



HAL
open science

Développement d'un nouveau modèle murin par transfert de gène pour étudier la propagation de la tauopathie : influence de l'agrégation de la protéine tau et de l'activation microgliale

Pauline Leal

► **To cite this version:**

Pauline Leal. Développement d'un nouveau modèle murin par transfert de gène pour étudier la propagation de la tauopathie : influence de l'agrégation de la protéine tau et de l'activation microgliale. Neurobiologie. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASL092 . tel-04287541

HAL Id: tel-04287541

<https://theses.hal.science/tel-04287541>

Submitted on 15 Nov 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Développement d'un nouveau modèle murin par transfert de gène pour étudier la propagation de la tauopathie : influence de l'agrégation de la protéine tau et de l'activation microgliale

Development of a new gene-transfer model in mice to study tauopathy spreading: influence of tau aggregation and microglia activation

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 568 signalisations et réseaux intégratifs en biologie (Biosigne)
Spécialité de doctorat : Neurosciences
Graduate School : Life Sciences and Health. Référent : Faculté de médecine

Thèse préparée dans l'unité de recherche Laboratoire des Maladies Neurodégénératives (Université Paris-Saclay, CEA, CNRS),
sous la direction du Dr. **Alexis BEMELMANS**.

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 18 octobre 2023, par

Pauline LEAL

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Elisabeth TRAIFFORT Directrice de recherche, INSERM	Présidente
Hélène HIRBEC Chargée de recherche, CNRS	Rapporteur & Examinatrice
David BLUM Directeur de recherche, INSERM	Rapporteur & Examinateur
Marie-Claude POTIER Directrice de recherche, CNRS	Examinatrice

*A ma grand-mère,
Ma tante Agnès,
Et ma tante Brigitte.*

*« La sagesse, c'est d'avoir des rêves suffisamment grands pour ne pas les perdre de vue
quand on les poursuit. »*

Oscar Wilde

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon jury, pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail, et la discussion de soutenance qui m'a beaucoup apportée. Je remercie particulièrement mes rapporteurs, Hélène Hirbec et David Blum pour le temps passé à la lecture de mon manuscrit, leurs suggestions et surtout leurs nombreux compliments.

J'aimerais également remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, Aurélie Goyensalle et Cécile Delarasse, pour leur bienveillance et leurs précieux conseils, votre avis extérieur et vos encouragements m'ont permis de trouver la motivation pour rebondir lors des différents obstacles auxquels nous avons fait face.

Je remercie Alexis, pour m'avoir donné l'opportunité de rejoindre ce laboratoire et dans un premier temps m'avoir accompagnée pendant cette période si particulière que le premier confinement du au COVID pendant mon stage de Master2. Malgré toutes les inconnues et l'impossibilité de manipuler, j'ai tout de même beaucoup appris et me suis sentie bien dans cette équipe. Ensuite, je te remercie pour m'avoir fait confiance pour réaliser ma thèse sur ce projet. Un sujet riche et complexe, qui m'a valu des bons nœuds au cerveau, mais qui m'a tenu à cœur pendant toute cette thèse. Je ne sais pas si on aura répondu à autant de questions qu'on a posé avec ce projet, mais c'était passionnant. Je te remercie également de m'avoir permis d'aller à de nombreux congrès, et de m'avoir intégrée dans des réunions d'autres de tes projets. Et enfin pour m'avoir fait confiance et m'avoir laissée superviser 3 stagiaires : Anaïs dès le 6^{ème} mois de thèse, Enora avec le projet PNN et Cécile avec le projet vieillissement.

Tout ce travail je n'aurai pas pu le réaliser aussi sereinement (autant que je puisse l'être) sans notre équipe, l'équipe Biomol. Karine, Gwen, MCG, Noëlle, Charlène et maintenant Deborah et Sueva. Cette équipe qui aime se rassembler pour un bon ptit dej ou pour manger des gâteaux. Merci pour votre enthousiasme et surtout pour votre soutien sur la toute fin de ma thèse qui s'est avérée encore plus complexe et difficile que prévu. Karine, merci pour tes conseils lors de ma thèse, j'ai eu cette chance que tu sois disponible pour nous donner ton avis lors des nombreux échecs de manip. Merci également pour ta bonne humeur, ton enthousiasme lorsque quelqu'un ramenait un gâteau au labo, et pour tous les moments passés ensemble en congrès. Marie-Claude, ou MCG, merci à toi pour ta bienveillance sans faille, ta bonne humeur et ton enthousiasme scientifique. J'ai apprécié partager avec toi le projet de transduction de la microglie, et j'espère qu'un jour, sûrement après notre départ, l'équipe arrive à transduire Poulpi !! Merci également de nous avoir accueilli pour m'entraîner pour l'oral de l'ED en temps de covid ! C'était un peu la classe de dire que je m'entraînais dans une salle de cinéma privée ! 😊 C'était un plaisir de faire ce congrès en Suède à tes côtés ! Je

te souhaite tout le meilleur pour ta retraite, plein de voyages, et de beaux moments avec ta famille. Profites-en !!

Gwen, tant de choses pour lesquelles j'aimerais te remercier, je ne sais pas par où commencer. Merci pour m'avoir accueillie dans ton bureau au début de ma thèse, j'y ai passé de très bon moment, on aura bien rigolé ! Merci de m'avoir formée quand j'en avais besoin, et surtout surtout de m'avoir prêté main forte quand cela était nécessaire pour tout type de manip : injections, repro, perf, sessions coupes, immuno, sessions montages de coupes etc etc. C'était vachement plaisant de faire tout ça avec quelqu'un et pouvoir discuter. J'espère que tu te sentiras bien dans ton nouveau bureau, et que tu sauras prendre des journées de TT quand tu en auras l'occasion ! Noëlle, tu es si solaire et bienveillante. Ça a été un réel plaisir de pouvoir te côtoyer au labo, toujours de bonne humeur, et tournée vers le positif. Merci pour ton aide lorsque j'ai dû utiliser le L3. Et surtout j'ai été ravie de partager avec toi sur ta passion des plantes. Toutes les boutures partiront avec moi dans mon prochain labo pour penser à vous !

Charlène, Sueva et Deborah, nous n'avons malheureusement pas eu beaucoup d'occasions de travailler ensemble mais je vous remercie pour votre aide, et votre soutien lorsque c'était nécessaire.

J'aimerais ensuite sincèrement remercier les personnes qui m'ont aidée pour la bonne réalisation de mes manip. Tout d'abord, la plateforme expérimentation animale avec Martine, Mylène, Julien M., et Marjorie. Merci infiniment pour votre aide sur les multiples séries d'injections, votre flexibilité et votre bonne humeur qui me permettait d'être un peu plus détendue lors de ces manip qui me stressaient beaucoup. Merci Julien pour ton aide, notamment lors du comportement pendant mon Master 2, mais de manière générale pour ta gentillesse et ta bonne humeur sans faille. Merci également à Vivien qui ne fait pas partie de la plateforme mais qui a toujours été volontaire pour aider !

Je remercie également les « filles de la plateforme histo » Fanny P., Pauline G. et Caro. J'ai passé un bon bout de temps sur les paillasses d'histo et c'était un plaisir de discuter avec vous. Vous m'avez également beaucoup aidé lors des perfs et de mes nombreux problèmes d'histo, ou pour me former quand je voulais essayer une nouvelle technique. J'ai bien rigolé et passé de très bons moments avec vous.

Revenons à mes stagiaires. J'ai vraiment apprécié de travailler avec vous 3. Anaïs, ma première stagiaire, en 2^{ème} année de pharmacie, qui est arrivée alors que j'étais moi-même encore souvent perdue, j'ai adoré t'encadrer, et surtout j'étais contente d'avoir quelqu'un pour faire les manip avec moi après le départ de mon acolyte Charlotte. Tu as été adorable et tu as fait beaucoup de choses pour un stage de 2 mois ! Je te souhaite plein de bonheur et de succès dans tes futures directions professionnelles, à commencer par le diplôme de pharmacien ! Enora, ma deuxième stagiaire, en M1, qui m'a impressionnée par son courage. Tu as su te démener avec un sujet compliqué, nouveau pour nous, alors que je travaillais moi-même sur un autre modèle. Tout ça en travaillant à côté et en ayant pour aspiration de changer de filière vers la psycho. Je te souhaite plein de réussite dans cette voie. Et enfin, Cécile, stagiaire de M2, qui a maintenant pris ma relève en tant que doctorante. Toi aussi tu as eu le droit à un projet pas des plus simples avec des problèmes techniques dès le début. Malgré ça tu ne t'es

pas démontée et ça ne t'a pas découragée pour t'orienter vers une thèse avec nous. Je te souhaite plein de réussite dans ce nouveau projet qui s'annonce intense et j'ai hâte de voir les résultats que vous obtiendrez.

Merci à toutes les trois car grâce à vous j'ai appris à manager des étudiants, et c'est moins facile qu'il n'y paraît ! J'espère ne pas trop vous avoir soumis mon stress qui était parfois important et j'espère que vous avez passé un bon moment au laboratoire avec nous.

La thèse c'est du travail...beaucoup, des échecs... souvent, des réussites... parfois, du stress... tout le temps, et pour surmonter tout ça heureusement qu'il y avait les collègues étudiants. Les étudiants de MIR Cen c'est une très longue liste de personnes... et rien que lors de mon passage dans ce labo, il n'y a qu'à voir le nombre de membres sur le groupe « MIR Cen squad », qui a été créé lors de mon arrivée pour comprendre : 46 membres !!

Pour remercier tout ce beau petit monde je vais essayer de procéder par ordre chronologique, bien que certains passages et groupes s'entremêlent. Je suis déjà à 2 pages de remerciements donc je ne vais essayer de rester concise, mais je vous remercie tous chaleureusement pour votre soutien lors de ces 4 ans à MIR Cen. C'est grâce à l'ambiance entre nous que l'on tient le coup du stress engendré par cette aventure qu'est la thèse.

Les « anciens », les anciens, mais surtout mes amis. C'est non sans émotion que je vous remercie. Je m'estime tellement chanceuse d'être arrivée au laboratoire avec vous. Charlotte, Fanny, PA, JB, Yohann et Océ. Qu'est-ce que j'ai ris avec vous. Les rires au déjeuner, aux nombreuses pauses, au détour d'un couloir, puis lors de nos nombreuses soirées plus ou moins arrosées, plus ou moins autorisées, font de mes 1^{ères} années au laboratoire certainement mes préférées.

Charlotte, je te remercie pour tant de choses. Pour m'avoir accueillie au labo lors de mon stage de M2, et m'avoir tout de suite intégrée aux groupes des étudiants, m'avoir formée sur ton projet et avoir pris le temps. J'ai adoré travailler avec toi, vraiment. Je me souviendrai longtemps de ces sessions montage de coupes de l'enfer sur du Julien Doré en boucle tous les jours à 10h30 et 15h43 ! Je suis tellement contente d'être tombée sur toi comme superviseuse de stage et co-thésarde. Merci de m'avoir légué ta bible, ton projet, et d'avoir été à mes côtés tout du long, même après ta soutenance de thèse. Franchement je ne pouvais pas rêver mieux comme prédécesseuse. Qui sait peut-être qu'un jour on sera amenées à collaborer, en tout cas je risque encore de t'embêter un peu pour le papier GD !

Et je te souhaite tout le meilleur pour la suite professionnelle, et personnelle, avec ton petit (pas si petit) chien, trop choupi !

Fanny, je te remercie pour les nombreux fous rires, j'ai adoré partager tous ces moments de pétage de câbles de l'une ou de l'autre. Il est clair que tu participais activement à l'ambiance déjantée du bureau et des pauses dej. Merci pour ta bonne humeur malgré les nombreux coups durs que tu as eu durant ta thèse, et ta bienveillance envers les autres, tout le temps. Tu as largement participé au fait que je me suis sentie parfaitement intégrée dans le groupe, qui est maintenant un groupe d'amis, et je suis reconnaissante d'en faire partie. Je suis contente pour toi pour ta nouvelle vie depuis ta thèse, vous avez l'air vraiment bien chez vous

et Tapio est un amour de ptit chien. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite : de la moula, et toujours autant de fous rires et de conneries !

Yohann, merci d'être toi, si perché et passionné. Merci pour ces pauses interminables au début de notre thèse, ces sessions among us, ces soirées « clandestines », merci pour tous ces bons souvenirs ! Je te souhaite de trouver ta voie prochainement, une voie qui te convienne sur tous les plans, et tout le bonheur que tu mérites !

PA, j'ai tellement de choses à dire que je ne sais pas si je vais réussir à synthétiser. On n'a jamais été au labo ensemble (enfin si... 1 semaine !) et pourtant nous sommes devenus de véritables amis et j'ai vraiment de la chance pour ça. Merci pour les soirées, merci pour les bingo Koh Lanta, merci pour les noooombreux fous rires, merci pour ta gentillesse et bienveillance lors de mes nombreuses remises en question lors de la thèse, merci de m'avoir acceptée parmi vous pour les semaines rando, qui sont maintenant un rituel, et pour le semi ! J'ai hâte de voir ce que la suite nous réserve, et peut-être qu'on se retrouvera en Suisse tous ensemble, pour perpétuer les randos, les apéros et les commérages !

Marina, je reste admirative de ton courage, tu es une battante et une grosse bosseuse, c'est remarquable. Merci pour tous tes conseils, ton aide pour les macros, et pouvoir m'avoir fait tant rire avec tes remarques loufoques et décalées. Je te souhaite tout le meilleur pour toi et ta petite famille, à Boston. Tu vas accomplir de grandes choses, personne n'en doute, j'ai hâte de voir lesquelles ! Et j'espère qu'on se recroisera en congrès et lors de voyage vers nos pays respectifs.

Ensuite je remercie mes copines de galères, Mathilde, Amélie et Miriam. Le squad des organisatrices de la journée des anciens. Que d'aventures avec vous. Merci d'avoir été présentes tout au long de ces 3 années de thèse. Mathilde, j'ai adoré partager ces premiers moments de thèse dans le même bureau que toi, qu'est-ce qu'on a rigolé, pendant toutes ces pauses ! La thèse aurait été encore plus folklo si on avait pu rester au R+2 ensembles, mais on a réussi à garder un peu cet esprit avec l'anniversaire bi-annuel de notre exploit, celui d'avoir tenu jusque-là. Et puis on a réussi à maintenir les pauses commérages, notamment autour de carambar dans notre cachette plus si secrète. Et nos footings réguliers, et le semi tellement de souvenirs qu'il va être difficile de tous les énumérer. Je te souhaite plein de courage pour la fin de cette thèse, et je te souhaite de trouver ce qui te plaît pour après ! On se revoit vite autour d'une binouze ! Amélie, Merci pour ta gentillesse, je suis trop contente de t'avoir rencontrée et de te compter parmi mes amies. Cette dernière année nous a rapproché « grâce » aux dernières galères de thèse partagées. Je te souhaite tout le meilleur dans la suite de ta formation et pour après. Et au fait Améloche ! Quand est ce qu'on va à la pistoche ? :D Miriam, tu es une personne exceptionnelle et je suis contente qu'on soit amie, ta générosité, ton enthousiasme et ta bienveillance m'ont à plusieurs reprises remonté le moral ! Merci pour ton aide sur la transcriptomique, je risque de te poser encore des questions pendant longtemps ! Besos !

Emma, Nathan, je suis ravie d'avoir fait partie de votre équipe, je vous souhaite plein de courage et de réussite pour la suite. Emma, tu verras, on s'en fait une montagne mais cela se

passer sans même que l'on réalise ! Nathan, bon courage pour la suite, ravie de t'avoir recroisé au labo, après t'avoir rencontré à Phasol !

Les étudiants de la team 3 : Tom, Karouna, Yiannis. Merci à vous 3, j'ai passé de bons moments avec vous, à commérer, rigoler et rager sur la thèse. Tom à parler plantes, Yiannis à philosopher sur la vie et remettre en question très régulièrement notre passion pour la science et la rentabilité de ce projet, et Karouna à échanger sur nos galères de manips. Je vous souhaite tout le meilleur pour la suite ! Et bon courage pour le déménagement, j'espère que vous vous sentirez bien dans votre nouveau labo !

Et tous les autres étudiants que j'ai pu croiser, désolée si j'en oublie, merci à tous pour votre bienveillance, vraiment, on s'entraide tous entre nous, c'est une belle valeur et j'espère que cela perdurera. Je cite notamment Sarah, Chloé, Léo, Milena, Bradel, Gaetan, et les étudiants du bureau 110. Bon courage à vous pour la suite de vos projets, et plein de bonheur en général. La distance (d'un étage) aura limité nos interactions mais je suis ravie d'avoir croisé vos chemins, et merci à vous tous pour tous vos mots et d'être venus si nombreux à ma fête post soutenance.

