beta$  pathology. *Acta Neuropathol.* 135, 201–212. doi: 10.1007/s00401-017-1791-x
- Edgren, G., Hjalgrim, H., Rostgaard, K., Lambert, P., Wikman, A., Norda, R., et al. (2016). Transmission of neurodegenerative disorders through blood transfusion: a cohort study. *Ann. Intern. Med.* 165, 316–324. doi: 10.7326/M15-2421
- Fossati, S., Ramos Cejudo, J., Debure, L., Pirraglia, E., Sone, J. Y., Li, Y., et al. (2019). Plasma tau complements CSF tau and P-tau in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 11, 483–492. doi: 10.1016/j.dadm.2019.05.001
- Frederick, C., Ando, K., Leroy, K., Heraud, C., Suain, V., Buee, L., et al. (2015). Rapamycin ester analog CCI-779/temsirolimus alleviates tau pathology and improves motor deficit in mutant tau transgenic mice. *J. Alzheimers Dis.* 44, 1145–1156. doi: 10.3233/jad-142097
- Glenner, G. G., and Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 885–890. doi: 10.1016/s0006-291x(84)80190-4
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Cairns, N. J., and Crowther, R. A. (1992). Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8, 159–168. doi: 10.1016/0896-6273(92)90117-v
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y. C., Zaidi, M. S., and Wisniewski, H. M. (1986). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 261, 6084–6089.
- He, Z., Guo, J. L., McBride, J. D., Narasimhan, S., Kim, H., Changolkar, L., et al. (2018). Amyloid- $\beta$  plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation. *Nat. Med.* 24, 29–38. doi: 10.1038/nm.4443
- Héraud, C., Goufak, D., Ando, K., Leroy, K., Suain, V., Yilmaz, Z., et al. (2014). Increased misfolding and truncation of tau in APP/PS1/tau transgenic mice compared to mutant tau mice. *Neurobiol. Dis.* 62, 100–112. doi: 10.1016/j.nbd.2013.09.010
- Herber, D. L., Roth, L. M., Wilson, D., Wilson, N., Mason, J. E., Morgan, D., et al. (2004). Time-dependent reduction in A $\beta$  levels after intracranial LPS administration in APP transgenic mice. *Exp. Neurol.* 190, 245–253. doi: 10.1016/j.expneurol.2004.07.007
- Houben, S., Leroy, K., Ando, K., Yilmaz, Z., Widomski, C., Buee, L., et al. (2019). Genetic ablation of tau in postnatal neurons rescues decreased adult hippocampal neurogenesis in a tauopathy model. *Neurobiol. Dis.* 127, 131–141. doi: 10.1016/j.nbd.2019.02.021
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., et al. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733–736. doi: 10.1038/325733a0
- Kook, S. Y., Hong, H. S., Moon, M., Ha, C. M., Chang, S., and Mook-Jung, I. (2012). A $\beta$ <sub>1–42</sub>-RAGE interaction disrupts tight junctions of the blood-brain barrier via Ca<sup>2+</sup>-calineurin signaling. *J. Neurosci.* 32, 8845–8854. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6102-11.2012
- Kook, S. Y., Seok Hong, H., Moon, M., and Mook-Jung, I. (2013). Disruption of blood-brain barrier in Alzheimer disease pathogenesis. *Tissue Barriers* 1:e23993. doi: 10.4161/tisb.23993
- Lee, J. W., Lee, Y. K., Yuk, D. Y., Choi, D. Y., Ban, S. B., Oh, K. W., et al. (2008). Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of  $\beta$ -amyloid generation. *J. Neuroinflammation* 5:37. doi: 10.1186/1742-2094-5-37
- Leroy, K., Ando, K., Laporte, V., Dedecker, R., Suain, V., Authélet, M., et al. (2012). Lack of tau proteins rescues neuronal cell death and decreases amyloidogenic processing of APP in APP/PS1 mice. *Am. J. Pathol.* 181, 1928–1940. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.08.012
- Leroy, K., Bretteville, A., Schindowski, K., Gilissen, E., Authélet, M., De Decker, R., et al. (2007). Early axonopathy preceding neurofibrillary tangles in mutant tau transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 171, 976–992. doi: 10.2353/ajpath.2007.070345
- Leroy, K., Menu, R., Conreur, J. L., Dayanandan, R., Lovestone, S., Anderton, B. H., et al. (2000). The function of the microtubule-associated protein tau is variably modulated by graded changes in glycogen synthase kinase-3 $\beta$  activity. *FEBS Lett.* 465, 34–38. doi: 10.1016/s0014-5793(99)01720-2
- Lewis, J., Dickson, D. W., Lin, W. L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., et al. (2001). Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 293, 1487–1491. doi: 10.1126/science.1058189
- Lin, S. Y., Hsu, W. H., Lin, C. C., Lin, C. L., Yeh, H. C., and Kao, C. H. (2019). Association of transfusion with risks of dementia or Alzheimer's disease: a population-based cohort study. *Front. Psychiatry* 10:571. doi: 10.3389/fpsy.2019.00571
- Llewellyn, C. A., Hewitt, P. E., Knight, R. S., Amar, K., Cousens, S., Mackenzie, J., et al. (2004). Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 363, 417–421. doi: 10.1016/S0140-6736(04)15486-X
- Lue, L. F., Pai, M. C., Chen, T. F., Hu, C. J., Huang, L. K., Lin, W. C., et al. (2019). Age-dependent relationship between plasma A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 and total tau levels in cognitively normal subjects. *Front. Aging Neurosci.* 11:222. doi: 10.3389/fnagi.2019.00222
- Maphis, N., Xu, G., Kokiko-Cochran, O. N., Cardona, A. E., Ransohoff, R. M., Lamb, B. T., et al. (2015). Loss of tau rescues inflammation-mediated neurodegeneration. *Front. Neurosci.* 9:196. doi: 10.3389/fnins.2015.00196
- Metaxas, A., Thygesen, C., Kempf, S. J., Anzalone, M., Vaitheeswaran, R., Petersen, S., et al. (2019). Ageing and amyloidosis underlie the molecular and pathological alterations of tau in a mouse model of familial Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* 9:15758. doi: 10.1038/s41598-019-52357-5
- Montagne, A., Barnes, S. R., Sweeney, M. D., Halliday, M. R., Sagare, A. P., Zhao, Z., et al. (2015). Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron* 85, 296–302. doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.032

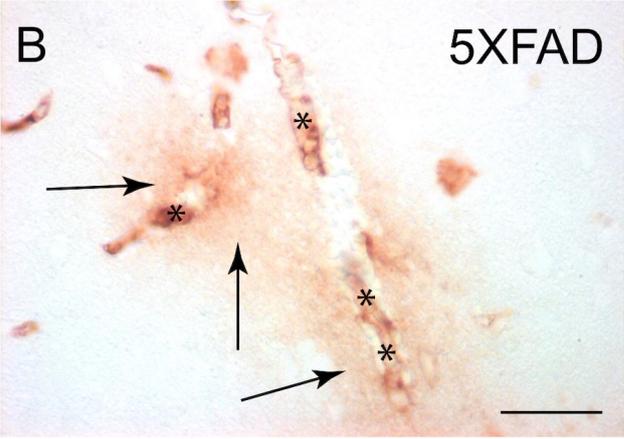
- Mudher, A., Colin, M., Dujardin, S., Medina, M., Dewachter, I., Alavi Naini, S. M., et al. (2017). What is the evidence that tau pathology spreads through prion-like propagation? *Acta. Neuropathol. Commun.* 5:99. doi: 10.1186/s40478-017-0488-7
- Nelson, P. T., Alafuzoff, I., Bigio, E. H., Bouras, C., Braak, H., Cairns, N. J., et al. (2012). Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 71, 362–381. doi: 10.1097/NEN.0b013e31825018f7
- Oakley, H., Cole, S. L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., et al. (2006). Intraneuronal  $\beta$ -amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J. Neurosci.* 26, 10129–10140. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., et al. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409–421. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00434-3
- O'Meara, E. S., Kukull, W. A., Schellenberg, G. D., Bowen, J. D., McCormick, W. C., Teri, L., et al. (1997). Alzheimer's disease and history of blood transfusion by apolipoprotein-E genotype. *Neuroepidemiology* 16, 86–93. doi: 10.1159/000109675
- Poncelet, L., Ando, K., Vergara, C., Mansour, S., Suain, V., Yilmaz, Z., et al. (2019). A 4R tauopathy develops without amyloid deposits in aged cat brains. *Neurobiol. Aging* 81, 200–212. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2019.05.024
- Rosenberg, G. A. (2014). Blood-brain barrier permeability in aging and Alzheimer's disease. *J. Prev. Alzheimers Dis.* 1, 138–139. doi: 10.14283/jpad.2014.25
- Rozenstein-Tsalkovich, L., Grigoriadis, N., Loubopoulos, A., Nousiopoulou, E., Kassis, I., Abramsky, O., et al. (2013). Repeated immunization of mice with phosphorylated-tau peptides causes neuroinflammation. *Exp. Neurol.* 248, 451–456. doi: 10.1016/j.expneurol.2013.07.006
- Schindowski, K., Bretteville, A., Leroy, K., Begard, S., Brion, J. P., 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. doi: 10.2353/ajpath.2006.060002
- Selenica, M. L., Benner, L., Housley, S. B., Manchec, B., Lee, D. C., Nash, K. R., et al. (2014). Histone deacetylase 6 inhibition improves memory and reduces total tau levels in a mouse model of tau deposition. *Alzheimers Res. Ther.* 6:12. doi: 10.1186/alzrt241
- Spangenberg, E., Severson, P. L., Hohsfield, L. A., Crapser, J., Zhang, J., Burton, E. A., et al. (2019). Sustained microglial depletion with CSF1R inhibitor impairs parenchymal plaque development in an Alzheimer's disease model. *Nat. Commun.* 10:3758. doi: 10.1038/s41467-019-11674-z
- Stygelbout, V., Leroy, K., Pouillon, V., Ando, K., D'Amico, E., Jia, Y., et al. (2014). Inositol trisphosphate 3-kinase B is increased in human Alzheimer brain and exacerbates mouse Alzheimer pathology. *Brain* 137, 537–552. doi: 10.1093/brain/awt344
- Tatebe, H., Kasai, T., Ohmichi, T., Kishi, Y., Kakeya, T., Waragai, M., et al. (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. *Mol. Neurodegener.* 12:63. doi: 10.1186/s13024-017-0206-8
- Terwel, D., Muyliaert, D., Dewachter, I., Borghgraef, P., Croes, S., Devijver, H., et al. (2008). Amyloid activates GSK-3 $\beta$  to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice. *Am. J. Pathol.* 172, 786–798. doi: 10.2353/ajpath.2008.070904
- van de Haar, H. J., Burgmans, S., Jansen, J. F., van Osch, M. J., van Buchem, M. A., Muller, M., et al. (2016). Blood-brain barrier leakage in patients with early Alzheimer disease. *Radiology* 281, 527–535. doi: 10.1148/radiol.2016152244
- Vanden Dries, V., Stygelbout, V., Pierrot, N., Yilmaz, Z., Suain, V., De Decker, R., et al. (2017). Amyloid precursor protein reduction enhances the formation of neurofibrillary tangles in a mutant tau transgenic mouse model. *Neurobiol. Aging* 55, 202–212. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.03.031
- Vergara, C., Houben, S., Suain, V., Yilmaz, Z., De Decker, R., Vanden Dries, V., et al. (2019). Amyloid- $\beta$  pathology enhances pathological fibrillary tau seeding induced by Alzheimer PHF *in vivo*. *Acta Neuropathol.* 137, 397–412. doi: 10.1007/s00401-018-1953-5
- Wegiel, J., and Wisniewski, H. M. (1990). The complex of microglial cells and amyloid star in three-dimensional reconstruction. *Acta Neuropathol.* 81, 116–124. doi: 10.1007/bf00334499
- Wisniewski, H. M., Vorbrodt, A. W., and Wegiel, J. (1997). Amyloid angiopathy and blood-brain barrier changes in Alzheimer's disease. *Ann. N Y Acad. Sci.* 826, 161–172. doi: 10.1111/j.1749-6632.1997.tb48468.x
- Wroe, S. J., Pal, S., Siddique, D., Hyare, H., Macfarlane, R., Joiner, S., et al. (2006). Clinical presentation and pre-mortem diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease associated with blood transfusion: a case report. *Lancet* 368, 2061–2067. doi: 10.1016/S0140-6736(06)69835-8
- Yamazaki, Y., Shinohara, M., Shinohara, M., Yamazaki, A., Murray, M. E., Liesinger, A. M., et al. (2019). Selective loss of cortical endothelial tight junction proteins during Alzheimer's disease progression. *Brain* 142, 1077–1092. doi: 10.1093/brain/awz011
- Yang, C. C., Chiu, M. J., Chen, T. F., Chang, H. L., Liu, B. H., and Yang, S. Y. (2018). Assay of plasma phosphorylated tau protein (Threonine 181) and total tau protein in early-stage Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 61, 1323–1332. doi: 10.3233/JAD-170810
- Zetterberg, H., Wilson, D., Andreasson, U., Minthon, L., Blennow, K., Randall, J., et al. (2013). Plasma tau levels in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* 5:9. doi: 10.1186/alzrt163

