

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