Passons aux personnes de l'extérieur,

Les filles, « les filles de la fac », qu'est-ce que j'ai de la chance de vous compter parmi mes amies. Je vais faire court sinon je pourrais écrire 10 pages, et vous ne serez probablement pas amenées à lire ces lignes, mais je tenais à vous remercier ici car c'est aussi grâce à vous que j'ai tenu bon pendant les moments difficiles de cette thèse. Et c'est également avec vous que j'ai fêté les réussites. Mes plus belles rencontres de fac de pharma. J'ai hâte de voir ce que l'avenir nous réserve à toutes, et de pouvoir fêter les bonheurs de chacune !

J'ai fait beaucoup de très belles rencontres pendant cette thèse, mais celle qui compte le plus c'est bien toi JB. Tu fais partie de la plupart de mes meilleurs souvenirs au labo. Et j'en ai des souvenirs ! D'abord, des fous rires pendant les nombreuses pauses, pendant les soirées au PMU, les soirées Koh Lanta, puis des week ends et des voyages, le plus incroyable des souvenirs étant sûrement les aurores boréales. Je te remercie pour ça et puis pour ton soutien durant cette thèse. Tu m'as soutenue dans les moments les plus sombres que j'ai dû traverser durant cette thèse, au plan personnel et professionnel, et tu m'as relevée au moment où ma confiance en moi était au plus bas. Tu m'apprends petit à petit à bannir la phrase « je suis nulle » de mon vocabulaire. Beaucoup de gens m'ont aidé pendant cette thèse mais c'est bien toi qui as dû me supporter tous les jours.

J'ai hâte de créer de nouveaux souvenirs, des souvenirs Suisse, des randos, et des voyages. Merci pour tout.

Et puis ma famille. Mon petit frère, Thibaut et puis mes parents. Je ne saurais suffisamment vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi. Vous m'avez toujours soutenu dans mes projets même lorsque cela vous dépassait, tout d'abord avec pharma puis avec le doctorat. Ça n'a pas toujours été facile mais vous avez cru en moi. Vous vous êtes toujours accrochés pour essayer de comprendre, jusqu'à comprendre certaines spécificités de mon projet de thèse. Ces quatre dernières années ne nous ont pas épargnés, mais on a su se relever.

Si j'en suis là c'est grâce à vous, car c'est vous qui m'avez inculqué la persévérance, la résilience, et le courage, mais aussi la débrouillardise.

Thibaut, je te souhaite plein de bonheur, et de beaux projets avec Manon et plein de ronrons avec votre nouveau petit monstre poilu.

Maman et Papa je vous souhaite plein de bonheur dans votre nouvelle maison à Fouesnant, avec plein de belles balades au bord de la mer et de beaux voyages.

Merci !

Table des matières

REMERCIEMENTS	2
TABLE DES MATIERES	8
TABLE DES FIGURES.....	11
TABLE DES TABLEAUX.....	13
INTRODUCTION.....	14
I. MALADIE D'ALZHEIMER	15
I.A. Généralités	15
I.B. Les lésions histopathologiques caractéristiques de la MA	16
I.C. Moyens diagnostiques actuels	18
I.D. Traitement.....	21
II. PROTEINE TAU	24
II.A. Origine dans le cerveau	24
II.B. Modifications post-traductionnelles.....	25
II.C. Localisation cellulaire et sub-cellulaire.....	29
II.D. Turn-over de tau	31
II.E. Fonctions	33
II.F. Conditions pathologiques.....	37
II.F.1. Les tauopathies	37
II.F.2. La tauopathie dans la maladie d'Alzheimer	39
II.G. Propagation des formes pathologiques de la protéine tau	41
II.G.1. Les stades de Braak.....	41
II.G.2. Hypothèse Prion.....	43
II.G.3. Propagation de la protéine tau dans les autres tauopathies	44
II.G.4. Mécanismes de propagation interneuronale.....	45
II.G.5. Impact de l'Amyloïdose sur tau	49
II.G.6. Modèles d'études tauopathies	50
II.G.6.a) Modèles in vitro	50
II.G.6.b) Modèles in vivo	51
III. NEUROINFLAMMATION	54
III.A.1. Rôle des astrocytes dans la maladie d'Alzheimer	55
III.A.2. La réponse du système immunitaire périphérique	58
III.A.3. La microglie.....	60
III.A.3.a) Origines et fonctions	60
III.A.3.b) Hétérogénéité microgliale.....	63
III.A.3.c) Microglie et tau	65
III.A.3.d) Microglie et propagation de la protéine Tau.....	74
IV. OBJECTIFS DE LA THESE	77
MATERIEL & METHODES	82
I. ANIMAUX.....	83
II. CONSTRUCTIONS AAV	83
II.A. Différents vecteurs utilisés	83
II.B. Production virale	84
III. PROCEDURES CHIRURGICALES	85
IV. HISTOLOGIE	86
IV.A. Perfusion.....	86
IV.B. Immunohistochimie (IHC).....	87
V. ANALYSES D'IMAGES.....	88

V.A.	Mesure du niveau de propagation en contralatéral après injection dans le GD	88
V.B.	Mesure du niveau de propagation en ipsilatéral après injection dans le GD	89
V.C.	Acquisitions par scanner de lames	90
V.D.	Mesure du niveau d'agrégation	90
V.E.	Mesure de la neurodégénérescence	90
V.F.	Mesure du niveau d'inflammation	90
V.G.	Analyse morphologique de la microglie	91
VI.	HYBRIDATION IN SITU	91
VII.	TRANSCRIPTOMIQUE	93
RESULTATS	96
I.	PARTIE 1 – DEVELOPPEMENT D'UN MODELE DE TAUOPATHIE INDUITE DANS LA RETINE	97
I.A.	Etude de la propagation de la protéine tau dans un modèle ciblant les cellules ganglionnaires de la rétine – Résultats publiés.....	97
I.B.	Etude de l'effet de l'altération de la matrice extracellulaire sur la propagation de la protéine tau 100	
I.B.1.	Design expérimental	101
I.B.2.	Résultats	102
I.B.3.	Discussion	107
II.	PARTIE 2 - DEVELOPPEMENT D'UN MODELE DE TAUOPATHIE PAR TRANSFERT DE GENES CIBLANT LE GYRUS DENTE, POUR ETUDIER LA PROPAGATION DES ESPECES TOXIQUES DE LA PROTEINE TAU	109
II.A.	Preuve de concept du modèle	109
II.A.1.	Résultats avec construction Syn2- Tau WT/P301L/ProAg.....	109
II.A.1.a)	Résultats.....	110
II.A.1.b)	Discussion.....	114
II.A.2.	Résultats avec constructions PGK et lentivirus	115
II.A.2.a)	Utilisation du promoteur PGK	116
II.A.2.b)	Utilisation des lentivirus.....	117
II.A.2.c)	Discussion.....	120
II.B.	Etude de l'influence de l'agrégation de la protéine tau sur sa propagation	121
II.B.1.	Design expérimental	121
II.B.2.	Résultats	122
II.B.3.	Discussion	132
II.C.	Etude de l'influence de l'activation microgliale sur la propagation de la protéine tau.....	134
II.C.1.	Design expérimental	134
II.C.2.	Résultats	135
II.C.3.	Discussion	137
II.D.	Effet de l'âge sur la propagation de la protéine tau.....	139
II.D.1.	Design expérimental	139
II.D.2.	Résultats	140
II.D.3.	Discussion	142
II.E.	Effet de l'amyloïdose sur la propagation de la tauopathie	143
II.E.1.	Design expérimental	143
II.E.2.	Résultat	144
II.E.3.	Discussion	152
II.F.	Effet de l'agrégation de la protéine tau, dans un contexte d'amyloïdose, sur sa propagation... 153	
II.F.1.	Design expérimental	154
II.F.2.	Résultats	156
II.F.3.	Discussion	158
III.	PARTIE 3 – ANALYSE DU PROFIL TRANSCRIPTOMIQUE DE LA MICROGLIE DANS UN MODELE MURIN D'INDUCTION D'UNE TAUOPATHIE PAR TRANSFERT DE GENES.....	161
III.A.	Design expérimental.....	161
III.B.	Résultats.....	162
III.C.	Discussion	171
DISCUSSION GENERALE	174

I.	RAPPEL DES PRINCIPAUX RESULTATS.....	175
I.A.	<i>Le modèle intravitréen</i>	175
I.B.	<i>Le modèle du gyrus denté</i>	176
II.	LIMITES DE NOTRE ETUDE	182
III.	PERSPECTIVES	184
	BIBLIOGRAPHIE	186
	ANNEXES	210

Table des figures

FIGURE 1. LES VOIES DE CLIVAGE DE L'APP	16
FIGURE 2. STADES CLINIQUES DE LA MA.....	18
FIGURE 3. EVOLUTION DES BIOMARQUEURS DE LA MA.....	20
FIGURE 4. SITES DE PHOSPHORYLATION DE LA PROTEINE TAU HUMAINE RETROUVEES DANS LE CADRE DE LA MA	26
FIGURE 5. NIVEAU DE PHOSPHORYLATION DE LA PROTEINE TAU AU COURS DU DEVELOPPEMENT ET CHEZ L'HOMME ADULTE EN CONDITION PHYSIOLOGIQUE ET PATHOLOGIQUE.....	27
FIGURE 6. DIFFERENTES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES RETROUVEES SUR LA PROTEINE TAU.....	29
FIGURE 7. LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE LA PROTEINE EN CONDITION PHYSIOLOGIQUE.....	30
FIGURE 8. DIFFERENCES DE LOCALISATION ET D'EXPRESSION DU GENES MAPT CHEZ L'HOMME ET LE MODELE MURIN.	31
FIGURE 9. NOUVELLE HYPOTHESE SUR LES SITES DE FIXATION DE LA PROTEINE TAU SUR LES MICROTUBULES.....	34
FIGURE 10. MODIFICATIONS DE LOCALISATION DE LA PROTEINE TAU EN CONDITION PATHOLOGIQUE ENTRAINANT DES MODIFICATIONS DU TRANSPORT AXONAL.....	35
FIGURE 11. PRINCIPALES FONCTIONS DE LA PROTEINE TAU	37
FIGURE 12. CLASSIFICATION DES TAUOPATHIES.....	39
FIGURE 13. CASCADE PATHOLOGIQUE DE LA PROTEINE TAU ENTRAINANT SON AGREGATION.....	40
FIGURE 14. FONCTIONS DE LA PROTEINE TAU EN CONDITIONS PATHOLOGIQUES.....	41
FIGURE 15. PROGRESSION DE L'AMYLOÏDOSE ET DE LA TAUOPATHIE DANS LE CADRE DE LA MA.	42
FIGURE 16. MECANISMES INTER-NEURONAUX DE PROPAGATION DE LA PROTEINE TAU.....	48
FIGURE 17. GENES AYANT DES VARIANTS ASSOCIES AVEC L'APPARITION DES LOAD.	55
FIGURE 18. INTERACTION ENTRE LA MICROGLIE ET LES ASTROCYTES.....	57
FIGURE 19. FONCTIONS DU SYSTEME IMMUNITAIRE PERIPHERIQUE LORS DU DEVELOPPEMENT ET VIEILLISSEMENT CEREBRAL.	59
FIGURE 20. ORIGINE DEVELOPPEMENTALE DES PROGENITEURS MICROGLIAUX.	61
FIGURE 21. DIVERSITE DES FONCTIONS MICROGLIALES EN PHYSIOLOGIE.	63
FIGURE 22. HETEROGENEITE MICROGLIALE.	64
FIGURE 23. VOIES DE SIGNALISATION DU RECEPTEUR MICROGLIAL TREM2.	69
FIGURE 24. VARIANTS DE TREM2.	71
FIGURE 25. DICHOTOMIE D'ACTION DE LA MICROGLIE ET DES VARIANTS DE TREM2 SUR LA PATHOLOGIE.	72
FIGURE 26. INFLUENCE DE L'AMYLOÏDOSE ET DE L'ACTIVATION MICROGLIALE SUR LA PROPAGATION DE LA PROTEINE TAU.	76
FIGURE 27. VECTEUR VIRAL COMPOSE DU GENE RAPPORTEUR GFP, DE LA PROTEINE TAU PORTANT UN TAG V5, LES DEUX ETANT SEPARES PAR LE PEPTIDE P2A.	78
FIGURE 28. SCHEMA D'INJECTION ET DE PROPAGATION	78
FIGURE 29. RECAPITULATIF DES DIFFERENTS OBJECTIFS DU PROJET.....	80
FIGURE 30. SCHEMA DU VECTEUR VIRAL SYN2-GFP-P2A-TAUWT-V5.....	84
FIGURE 31. SCHEMA DU VECTEUR VIRAL PGK-GFP-P2A-TAUWT-V5	84
FIGURE 32. SCHEMA DU VECTEUR VIRAL CBA-TAUWT	84
FIGURE 33. COORDONNEES D'INJECTION DES AAV SELON L'ALLEN BRAIN ATLAS.....	86
FIGURE 34. SCHEMATISATION DU DESIGN EXPERIMENTAL.	98
FIGURE 35. EXPRESSION DE LA PROTEINE TAU HUMAINE DANS LES DIFFERENTES STRUCTURES ANATOMIQUES DES VOIES VISUELLES... 98	
FIGURE 36. PROPAGATION DE LA PROTEINE TAU DANS LE MODELE D'INJECTIONS INTRA-VITREENNES.	100
FIGURE 37. DESIGN EXPERIMENTAL DE L'ETUDE DE L'INFLUENCE DES PNNs SUR LA PROPAGATION DE LA PROTEINE TAU.....	102
FIGURE 38. DEVELOPPEMENT D'UNE TAUOPATHIE DANS LES RGCs APRES INJECTION DE RAAV PERMETTANT LA SUREXPRESSION DE LA PROTEINE TAU HUMAINE.....	103
FIGURE 39. ALTERATION DES PNNs APRES INJECTION DE LA CHABC DANS LE COLLICULUS SUPERIEUR GAUCHE.	104
FIGURE 40. QUANTIFICATION DE L'INTENSITE DE MARQUAGE GFP DANS LES ARBORISATIONS TERMINALES DES RGCs, AU NIVEAU DES COLLICULI SUPERIEURS.....	105
FIGURE 41. QUANTIFICATION DE L'INTENSITE DE MARQUAGE WFA DANS LES COLLICULI SUPERIEURS.....	106
FIGURE 42. OBSERVATION DU MARQUAGE V5 DANS LES COLLICULI SUPERIEURS.....	106
FIGURE 43. PROPAGATION DE LA PROTEINE TAU HUMAINE DANS LA COUCHE POLYMORPHIQUE DU GYRUS DENTE CONTRALATERAL. 111	
FIGURE 44. PROPAGATION DE LA PROTEINE TAU DANS LE GD CONTRALATERAL EN FONCTION DE LA DOSE DE VECTEUR INJECTEE 111	