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Houben, de Fisenne, Ando, Vanden Dries, Poncelet, Yilmaz, Mansour, De Decker, Brion and Leroy. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

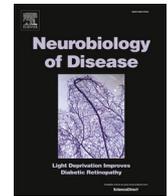


Supplemental figure 1



Suppl. Table 1 : Primary antibodies used in this study.

<b>Name of the antibody</b>	<b>Epitope</b>	<b>Host</b>	<b>Source/ Reference</b>
PHF1	Phosphorylated tau on ser 396/404	Mouse monoclonal	Otvos et al., 1994
MC1	Tau conformational epitope requiring both N-terminal fragment and a C-terminal fragment	Mouse monoclonal	Jicha et al., 1997
AT8	Phosphorylated tau on ser 202/Thr 205	Mouse monoclonal	Thermo Fisher, MN1020
pThr231	Phosphorylated tau on Thr 231	Rabbit polyclonal	Sigma, AB9668
B19	Total tau	Rabbit polyclonal	Brion et al., 1991
BR21	Human tau	Rabbit polyclonal	Ando et al., 2011
mTau5	Murine tau	Mouse monoclonal	Sennvik et al., 2007
Iba1	135-147 amino acids of Iba1	Goat polyclonal	Abcam, Ab5076
GFAP	Pig GFAP	Mouse monoclonal	Sigma, G3893
A $\beta$ 40	anti-amyloid A $\beta$ 40	Rabbit polyclonal	Thermo Fisher, 44-136
A $\beta$ 42	Anti-amyloid A $\beta$ 42	Rabbit polyclonal	Thermo Fisher, 44-344
6E10	1-16 N-terminal amino acids of amyloid	Mouse monoclonal	Novus Biologicals, NBP2-62566



# Alzheimer PHF-tau aggregates do not spread tau pathology to the brain via the Retino-tectal projection after intraocular injection in male mouse models

M.-A. de Fisenne<sup>a</sup>, Z. Yilmaz<sup>a</sup>, R. De Decker<sup>a</sup>, V. Suain<sup>a</sup>, L. Buée<sup>b</sup>, K. Ando<sup>a</sup>, J.-P. Brion<sup>a</sup>, K. Leroy<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Histology, Neuroanatomy and Neuropathology, ULB Neuroscience Institute, Université Libre de Bruxelles, Faculty of Medicine, Brussels, Belgium

<sup>b</sup> INSERM, U837. Université de Lille 2, Lille, France

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Neurofibrillary tangles  
Intraocular injection  
Transgenic mouse  
Alzheimer's disease  
Retina  
Tau pathology propagation

## ABSTRACT

Neurofibrillary tangles (NFT), a neuronal lesion found in Alzheimer's disease (AD), are composed of fibrillary aggregates of modified forms of tau proteins. The propagation of NFT follows neuroanatomical pathways suggesting that synaptically connected neurons could transmit tau pathology by the recruitment of normal tau in a prion-like manner. Moreover, the intracerebral injection of pathological tau from AD brains induces the seeding of normal tau in mouse brain. Creutzfeldt-Jacob disease has been transmitted after ocular transplants of cornea or sclera and the scrapie agent can spread across the retino-tectal pathway after intraocular injection of scrapie mouse brain homogenates. In AD, a tau pathology has been detected in the retina. To investigate the potential risk of tau pathology transmission during eye surgery using AD tissue material, we have analysed the development of tau pathology in the visual pathway of mice models expressing murine tau, wild-type or mutant human tau after intraocular injection of pathological tau proteins from AD brains. Although these pathological tau proteins were internalized in retinal ganglion cells, they did not induce aggregation of endogenous tau nor propagation of a tau pathology in the retino-tectal pathway after a 6-month incubation period. These results suggest that retinal ganglion cells exhibit a resistance to develop a tau pathology, and that eye surgery is not a major iatrogenic risk of transmission of tau pathology, contrary to what has been observed for transmission of infectious prions in prion diseases.

## 1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by the presence of neuronal lesions called neurofibrillary tangles composed of abnormally phosphorylated and aggregated tau proteins. These aggregated tau proteins found in neurofibrillary tangles form abnormal filaments called paired helical filaments (PHF). The development of tau pathology in brain of Alzheimer's disease (AD) patients is graded into 6 stages according to the neuroanatomical localisation and the density of NFT (Braak and Braak, 1991). Interestingly, the formation of NFT in the brain is not random but follows neuroanatomical pathways suggesting that synaptically connected neurons could transmit tau pathology by transcellular transfer of abnormal tau. In vitro and in vivo studies have suggested that abnormal tau can recruit and seed the

formation of new tau aggregates by a "Prion-like" mechanism (Mudher et al., 2017). Previous studies have shown that the intracerebral injection of pathological tau proteins (PHF-tau proteins) from AD brains induces the seeding of normal murine and human tau in mouse brain indicating that pathological tau can recruit endogenous tau to adopt a pathological form (Clavaguera et al., 2013; Audouard et al., 2016; Vergara et al., 2019).

The scrapie agent can spread across the retino-tectal pathway along neuronal pathways via axons emerging from the retina after intraocular injection of terminally affected scrapie mouse brain homogenates (Fraser, 1982). Infectious prions have been found in the retina and optic nerve in Creutzfeldt-Jacob patients and this disease has been transmitted after ocular transplants of cornea or sclera (Duffy et al., 1974; Heckmann et al., 1997; Mehta and Franks, 2002; Head et al., 2003; Head

\* Corresponding author at: Laboratory of Histology, Neuroanatomy and Neuropathology, Université Libre de Bruxelles, Faculty of Medicine, 808, route de Lennik, Bldg GE, CP620, 1070, Brussels, Belgium.

E-mail address: [Karelle.leroy@ulb.be](mailto:Karelle.leroy@ulb.be) (K. Leroy).

<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105875>

Received 22 April 2022; Received in revised form 27 August 2022; Accepted 21 September 2022

Available online 22 September 2022

0969-9961/© 2022 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

et al., 2005). In Alzheimer's disease, a tau pathology has been detected in the inner cell layer and in the inner and outer plexiform layers of the retina (Schön et al., 2012; Den Haan et al., 2018). Moreover, the presence of phosphorylated tau has been demonstrated in eye fluids suggesting that all eye tissues could be potentially contaminated by these tau proteins (Gijts et al., 2021; Romaus-Sanjurjo et al., 2022). However, it is not known if pathological tau could seed the aggregation of normal tau after optical surgery or graft. To investigate the ability of PHF-tau proteins from AD brains to seed murine or human tau and induce spreading of tau pathology in the brain after an ocular contamination, we have investigated the formation of tau pathology in the retina, the lateral geniculate nucleus and the superior colliculus after the injection of PHF-tau proteins from AD brains in the eye vitreous chamber of mice expressing murine or human tau.

## 2. Material and methods

### 2.1. Human brain tissue

Human brain tissue samples were taken at autopsy from a demented patient clinically diagnosed as having AD (60 years old, female, post-mortem delay of 24 h, NFT Braak stage VI and amyloid plaques Thal stage 4) or from a nondemented control subject (67 years old, male, post-mortem delay of 24 h). Tissue samples were fixed with formalin 10% and embedded in paraffin for neuropathological examination or were kept at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The neuropathological examination confirmed the presence of NFT and amyloid plaques in this AD case and their absence in the control case. This study on postmortem brain tissue was performed in compliance and following approval of the Ethical Committee of the Medical School of the Free University of Brussels.

### 2.2. Preparation of human sarkosyl-insoluble PHF-Tau fraction

Sarkosyl fractionation of human brain tissue was performed as previously described (Brion et al., 1991a; Vergara et al., 2019). 0.5 g of frozen frontal cortex from AD and control cases was homogenized in 10 volumes of ice-cold PHF-extraction buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.8 M NaCl, 1 mM EDTA, 10% sucrose). The homogenate was centrifuged at 15,000 xg for 20 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . N-lauroylsarcosine sodium salt (L-5125; Sigma-Aldrich) was added to the supernatant to reach a final concentration of 1% (w/v). The lysate was incubated at  $4^{\circ}\text{C}$  overnight with a mild agitation followed by an ultracentrifugation at 180,000 xg for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The Sarkosyl soluble supernatant was removed and the Sarkosyl-insoluble pellet containing PHF was gently rinsed and re-suspended in 0.25 ml of PBS by vigorous pipetting. The protein concentration was determined by Bradford protein assay (Bio-Rad) and adjusted to 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  for the AD case or 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  for the control case. These Sarkosyl fractions were aliquoted and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$ . This study on postmortem brain tissue was performed in compliance and following approval of the Ethical Committee of the Medical School of the Free University of Brussels.

### 2.3. Negative staining of Tau filaments by transmission electron microscopy

The Sarkosyl-insoluble material was ultrastructurally characterized by transmission electron microscopy. This material was adsorbed on formvar-carbon-coated EM grids and negatively stained with potassium phosphotungstate as reported (Vergara et al., 2019) before observation with a Zeiss EM 809 T at 80 kV. The average length of sarkosyl insoluble filaments was measured on 200 filaments with ImageJ software.

### 2.4. Biosensor FRET cells

The biosensor cellular assay (FRET) used cultured cells expressing a tau repeat domain (RD) fused to CFP and a tau RD fused to YFP (Furman

et al., 2015). This bio-assay is based on the uptake of seeds into cells which induces aggregation of tau-CFP and tau-YFP, producing a FRET signal. Cells were plated at a density of 400,000 cells per well in a 6-well plate. Eighteen hours later, cells were transfected with liposomes preparation by combining Xtremegene HP transfection reagent (Roche) with sarkosyl fractions from CTL or AD brains in Optimem medium. Liposome preparation was incubated 20 min at room temperature before adding to cells. Cells were observed with a Zeiss Axioplan microscope twenty-four hours after transfection.