FIGURE 45. VALIDATION DU MODELE PAR HYBRIDATION IN SITU	112
FIGURE 46. PROPAGATION DE LA PROTEINE TAU HUMAINE DANS LA COUCHE POLYMORPHIQUE DU GYRUS DENTE CONTRALATERAL APRES INJECTION DES TRANSGENES TAU PERMETTANT SON AGREGATION.	113
FIGURE 47. NIVEAU D'AGREGATION DE LA PROTEINE TAU APRES INJECTION DES AAV-TAUP301L ET TAUProAg DANS LE GD CHEZ LA SOURIS	114
FIGURE 48. DESIGN EXPERIMENTAL DE L'ETUDE BASEE SUR L'INJECTION DE RAAV SOUS PROMOTEUR PGK	116
FIGURE 49. NIVEAU D'AGREGATION DE LA PROTEINE TAU APRES INJECTION DES RAAV PORTANT LE PROMOTEUR PGK.	117
FIGURE 50. DESIGN EXPERIMENTAL DE L'ETUDE REPOSANT SUR L'INJECTION DE LENTIVIRUS.....	118
FIGURE 51. PROPAGATION DE LA PROTEINE TAU EN CONTRALATERAL APRES INJECTION DES LENTIVIRUS.	120
FIGURE 52. NIVEAU D'AGREGATION DE LA PROTEINE TAU APRES INJECTION DES LENTIVIRUS.....	120
FIGURE 53. MARQUAGE AT100 OBTENU DANS LA REGION CA1 DE L'HIPPOCAMPE APRES INJECTION DE L'AAV-TAUProAg.....	122
FIGURE 54. DESIGN EXPERIMENTAL DE L'ETUDE DE L'INFLUENCE DE L'AGREGATION DE LA PROTEINE TAU SUR SA PROPAGATION.....	122
FIGURE 55. PROPAGATION DE LA PROTEINE TAU HUMAINE DANS LE GYRUS DENTE ET LES REGIONS CA1,2 ET 3 DE L'HIPPOCAMPE CONTRALATERAL A L'INJECTION DU VECTEUR RAAV.....	124
FIGURE 56. HYBRIDATION IN SITU	125
FIGURE 57. PROPAGATION DE LA PROTEINE TAU HUMAINE MUTEE P301L UN ET TROIS MOIS APRES INJECTION, DANS LE GD ET LES REGIONS CA1, 2 ET 3 DE L'HIPPOCAMPE.....	126
FIGURE 58. QUANTIFICATION DU NIVEAU D'AGREGATION DE LA PROTEINE TAU	127
FIGURE 59. METHODE D'ANALYSE DE LA NEURODEGENERESCENCE POUR L'EXPERIENCE ETUDIANT L'INFLUENCE DE L'AGREGATION DE LA PROTEINE TAU SUR SA PROPAGATION.....	128
FIGURE 60. ANALYSE DE LA NEURODEGENERESCENCE INDUITE PAR LA SUREXPRESSION DES DIFFERENTES FORMES DE TAU.	130
FIGURE 61. ANALYSE SHOLL DE LA MICROGLIE DANS LA COUCHE GRANULAIRE DU GYRUS DENTE CONTRALATERAL.	131
FIGURE 62. ANALYSE MORPHOMETRIQUE DE LA MICROGLIE DANS LE GD CONTRALATERAL.	132
FIGURE 63. DESIGN EXPERIMENTAL DE L'ETUDE DE L'INFLUENCE DE L'ACTIVATION MICROGLIALE, VIA SON RECEPTEUR TREM2, SUR LA PROPAGATION DE LA PROTEINE TAU.....	135
FIGURE 64. PROPAGATION DE LA PROTEINE TAU HUMAINE TROIS ET SIX MOIS APRES INJECTION, DANS LE GYRUS DENTE ET LES REGIONS CA1, 2 ET 3 DE L'HIPPOCAMPE DE SOURIS DE LA LIGNEE TREM2 ^{-/-}	136
FIGURE 65. MESURE DE L'INTENSITE DU MARQUAGE IBA1	137
FIGURE 66. DESIGN EXPERIMENTAL DE L'ETUDE DE L'EFFET DE L'AGE SUR LA PROPAGATION DE LA PROTEINE TAU.	140
FIGURE 67. NIVEAU DE TRANSDUCTION DE L'HIPPOCAMPE	140
FIGURE 68. QUANTIFICATION DE LA PROPAGATION DE LA PROTEINE TAU EN FONCTION DE L'AGE.	141
FIGURE 69. QUANTIFICATION DE LA NEURODEGENERESCENCE INDUITE APRES INJECTION DE L'AAV-TAUWT CHEZ DES SOURIS JEUNES ET AGEES.	142
FIGURE 70. DESIGN EXPERIMENTAL DE L'ETUDE DE L'INFLUENCE DE L'AMYLOÏDOSE SUR LA PROPAGATION DE LA PROTEINE TAU.	144
FIGURE 71. INFLUENCE DE L'AMYLOÏDOSE SUR LA PROPAGATION DE LA PROTEINE TAU DANS L'HIPPOCAMPE CONTRALATERAL.....	145
FIGURE 72. HYBRIDATION IN SITU	146
FIGURE 73. PROPAGATION DE LA PROTEINE TAU DANS L'HIPPOCAMPE IPSILATERAL	147
FIGURE 74. DELIMITATION DES REGIONS ANALYSEES POUR LA QUANTIFICATION DES PLAQUES AMYLOÏDES	148
FIGURE 75. COMPTAGE DES PLAQUES AMYLOÏDES DANS DIFFERENTES SOUS-REGIONS ETUDIEES, DU COTE INJECTE AVEC L'AAV-TAU ET EN CONTRALATERAL.	149
FIGURE 76. INFLUENCE DE L'INJECTION DE RAAV PERMETTANT LA SUREXPRESSION DE LA PROTEINE TAU HUMAINE SUR LA TAILLE ET LE NOMBRE DE PLAQUES AMYLOÏDES DANS DIFFERENTES REGIONS CEREBRALES.....	152
FIGURE 77. DESIGN EXPERIMENTAL DE L'ETUDE DE L'INFLUENCE DE L'AGREGATION DE LA PROTEINE TAU HUMAINE SUR SA PROPAGATION DANS UN CONTEXTE D'AMYLOÏDOSE.	154
FIGURE 78. COURBE DE SURVIE DES SOURIS UTILISEES LORS DE CETTE ETUDE AVANT LEUR UTILISATION POUR L'ETUDE.	155
FIGURE 79. COURBE DE SURVIE DES SOURIS DE L'ETUDE DE L'AGREGATION DE LA PROTEINE TAU DANS UN CONTEXTE D'AMYLOÏDOSE.	156
FIGURE 80. PROPAGATION DE LA PROTEINE TAU EN FONCTION DE SON AGREGATION ET DE LA PRESENCE OU NON DE PLAQUES AMYLOÏDES.	157
FIGURE 81. PROPAGATION DE LA PROTEINE TAU EN FONCTION DE SON AGREGATION ET DE LA PRESENCE OU NON DE PLAQUES AMYLOÏDES EN DEHORS DE L'HIPPOCAMPE.....	158
FIGURE 82. DESIGN EXPERIMENTAL DE L'ETUDE TRANSCRIPTOMIQUE DES ASTROCYTES ET MICROGLIES DANS LE MODELE D'INJECTION DE RAAV PERMETTANT LA SUREXPRESSION DE LA PROTEINE TAI HUMAINE DANS L'HIPPOCAMPE.	162

FIGURE 83. ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES DES ECHANTILLONS.	164
FIGURE 84. DIAGRAMME DE VENN DES DEG PERMETTANT LA VISUALISATION DES DONNEES.	165
FIGURE 85. VOIES DE SIGNALISATION LES PLUS REPRESENTEES DANS L'ANALYSE D'ENRICHISSEMENT KEGG.	166
FIGURE 86. ANALYSE GSEA.....	169
FIGURE 87. ANALYSE DES TERMES DE LA COMPOSANTE CELLULAIRE PAR GENE ONTOLOGY.	170
FIGURE 88. REPROGRAMMATION METABOLIQUE DE LA MICROGLIE DANS LE CADRE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER.	172
FIGURE 89. SCHEMA RECAPITULATIF DES HYPOTHESES ISSUES DE L'ETUDE DE L'AGREGATION DE LA PROTEINE TAU.	181

Table des tableaux

TABLEAU 1. REFERENCES ET DILUTIONS DES ANTICORPS UTILISES POUR LES DIFFERENTES IMMUNOHISTOCHEMIES.	88
TABLEAU 2. REFERENCES PRODUITS POUR HYBRIDATION IN SITU.....	93
TABLEAU 3. RECAPITULATIF DES VOIES DEREGULEES DANS LE GROUPE TAUProAg PAR RAPPORT AUX GROUPES GFP ET TAUWT... ..	171
TABLEAU 4. TABLEAU RECAPITULATIF DES PARADIGMES EXPERIMENTAUX ETUDIES DANS LE MODELE D'INJECTIONS DES VECTEURS RAAV DANS LE GD ET RESULTATS PRINCIPAUX.....	178

INTRODUCTION

I. Maladie d'Alzheimer

I.A. Généralités

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative caractérisée par une perte lente et progressive des fonctions cognitives qui débute par des troubles de la mémoire récente et s'étend par la suite aux fonctions exécutrices comme le langage et la capacité d'adaptation menant à une dépendance des patients. C'est également la première cause de démence dans le monde, ce qui représente aujourd'hui plus de 55 millions de patients avec une incidence de 10 millions de nouveaux patients chaque année (« OMS | Démence » s. d.).

Ces caractéristiques font de cette maladie un enjeu majeur de santé publique. En effet, bien qu'elle ait été découverte en 1905 par Aloïs Alzheimer, il n'existe actuellement aucun traitement curatif et les causes de la maladie sont loin d'être totalement élucidées. De plus, la population étant vieillissante, il est estimé que, d'ici à 2050, la prévalence de la maladie triplera dans le monde (« OMS | Démence » s. d.). Il est donc indispensable de mieux comprendre les mécanismes fondamentaux à l'origine de cette maladie afin d'identifier et de développer des stratégies thérapeutiques efficaces.

La maladie est caractérisée par deux types de lésions histopathologiques : les lésions extracellulaires amyloïdes causées par le peptide A β , et les dégénérescences neurofibrillaires intra-neuronales causées par la protéine tau. On retrouve également une neuroinflammation importante, caractéristique des maladies neurodégénératives, impliquant notamment les astrocytes et la microglie, cette dernière étant la cellule immunitaire résidente du système nerveux central (SNC).

On distingue deux formes de MA : il existe une forme sporadique (ou LOAD : *late onset Alzheimer's disease*) et une forme héréditaire (ou EOAD : *early onset Alzheimer's disease*). Cette dernière est rare et ne concerne que moins d'1% des patients mais se développe généralement avant 60 ans et présente une évolution rapide. Elle est due à des mutations dans les gènes APP, PSEN1 et PSEN2. La forme sporadique, quant à elle, est la forme la plus répandue, elle concerne les personnes de plus de 65 ans et les facteurs de risques sont multiples. Les deux facteurs de risque les plus prédominants sont l'âge et le sexe. En effet, pour les formes sporadiques les personnes touchées sont généralement âgées (plus de 65 ans), et le ratio homme/femme est de 1 pour 2, ainsi les femmes ont plus de risque de

développer cette maladie. De plus, on retrouve des facteurs de risque environnementaux comme le stress, la qualité du sommeil, la pollution, le niveau d'éducation mais aussi des facteurs impliquant des comorbidités comme le diabète, l'obésité, les maladies cardiovasculaires ou encore la prise prolongée de benzodiazépines (X.-X. Zhang et al. 2021; Barnes et Yaffe 2011; Billioti de Gage et al. 2014).

I.B. Les lésions histopathologiques caractéristiques de la MA

Dans la MA il existe deux types de protéinopathies : les plaques amyloïdes causées par le peptide A-beta ($A\beta$) et les dégénérescences neurofibrillaires causées par la protéine tau. Ces deux protéines sont présentes à l'état physiologique dans le cerveau et sont nécessaires au bon fonctionnement cérébral, même si l'ensemble de leurs fonctions n'est pas totalement connu.

Le peptide $A\beta$ est composé de 39 à 43 acides aminés et provient du clivage de la glycoprotéine transmembranaire APP (peptide précurseur de l'amyloïde).

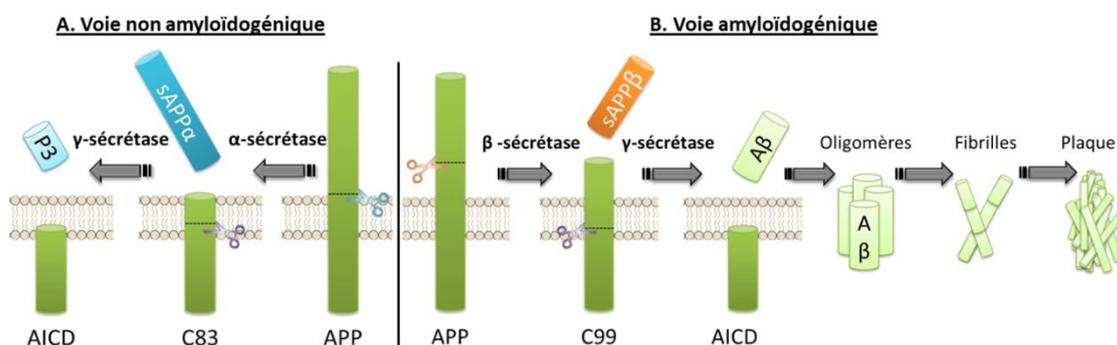


Figure 1. Les voies de clivage de l'APP D'après le manuscrit de thèse de Ceyzériat K.

Le clivage peut avoir lieu selon deux voies : la voie non amyloïdogène et la voie amyloïdogène (Figure 1).

Par la voie amyloïdogène l'APP est clivée par l' α -sécrétase en deux fragments : le fragment C83 (fragment carboxy-terminal de 83 résidus) qui demeure transmembranaire et le fragment sAPP α soluble ayant des propriétés neurotrophiques. Ensuite la γ -sécrétase clive le fragment C83 en deux fragments, le fragment AICD (domaine intracellulaire de l'APP) et le peptide P3 soluble. Cette voie est non-pathogénique. A l'inverse, la voie amyloïdogène implique le clivage

successif d'APP par la β -sécrétase (ou BACE1) et par la γ -sécrétase. Ces clivages libèrent respectivement le fragment C99 et le fragment sAPP β soluble, puis le fragment AICD et le peptide A β de 40 à 42 acides aminés. Ce peptide A β pourra alors s'oligomériser et à terme participer à la formation des plaques amyloïdes.

En condition physiologique les deux voies sont utilisées mais la voie non amyloïdogène est majoritaire. Dans un contexte pathologique l'équilibre est rompu et la machinerie de dégradation du peptide A β ne peut pas compenser ce déséquilibre. Ainsi le peptide A β s'accumule ce qui favorise son oligomérisation et la formation des plaques amyloïdes.

Comme expliqué précédemment, les formes EOAD de la MA impliquent des mutations génétiques héréditaires. Ces mutations touchent le gène de l'APP sur le chromosome 21 et les gènes PSEN1, PSEN2 présents respectivement sur les chromosomes 14 et 1 et qui codent pour 2 des 4 sous-unités de la γ -sécrétase. Ces mutations non-sens autosomales et dominantes sont les causes les plus communes de cas familiaux de MA. Les mutations du gène PSEN1 entraînent les formes les plus précoces et les plus agressives de MA, avec une apparition des symptômes entre 30 et 65 ans, pour la majorité entre 50 et 60 ans. Ces mutations entraînent notamment une augmentation du taux d'A β -42 (Cacace, Sleegers, et Van Broeckhoven 2016; Hampel et al. 2021).

Le deuxième type de lésions histologiques, les dégénérescences neurofibrillaires, sont quant à elles formées par l'accumulation de protéine tau hyperphosphorylée et sont intra-neuronales. La protéine tau fait partie de la famille des protéines associées aux microtubules : sa fonction principale est la stabilisation du cytosquelette. Cette protéine peut être physiologiquement phosphorylée, ce qui permet la régulation de ses fonctions, et en particulier de son affinité pour les microtubules, mais on peut également observer une hyperphosphorylation en condition pathologique. Nous détaillerons plus amplement les caractéristiques de la protéine tau en conditions physiologiques et pathologiques dans la deuxième partie de cette introduction.

I.C. Moyens diagnostiques actuels

Lorsque des soupçons de développement de la maladie sont établis, un examen cognitif appelé bilan neuropsychologique est établi par le neuropsychologue afin d'évaluer les performances cognitives du patient et détecter un éventuel déclin cognitif. Ce bilan est aussi appelé MMSE pour « Mini Mental State Examination ». Il permet d'évaluer entre autres la mémoire, le langage, et la compréhension.

On peut alors distinguer différents stades de la pathologie Alzheimer (Figure 2), allant de l'absence de symptômes, l'apparition de symptômes modérés qui n'altère pas la vie courante (troubles cognitifs légers, ou MCI pour *mild cognitive impairment* en anglais), et les trois derniers stades de la pathologie qui vont de léger à sévère en passant par le stade modéré, et qui sont accompagnés d'une démence due à la maladie interférant avec les activités du quotidien avec une aggravation avec le temps.

Alzheimer's Disease (AD) Continuum

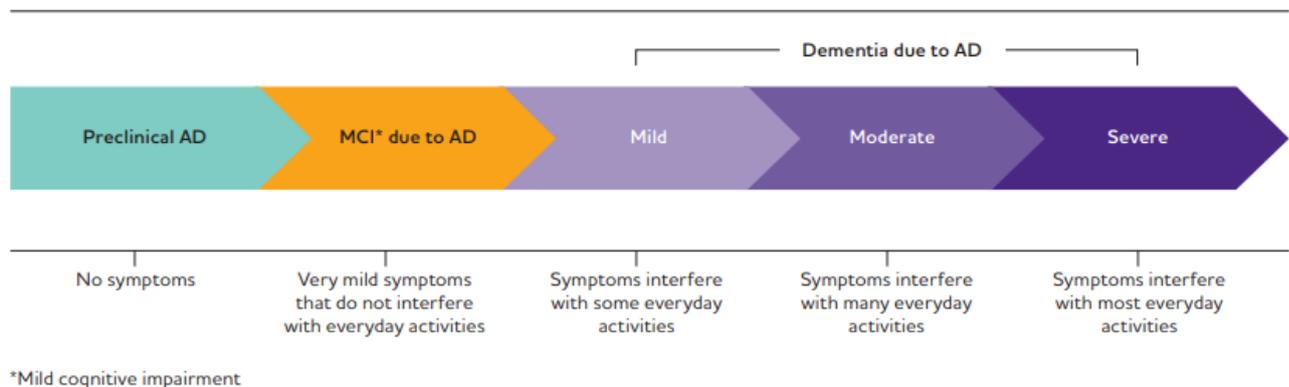


Figure 2. Stades cliniques de la MA. D'après AAIC Fact and Figures 2020

Au cours de la dernière décennie, l'imagerie médicale est devenue un outil prépondérant dans l'évaluation du stade de la pathologie et son évolution.

L'IRM (imagerie par résonance magnétique) est notamment utilisée pour mesurer l'atrophie cérébrale. Cet examen permet de mettre en évidence l'atrophie du cortex cérébral et de l'hippocampe ainsi que l'augmentation du volume des ventricules qui caractérisent la maladie (Bobinski et al. 1999; Whitwell et al. 2012). Par ailleurs, l'IRM permet d'obtenir des données fonctionnelles sur l'activité cérébrale qui peuvent être mises en registre avec les données morphologiques afin d'établir des cartes des réseaux de neurones connectés entre eux

(méthode appelée « resting state »). Cette méthode a permis de mettre en évidence des pertes de connectivité entre certaines régions cérébrales chez les patients MCI et MA (Y. Li et al. 2016).

La TEP (tomographie par émission de positons) est utilisée en routine afin de quantifier la consommation de glucose par le cerveau. L'injection chez le patient de desoxy-glucose marqué au Fluor18 permet en effet d'observer le profil métabolique du patient, la diminution de consommation de glucose dans certaines régions étant un profil caractéristique de la maladie d'Alzheimer. Depuis quelques années, de nouveaux radiotraceurs sont apparus afin de visualiser l'étendue des lésions amyloïdes et neurofibrillaires. En parallèle, la recherche de traceurs toujours plus spécifiques des différentes maladies neurodégénératives impliquant tau est toujours en cours.

Le développement de ces nouveaux traceurs étant très récent, le diagnostic de la maladie d'Alzheimer repose toujours sur une mesure des marqueurs d'amyloïdose et de tauopathie dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). Après une ponction lombaire on mesure le taux d'A β -42 et de protéine tau totale et phosphorylée dans le LCR (Recommandation de bonnes pratiques_HAS_2011). Dans le cas de la MA on observe une diminution d'A β -42 et une augmentation des formes phosphorylées de la protéine tau. On peut également mesurer le ratio A β -42 sur A β -40. Ce ratio renseigne sur la gravité de l'amyloïdose et la charge en plaque sénile. Plus le ratio est faible plus l'amyloïdose est avancée (Doecke et al. 2020). Il est également possible de mesurer la neurodégénérescence grâce au dosage de neurofilaments (Nfl = neurofilament light chain) dont la présence dans le LCR signe une souffrance des neurones dans le cerveau.

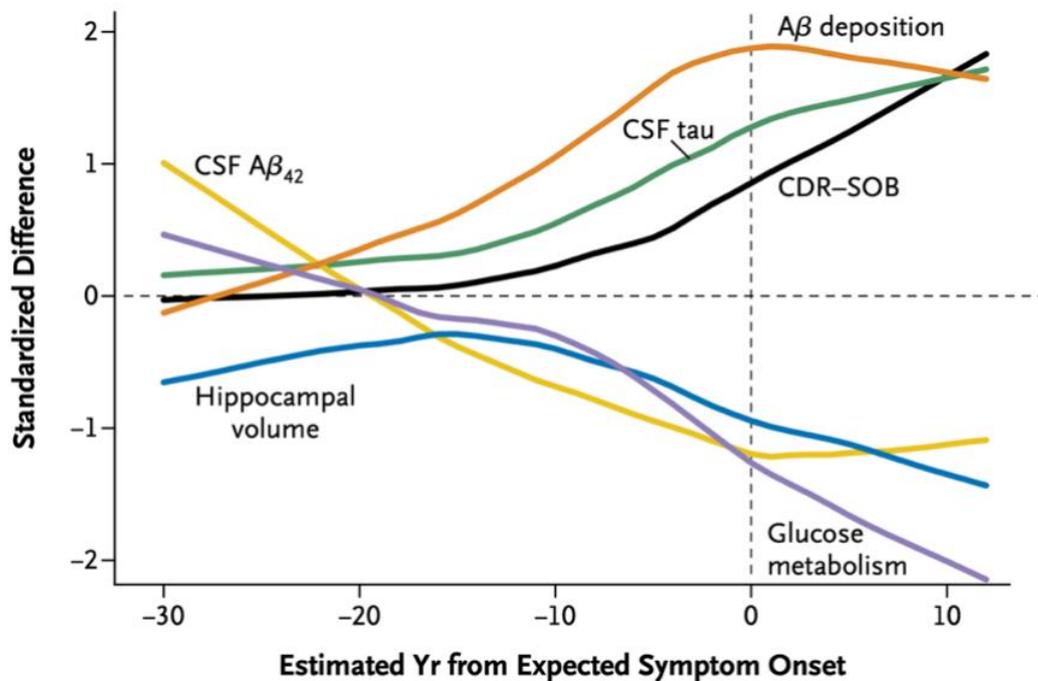


Figure 3. Evolution des biomarqueurs de la MA

L'une des raisons pour laquelle il est difficile de développer des traitements ciblant la maladie dans ses stades précoces est l'absence de biomarqueurs robustes pour détecter la maladie le plus tôt possible. Actuellement, le diagnostic de la maladie repose sur des techniques d'imagerie qui sont coûteuses et/ou des méthodes biochimiques qui nécessitent un prélèvement invasif de LCR, ce qui n'est pas réalisable en routine. En ce qui concerne le métabolisme du glucose, bien qu'il soit précoce et facilement mesurable, il n'est pas suffisamment spécifique de la MA. De ce fait, tous les traitements qui sont actuellement en essais cliniques ou qui ont été mis sur le marché ciblent la maladie de manière tardive lorsque les lésions sont déjà présentes et les symptômes déjà installés. Il est alors sans doute déjà trop tard pour infléchir la progression de la maladie. En effet les marqueurs de développement de la maladie les plus reconnus actuellement sont des marqueurs tardifs ou qui nécessitent une intervention invasive pour les mesurer (ponction lombaire) ce qui complique leur utilisation en routine et sur un grand nombre de personnes pour des raisons éthiques.

C'est pour cette raison que depuis quelques années, la recherche de biomarqueurs dans le cadre de la maladie d'Alzheimer est en plein essor. De nombreuses équipes étudient la possibilité de mettre en évidence des marqueurs de la maladie dans le sang. Les marqueurs étudiés sont identiques à ceux mesurés dans le LCR (Hampel et al. 2023). La difficulté de cette

méthode repose sur le fait que les marqueurs sont en quantité beaucoup plus faible que dans le LCR, la sensibilité de mesure doit donc être significativement augmentée. Malgré tout, il est possible depuis quelques années de mesurer le ratio A β -42/40 dans le plasma de manière précise (Nakamura et al. 2018; Palmqvist et al. 2019). En ce qui concerne la pathologie tau, on retrouve le même schéma que dans le LCR, avec une augmentation de la protéine tau phosphorylée plasmatique bien en amont de l'apparition des agrégats de tau, et une chronologie bien particulière de phosphorylation de sites spécifiques de la protéine. En effet, on retrouve d'abord la protéine tau phosphorylée sur la thréonine 231, puis sur la thréonine 217 et enfin sur la thréonine 181 (Ashton et al. 2022; Suárez-Calvet et al. 2020). Comme expliqué précédemment, la mesure de NfL reflète la souffrance neuronale. Ce marqueur est également mesurable dans le plasma, et l'augmentation de sa concentration est notamment associée aux stades MCI avec démence (Zetterberg et al. 2016; Mattsson et al. 2017). Enfin, d'autres études montrent que la mesure de la GFAP plasmatique est également un bon marqueur de la pathologie. Il est augmenté chez les patients aux stades précoces de la maladie d'Alzheimer et l'augmentation est d'autant plus importante que la pathologie évolue (Benedet et al. 2021).

I.D. Traitement

Malgré les nombreuses années d'étude et la découverte de nouveaux biomarqueurs, le traitement de la maladie d'Alzheimer reste un challenge. Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement préventif et les traitements développés sont indiqués pour des patients ayant déjà des symptômes de la maladie. Ils ont pour but de ralentir la progression de la maladie. Comme décrit précédemment, les traitements développés jusqu'à maintenant pour la MA sont peu efficaces, très certainement car appliqués trop tardivement du fait de l'absence d'un biomarqueur idéal qui serait détectable bien en amont de l'apparition des symptômes, peu coûteux, mesurable de manière non invasive, spécifique de la pathologie, et applicable à l'ensemble de la population. Ceci étant, de nombreuses stratégies ont été développées afin d'améliorer la qualité de vie des patients, et de réduire ou ralentir les symptômes cognitifs.

Les premiers traitements à avoir été utilisés sont notamment des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase comme le donépézil et la rivastigmine. Au-delà des lésions

caractéristiques décrites précédemment, on retrouve en effet des défauts des voies cholinergiques chez les patients Alzheimer, probablement due à une dégradation accrue de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase. Les traitements par le donépézil et la rivastigmine diminuent la dégradation de l'acétylcholine en ciblant l'acétylcholinestérase et préviennent la mort neuronale (Srivastava, Ahmad, et Khare 2021). Par ailleurs, un autre traitement visant les récepteurs NMDA est également sur le marché, la mémantine. Ce traitement bloque les récepteurs NMDA des neurones glutamatergiques pour empêcher une dégénérescence par excitotoxicité, induite par un excès de glutamate à la synapse (R. Wang et Reddy 2017; Srivastava, Ahmad, et Khare 2021). Du fait de leur faible efficacité et de leur mauvaise tolérance, ces traitements ont été récemment retirés de la liste des médicaments remboursables par l'Assurance Maladie en France (Recommandations_HAS_2016).

En parallèle, de nombreux essais cliniques reposant sur l'immunothérapie se sont développés ces dernières années. En particulier, le développement d'anticorps ciblant A β s'accélère. Tout d'abord, en juin 2021 la mise sur le marché du premier anticorps anti-A β , l'aducanumab (Aduhelm) développé par Biogen et Eisai, a été approuvée par la FDA via une procédure accélérée. Malheureusement l'efficacité thérapeutique réelle de ce traitement est controversée (Walsh et al. 2021; Rubin 2021; Mullard 2021). Bien que le traitement permette l'élimination des dépôts amyloïdes dans le cerveau, son efficacité sur le déclin cognitif reste faible. De plus, les résultats divergents lors des études de phase II n'ont fait qu'accroître le scepticisme concernant ce traitement (Vaz et al. 2022; Knopman, Jones, et Greicius 2021).

Peu de temps après, en janvier 2023, la FDA a approuvé la mise sur le marché du lecanemab (Leqembi) développé par Eisai. Contrairement à l'aducanumab qui se lie préférentiellement aux agrégats d'A β , ce traitement cible davantage les protofibrilles d'A β et semble avoir une meilleure efficacité (Alzforum_2021). Il permet en effet d'éliminer de manière efficace les plaques amyloïdes mais surtout est efficace sur le déclin cognitif, qu'il ralentit d'environ 25% (van Dyck et al. 2023). Bien que ces résultats soient encourageants pour le futur de la recherche sur la maladie d'Alzheimer, il est tout de même à noter que ces traitements ne semblent pas indiqués pour tous les patients. De récentes observations ont notamment montré la survenue d'effets secondaires néfastes voire mortels chez certains patients ayant une composante amyloïde vasculaire. Ces effets indésirables sont nommés ARIA (pour l'anglais, amyloid-related imaging abnormalities) et consistent en l'apparition d'hémorragies

cérébrales chez les patients. Ce type d'effet indésirable a été mis en évidence dans les différents essais cliniques basés sur l'utilisation d'immunothérapies ciblant l'amyloïdose, aussi appelées thérapies « disease modifying ». L'hypothèse principale expliquant la survenue de ces ARIA est que les dépôts amyloïdes, chez ces patients, s'accumulent au niveau de la paroi des vaisseaux et la fragilisent. Après l'administration d'immunothérapies ciblant l'amyloïdose, les dépôts vasculaires sont éliminés ce qui favorise les hémorragies observées chez certains patients (Barakos et al. 2022).

A l'instar des anticorps anti-A β , de nombreux essais cliniques sont en cours avec des anticorps anti-tau. Ces essais ont pour population cible des stades de MA légère à modérée, voire prodromale. Ces immunothérapies ont pour but de prévenir l'agrégation et la propagation de la protéine tau (Delrieu et Vellas 2020). Très récemment, les résultats de l'étude clinique de Phase I d'oligonucléotides anti-sens (ASO) spécifique de la protéine tau sont parus. Cet ASO développé par Biogen et Ionis Pharmaceuticals permet une diminution des dégénérescences neurofibrillaires dans le cerveau et une diminution de près de 60% de la protéine tau totale et hyperphosphorylée dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) dès 6 mois de traitement chez des patients souffrant des phases précoces de la maladie d'Alzheimer. Le traitement est maintenant en phase II (Mummery et al. 2023).

Bien que certaines de ces stratégies montrent des effets, il est de plus en plus envisagé que le traitement de la maladie d'Alzheimer devra reposer sur des thérapies combinées visant à la fois l'amyloïdose et la tauopathie, voire la neuroinflammation (Cummings, Tong, et Ballard 2019).

II. Protéine Tau

II.A. Origine dans le cerveau

La protéine tau fut découverte en 1976 par Cleveland, et al. Elle est codée par le gène *MAPT* (*microtubule associated protein tau*) situé sur le locus q21 du chromosome 17 (Neve et al. 1986). Dans le cerveau, elle est essentiellement exprimée dans les neurones. Cette protéine fait partie de la famille des protéines associées aux microtubules (MAP).

Le protéine tau est majoritairement retrouvée sous 6 isoformes dans le cerveau humain. Ces isoformes diffèrent par l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager du gène *MAPT*, et plus particulièrement des exons 2, 3 et 10, qui permet l'obtention d'isoformes sans ou avec 1 ou 2 insertions de respectivement 29 ou 58 acides aminés (nommées 0N, 1N ou 2N selon le nombre de répétitions) dans le domaine de projection localisé dans la portion amino-terminale, et l'insertion de 3 ou 4 pseudo-répétitions (nommées 3R ou 4R) de 18 acides aminés au niveau de la région dite des domaines répétés qui est la partie de la protéine qui se lie aux microtubules en carboxy-terminal (M. Goedert et al. 1989). Les isoformes 3R et 4R sont retrouvées avec un ratio 1:1 dans le cerveau humain, et les isoformes 0, 1 et 2N représentent respectivement 36,8%, 53,7% et 9,5% du total des isoformes de tau retrouvées dans le cerveau humain (Hong et al. 1998). Ces deux domaines entraînent différentes combinaisons lors de l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager du gène *MAPT*: 0N/3R, 0N/4R, 1N/3R, 1N/4R, 2N/3R et 2N/4R, la forme 1N4R étant prédominante chez l'Homme adulte. Ces isoformes sont de plus exprimées différemment au cours de la vie : les six isoformes sont retrouvées chez l'Homme adulte alors que durant le développement on ne retrouve que la forme foétale 0N3R (M. Goedert et Jakes 1990).

Ces isoformes confèrent à la protéine tau des spécificités de fonction et de localisation différentes. En effet les isoformes 4R permettent une association aux microtubules 2,5 à 3 fois plus rapide que les isoformes 3R, le nombre de répétitions du domaine amino-terminal n'a pas d'impact sur cette caractéristique (M. Goedert et Jakes 1990). De plus, selon le type de neurones et la localisation dans le cerveau, les isoformes retrouvées ne seront pas les mêmes : l'ARNm codant pour les formes 3R est retrouvé par exemple, dans l'hippocampe, dans les neurones granulaires et les neurones pyramidaux tandis que l'ARNm codant pour les formes 4R est uniquement retrouvé dans les neurones pyramidaux. Ainsi, le niveau de polymérisation

des microtubules n'est pas le même dans tous les types cellulaires (M. Goedert et al. 1989; M. Goedert et Jakes 1990; Espinoza et al. 2008; de Silva et al. 2003).

II.B. Modifications post-traductionnelles

La protéine tau subit de nombreuses modifications post-traductionnelles qui régulent ses fonctions. La phosphorylation de tau est la modification post-traductionnelle la plus étudiée. Il y a 85 sites de phosphorylation constitutifs sur la protéine tau dont des sites sur des résidus sérines, thréonines et tyrosines qui représentent respectivement 53, 41 et 6% des sites. L'affinité de la protéine tau pour les microtubules est essentiellement régulée par sa phosphorylation, plus la protéine est phosphorylée moins elle est affine pour les microtubules. En condition pathologique la phosphorylation de la protéine tau est augmentée et de nouveaux sites de phosphorylation apparaissent (Figure 4), on retrouve notamment de nombreux sites de phosphorylation dans le domaine C-terminal de liaison aux microtubules, ce qui module directement l'affinité de la protéine pour les microtubules, notamment les sites Ser262, Ser293, Ser324 and Ser356, situés chacun sur une des répétitions du domaine de liaison aux microtubules. Il a également été montré que des sites de phosphorylation en dehors du domaine de liaison aux microtubules agissent indirectement sur l'affinité de tau pour les microtubules notamment les sites Thr214, Thr231 and Ser235 (T. Guo, Noble, et Hanger 2017).