### 2.5. Western blotting

The protein assay was performed with the Bradford method (Biorad). Sarkosyl insoluble fractions were heated in Laemmli buffer at  $100^{\circ}\text{C}$  for 5 min and were analysed by western blotting with anti-total tau B19 and anti-phosphotau PHF-1 antibodies as previously described (Frederick et al., 2015; Vanden Dries et al., 2017). Fractions (5  $\mu\text{g}/\text{lane}$ ) were run in 10% Tris-glycine SDS-PAGE gels and transferred on nitrocellulose membranes. The nitrocellulose sheets were blocked in semifat dry milk (10% (w/v) in Tris-buffered saline) for 1 h at room temperature and they were incubated with primary antibodies overnight followed by anti-rabbit or anti-mouse immunoglobulins conjugated to peroxidase. Finally, the membranes were incubated in pico substrate (Pierce). The ECL signal was captured using a Fusion SOLO 4S system equipped with a DARQ-7 camera and the fusion-capt software (Vilber-Lourmat). Blot quantitation was performed with ImageJ software (NIH) and data normalization between blots was performed by placing a standard in each blot. The standard used is a brain homogenate of a Tg22 mouse.

### 2.6. Mouse lines

Tg22 mice (also referred to as THY-Tau22 mice) express a 1N4R human tau isoform mutated at positions G272V and P301S, under control of a Thy1 promoter, and display tau pathology in absence of motor dysfunction (Schindowski et al., 2006). Gallyas-positive neurofibrillary tangles appear in the cortex and the hippocampus at 6 months of age in these mice (Schindowski et al., 2006). Only male heterozygous Tg22 mice were used in this study and male littermates non-transgenic mice (pooled and named hereafter with C57BL/6 J wild-type mice) were also used in this study.

hTau mice express the six human tau isoforms, under tau promoter, in the absence of murine tau (Andorfer et al., 2003). Briefly, it was made by crossing two mice lines, 8c mice, that produce all human tau isoforms (Duff et al., 2000) and TauKO mice that do not express murine tau, by disrupting MAPT gene with a cDNA for enhanced green fluorescent protein (EGFP) inserted into exon one (Tucker et al., 2001). Only male heterozygous animals for the hTau transgene were used in this study and male littermates that do not carry the hTau transgene but are KO for murine tau and named TauKO were used as controls.

All mouse lines were maintained on a C57BL/6 genetic background. Mice were genotyped by PCR using previously described primers for human tau, murine tau and GFP on genomic DNA as reported (Andorfer et al., 2003; Schindowski et al., 2006; Ando et al., 2011). All mice were maintained on a 12 h light/dark cycle, with food and water ad libitum. All studies on animals were performed in compliance and following approval of the Ethical committee for the care and use of laboratory animals of the medical School of the Free University of Brussels.

### 2.7. Intravitreal injection

Animals were anesthetized with a solution of xylazine 2% (Rompun, Bayer) and ketamine (10% v/v) (Nimatek, Eurovet) in physiological serum by intraperitoneal injection (100  $\mu\text{l}/10\text{ g}$  of body weight, final dose, 10 mg/kg xylazine, and 75 mg/kg ketamine). One drop of oxybuprocaine chlorhydrate 0,4% (4 mg/ml) (Unicaïne, Théa) was applied to the mouse eye as a topical anesthetic before intravitreal injection.

Mice were injected into the eye posterior vitreous chamber under a stereomicroscope with a 33 gauge needle connected to a Hamilton microsyringue (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Switzerland).

Two micrograms of Sarkosyl-insoluble material from AD brain or one microgram from CTL brain was injected in a volume of 1  $\mu$ l which corresponded to 3,5 mg of AD or CTL brain tissues.

2  $\mu$ g of cholera toxin subunit B (ThermoFisher) was injected in a volume of 1  $\mu$ l in three WT mice as positive control to validate the injection method and to visualize the toxin along the visual pathway as previously described (Angelucci et al., 1996)

## 2.8. Stereotaxic injection

Six-month-old WT mice were deeply anesthetized with a solution of xylazine (2% v/v) (Rompun, Bayer) and ketamine (10% v/v) (Nimatek) in physiological saline by intraperitoneal injection (100  $\mu$ l/10 g of body weight), final dose 10 mg/kg xylazine and 100 mg/kg ketamine). Unilateral stereotaxic injections were performed using a stereotaxic apparatus (Kopf instruments, Tujunga, CA) in the left primary somatosensory cortex (rostro-caudal -1,46 mm; lateral +0,15 mm; depth - 0,10 mm) as previously described (Vergara et al., 2019). One microgram of Sarkosyl-insoluble material was injected in a volume of 1  $\mu$ l at the concentration of 1  $\mu$ g/ $\mu$ l at a speed of 0.1  $\mu$ l/min with a pump (kdScientific), using a 200  $\mu$ m diameter needle (ThermoFisher). The needle was gently removed 5 min after injection.

## 2.9. Antibodies

The tau antibody (DAKO, A0024) is a rabbit polyclonal antibody raised to human, mouse and rat tau proteins. The B19 antibody, used to detect PHF in AD sarkosyl fraction by western blotting (Fig. 2), is a rabbit polyclonal antibody raised to adult bovine tau proteins. This antibody reacts with adult and fetal tau isoforms in bovine, rat, mouse and human nervous tissue in a phosphorylation-independent-manner (Brion et al., 1991b; Leroy et al., 2000). The BR21 rabbit polyclonal antibody is specific for human tau (Ando et al., 2011). The mouse monoclonal antibodies AT8 (Thermo Fisher, MN1020) and PHF-1 (kindly provided by Drs. P. Davies and S. Greenberg, New York) recognize tau phosphorylated at Ser 202 and Thr205 (Goedert et al., 1995) and at Ser396 and Ser404 respectively (Otvos Jr et al., 1994). The mouse monoclonal MC1 antibody (generous gift from Dr. P. Davis) recognizes a conformational epitope requiring both an N-terminal and a C-terminal fragments of tau (Jicha et al., 1997). The antibody raised against the subunit B of cholera toxin is a polyclonal goat antibody purchased from Calbiochem (227040).

## 2.10. Histological staining and immunohistochemistry

Mice were sacrificed by cervical dislocation and a sample number has been given allowing blinded analysis concerning the type of treatments that mice received. Eyes, optic nerves and brains were fixed in 10% formalin for 24 h before embedding in paraffin. Tissue sections (7  $\mu$ m thick) and immunohistochemical labellings were performed using the ABC method as previously described (Stygelbout et al., 2014). Briefly, tissue sections were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to inhibit endogenous peroxidase and incubated with the blocking solution (10% normal horse serum in TBS). After an overnight incubation with the diluted primary antibody, the sections were sequentially incubated with either horse anti-mouse or goat anti-rabbit antibodies conjugated to biotin (Vector Laboratories) followed by the ABC complex (Vector Laboratories). The peroxidase activity was developed using diaminobenzidine (DAB) as chromogen. Slides were counterstained with hematoxylin and examined with a Zeiss Axioplan microscope. Digital images were acquired using an AxioCam HRc camera (Zeiss) and the Axiovision software (Zeiss).

## 2.11. Quantification of tau pathology

After immunolabelling with the AT8, PHF-1 and MC1 antibodies, the density of phospho-tau positive neurons in the lateral geniculate nucleus and in the superior colliculus was estimated in mice injected with AD or CTL fractions. Three adjacent sections were used per brain sample. The Stereo Investigator system software from MBF Bioscience associated to the AxioImager microscope (Zeiss) were used to perform automatically and systematic analyses of the entire geniculate or superior colliculus areas. The surface of the lateral geniculate nucleus or of the superior colliculus was measured on each section with the software and phospho-tau positive neurons were manually tagged. As a result, we calculated a density of phospho-tau positive neurons expressed as a number of positive neurons/mm<sup>2</sup>.

## 2.12. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Prism program version 5.0 (Graphpad Software, San Diego, CA). Statistical comparisons were performed using (two-tailed) Mann-Whitney test to compare two groups. Values of  $p < 0.05$  were considered significant. Numbers of samples are indicated in the figure legends and ranges represent means  $\pm$  SD.

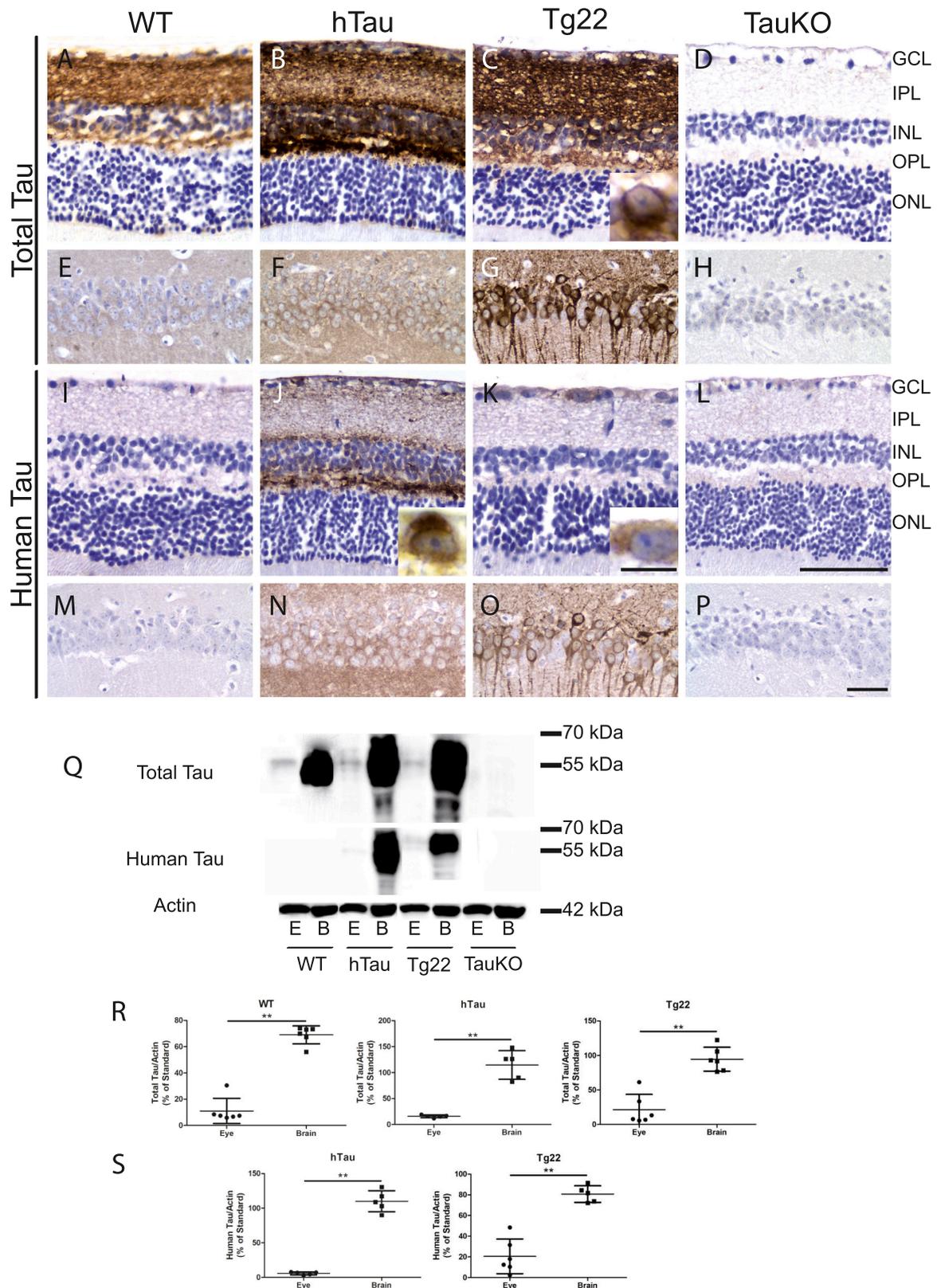
## 3. Results

### 3.1. Localisation and expression of tau in the retina

In this study, experiments have been done in mice that express murine tau (non-transgenic wild-type (WT) mice), human WT tau (hTau mice), human mutant tau and murine tau (Tg22 mice) or mice deficient in tau proteins (TauKO mice). To evaluate the distribution of tau proteins in the retina of these different mice models, an immunolabelling with anti-total tau or anti-human tau antibodies was performed on the retina of WT (Fig. 1 A and I), hTau (Fig. 1 B and J), Tg22 (Fig. 1 C and K) and TauKO mice (Fig. 1 D and L). Total tau antibody detected tau proteins in the ganglion cell layer, in the inner plexiform layer, in the inner nuclear layer and in the outer plexiform layer of WT (Fig. 1 A), hTau (Fig. 1 B) and Tg22 (Fig. 1 C) mice retina. Human tau proteins were detected in the ganglion cell layer, in the inner and outer plexiform layers of hTau mice retina (Fig. 1 J). Tau proteins are expressed under the human tau promoter in this model. In Tg22 mice retina (Fig. 1 K), human tau proteins, expressed the Thy1.2 promoter, were only present in the ganglion cell layer. Moreover, human tau proteins were detected in the cell bodies of ganglion cells (small insets in Fig. 1 J and K). However, by Western blot analysis tau expression was found to be quite significantly lower in the retina compared to the brain in the different mouse models (total tau (WT:  $p = 0.0022$ ; hTau:  $p = 0.0079$  and Tg22:  $p = 0.0022$ ) and human tau (hTau:  $p = 0.0079$  and Tg22:  $p = 0.0043$ )) (Fig. 1 Q, R and S), e.g. being up to 10 times lower in the eye compared to the brain in WT mice. Human tau proteins were not detected in WT mice retina or brain (Fig. 1 I, M Q and S) and were never detected with anti-tau antibodies in the retina of TauKO mice as expected (Fig. 1 D, L and Q).

### 3.2. Characterisation of human Alzheimer sarkosyl fractions and seeding abilities

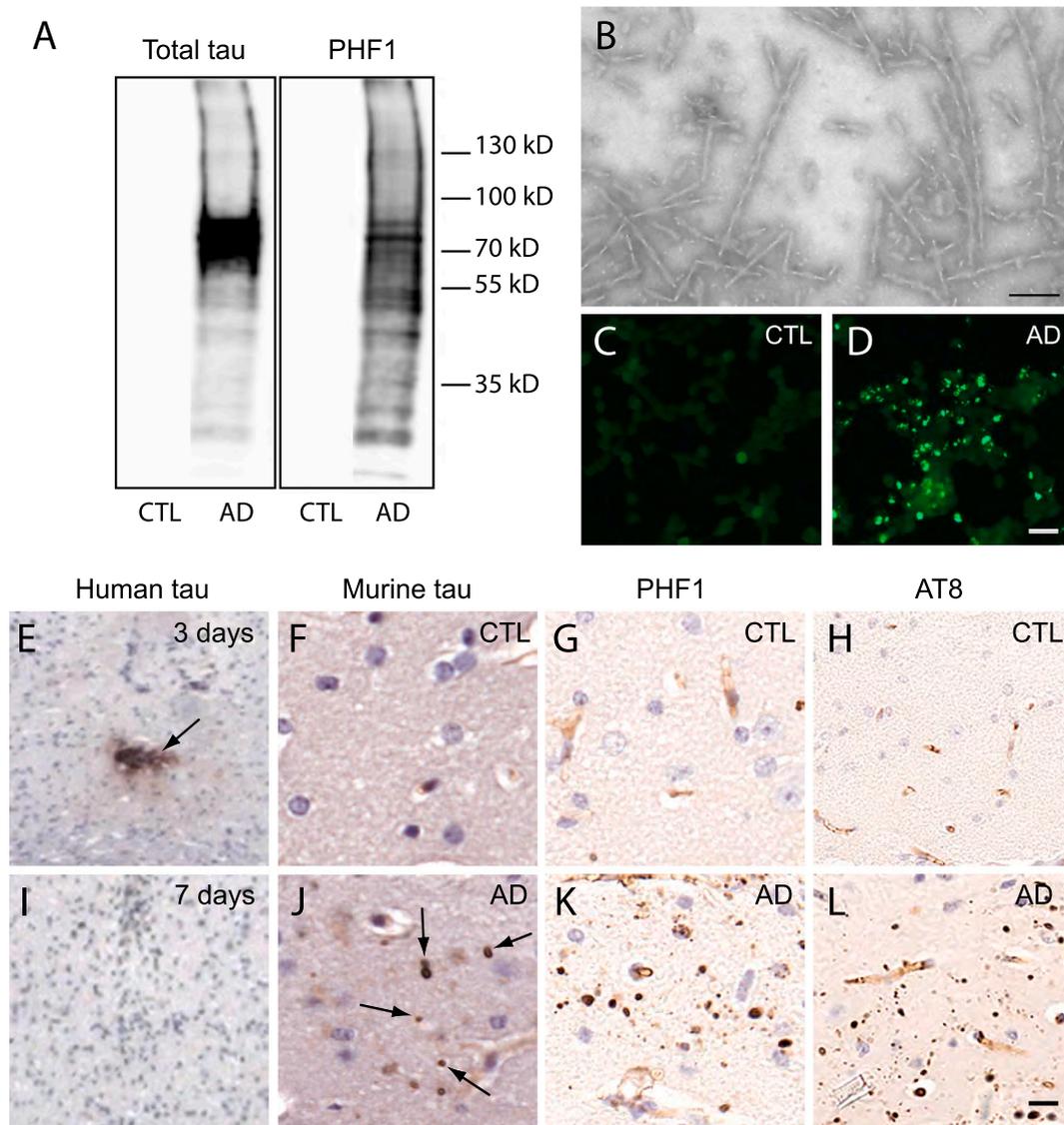
Before the intraocular injection, we have characterized sarkosyl fractions isolated from non-demented (named control (CTL)) or AD brains for the presence of tau proteins and the seeding abilities of these fractions in cultured cells or after stereotaxic injection in the brain (as positive controls) (Fig. 2). Phosphorylated tau proteins were detected with total or PHF-1 antibodies by western blotting in AD sarkosyl fraction (PHF-tau proteins) but were absent in CTL sarkosyl fractions (Fig. 2 A). The presence of tau filaments in the form of PHF in sarkosyl fractions



**Fig. 1.** Localization and expression of tau proteins in the retina of different mouse models. A-P: Immunolabelling with anti-total tau antibody (A-H) or with anti-human tau antibody (I-P) on the retina (A-D and I-L) or the hippocampus (E-H and M-P) of WT (A, E, I, M), hTau (B, F, J, N), Tg22 (C, G, K, O) and TauKO mice (D, H, L, P). Scale bars: L and P: 50 μm, small window in K: 10 μm.

Q: Western blotting of retina or brain homogenates of WT, hTau, Tg22 and TauKO mice with anti-total or anti-human tau antibodies. Actin was used as a control of charge.

R and S: Quantification of the expression of total tau (R) or human tau (S) proteins in retina and brain homogenates of WT, hTau and Tg22 mice. The results are presented as a percentage of the standard (which is 100%). The level of tau expression is significantly higher in brains compared to retinas in the different mice models (WT (n = 6), hTau (n = 5) and Tg22 (n = 6)). Two-tailed Mann-Whitney test, \*\* = p < 0.01.



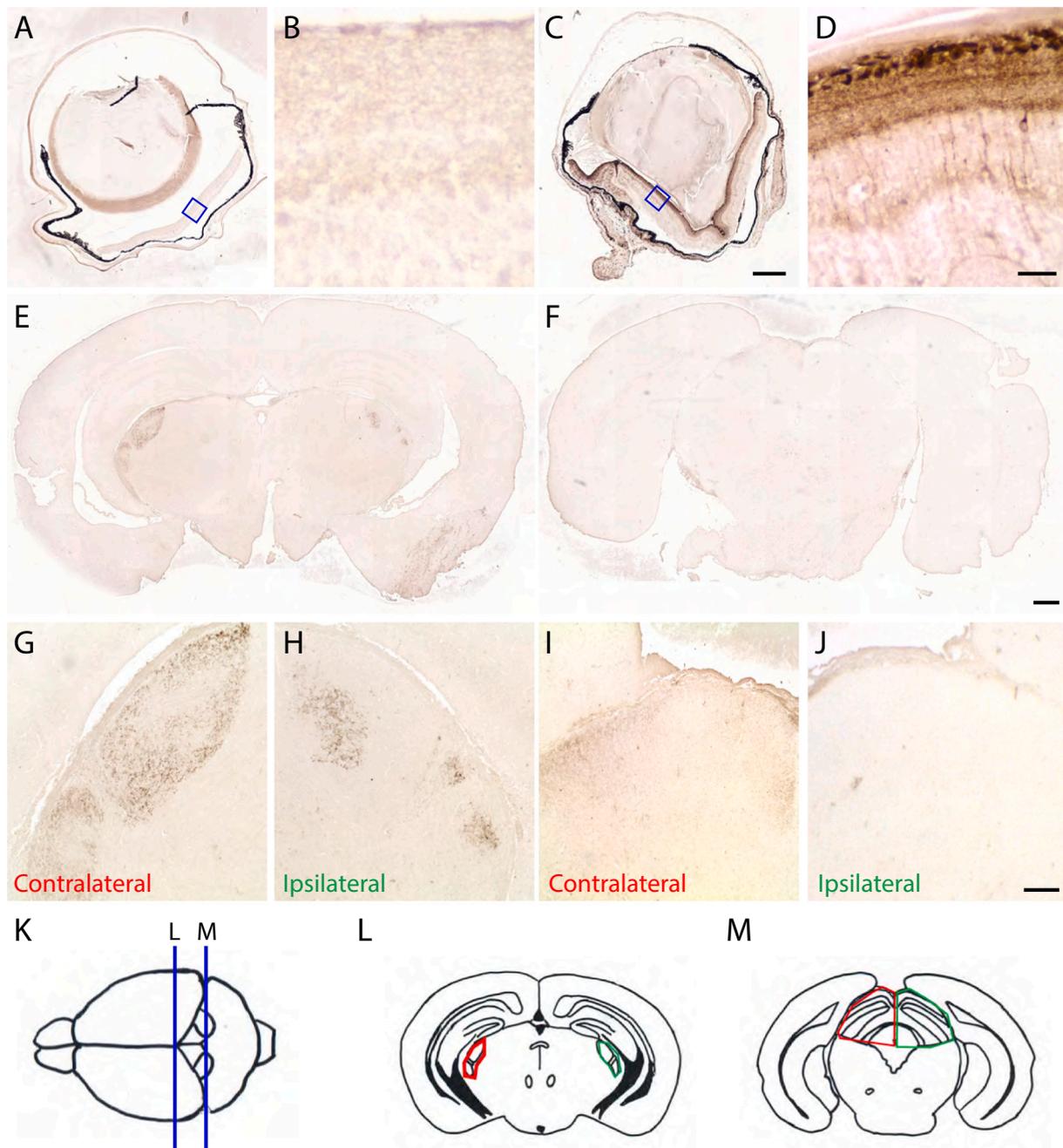
**Fig. 2.** PHF-tau proteins from AD sarkosyl fraction have the ability to induce the seeding of tau in cultured cells or in the brain of WT mice after stereotaxic injection. **A:** Western blotting of sarkosyl insoluble fraction from control (CTL) or Alzheimer's disease (AD) brains (PHF-tau) with anti-phosphotau antibody (PHF1) or total tau antibody (B19). Tau immunoreactivity was detected in sarkosyl fraction from AD brain but not in sarkosyl fraction from CTL brain. **B:** Sarkosyl insoluble fraction from AD brain contains paired helical filaments (PHF) observed by transmission electron microscopy. Scale bar: 50 nm. **C and D:** Detection of FRET signals in biosensor cells treated with CTL (C) or AD sarkosyl fractions. FRET signal is observed in AD treated cells (D) but absent in CTL treated cells (C). **E – L:** Immunolabelling on mouse brains intracerebrally injected by stereotaxy in the primary somatosensory cortex with sarkosyl fraction from CTL (F-H) or AD (E, I-L) sarkosyl fractions with anti-human tau (E and I), anti-murine tau (F and J), and with anti-phosphotau antibodies (PHF-1 in G and K, AT8 in H and L). Injected material was detected in the brain 3 days after injection (E) and has disappeared 7 days after injection (I). 3 months after injection, tau positive inclusions were observed in mice injected with AD fraction (J-L) but not in mice injected with CTL fraction (F-H). Slides were counterstained with Hematoxylin. Scale bar: 20  $\mu$ m.