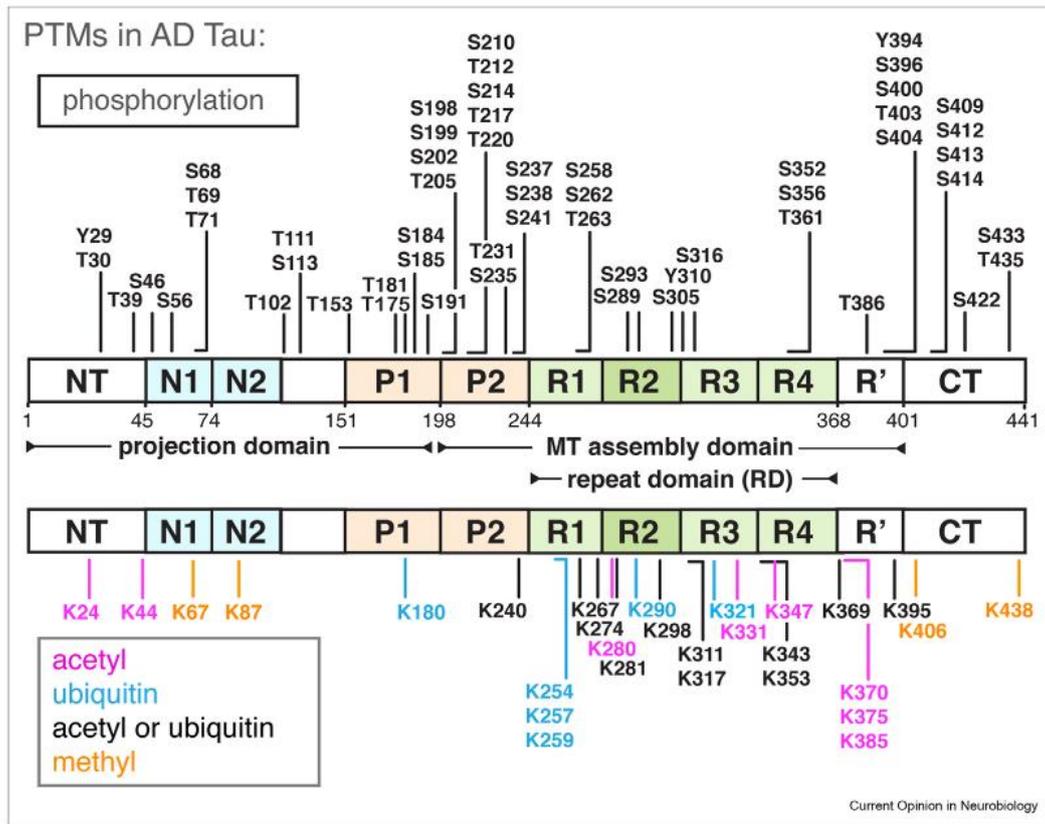


Figure 4. Sites de phosphorylation de la protéine tau humaine retrouvées dans le cadre de la MA D'après Wegmann et al. 2021

La protéine Tau peut être phosphorylée par trois classes de kinases : les sérine/thréonine-protéine kinases dirigées par la proline (ou PDK pour l'anglais « proline-directed protein kinases »), elles ciblent les sérines ou thréonines précédant un résidu proline, ce sont les principaux vecteurs de la phosphorylation de tau, comme GSK-3, Cdk5 et MAPK, mais aussi les sérine/thréonine-protéine kinases non dirigées par la proline (TTBK1/2, CK1, DYRK1A, MARK, Akt, PKA, PKC, AMPK et CaMKII) et enfin les tyrosine kinases (Src, Fyn, Abl, et Syk). A l'inverse, la protéine tau peut être déphosphorylée par de nombreuses phosphatases, notamment PP2A mais aussi PP1, PP5 et PP2B (Martin et al. 2013). Le taux de phosphorylation de la protéine dépend donc de l'équilibre d'activité entre les kinases et les phosphatases. Par ailleurs, le taux de phosphorylation de la protéine ainsi que les sites sur lesquelles elle est phosphorylée entraîne une distribution subcellulaire différente de la protéine tau dans le neurone (Tapia-Rojas et al. 2019).

La protéine tau peut également être hyperphosphorylée, entraînant ainsi un contexte pathologique que l'on nomme tauopathie. La pathogénèse des tauopathies sera expliquée plus en détails dans une prochaine partie.

La phosphorylation et l'agrégation de tau sont ainsi des paramètres largement utilisés pour la caractérisation d'une tauopathie, mais ce lien entre phosphorylation et agrégation reste débattu car on retrouve le même schéma de phosphorylation sur la protéine tau fœtal au cours du développement, que sur la protéine tau retrouvée dans les lésions de tauopathie présentes dans le cerveau des patients. Pourtant, on ne retrouve pas d'agrégats de protéine tau au cours du développement. Il semblerait donc qu'au cours de la pathologie un autre facteur participe à la formation d'agrégats à partir de la protéine tau hyperphosphorylée. Des études ont montré que l'association de plusieurs modifications post-traductionnelles (PTM pour *post-translational modifications*), associées à la phosphorylation, permettent l'agrégation de tau dans des conditions pathologiques, notamment l'acétylation et l'ubiquitinylation (Figure 5 ; Wegmann, Biernat, et Mandelkow 2021)

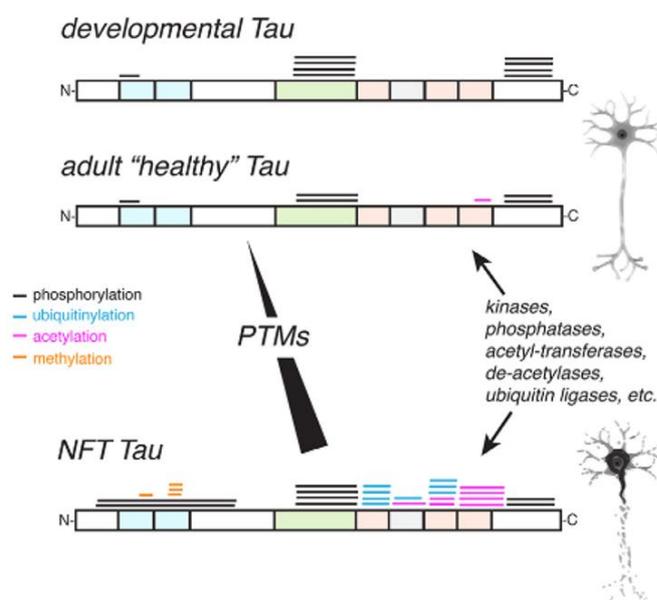


Figure 5. Niveau de phosphorylation de la protéine tau au cours du développement et chez l'Homme adulte en condition physiologique et pathologique. D'après Wegmann et al. 2021

La protéine tau peut également subir d'autres modifications post-traductionnelles comme l'acétylation, la glycation, la méthylation, l'ubiquitinylation, la troncation etc...

Par exemple, la méthylation de la protéine permet la régulation de son métabolisme car elle entre en compétition avec son ubiquitinylation et son acétylation qui participent à son adressage au protéasome (Tapia-Rojas et al. 2019).

Les autres modifications post-traductionnelles permettent de réguler sa phosphorylation ou son adressage au protéasome (Figure 6).

Le clivage protéolytique de la protéine tau peut être effectué par différentes protéases et notamment la caspase 3. Les fragments formés après clivage par la caspase 3 seront plus enclins à s'accumuler et participeront plus facilement à la formation d'agrégats avec la protéine tau non clivée (Jarero-Basulto et al. 2013). Ainsi la protéine tau clivée par la caspase 3 est un marqueur de la formation d'agrégats dans la maladie d'Alzheimer, et la présence, dans le cerveau, de ces fragments de tau est corrélée avec le déclin cognitif. Le clivage par la caspase 3 est régulé par la phosphorylation du résidu sérine en position 422 : lorsque ce résidu est phosphorylé, le clivage par la caspase est inhibé (Wai et al. 2009).

En outre, ces modifications post-traductionnelles peuvent également être impliquées dans un contexte pathologique, notamment avec une dérégulation de la phosphorylation de tau qui entraîne une hyperphosphorylation, ou d'autres types de PTM qui entraînent une toxicité comme il l'a été montré pour l'acétylation (Gabor G. Kovacs et al. 2016).

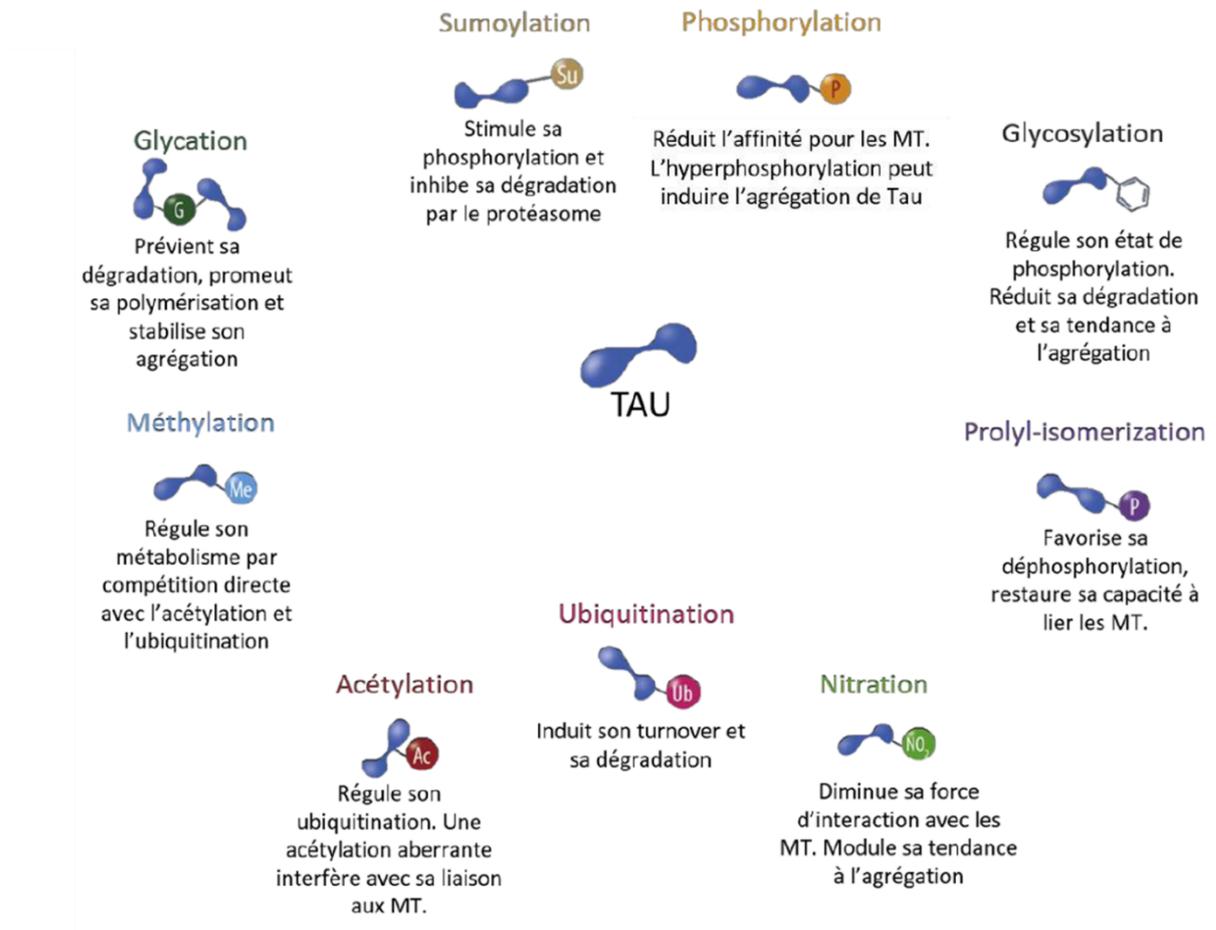


Figure 6. Différentes modifications post-traductionnelles retrouvées sur la protéine tau.
D'après Tapia-Rojas et al. 2019

II.C. Localisation cellulaire et sub-cellulaire

Comme nous l'avons déjà mentionné plus tôt, la localisation de la protéine tau dans les neurones est finement régulée. En conditions physiologiques, la protéine tau est décrite comme particulièrement enrichie dans le compartiment axonal et dans le compartiment post-synaptique des épines dendritiques, alors que le taux de protéine tau est faible dans le soma et le compartiment pré-synaptique. On décrit également une barrière au niveau du segment initial de l'axone (ou AIS) qui empêche la diffusion rétrograde de la protéine tau vers le soma, ce qui permettrait d'augmenter le taux de protéine tau dans l'axone (X. Li et al. 2011). La localisation de tau dans les dendrites est notamment expliquée par sa liaison à certains éléments post-synaptiques comme Fyn, mais également par l'adressage au compartiment post-synaptique par les microtubules (Ittner et Ittner 2018).

La localisation de la protéine tau diffère dans un contexte pathologique. En effet, elle est essentiellement exprimée dans les neurones et plus particulièrement dans les axones (Figure 7), cependant un phénotype pathologique peut entraîner un changement de cette distribution au sein même d'un neurone. Les mécanismes précis ne sont encore que peu connus mais il n'est pas exclu que la phosphorylation de la protéine tau puisse modifier sa perméabilité face à l'AIS et ainsi permettre l'envahissement du soma par la protéine tau (Hatch et al. 2017). Il a également été montré que le peptide A β sous forme oligomérique pouvait altérer cette barrière (Marin et al. 2016).

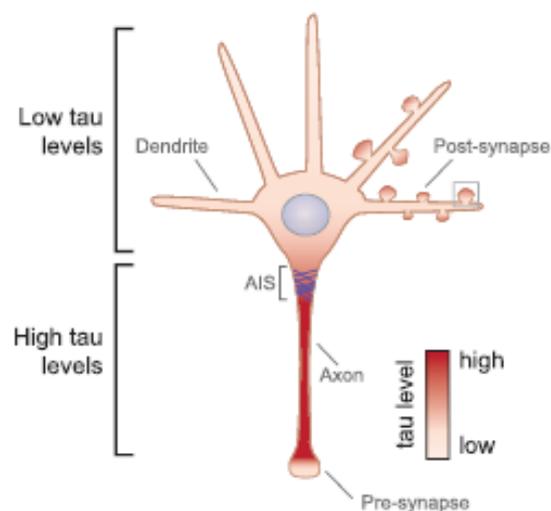
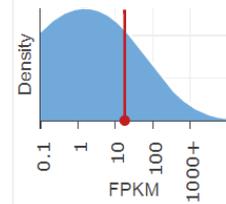
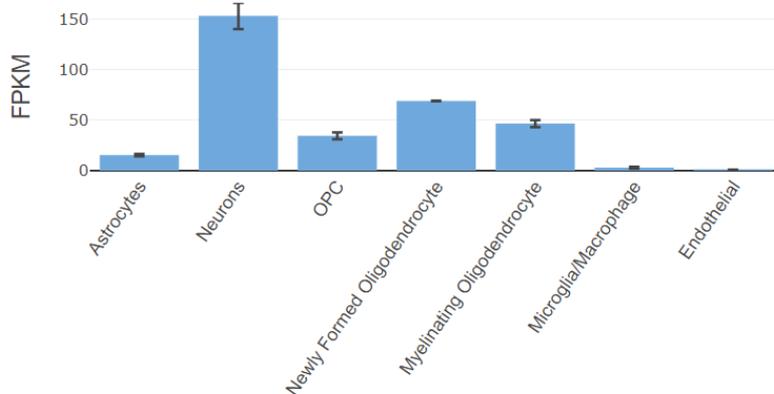


Figure 7. Localisation subcellulaire de la protéine en condition physiologique *D'après Ittner et Ittner 2018*

De plus, la protéine tau peut parfois être retrouvée dans d'autres types cellulaires comme les astrocytes et les oligodendrocytes, et ceci particulièrement dans des contextes pathologiques. Sa distribution au sein des différents types cellulaires n'est pas forcément la même d'une espèce à l'autre. En effet, les données ci-dessous montre une expression du gène MAPT (permettant l'expression de la protéine tau) que l'expression semble presque exclusivement neuronale chez l'Homme, elle concerne les astrocytes (Perea et al. 2019), les oligodendrocytes et leurs progéniteurs (Müller et al. 1997) ainsi que les neurones chez la souris. L'expression neuronale étant presque 10 fois supérieure dans les neurones que dans les astrocytes dans cette espèce (Figure 8). (**BrainRNAseq**) Ces données sont extraites du site BrainRNAseq, regroupant des études RNAseq sur la souris et des tissus humains réalisées dans le labo de Barres et sont accessibles en open access sur brainrnaseq.org (Y. Zhang et al. 2014; 2016).