from AD brain was confirmed by negative staining by electron microscopy (Fig. 2 B). The seeding ability of PHF-tau proteins in AD sarkosyl fraction was tested in the biosensor FRET assay cells (Fig. 2 C and D). We have observed a FRET signal in cells treated with AD sarkosyl fraction (Fig. 2 C) but not in cells treated with CTL sarkosyl fractions (Fig. 2 D) suggesting a seeding of recombinant tau by AD sarkosyl fraction in these cells. Moreover, we have analysed the seeding capacity of PHF-tau proteins after intracerebral injection in the somatosensory cortex of WT mice. We have detected human AD PHF-tau proteins (injected material) in the brain of WT mice 3 days after stereotaxic injection, but this material is not anymore detectable 7 days after the injection. 3 months after intracerebral injection of PHF-tau proteins, we have observed a seeding of murine tau in a highly phosphorylated state in WT mice (Fig. 2 J-L) whereas no seeding was observed after injection of CTL

sarkosyl fractions (Fig. 2 F-H). Tau pathology propagated on approximately 1.2 mm in the anteroposterior axis but also in the contralateral part of the brain by the corpus callosum indicating that our PHF-tau proteins have seeding and propagating properties as we previously described (Audouard et al., 2016; Vergara et al., 2019).

### 3.3. Detection of the Cholera Toxin subunit B in the visual pathway

To validate our intraocular injection technique, we have first injected the cholera toxin subunit B in the posterior vitreous chamber of WT mice (Fig. 3). As previously described (Angelucci et al., 1996), cholera toxin subunit B was detected 24 h after the injection, in the ganglion cell layer of the retina, in the geniculate nucleus and the superior colliculus of the contralateral side of the brain (Fig. 3C-J). We have also observed



**Fig. 3.** Detection of the Cholera Toxin subunit B in the retina and in the brain of injected WT mice.

A – D: Immunolabelling of the eyes (A and C) of WT mice injected in the eye vitreous chamber with physiological serum (A) or subunit B of the Cholera Toxin (C) with anti-Cholera Toxin antibody. B and D are higher magnifications of a part of the retina corresponding to blue inset in A and C respectively. Scale bars: C: 200  $\mu$ m; D: 20  $\mu$ m.

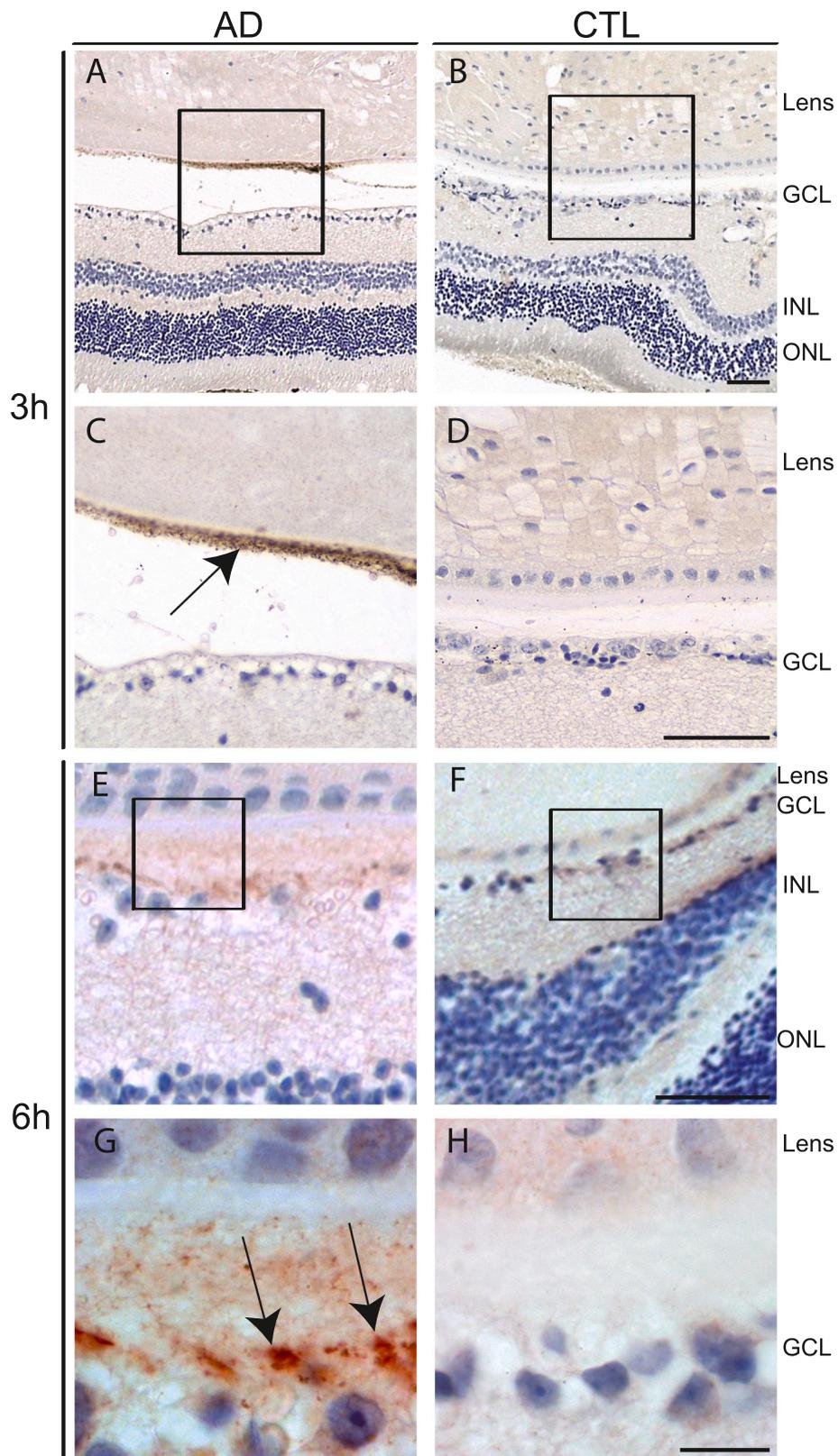
E – J: Immunolabelling of the brain of WT mice injected in the eye vitreous chamber with subunit B of the Cholera Toxin (E and F) with anti-Cholera Toxin antibody. G, H, I and J are higher magnifications of the contralateral (G) and ipsilateral (H) lateral geniculate nucleus and of the contralateral (I) and ipsilateral (J) superior colliculus. Scale bars: F: 200  $\mu$ m; J: 40  $\mu$ m.

K – L: Schematic illustrations of coronal brain sections (antero-posterior localization shown in K) used to analyze the formation of tau pathology in the lateral geniculate nucleus (L) and the superior colliculus (M). The quantifications of tau pathology have been analysed in these brain areas delimited by a red line for the contralateral side and by a green line for the ipsilateral side of the brain.

cholera toxin positive axonal fibers in the geniculate nucleus of the ipsilateral side of the brain. Analysis in geniculate and superior colliculus regions have been further performed in brain areas as defined by red and green circles for contralateral (red) or ipsilateral (green) sides of the brain (Fig. 3 K and L).

#### 3.4. PHF-tau proteins were internalized in the cytoplasm of the retinal ganglion cells

Localisation of PHF-tau proteins was examined in the eye at 10 min., 30 min., 1, 3, 6, 24 h and 5 days after the intravitreal injection in TauKO mice (Fig. 4). 3 h after the injection, PHF-tau proteins were detected in the posterior part of the vitreous in AD injected mice (Fig. 4 A and C) and