Mapt - Mus musculus



MAPT - Homo sapiens

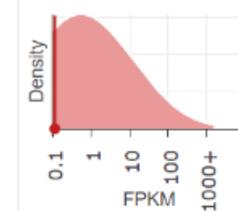
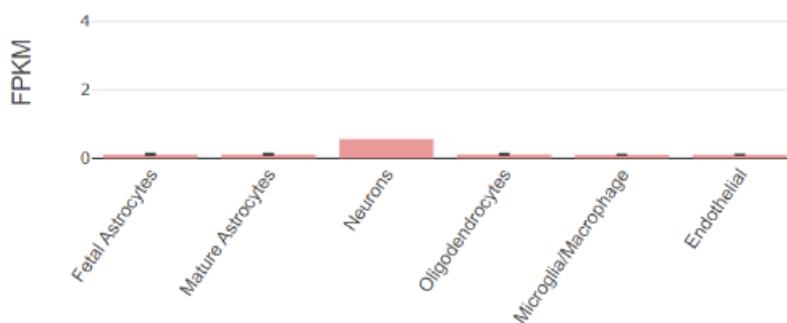


Figure 8. Différences de localisation et d'expression du gènes MAPT chez l'Homme et le modèle murin D'après Zhang et al. 2014;2016.

II.D. Turn-over de tau

Toute protéine possède une demi-vie qui est régulée par les facteurs permettant sa production, son maintien et son élimination. Dans le cas de la protéine tau, il a été montré dans une étude de Sato et al. , réalisée sur des cellules iPSCs humaines dérivées en neurones, que la demi-vie de cette protéine est d'environ 6,7 jours et que cette demi-vie est diminuée si la protéine est phosphorylée ou sous un isoforme 4R (Sato et al. 2018).

Le turn-over de la protéine tau est régulé par les systèmes permettant la dégradation de tau. A ce jour, deux voies de dégradation ont été identifiées : le système ubiquitine-protéasome (UPS) et la voie autophagique et lysosomale.

La première voie est une voie protéolytique intracellulaire qui permet notamment l'élimination des protéines mal conformées. L'adressage vers la voie du protéasome est initié par le marquage par ubiquitylation des protéines qui nécessitent d'être dégradées. Une fois polyubiquitylées (présence d'une chaîne d'au moins quatre ubiquitines), ces protéines peuvent être reconnues par les différentes sous-unités du protéasome, puis être clivées en plus petits peptides jusqu'au clivage de chaque acide aminé qui sont ensuite recyclés. Il a été montré que la protéine tau était dégradée en partie par ce système, mais que l'ubiquitylation n'était pas limitante, c'est-à-dire que la protéine tau peut également être dégradée par le protéasome via un processus ubiquitine-indépendant (David et al. 2002). Par ailleurs, une diminution de l'activité du protéasome a été montrée dans le cerveau de patients atteints par la maladie d'Alzheimer, ainsi qu'une corrélation entre altération du protéasome et observation d'agrégats de tau (Keck et al. 2003). De plus, d'autres études ont montré que cette sélectivité régionale d'activité du protéasome pouvait également être observée en condition physiologique, et ainsi permettre une accumulation de la protéine tau au niveau des éléments pré- et post-synaptiques.

La deuxième voie de dégradation de la protéine tau est la voie d'autophagie via la voie lysosomale. En effet de nombreuses études ont montré que l'inhibition du lysosome entraîne l'augmentation de la protéine tau (Bednarski et Lynch 1996), et que cette voie est probablement une voie compensatoire de la voie du protéasome car lorsqu'on inhibe le protéasome, on peut observer une augmentation de la formation d'autophagosome et une diminution du taux de protéine tau totale (Krüger et al. 2012).

II.E. Fonctions

Le rôle principal attribué à la protéine tau est la stabilisation du cytosquelette grâce à sa liaison aux microtubules. De ce fait, elle contribue largement à la structure des axones. La protéine tau agit directement sur la stabilité des microtubules, via ses domaines de liaison en C-terminal, mais également indirectement grâce à son interaction avec d'autres protéines et notamment son action inhibitrice de certaine enzyme. Par exemple, la protéine tau peut se lier à l'histone déacetylase-6 (HDAC6) et l'inhiber, ce qui est responsable de la déacétylation de la tubuline et ainsi à la régulation de la stabilité des microtubules (Perez et al. 2009). Il est donc largement admis que la fonction principale de tau est de stabiliser les microtubules, mais une étude publiée récemment de *Baas et Qiang* suggère un rôle plus complexe de l'interaction de tau avec les microtubules ([Figure 9](#)) : les microtubules sont constitués de domaines stables et de domaines labiles, et contrairement à ce qui était admis, la protéine tau serait majoritairement liée aux domaines labiles des microtubules et non aux domaines stables. Ainsi la protéine tau, via la modulation de son affinité pour les microtubules se détachera et favorisera la dépolymérisation et inversement. Dans leur étude *in vitro* *Baas and Qiang* déplètent la protéine tau des neurones et les domaines stables ne sont pas moins stables comme il était admis auparavant, alors que les domaines labiles deviennent plus courts et plus stables. De plus, le taux de protéine MAP6, un stabilisateur des microtubules, augmente, et MAP6 se fixe davantage aux microtubules ce qui explique la stabilité plus importante des domaines labiles en absence de tau. Ainsi, le rôle de la protéine tau dans la stabilisation des microtubules n'est pas tant d'augmenter la stabilité du polymère de domaines stables mais plutôt d'empêcher la croissance trop importante des domaines labiles. (Baas et Qiang 2019; Tapia-Rojas et al. 2019)

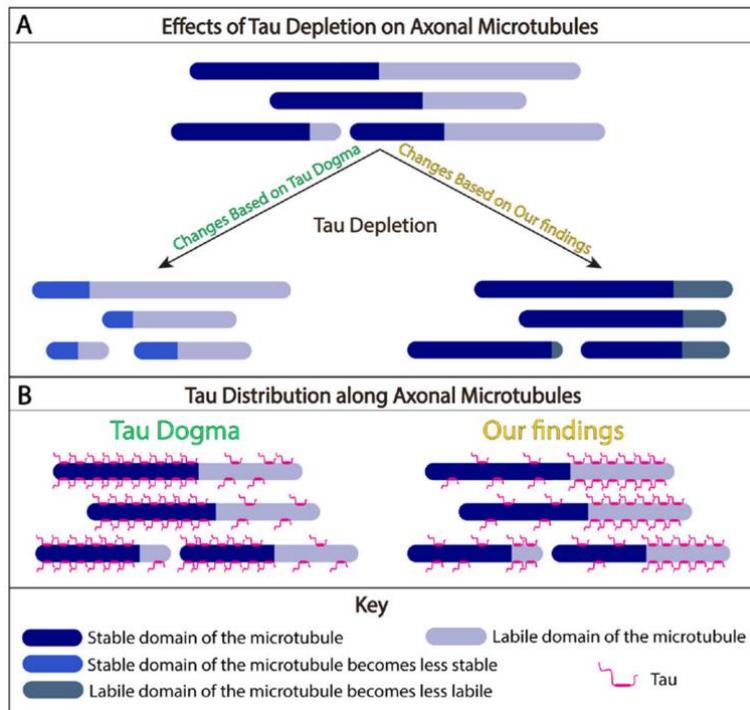


Figure 9. Nouvelle hypothèse sur les sites de fixation de la protéine tau sur les microtubules. D'après Baas et Qiang 2019.

Une étude de 2014 a également montré la rapidité avec laquelle la protéine tau se fixe et se détache d'un microtubule, en environ 40ms, impliquant un mécanisme dit de « kiss-and-hop » de la protéine tau sur les microtubules (Janning et al. 2014).

Ce qui remet également en cause l'argument selon lequel la protéine tau participe à la régulation du transport axonal. Cependant, de nombreuses études, dont celle de Dixit et coll. en 2008, montre un effet de la protéine tau sur la dynamique du transport axonal. D'après cette étude, le rôle de la protéine tau semble dépendre de sa concentration au sein du neurone. La protéine tau est en effet différenciellement exprimée au sein même de l'axone dans lequel elle est présente en plus grande quantité au niveau des terminaisons axonales. Les microtubules sont essentiels au transport axonal car les protéines cargo que sont les dynéines et les kinésines se fixent aux microtubules pour circuler du soma jusqu'à l'arborisation terminale de l'axone et transporter notamment des vésicules d'un pôle à l'autre du neurone. Le gradient de concentration de la protéine tau au sein du neurone va permettre de rythmer la liaison des protéines cargo et leur mobilité le long du cytosquelette de microtubules : en présence de tau, la kinésine se détache des microtubules, et la dynéine

adopte un mouvement rétrograde. En condition physiologique cela permet de réguler le transport axonal (Dixit et al. 2008). Or, il a été montré que la distribution de la protéine tau au sein du neurone est modifiée dans le cadre de la maladie d'Alzheimer. En condition pathologique, la polarisation de la distribution de tau dans le neurone est modifiée, et on observe une augmentation de la concentration de tau dans le compartiment somato-dendritique et une diminution au niveau synaptique (Figure 10, Dixit et al. 2008). Ainsi, la kinésine ne sera plus capable de se lier aux microtubules au niveau somatique, et la dynéine n'empruntera plus son trajet des terminaisons axonales vers le soma, ce qui compromettra fortement le transport axonal et mènera à une neurodégénérescence (Dixit et al. 2008).

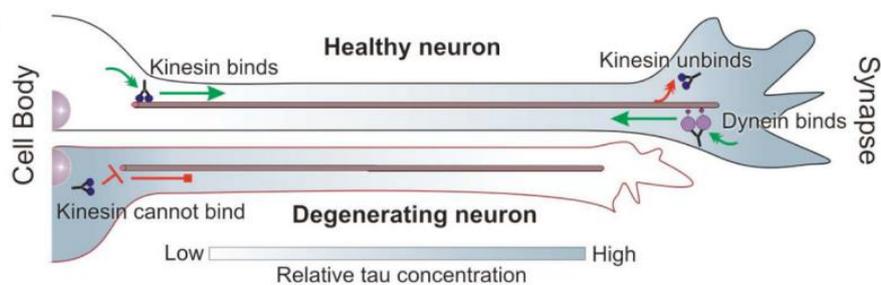


Figure 10. Modifications de localisation de la protéine tau en condition pathologique entraînant des modifications du transport axonal. D'après Dixit et al. 2008.

De nombreux autres rôles de la protéine tau ont été mis en évidence. Notamment grâce à l'utilisation de souris déficientes en protéine tau (Tau KO) qui permettent d'identifier les voies impactées par l'absence de tau (Ke et al. 2012; Harada et al. 1994). La protéine tau est majoritairement retrouvée dans les axones des neurones mais on peut également la retrouver en plus petite quantité dans les dendrites et les épines dendritiques. Son rôle dans les dendrites n'est pas encore totalement élucidé mais une étude récente a montré qu'elle serait impliquée dans la plasticité synaptique des neurones de l'hippocampe en réponse au BDNF (brain-derived neurotrophic factor). Dans la même logique, la protéine tau aurait également un rôle dans la morphologie et la maturation synaptique des neurones granulaires de l'hippocampe au cours du développement (T. Guo, Noble, et Hanger 2017; Regan, Whitcomb, et Cho 2017). Ces études sont notamment étayées par l'observation d'une altération de la plasticité synaptique dans un modèle de souris Tau KO (Kimura et al. 2014; T. Ahmed et al.

2014). Le domaine enrichi en Proline de la protéine tau lui permet d'interagir avec les protéines de la famille des kinases Src comme Fyn ou Lck. L'interaction entre tau et Fyn permettrait le contrôle des voies de signalisations cellulaires neuronales. Cette interaction semble importante pour l'adressage de Fyn dans les épines dendritiques ce qui permet ensuite la régulation de la signalisation du récepteur NMDA dans les dendrites (Ittner et al. 2011; Pooler, Noble, et Hanger 2014; Wolfe 2012).

Le rôle de la protéine tau dans les synapses est de plus en plus étudié, il semblerait qu'elle interagisse avec de nombreux acteurs synaptiques et permettrait le maintien de l'intégrité synaptique en lien avec le cytosquelette. Par exemple, Tau interagit directement avec les filaments d'actine dans les boutons présynaptiques et les épines dendritiques (Dillon et Goda 2005; Sotiropoulos et al. 2017). Par ailleurs une étude a montré que la protéine tau serait présente dans les éléments pré- et post-synaptiques dans les synaptosomes issus d'individus sains et de patients Alzheimer (Tai et al. 2012). La protéine tau phosphorylée quant à elle, a été retrouvée en plus grande quantité dans les éléments post-synaptiques. En utilisant des modèles *in vivo* de tauopathie exprimant la forme mutée P301L de tau qui est associée à la démence fronto-temporale avec parkinsonisme liée au chromosome 17 (FTDP-17), une étude a montré que les formes pathologiques de tau sont retrouvées dans les éléments pré- et post-synaptiques, ce qui suggère que la distribution des différentes formes de tau est modifiée dans un contexte pathologique (Harris et al. 2012; Sotiropoulos et al. 2017).

L'interaction de tau avec la kinase Fyn permet également une régulation de la phosphorylation des récepteurs NMDA présents dans les boutons dendritiques. La présence de la protéine tau dans ces boutons dendritiques est due d'une part à l'adressage de la protéine tau retrouvée dans le soma par les microtubules vers les boutons (Ittner et Ittner 2018), mais également à la traduction de l'ARNm de tau directement dans les boutons dendritiques (Kobayashi et al. 2017). Le complexe entre tau et Fyn joue également un rôle dans la myélinisation.

Enfin, de nombreuses études ont démontré la présence de la protéine tau dans le noyau des neurones, et sa capacité à interagir avec l'ADN et l'ARN (Camero et al. 2014). La protéine tau participe notamment à la régulation de la stabilité de l'hétérochromatine et donc sans doute à la régulation de l'expression des gènes dans les neurones (Sjöberg et al. 2006). Certaines études montrent également qu'en situation de stress la protéine tau transloque dans le noyau afin de protéger l'ADN (Sultan et al. 2011).

En outre, parmi les nombreux rôles Il a été montré que tau pourrait avoir un rôle dans la signalisation cérébrale de l'insuline, ce qui pourrait expliquer l'altération du métabolisme du glucose associé avec une résistance à l'insuline dans l'hippocampe (Marciniak et al. 2017; Gratuze et Planel 2017).

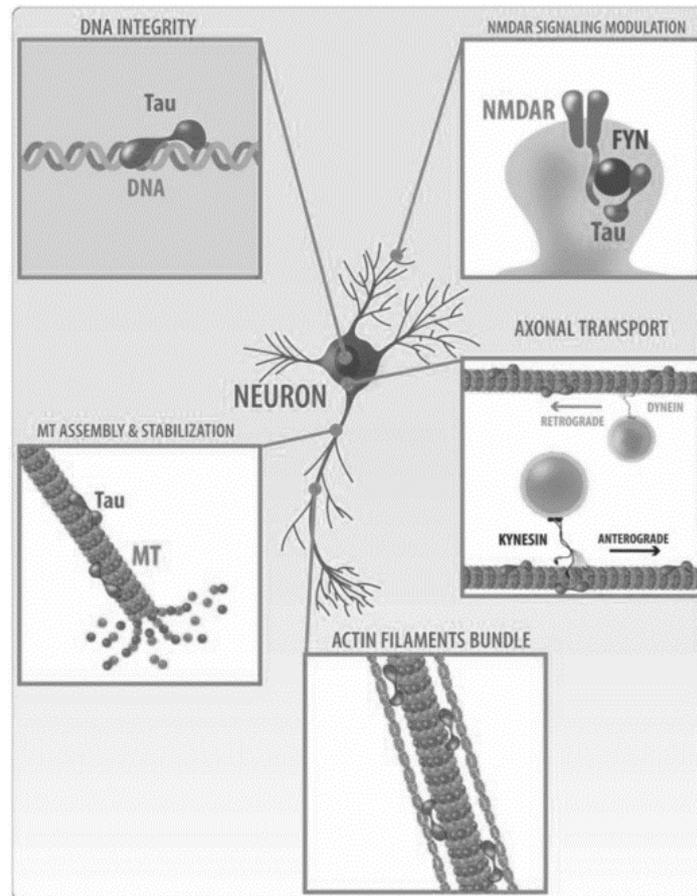


Figure 11. Principales fonctions de la protéine tau D'après Tapia-Rojas et al. 2019.

Les différentes fonctions de la protéine tau sont largement régulées par l'équilibre de ces modifications post-traductionnelles, une dérégulation entraînant une perte de ses fonctions physiologiques et un rôle dans certaines dysfonctions pathologiques.

II.F. Conditions pathologiques

II.F.1. Les tauopathies

A ce jour, près de 26 tauopathies différentes ont été identifiées, toutes présentant des phénotypes cliniques et des physiopathologies différents. Elles se distinguent par l'isoforme

de la protéine tau impliquée, mais également le type cellulaire ou encore la région cérébrale touchée. Il existe notamment deux types de classifications des tauopathies, la première se basant sur la place de la protéine tau dans la pathologie, la deuxième se basant sur les isoformes de tau impliquées.