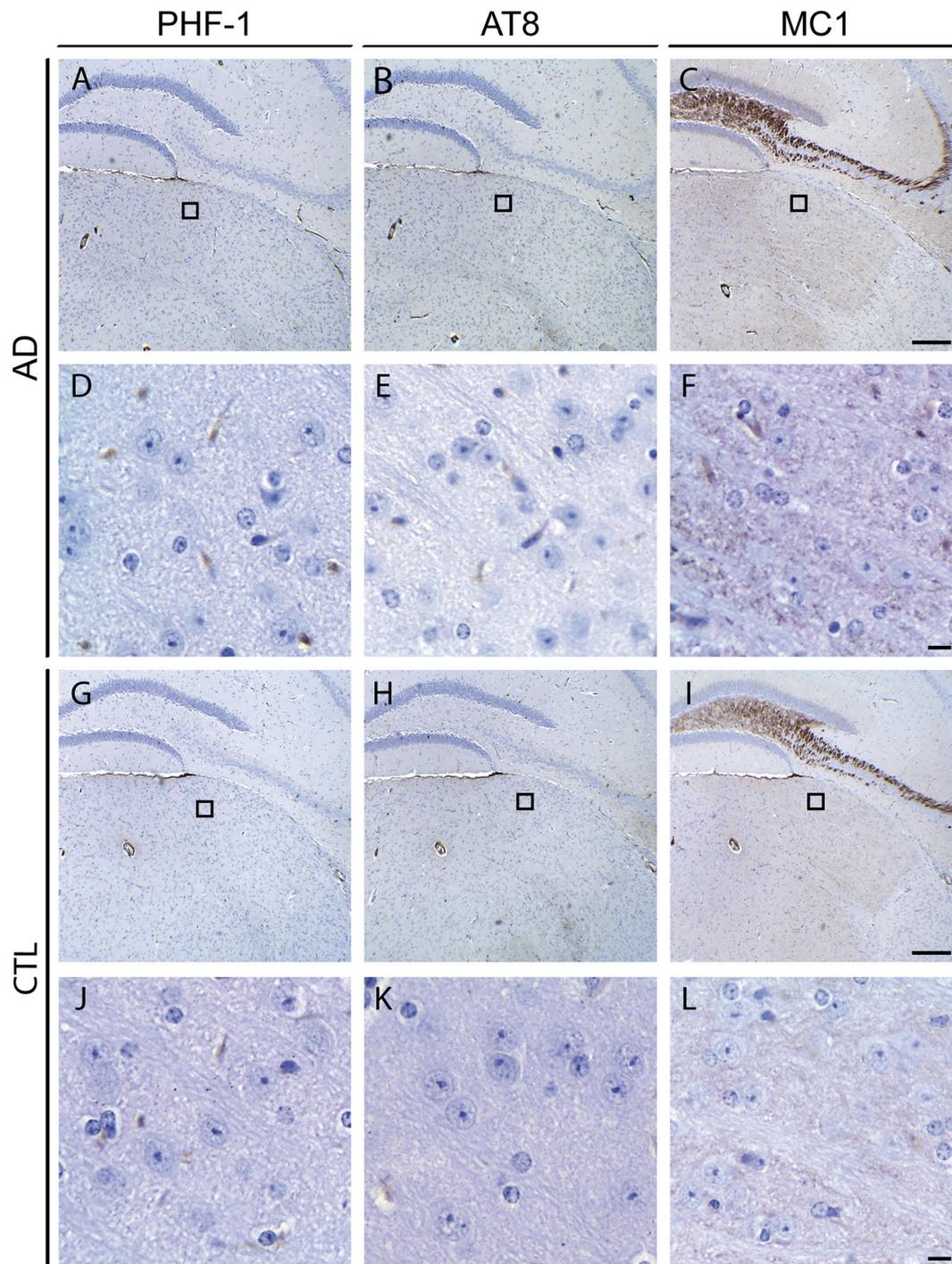
**Fig. 4.** PHF-tau proteins are detected in the ganglion cells 6 h after injection.

not in CTL injected mice (Fig. 4 B and D). 6 h after the injection, we have observed PHF-tau proteins in the cell bodies of ganglion cells (arrows in Fig. 4 G) of AD injected mice (Fig. 4 E and G) but not in CTL injected mice (Fig. 4 F and H). We next performed immunolabelling with AT8 or PHF1 antibodies to analyze the phosphorylation state of injected PHF-

tau proteins. These antibodies labelled PHF-tau proteins in the posterior part of the vitreous in AD injected mice 3 h after the injection but did not detect PHF-tau in the ganglion cells 6 h after the injection.

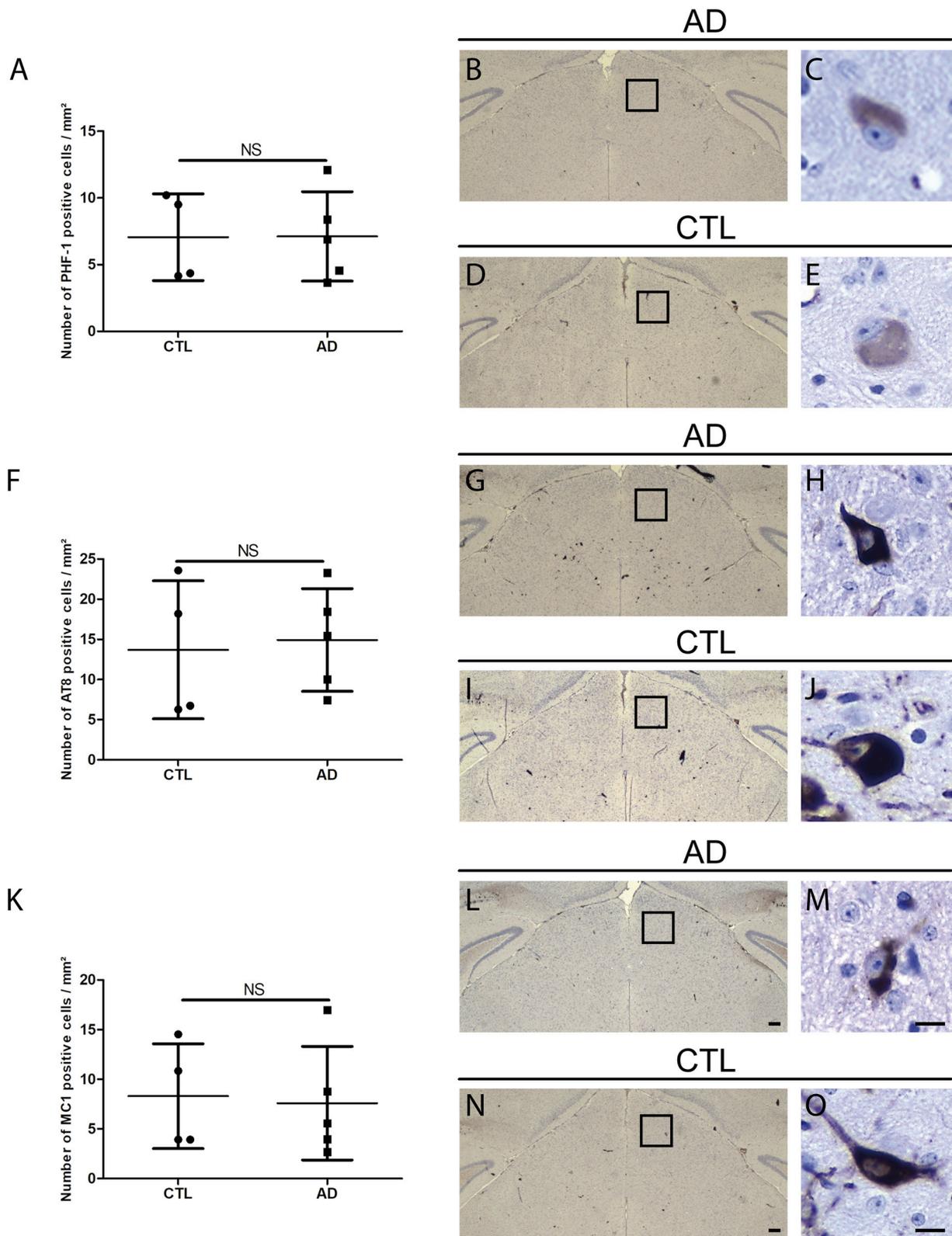
### 3.5. Analysis of the development of tau pathology in the visual pathway

To assess the propagation of tau pathology along the visual pathway after the internalisation of PHF-tau proteins in retinal ganglion cells, we have performed immunolabelling with antibodies recognizing phosphorylated tau on ser 396/404 (PHF-1 antibody) (Fig. 5 A, D, G, J and Fig. 6 A-E), on ser 202/thr 205 (AT8 antibody) (Fig. 5 B, E, H, K and Fig. 6 F-J) and recognizing conformational change (MC1 antibody) (Fig. 5 C, F, I, L and Fig. 6 K-O) on the brain of WT, hTau and Tg22 mice injected with CTL or AD sarkosyl fraction. We have analysed the presence of tau pathology along the visual pathway in the geniculate nucleus (Fig. 5) and in the superior colliculus (Fig. 6) of these injected mice after 6 months of incubation. Tau proteins have been detected in the neuropil in the geniculate nucleus like in other brain regions but a tau pathology was never observed in the geniculate nucleus of WT, hTau or Tg22 mice injected with AD or CTL sarkosyl fraction (Tg22 mice illustrated in



**Fig. 5.** Analysis of tau pathology spreading in the geniculate nucleus.

Immunolabelling of the geniculate nucleus of Tg22 mice with phosphotau antibodies (PHF-1 antibody recognizing phosphoserine 396/404 (A, D, G, J) or AT8 antibody raised against phosphoSer202/Thr205 (B, E, H, K) or with conformational antibody (MC1) (C, F, I, L) after intraocular injection of AD (A-F) or CTL (G-L) fractions. AD ( $n = 5$ ) and CTL ( $n = 4$ ). Pictures (D-F) and (J-L) are higher magnifications of the framed areas in pictures (A-C) and (G-I) respectively. Scale bars: I: 200  $\mu\text{m}$ ; L: 10  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 6.** Analysis of tau pathology spreading in the superior colliculus. Immunolabelling of the superior colliculus of Tg22 mice with phosphotau antibodies (PHF-1 antibody recognizing phosphoserines 396/404 (A-E) or AT8 antibody recognizing phosphoSer202/Thr205 (F-J)) or with conformational antibody (MC1) (K-O) after intraocular injection of AD (B-C, G-H, L-M) or CTL (D-E, I-J, N-O) fractions. Cells in (C,E,H,J,M,O) come from the framed areas in a part of the superior colliculus in pictures (B,D,G,I,L,N) respectively. The number of neurons showing phosphotau or conformational change of tau proteins is not significantly different between AD or CTL injected mice (AD (n = 5) and CTL (n = 4) (A: PHF-1 antibody, F: AT8 antibody, K: MC1 antibody). Two-tailed Mann-Whitney test. Scale bars: N: 200  $\mu$ m; O: 10  $\mu$ m.

Fig. 5). In the superior colliculus of Tg22 mice, a tau pathology was detected with PHF-1, AT8 and MC1 antibodies (Fig. 6C, E, H, J, M and O) but the quantification of tau pathology with the different antibodies did not show any differences between AD or CTL injected mice (PHF-1:  $p = 0.8286$ ; AT8:  $p = 0.6334$  and MC1:  $p = 0.6965$ ) (Fig. 6 A, F and K).

#### 4. Discussion

Alzheimer's disease is the most frequent cause of dementia representing a health challenge for our ageing societies. In this disease, intraneuronal lesions called neurofibrillary tangles are characterized by the misfolding and the accumulation of tau proteins in neurons leading to neuronal dysfunction and cognitive deficits. These lesions spread progressively between synaptically connected brain regions during the evolution of the disease. Previous studies have shown that the intracerebral injection of pathological tau proteins recruit and seed the aggregation of normal endogenous tau proteins suggesting that pathological tau proteins could share some common properties with prions (Clavaguera et al., 2013; Audouard et al., 2016; Vergara et al., 2019). It was previously observed that prions propagate in the retino-ectal pathway after corneal or sclera grafts in humans (Duffy et al., 1974; Heckmann et al., 1997; Mehta and Franks, 2002; Head et al., 2003; Head et al., 2005) or even after intraocular injection of prions in experimental models (Fraser, 1982). Pathological prion proteins have been observed in the plexiform layers of the retina of CJD patients (Head et al., 2003; Head et al., 2005) and intracerebral injection of eye homogenates from CJD subjects into non-human primates has shown transmission of the disease (Brown et al., 1994). To assess the ability of pathological tau (PHF-tau) to propagate tau seeding in the retino-ectal pathway we have analysed the formation and propagation of tau pathology along this pathway in several mice models expressing murine or human tau, after intraocular injection of PHF-tau isolated from AD brain.