Si on classe les tauopathies selon l'importance et la place de la protéine tau dans la pathologie, on différencie les tauopathies primaires des secondaires. Les tauopathies primaires regroupent les maladies impliquant principalement la protéine tau. On retrouve notamment les dégénérescences fronto-temporales liées à la mutation de tau (FTLD/FTDP-17), la paralysie supranucléaire progressive (PSP), la dégénérescence corticobasale (CBD), et la maladie de Pick. Les tauopathies secondaires sont des pathologies pour lesquelles tau joue un rôle dans la pathogénèse mais n'est pas le seul ou le principal facteur de la maladie, comme cela est le cas pour la maladie d'Alzheimer, la maladie de Creutzfeldt-Jakob, la démence familiale britannique ou encore l'encéphalopathie traumatique chronique.

A l'inverse, si on classe les tauopathies selon les isoformes impliquées, on distingue 3 classes ([Figure 12](#)). En effet, il faut noter qu'en condition physiologique on retrouve un ratio équivalent d'isoformes 3R et 4R dans le cerveau humain. La première classe de tauopathies regroupe ainsi les maladies dont l'isoforme prédominante impliquée dans la formation des dégénérescences neurofibrillaires (DNF) est l'isoforme 4R. On retrouve notamment la CBD, la PSP, l'AGD (argyrophilic grain disease), et les tauopathies gliales globulaires. La deuxième classe regroupe les pathologies qui impliquent préférentiellement l'isoforme 3R, comme par exemple la maladie de Pick. Et enfin, on distingue également les pathologies pour lesquelles on retrouve un ratio équivalent des formes 3R et 4R dans les DNF, comme notamment dans la maladie d'Alzheimer et la PART (primary age-related tauopathy) (Irwin 2016; V. M. Lee et Trojanowski 1999; Höglinger, Respondek, et Kovacs 2018).

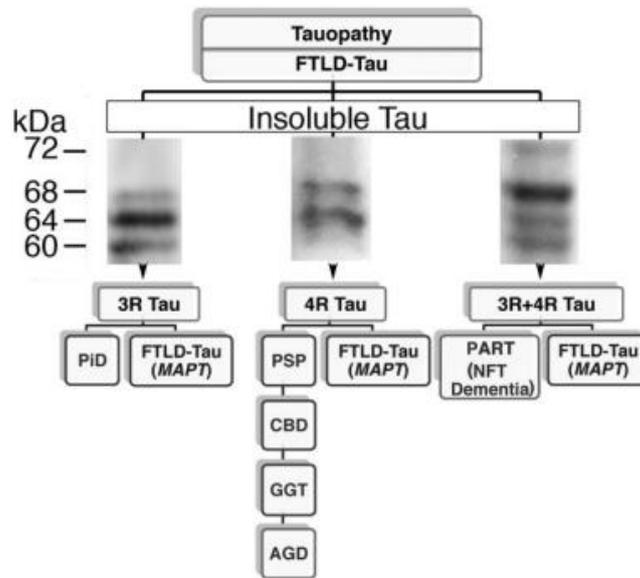


Figure 12. Classification des tauopathies. D'après G. G. Kovacs 2015

II.F.2. La tauopathie dans la maladie d'Alzheimer

Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, la tauopathie est décrite comme secondaire. C'est-à-dire que ce n'est pas la seule protéinopathie à l'origine du développement de la maladie et que son apparition serait consécutive à la présence d'autres lésions. En effet, comme décrit précédemment, elle est toujours associée avec une amyloïdose qui apparaît avant l'envahissement du cerveau par la protéine tau pathologique.

La progression de la tauopathie dans la maladie d'Alzheimer est bien décrite, bien que la genèse de la tauopathie ne soit pas encore totalement élucidée. La pathologie est décrite comme issue d'une hyperphosphorylation de la protéine tau sur ses sites physiologiques et pathologiques, ce qui engendre une diminution de l'affinité de la protéine pour les microtubules et ainsi une augmentation du pool de protéine tau soluble. Cette solubilisation de tau va favoriser son oligomérisation, puis la formation de filaments hélicoïdaux appariés, et après leur maturation, l'apparition des (DNF) (Figure 13). Ces dernières sont donc composées d'agrégats de protéine tau hyperphosphorylée et sont retrouvées dans le soma des neurones. La présence de DNF dans les neurones entraîne une perte synaptique, médiée notamment par la microglie (Scott-Hewitt et al. 2020). Cette perte synaptique et

l'accumulation de DNF et de protéine tau hyperphosphorylée entraînent ensuite la mort neuronale. Le lien mécanistique entre l'accumulation de DNF et la mort neuronale n'est pas encore élucidé tout comme la nature du lien entre les deux (direct ou indirect). En effet il est probable que la mort neuronale soit médiée par les cellules gliales.

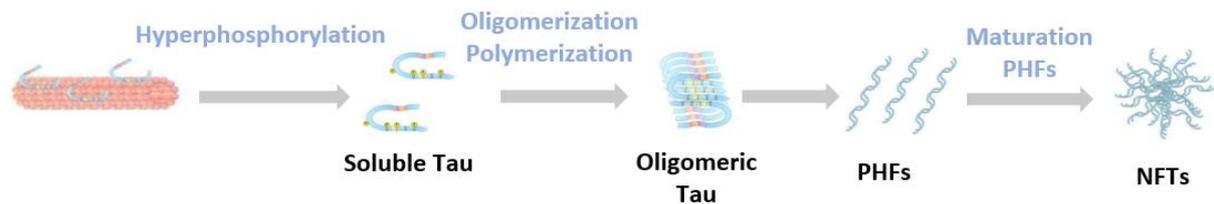


Figure 13. Cascade pathologique de la protéine tau entraînant son agrégation. *Modifié d'après Martin et al. 2011*

Du fait de la corrélation entre la présence de DNFs et l'apparition des symptômes cognitifs dans la MA, élément qui sera développé dans la prochaine partie, il a longtemps été admis que les DNFs étaient la forme la plus toxique de la protéine tau.

Cependant, plusieurs études récentes montrent qu'au contraire, bien que les DNFs soient les formes tardives de la protéine tau pathologique, elles ne seraient ni nécessaires ni suffisantes à la toxicité induite par la protéine tau. Ces faits ont notamment été montrés dans un modèle *in vivo* utilisant la drosophile dans lequel a été montrée une corrélation entre l'accumulation cytosolique de la protéine tau hyperphosphorylée soluble et la neurodégénérescence (Feuillette et al. 2010), ainsi la forme soluble de la protéine tau serait responsable de la toxicité liée à tau et non les DNFs. Un modèle *in vivo* développé au laboratoire, obtenu par surexpression de différentes formes de la protéine tau chez le rat grâce à l'utilisation de la technique de transfert de gène par AAV, a montré une toxicité plus importante des formes oligomériques et solubles de la protéine que les formes agrégées (d'Orange et al. 2018).

A l'instar des différentes fonctions attribuées à la protéine tau décrites précédemment, lorsque la protéine arbore une conformation anormale et devient pathologique, ces mêmes fonctions sont altérées (Figure 14). On observe notamment un effet délétère sur le génome due à une altération du transport des facteurs de transcription vers le noyau, mais également au niveau du système de dégradation impliquant les lysosomes et le protéasome (Niewiadomska et al. 2021). Comme nous le décrivions précédemment la protéine tau a pour

fonction principale le maintien du cytosquelette et en découle un effet sur le transport axonal, qui est altéré en conditions pathologiques avec notamment une incapacité des kinésines à se fixer aux microtubules (Dixit et al. 2008). En outre, la protéine tau pathologique peut également altérer le métabolisme neuronal et la transmission synaptique (Tracy et Gan 2018; Usenovic et al. 2015).

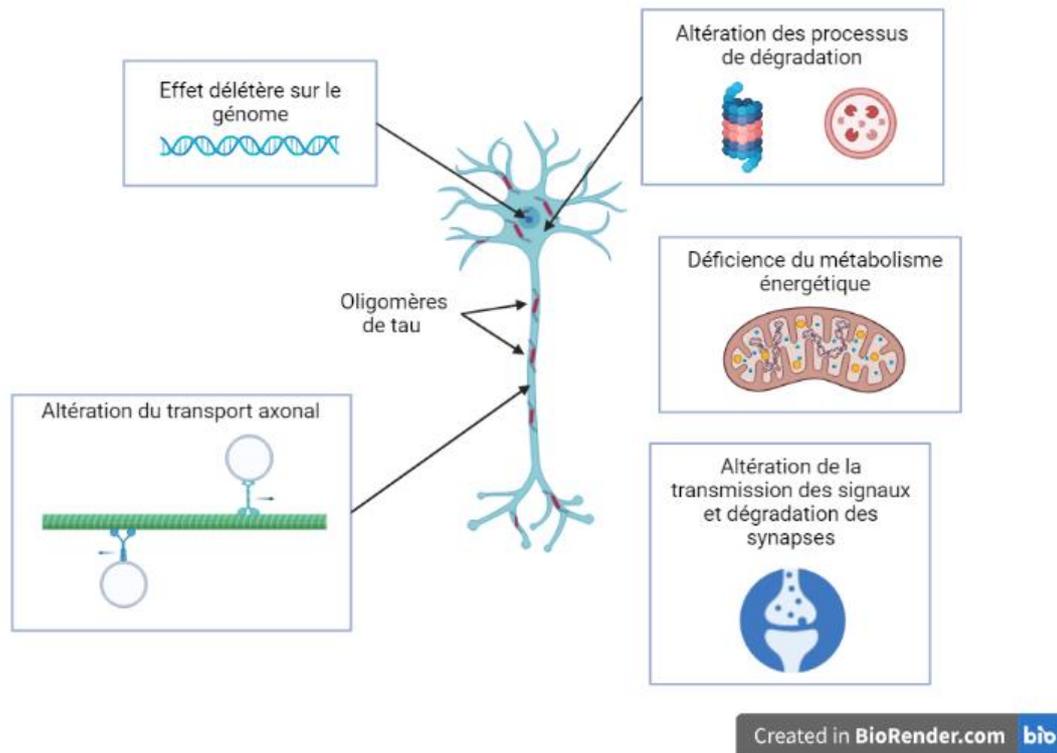


Figure 14. Fonctions de la protéine tau en conditions pathologiques. D'après Niewiadomska et al. 2021. Créé sur Biorender.com

II.G. Propagation des formes pathologiques de la protéine tau

II.G.1. Les stades de Braak

L'étude anatomopathologique de 83 cerveaux humains déments ou non en 1991 par Braak et Braak a permis la stratification de la MA en plusieurs stades. Ces chercheurs ont étudié l'apparition des lésions amyloïdes et neurofibrillaires dans les différentes régions cérébrales de patients atteints à différents stades de la pathologie (Figure 15). En ce qui concerne les lésions liées à la protéine tau, six stades ont ainsi été mis en évidence, illustrant une progression spatio-temporelle typique de la tauopathie dans le cerveau des patients atteints par la MA. Les stades, qui sont maintenant connus comme les « stades de Braak », décrivent

l'apparition des dégénérescences neurofibrillaires dans le cortex transentorhinal, leur propagation vers les régions limbiques, et enfin leur envahissement du neocortex, correspondant respectivement aux stades I-II, III-IV et V-VI. Les stades I-II correspondent à des déficits cognitifs légers, les stades III-IV à des déficits cognitifs modérés, et les stades V-VI à des déficits cognitifs modérément sévères à très sévères, la démence peut apparaître à partir du stade IV. La progression des lésions amyloïdes est décrite par les stades de Thal.

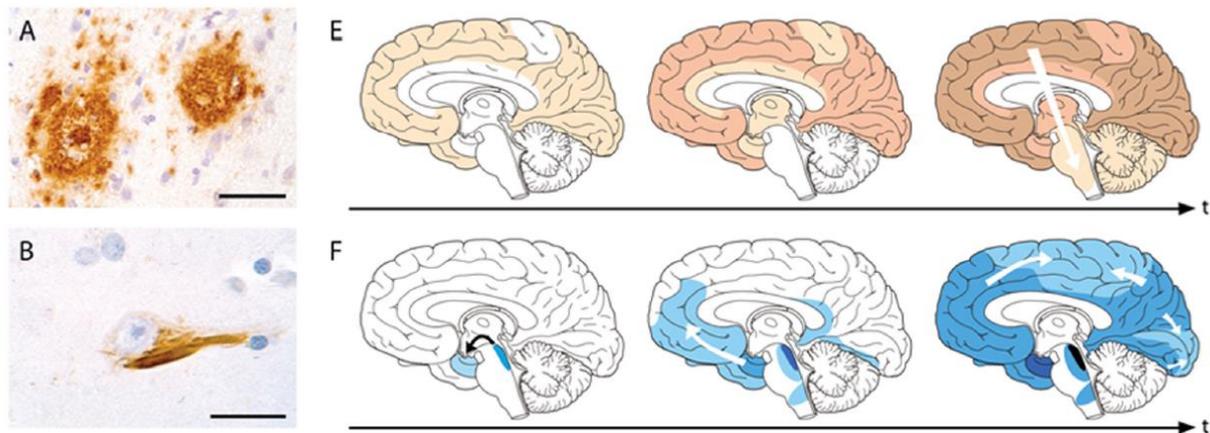


Figure 15. Progression de l'amyloïdose et de la tauopathie dans le cadre de la MA. D'après Jucker et Walker 2013

La propagation de la tauopathie est donc très bien décrite dans le cadre de la MA. Cette propagation suit des régions anatomiquement connectées et semblent s'opérer par transmission de la protéine tau pathologique d'un neurone malade vers un neurone sain sur lequel il projette. Le décours spatiotemporel de la tauopathie est retrouvé à l'identique chez tous les patients atteints de la MA. Ce schéma de propagation de la tauopathie est différent de celui de l'amyloïdose dans le cadre de la MA, en effet l'amyloïdose se développe tout d'abord dans les régions corticales avant de s'étendre aux régions limbiques (Figure 15). Contrairement à la tauopathie, l'amyloïdose ne semble pas corrélée aux symptômes cognitifs de la maladie.

Avec cette étude anatomopathologique de grande ampleur, Braak et al. ont également montré que la propagation de la tauopathie est fortement liée à la progression des symptômes cognitifs de la MA. Ainsi, lorsque les fonctions d'une région deviennent affectées, cela est fortement corrélé chronologiquement avec l'envahissement de cette même région par la tauopathie et on y retrouve des dégénérescences neurofibrillaires.

Par ailleurs le développement de biomarqueurs pour la protéine tau a permis de confirmer ces observations. En effet, ces dernières étaient basées sur l'observation post mortem de cerveaux humains. L'avancement technologique et la découverte de traceurs des formes pathologiques de la protéine tau ont confirmé ces résultats par tomographie par émission de positons (TEP) en utilisant le radiotracteur marqué au fluor 18, le [¹⁸F]-Flortaucipir. Une étude clinique sur 51 patients, 15 personnes contrôles et 36 personnes diagnostiquées comme souffrant de la maladie d'Alzheimer, basée sur l'étude de la corrélation entre les symptômes cognitifs et l'imagerie TEP de tau et d'Aβ montre une corrélation claire entre l'altération des certaines fonctions cognitives et les régions touchées par la tauopathie. En contraste, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre l'imagerie spécifique de l'amyloïdose et l'altération des fonctions cognitives (Lagarde et al. 2022; Bejanin et al. 2017).

II.G.2. Hypothèse Prion

Les maladies à Prion, aussi nommées encéphalopathies spongiformes transmissibles, sont des maladies infectieuses induites par la mauvaise conformation d'une protéine, plus particulièrement la protéine prion, nommée ainsi par leur découvreur, Stanley Prusiner, en 1982 pour « **proteinacious infectious only** particle ». Ces maladies touchent les mammifères et parmi celles touchant l'Homme, les plus connues sont la maladie de Creutzfeldt-Jacob (CJ) et la maladie de Kuru. La particularité de ces maladies est la propagation de la pathologie qui repose sur la capacité de la protéine mal conformée d'une part à s'agréger, et d'autre part à recruter la forme physiologique de la protéine pour induire sa conformation anormale, entraînant ainsi la formation d'agrégats protéiques en cascade et la propagation de la pathologie d'un neurone à l'autre (Ma et Wang 2014).

Il existe 3 types de maladies à prion : les formes sporadiques avec notamment la maladie de CJ, les formes génétiques où on retrouve la forme génétique de CJ mais également le syndrome Gerstmann-Straussler-Scheinker, et enfin les formes acquises comprenant notamment la maladie de Kuru. Dans la majorité des cas la maladie est de forme sporadique (Sigurdson, Bartz, et Glatzel 2019).

La MA partage plusieurs caractéristiques avec les maladies à Prion. En effet, que cela concerne les lésions induites par l'amyloïdose ou par la tauopathie, la maladie débute par l'adoption d'une conformation anormale par ces deux protéines qui, en conditions physiologiques sont naturellement produites par la cellule. De plus, ces deux protéinopathies peuvent apparaître de manière sporadique, comme par exemple dans le cas de la MA pour les tauopathies et de la démence familiale britannique pour l'amyloïdose, ou de manière génétique, comme par exemple dans le cas des démences fronto-temporales pour les tauopathies et des EOAD pour l'amyloïdose.