In the retina, tau proteins have similar functions to those found in the brain such as stabilizing microtubules and regulating axonal transport (Ho et al., 2012) but are also implicated in axon development during retinal ganglion cells differentiation (Wang et al., 2000; Lieven et al., 2007) and in visual plasticity in adult mice (Rodriguez et al., 2020). Tau proteins are mainly expressed in a dephosphorylated form in all layers of the human retina (Löffler et al., 1995; Leger et al., 2011). In AD, tau proteins are hyperphosphorylated in all layers of the retina except the ONL (Löffler et al., 1995; Schön et al., 2012; Den Haan et al., 2018; Grimaldi et al., 2019) but never in a fibrillated (Den Haan et al., 2018) or an aggregated form (Schön et al., 2012). Moreover, the typical structures formed by tau proteins in the AD brain (tangles, neuritic plaques and neuropil threads) are not found in the retina (Den Haan et al., 2018).

We first validated our intraocular injection procedure using the cholera toxin subunit B that as expected (Angelucci et al., 1996) was rapidly transported along the retino-ectal pathway.

We observed the internalisation of injected PHF-tau into the retinal ganglion cells a few hours after intraocular injection. In a recent study using similar time points as us, a retinal uptake of fibrils made of truncated human K18 tau fragments after their intravitreal injection in WT mouse eyes was not observed (Veys et al., 2021). The discrepancy with our results showing an internalisation of PHF-tau in retinal ganglion cells could be explained by the nature of injected material, since Veys et al. injected fibrils composed of recombinant K18 whereas we injected native PHF-tau proteins isolated from AD brains. Our injected material exhibits many post-translational modifications found in AD such as conformational and phosphorylated epitopes which can play an important role in their ability, not only to form aggregates, but also to be internalized into cells (Alonso et al., 2001; Despres et al., 2017; Carlo-magno et al., 2021). For instance, tau proteins phosphorylated by glycogen synthase kinase-3beta were observed to be internalized into cortical cells ten times more easily than the low phosphorylated ones (Wauters et al., 2016). These observations suggest that the absence of

retinal uptake of K18 tau fragments could be due to the absence of phosphorylation, and potentially other post-translational modifications, of these recombinant peptides.

Despite the internalisation of PHF-tau in retinal ganglion cells, we did not observe aggregation of endogenous tau proteins expressed by these cells, either wild-type murine tau (WT mice), wild-type human tau (hTau mice), or aggregation prone human tau (THY-tau22 mice).

A previous study showed that the expression of human tau in mice significantly accelerates propagation of AD brain-derived pathological tau compared to mice expressing murine tau suggesting increased seeding abilities of human tau versus murine tau (Saito et al., 2019). We could however not detect tau aggregation in retinal ganglion cells even in our mice expressing human tau. The absence of tau seeding in the retinal ganglion cells could be due to the biochemical/conformational properties of the pathological fibrillar tau aggregates used in our study. However, the seeding ability of our PHF-tau fibrillar aggregates has been demonstrated in this study and previous ones (Audouard et al., 2016; Vergara et al., 2019) after intracerebral injection that induced aggregation of murine tau. Our results suggest rather that the absence of seeding in the retinal ganglion cells is not due to the absence of seeding activity of our injected PHF-tau fibrillar aggregates but is rather due to a resistance of these cells to develop a tau pathology. A previous study has shown that dephosphorylation of tau derived from AD brain reduces the seeding activity of tau (Wu et al., 2021). In our study, PHF-tau proteins internalized in ganglion cells are dephosphorylated for AT8 and PHF1 epitopes suggesting that phosphatases activity in ganglion cells could protect the cells against tau seeding. Indeed, in retina of AD patients, tau proteins accumulate in cell bodies of retinal ganglion cells (Schön et al., 2012; Den Haan et al., 2018) but these tau proteins are not aggregated supporting the hypothesis that these cells are resistant to induction of tau seeding.

Contrary to what has been observed for prions in Creutzfeldt-Jacob's disease, the presence of tau pathology has never been described in cornea or sclera of AD patients. However, studies in mice have shown the presence of phosphorylated tau in the cornea suggesting that corneal grafts could be at risk (Zhao et al., 2013; Li et al., 2022). Absence of transmission of AD after transplantation of corneal tissue has not been reported to our knowledge. Our comparative analysis of tau expression level in the eye and the brain, showed a significantly lower expression level of tau in the eye compared to the brain of the different mouse models used in this study; a concentration-dependent kinetic of tau aggregation could be a factor explaining the resistance of retinal ganglion cells to induction of tau seeding. Indeed, increasing the level of tau expression favours tau aggregation in transgenic models and in human tauopathies. Eg an increased level of tau expression due to MAPT gene duplication causes the formation of a tau pathology (Le Guennec et al., 2017).

Prion propagates rapidly (Gibbs Jr et al., 1994; Zobeley et al., 1999) but contrary to what has been observed for prions in previous studies, we did not observe a tau pathology propagation from the eye to the brain in our mice models even after 6 months of incubation. Tau pathology was not observed at the level of the two synaptic relays of the retino-ectal pathways, ie the geniculate nucleus and the superior colliculus in WT and htau mice. The absence of tau pathology propagation is not due to disturbances in the axonal transport in mice overexpressing tau proteins as it was shown that the absence or the overexpression of tau did not affect axonal transport in ganglion cells (Yuan et al., 2008). Tau pathology was present in these brain areas in THYtau-22 mice, but was not quantitatively different between mice injected with PHF-tau or control fractions, suggesting that this tau pathology is part of the phenotype of THY-tau 22 mice expressing an aggregation prone mutant tau under control of the Thy1.2 promoter.

We can not exclude that longer incubation times would lead to tau protein aggregation and propagation. Also, we cannot exclude that another form of pathological tau, such as tau oligomers, could be more efficient to induce tau aggregation and spreading in the visual pathway.

## 5. Conclusion

We evidenced for the first time that pathological tau proteins isolated from AD brains can enter into retinal ganglion cells after intraocular injection. We did not demonstrate a transmission of tau pathology to the brain after an ocular contamination in our mice models. We cannot exclude however that there is no risk of transmission by the retino-tectal pathway in human in whom longer incubation time should be possible, but our results suggest that eye surgery is not a major risk of transmission of tau pathology.

Immunolabelling with anti-human tau antibody of the eye of AD (A and C, E and G) or CTL (B and D, F and H) injected TauKO mice, 3 h (A-D) or 6 h (E-H) after the intraocular injection. 3 h after injection, PHF-tau proteins were detected near the posterior part of the lens (C) whereas this injected material was detected in the ganglion cells of the retina 6 h after the injection (G). Scale bars: B, D and F: 50  $\mu$ m; H: 10  $\mu$ m.

## Funding

K. L. was supported by the Fund Defay, the Fund Van Buuren, the Rotary (Hope in head), the Fondation Recherche Alzheimer / Stichting Alzheimer Onderzoek (FRA/SAO 2018-0021, FRA/SAO 2021-0028) and the Génicot Fund. J.P.-B. was supported by grants from the Belgian Fonds de la Recherche Scientifique Médicale (T.0027.19), the Fund Aline (King Baudouin Foundation), the Fondation Recherche Alzheimer / Stichting Alzheimer Onderzoek (FRA/SAO 2019-0027) and the Génicot Fund.

## Availability of data

All data generated or analysed during this study are included in this published article.

## Ethics approval and consent to participate

Autopsies were carried out after written informed consent was obtained from family members. This study on postmortem brain tissues was performed in compliance and following approval of the Ethical Committee of the Medical School of the Free University of Brussels (ethical protocol number: P2009/015).

## Ethics approval of animal usage

All studies on animals were performed in compliance and following approval of the Ethical committee for the care and use of laboratory animals of the Medical School of the Free University of Brussels (Authorization number: 599 N).

## Consent for publication

Not applicable.

## Arrive guidelines

This study is in accordance with ARRIVE guidelines.

## Author statement

DFMA and LK conceived and planned the experiments. DFMA carried out the experiments. YZ, DDR, SV, AK contributed to sample preparation. BL provided Tg22 model. DFMA, LK, BJP contributed to the interpretation of the results. LK took the lead in writing the manuscript. All authors provided critical feedback and helped shape the research, analysis and manuscript.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no conflict of interests.

## Data availability

Data will be made available on request.

## Acknowledgements

We are very grateful to late Dr. Peter Davies for providing PHF-1 and MC1 antibodies.

## References

- Alonso, A., Zaidi, T., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 2001. Hyperphosphorylation induces self-assembly of  $\tau$  into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (12), 6923–6928.
- Ando, K., Leroy, K., Héraud, C., Yilmaz, Z., Authélet, M., Suain, V., De Decker, R., Brion, J.-P., 2011. Accelerated human mutant tau aggregation by knocking out murine tau in a transgenic mouse model. *Am. J. of Pathol.* 178(2), 803–816. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.10.034>.
- Andorfer, C., Kress, Y., Espinoza, M., De Silva, R., Tucker, K.L., Barde, Y.A., Duff, K., Davies, P., 2003. Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *J. Neurochem.* 86, 582–590.
- Angelucci, A., Clascá, F., Sur, M., 1996 Mar. Anterograde axonal tracing with the subunit B of cholera toxin: a highly sensitive immunohistochemical protocol for revealing fine axonal morphology in adult and neonatal brains. *J. Neurosci. Methods* 65 (1), 101–112.
- Audouard, E., Houben, S., Masaracchia, C., Yilmaz, Z., Suain, V., Authélet, M., De Decker, R., et al., 2016 Oct. High-molecular-weight paired helical filaments from Alzheimer brain induces seeding of wild-type mouse Tau into an argyrophilic 4R Tau pathology in vivo. *Am. J. Pathol.* 186 (10), 2709–2722. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.06.008>.
- Braak, H., Braak, E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82 (4), 239–259.
- Brion, J.P., Hanger, D.P., Bruce, M.T., Couck, A.M., Flament-Durand, J., Anderton, B.H., 1991a. Tau in Alzheimer neurofibrillary tangles. N- and C-terminal regions are differentially associated with paired helical filaments and the location of a putative abnormal phosphorylation site. *Biochem. J.* 273 (Pt 1), 127–133.
- Brion, J.P., Hanger, D.P., Couck, A.M., Anderton, B.H., 1991b. A68 proteins in Alzheimer's disease are composed of several tau isoforms in a phosphorylated state which affects their electrophoretic mobilities. *Biochem. J.* 279 (Pt 3), 831–836.
- Brown, P., Gibbs Jr., C.J., Rodgers-Johnson, P., Asher, D.M., Sulima, M.P., Bacote, A., Goldfarb, L.G., Gajdusek, D.C., 1994 May. Human spongiform encephalopathy: the National Institutes of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Ann. Neurol.* 35 (5), 513–529. <https://doi.org/10.1002/ana.410350504>.
- Carlomagno, Y., Manne, S., DeTure, M., Prudencio, M., Zhang, Y.J., Hanna Al-Shaikh, R., Dummore, 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 Mar 16. The AD tau core spontaneously self-assembles and recruits full-length tau to filaments. *Cell Rep.* 34 (11), 108843 <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108843>.
- Clavaguera, F., Akatsu, H., Fraser, G., Crowther, R.A., Frank, S., Hench, J., Probst, A., et al., 2013 Jun 4. Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (23), 9535–9540. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301175110>.
- Den Haan, J., Morrema, T.H.J., Verbraak, F.D., de Boer, J.F., Scheltens, P., Rozemuller, A.J., Bergen, A.A.B., Bouwman, F.H., Hoozemans, J.J., 2018 Dec 28. Amyloid-beta and phosphorylated tau in post-mortem Alzheimer's disease retinas. *Acta Neuropathol Commun.* 6 (1), 147. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0650-x>.
- Despres, C., Byrne, C., Qi, H., Cantrelle, F.X., Huvent, I., Chambraud, B., et al., 2017 Aug 22. Identification of the Tau phosphorylation pattern that drives its aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (34), 9080–9085.
- Duff, K., Knight, H., Refolo, L.M., Sanders, S., Yu, X., Picciano, M., Malester, B., Hutton, M., Adamson, J., Goedert, M., Burki, K., Davies, P., 2000. Characterization of pathology in transgenic mice over-expressing human genomic and cDNA tau transgenes. *Neurobiol. Dis.* 7, 87–98.
- Duffy, P., Wolf, J., Collins, G., DeVoe, A.G., Streeten, B., Cowen, D., 1974 Mar 21. Letter: possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N. Engl. J. Med.* 290 (12), 692–693.
- Fraser, H., 1982. Neuronal spread of scrapie agent and targeting of lesions within the retino-tectal pathway. *Nature* 295, 149–150.
- Frederick, C., Ando, K., Leroy, K., Héraud, C., Suain, V., Buée, L., Brion, J.P., 2015. Rapamycin ester analog CCI-779/Temsirolimus alleviates tau pathology and improves motor deficit in mutant tau transgenic mice. *J. Alzheimers Dis.* 44, 1145–1156. <https://doi.org/10.3233/JAD-142097>.
- Furman, J.L., Holmes, B.B., Diamond, M.I., 2015 Dec 8. Sensitive detection of proteopathic seeding activity with FRET flow cytometry. *J. Vis. Exp.* 106, e53205 <https://doi.org/10.3791/53205>.

- Gibbs Jr., C.J., Asher, D.M., Koblina, A., Amyx, H.L., Sulima, M.P., Gajdusek, D.C., 1994. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease to a chimpanzee by electrodes contaminated during neurosurgery. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 57, 757–758.
- Gijs, M., Ramakers, I.H.G.B., Visser, P.J., Verhey, F.R.J., van de Waarenburg, M.P.H., Schalkwijk, C.G., Nuijts, R.M.M.A., Webers, C.A.B., 2021 Nov 22. Association of tear fluid amyloid and tau levels with disease severity and neurodegeneration. *Sci. Rep.* 11 (1), 22675. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01993-x>.
- Goedert, M., Jakes, R., Vanmechelen, E., 1995. Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205. *Neurosci. Lett.* 189, 167e169.
- Grimaldi, A., Pediconi, N., Oieni, F., Pizzarelli, R., Rosito, M., Giubettini, M., Santini, T., Limatola, C., Ruocco, G., Ragozzino, D., Di Angelantonio, S., 2019 Sep 4. Neuroinflammatory processes, A1 astrocyte activation and protein aggregation in the retina of Alzheimer's disease patients, possible biomarkers for early diagnosis. *Front. Neurosci.* (13), 925. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00925>.
- Head, M.W., Northcott, V., Rennison, K., Ritchie, D., McCardle, L., Bunn, T.J., McLennan, N.F., Ironside, J.W., Tullio, A.B., Bonshek, R.E., 2003 Jan. Prion protein accumulation in eyes of patients with sporadic and variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44 (1), 342–346.
- Head, M.W., Peden, A.H., Yull, H.M., Ritchie, D.L., Bonshek, R.E., Tullio, A.B., Ironside, J.W., 2005 Sep. Abnormal prion protein in the retina of the most commonly occurring subtype of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Br. J. Ophthalmol.* 89 (9), 1131–1133.
- Heckmann, J.G., Lang, C.J., Petruc, F., Druschky, A., Erb, C., Brown, P., Neundörfer, B., 1997 Sep. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease via a corneal transplant. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 63 (3), 388–390.
- Ho, W.L., Leung, Y., Tsang, A.W., So, K.F., Chiu, K., Chang, R.C., 2012. Review: tauopathy in the retina and optic nerve: does it shadow pathological changes in the brain? *Mol. Vis.* 18, 2700–2710.
- 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. *J. Neurosci. Res.* 48, 128–132.
- Le Guennec, K., Quenez, O., Nicolas, G., et al., 2017. 17q21.31 duplication causes prominent tau-related dementia with increased MAPT expression. *Mol. Psychiatry* 22, 1119–1125. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.226>.
- Leger, F., Fernagut, P.O., Canron, M.H., Léoni, S., Vital, C., Tison, F., Bezard, E., Vital, A., 2011 Jan. Protein aggregation in the aging retina. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 70 (1), 63–68. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31820376cc>.
- Leroy, K., Menu, R., Conreur, J.L., Dayanandan, R., Lovestone, S., Anderton, B.H., Brion, J.P., 2000. The function of the microtubule-associated protein tau is variably modulated by graded changes in glycogen synthase kinase-3beta activity. *FEBS Lett.* 465, 34–38.
- Li, S., Shi, S., Luo, B., Xia, F., Ha, Y., Merkley, K.H., Motamedi, M., Zhang, W., Liu, H., 2022 Feb. Tauopathy induces degeneration and impairs regeneration of sensory nerves in the cornea. *Exp. Eye Res.* 215, 108900 <https://doi.org/10.1016/j.exer.2021.108900>.
- Lieven, C.J., Millet, L.E., Hoegger, M.J., Levin, L.A., 2007 Nov. Induction of axon and dendrite formation during early RGC-5 cell differentiation. *Exp. Eye Res.* 85 (5), 678–683. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2007.08.001>.
- Löffler, K.U., Edward, D.P., Tso, M.O., 1995 Jan. Immunoreactivity against tau, amyloid precursor protein, and beta-amyloid in the human retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36 (1), 24–31.
- Mehta, J.S., Franks, W.A., 2002. The sclera, the prion, and the ophthalmologist. *Br. J. Ophthalmol.* 86, 587–592.
- Mudher, A., Colin, M., Dujardin, S., Medina, M., Dewachter, I., Naini, S.M.A., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., Buee, L., Goedert, M., Brion, J.P., 2017. What is the evidence that tau pathology spreads through prion-like propagation? *Acta Neuropathol. Commun.* 5, 99.
- Otvos Jr., L., Feiner, L., Lang, E., Szendrei, G.I., Goedert, M., Lee, V.M., 1994. Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated at serine residues 396 and 404. *J. Neurosci. Res.* 39, 669–673.
- Rodriguez, L., Joly, S., Zine-Eddine, F., Mdzomba, J.B., Pernet, V., 2020 Nov. Tau modulates visual plasticity in adult and old mice. *Neurobiol. Aging* 95, 214–224. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2020.07.024>.
- Romau-Sanjurjo, D., Regueiro, U., López-López, M., Vázquez-Vázquez, L., Ouro, A., Lema, I., Sobrino, T., 2022. Alzheimer's disease seen through the eye: ocular alterations and neurodegeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 23 (5):2486.
- Saito, T., Mihira, N., Matsuba, Y., Sasaguri, H., Hashimoto, S., Narasimhan, S., Zhang, B., Murayama, S., Higuchi, M., Lee, V., Trojanowski, J., Saido, T., 2019 Aug 23. Humanization of the entire murine MAPT gene provides a murine model of pathological human tau propagation. *J. Biol. Chem.* 294 (34), 12754–12765.
- Schindowski, K., Bretteville, A., Leroy, K., Bégard, S., Brion, J.P., Hamdane, M., Buée, L., 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.
- Schön, C., Hoffmann, N.A., Ochs, S.M., Burgold, S., Filser, S., Steinbach, S., Seeliger, M. W., Arzberger, T., Goedert, M., Kretschmar, H.A., Schmidt, B., Herms, J., 2012. Long-term in vivo imaging of fibrillar tau in the retina of P301S transgenic mice. *PLoS One* 7 (12), e53547. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053547>.
- Stygelbout, V., Leroy, K., Pouillon, V., Ando, K., D'Amico, E., Jia, Y., Luo, H.R., Duyckaerts, C., Erneux, C., Schurmans, S., Brion, J.P., 2014. Inositol trisphosphate 3-kinase B is increased in human Alzheimer brain and exacerbates mouse Alzheimer pathology. *Brain* 137, 537–552. <https://doi.org/10.1093/brain/awt344>.
- Tucker, K.L., Meyer, M., Barde, Y.A., 2001. Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nat. Neurosci.* 4, 29–37.
- Vanden Dries, V., Stygelbout, V., Pierrot, N., Yilmaz, Z., Suain, V., De Decker, R., Buée, L., Octave, J.N., Brion, J.P., Leroy, K., 2017. Amyloid precursor protein reduction enhances the formation of neurofibrillary tangles in a mutant tau transgenic mouse model. *Neurobiol. Aging* 55, 202–212. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.03.031>.
- Vergara, C., Houben, S., Suain, V., Yilmaz, Z., De Decker, R., Vanden Dries, V., Boom, A., Mansour, S., Leroy, K., Ando, K., Brion, J.P., 2019 Mar. Amyloid-β pathology enhances pathological fibrillary tau seeding induced by Alzheimer PHF in vivo. *Acta Neuropathol.* 137 (3), 397–412. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1953-5>.
- Veys, L., Van Houcke, J., Aerts, J., Van Pottelberge, S., Mahieu, M., Coens, A., Melki, R., Moechars, D., De Muynck, L., De Groef, L., 2021 Jan. Absence of uptake and prion-like spreading of alpha-synuclein and tau after intravitreal injection of preformed fibrils. *Front. Aging Neurosci.* 15 (12) <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.614587>, 614587.
- Wang, S.W., Gan, L., Martin, S.E., Klein, W.H., 2000 Aug. Abnormal polarization and axon outgrowth in retinal ganglion cells lacking the POU-domain transcription factor Brn-3b. *Mol. Cell. Neurosci.* 16 (2), 141–156. <https://doi.org/10.1006/mcne.2000.0860>.
- Wauters, M., Wattiez, R., Ris, L., 2016. Internalization of the extracellular full-length tau inside Neuro2A and cortical cells is enhanced by phosphorylation. *Biomolecules* 6 (3), 36. <https://doi.org/10.3390/biom6030036>.
- Wu, R., Li, L., Shi, R., Zhou, Y., Jin, N., Gu, J., Tung, Y.C., Liu, F., Chu, D., 2021 May. Dephosphorylation passivates the seeding activity of oligomeric tau derived from Alzheimer's brain. *Front. Mol. Neurosci.* 13 (14) <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.631833>, 631833.
- Yuan, A., Kumar, A., Peterhoff, C., Duff, K., Nixon, R.A., 2008 Feb 13. Axonal transport rates in vivo are unaffected by tau deletion or overexpression in mice. *J. Neurosci.* 28 (7), 1682–1687. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5242-07.2008>.
- Zhao, H., Chang, R., Che, H., Wang, J., Yang, L., Fang, W., Xia, Y., Li, N., Ma, Q., Wang, X., 2013 Sep 13. Hyperphosphorylation of tau protein by calpain regulation in retina of Alzheimer's disease transgenic mouse. *Neurosci. Lett.* (551), 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.06.026>.
- Zobeley, E., Flechsig, E., Cozzio, A., Enari, M., Weissmann, C., 1999. Infectivity of scrapie prions bound to a stainless steel surface. *Mol. Med.* 5, 240–243.