Par ailleurs la maladie d'Alzheimer et particulièrement les tauopathies semblent utiliser les mêmes mécanismes pour se propager dans le cerveau des patients. En effet dans les deux cas on observe une propagation entre régions anatomiquement connectées et, bien que les mécanismes ne soient pas encore totalement élucidés, en utilisant les mêmes procédés comme les exosomes et les nanotubes (Ayers, Giasson, et Borchelt 2018). Ce point sera détaillé plus tard dans la partie « Mécanismes de propagation interneuronale ».

De la même manière que pour les maladies à prions, lorsqu'on injecte à des rongeurs des homogénats de cerveaux de patients ou de souris atteintes de la maladie d'Alzheimer ou d'amyloïdose et/ou de tauopathie, on observe un développement de la pathologie chez les receveurs. Les protéines anormalement conformées sont capables de recruter les protéines saines du receveur pour qu'elles participent à leur tour à la pathogénèse (McAllister et al. 2020).

Toutes ces caractéristiques mais particulièrement les similitudes de mécanismes de propagation permettent de qualifier les tauopathies de maladies à prion ou « prion-like ».

En 2009, les premières études *in vitro* établissaient que les agrégats de la protéine Tau dans le milieu extracellulaire pouvaient être internalisés par une cellule et entraîner la formation de nouveaux agrégats dans cette cellule (Frost, Jacks, et Diamond 2009).

II.G.3. Propagation de la protéine tau dans les autres tauopathies

A l'instar des stades Braak caractérisant l'avancée de la tauopathie dans la MA, des stades de gravité de la maladie ont été également définis pour les autres tauopathies. On retrouve par

exemple pour la maladie de Pick, la distinction de 4 stades. La tauopathie apparait tout d'abord dans les régions limbiques et le néocortex et progresse au fur et à mesure dans les régions corticales profondes et le cervelet (Irwin et al. 2016). En ce qui concerne la démence à grains argyrophiles, on distingue 3 stades (Y. Saito et al. 2004) et pour la PSP on distingue 4 grades de gravité différents avec l'établissement d'un score à 7 niveaux (Williams et al. 2007). Bien que ces maladies soient différentes, les stades définis pour chacune de ces maladies montrent la progression de la tauopathie par des régions anatomiquement connectées et entre des neurones synaptiquement connectés. La propagation semble toujours se faire en lien avec une activité neuronale, et non pas simplement par proximité anatomique (Fuster-Matanzo, Hernández, et Ávila 2018).

II.G.4. Mécanismes de propagation interneuronale

La mise en évidence d'un schéma spatio-temporelle identique chez les patients atteints de la MA par Braak et Braak semble sous-entendre une propagation de la protéine tau de manière trans-synaptique, et antérograde. Les modèles d'étude de la propagation de la protéine tau sont donc basés sur cette hypothèse. Cependant des récents résultats montrent que la protéine tau serait également capable de propager de manière rétrograde (Seemiller et al. 2021; Ramirez et al. 2023).

Il a donc été montré que la protéine tau pathologique est capable de passer d'un neurone à un autre neurone interconnecté. Il existe, à l'heure actuelle, plusieurs hypothèses concernant les mécanismes permettant sa sécrétion par le neurone donneur, mais également sa recapture par le neurone receveur ([Figure 16](#)).

Parmi les hypothèses de sécrétion, on retrouve l'hypothèse de l'utilisation de la voie de sécrétion des exosomes. Cette hypothèse est corroborée par des résultats obtenus in vitro et in vivo. On peut notamment citer les résultats de l'équipe de Wang et coll. qui ont utilisé des cellules N2a, ainsi que des neurones issus de cultures primaires et surexprimant la protéine tau. Ils ont montré que lors de sa dépolarisation le neurone est capable de sécréter des exosomes contenant la protéine tau. Grâce à l'utilisation de tranches d'hippocampe en culture ils ont également montré que ces exosomes peuvent être recaptés par les neurones

synaptiquement connectés avec le neurone excréteur, mais également la microglie (Y. Wang et al. 2017).

Il a également été montré que la protéine tau peut être prise en charge par un autre système vésiculaire que l'on appelle les ectosomes. Ce sont des vésicules plus grandes que les exosomes, et qui sont formées directement de la membrane extracellulaire de la cellule, contrairement aux exosomes qui sont issus des organelles multivésiculaires intracellulaires (compartiment endo-lysosomal). L'ectosome fusionne ensuite avec la membrane de la cellule post-synaptique et relargue directement son contenu dans la cellule receveuse (Dujardin, Bégard, et al. 2014).

L'étude de la propagation trans-synaptique de tau a également mis en évidence l'existence de structures permettant la liaison directe entre deux neurones synaptiquement connectés. On nomme ces structures des nanotubes. Comme leur nom l'indique, ce sont de petites structures formant un pont entre les deux neurones, et permettant ainsi la transmission de certain contenu du neurone pré- vers le neurone post-synaptique en s'affranchissant du système sécrétoire de la cellule. Il a été montré que ces nanotubes pouvaient contribuer à la transmission des formes pathologiques de différentes protéines comme la protéine tau mais également l'huntingtine, l'alpha-synucléine et autres. Par ailleurs une étude a également montré que la protéine tau mal conformée pouvait promouvoir la formation de ces nanotubes, dits à effet tunnel, probablement comme mécanisme de clairance de la protéine tau pathologique. Enfin, il semblerait que ces nanotubes permettent également la connexion entre les neurones et les astrocytes. Cependant, ces derniers font débat car ils n'ont jamais été observés *in vivo* (Tardivel et al. 2016; Abounit et al. 2016).

Cependant, beaucoup d'études ont montré que la protéine tau retrouvée dans le milieu extracellulaire est majoritairement dépourvue de membrane, suggérant que la voie de sécrétion impliquant l'excrétion de vésicules ne représenterait qu'une petite partie de la protéine tau excrétée par les neurones. Certaines études évoquent notamment la possibilité que la protéine tau passe la membrane du neurone par translocation directe (Gibbons, Lee, et Trojanowski 2019).

La membrane des neurones est composée de micro-domaines riches en cholestérol. A proximité de ces domaines on peut retrouver des proteoglycans à héparane-sulfate (HSPGs).

Les microdomaines de membrane riches en cholestérol permettent un passage de la protéine tau anormalement conformée et sa prise en charge par les HSPGs au niveau de la membrane, les HSPGs permettent ensuite la libération de la protéine dans l'espace synaptique. Ces protéines anormalement conformées peuvent ensuite être captées par les HSPGs du neurone post-synaptique. Le complexe HSPGs-Tau sera internalisé et pris en charge par le système de dégradation lysosomal. Ainsi, la protéine intègre le neurone post-synaptique et entraîne la cascade pathologique dans ce neurone (Brunello et al. 2020).

Il existe également un autre système de prise en charge du complexe HSPGs-Protéine Tau qui repose sur la macropinocytose. Ce phénomène consiste en l'invagination de la membrane cellulaire et la mobilisation des filaments d'actine pour former une vésicule intracellulaire (Gibbons, Lee, et Trojanowski 2019).

Par ailleurs, il a été montré que l'activité neuronale augmente la sécrétion de protéine tau (Ismael et al. 2021). Et que l'augmentation de la concentration de la protéine tau dans le milieu extracellulaire pouvait impacter la sécrétion de tau par les neurones (**Zhao et al. 2021**), probablement grâce à un système de rétrocontrôle encore méconnu.

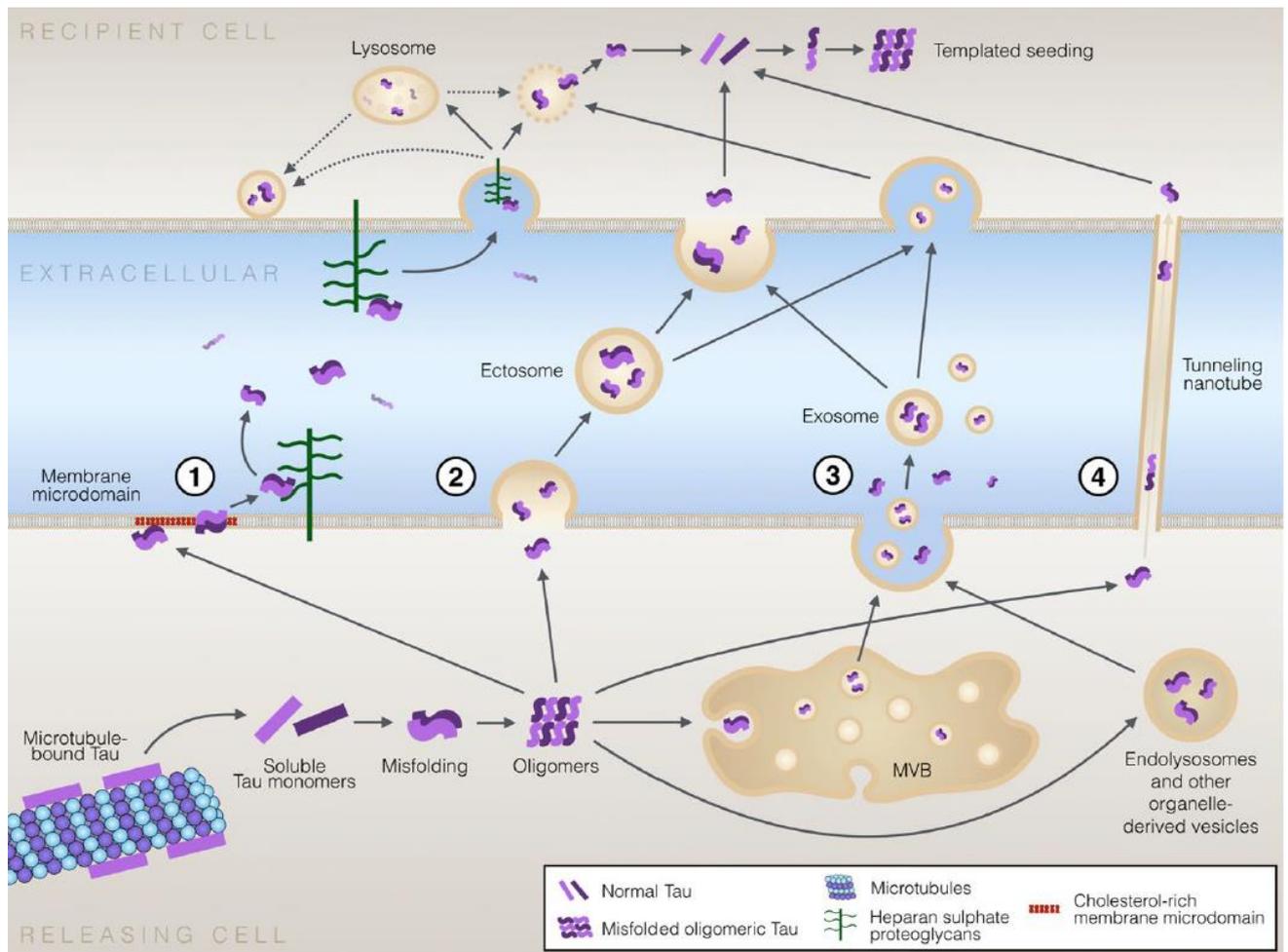


Figure 16. Mécanismes inter-neuronaux de propagation de la protéine tau. D'après Brunello et al. 2020

Deux études ont également mis en évidence des récepteurs qui sont capables de reconnaître la protéine tau en tant que ligand. Très récemment, il a été montré que l'expression du récepteur RAGE augmente avec la tauopathie, et des modèles "knock-out" pour le gène correspondant entraîne une diminution de la propagation de la tauopathie. Ce récepteur est également exprimé par la microglie (Y. Kim et al. 2023). Un autre récepteur, capable de lier la protéine tau, a été identifié par l'équipe de Kosik en 2020. Le récepteur LRP1, via une interaction avec un résidu lysine de la région de liaison aux microtubules de la protéine tau, joue un rôle dans l'internalisation et la propagation de la protéine tau (Rauch et al. 2020).

II.G.5. Impact de l'Amyloïdose sur tau

Le peptide A β et son accumulation sous forme de plaques amyloïdes ont longtemps été placées au centre de l'étiologie de la pathologie. En effet la découverte dans les années 90 d'une mutation pathologique sur le gène codant le précurseur de la protéine A β (APP pour *amyloid precursor protein*) sur le chromosome 21 suggérait que les dépôts de protéine A β étaient responsables de la maladie d'Alzheimer. Cet apport de la génétique a conduit Hardy et collaborateurs à formuler l'hypothèse de la cascade amyloïde qui désigne la formation de dépôts de peptides A β comme événement initial, favorisant l'hyperphosphorylation de la protéine Tau et la formation de dégénérescences neurofibrillaires, qui vont elles-mêmes induire une dysfonction neuronale, des pertes synaptiques et finalement la mort des neurones (Hardy et Allsop 1991).

Cette hypothèse est tout de même remise en question par certains éléments. Notamment depuis qu'il a été montré que certaines personnes ont des plaques amyloïdes mais ne développent jamais les symptômes de la maladie d'Alzheimer, suggérant que les plaques amyloïdes ne sont pas suffisantes au développement de la maladie. De plus il a également été montré que la propagation de la tauopathie dans le cerveau suit un schéma bien spécifique et défini qui est fortement corrélée à la progression des symptômes cognitifs de la pathologie. C'est-à-dire que lorsqu'une région est touchée par la tauopathie, les fonctions associées à cette région sont altérées. Ces découvertes ont nuancé l'implication de l'amyloïdose dans la maladie d'Alzheimer.

Cependant, il semblerait que le schéma pathologique soit bien plus complexe. En effet, il est peut-être caduc de traiter le sujet de la maladie d'Alzheimer comme due à un élément qui entrainerait une cascade d'autres éléments pathologiques, et plutôt voir chaque élément pathologique comme un facteur accélérant la pathogénèse et travaillant en synergie avec d'autres facteurs pour amener à la pathologie telle qu'on la connaît. De nombreuses publications récentes suggèrent plutôt un effet synergique entre ces différents acteurs de la pathologie, notamment entre l'amyloïdose et la microglie pour potentialiser la tauopathie. Il est bien décrit que l'amyloïdose peut avoir un effet direct sur la tauopathie en favorisant l'hyperphosphorylation de tau, mais il semblerait aussi que, par son interaction avec la microglie, l'amyloïdose favorise la propagation des formes pathologiques de la protéine tau.

Comme nous l'avons discuté lors de la première partie, la maladie d'Alzheimer et les tauopathies ne se limitent donc pas à l'implication seule des neurones, les cellules gliales que sont la microglie et les astrocytes ont également un rôle majeur dans la pathogénèse et son aggravation. De plus, au-delà d'une transmission trans-synaptique interneuronale de la protéine tau, de nombreuses études ont montré l'implication de la microglie dans la facilitation de cette propagation (Asai et al. 2015). Ces éléments seront discutés plus largement dans la prochaine partie traitant de la neuroinflammation.

II.G.6. Modèles d'études tauopathies

De nombreux modèles ont été développés afin d'étudier les tauopathies et la maladie d'Alzheimer, notamment des modèles transgéniques, cependant ces modèles entraînent un développement de la maladie de manière aléatoire dans les différentes régions cérébrales, ils sont donc difficiles à exploiter pour étudier les mécanismes impliqués dans la propagation. L'étude de la propagation de la protéine tau et de ces formes pathologiques a donc nécessité le développement de nouveaux modèles.

II.G.6.a) Modèles *in vitro*

Les premières évidences de propagation de la protéine tau d'un neurone à l'autre ont d'abord été décrites grâce à des modèles *in vitro*. Plusieurs équipes ont développé un modèle de co-culture avec une cellule « donneuse » qui exprime la protéine tau, et une cellule « receveuse » qui est une cellule « saine ». Ces études ont montré la capacité des cellules à transmettre et recapturer les agrégats de tau. Cependant, ces études ont été souvent réalisées dans des cellules non neuronales (lignées cellulaires HEK, COS et CHO essentiellement) (Calafate et al. 2015; Frost, Jacks, et Diamond 2009; Katsinelos et al. 2018; Kfoury et al. 2012; Wu et al. 2016).

Suite à ces découvertes, d'autres équipes ont utilisés les vecteurs viraux, des fibrilles synthétiques ou encore des extraits d'exosomes purifiés à partir de cerveaux de patients (Y. Wang et al. 2017), ou de cultures microgliales (Zhu et al. 2022) et ont montré l'implication de la microglie, via les exosomes, dans la propagation de la protéine tau.

Ces modèles ont mis en évidence la propagation de la protéine tau d'une cellule à l'autre, de manière trans-synaptique. Cependant il est également intéressant d'étudier ces mécanismes *in vivo* de façon à étudier les mécanismes favorisant la propagation de la protéine tau d'une région cérébrale à l'autre.

II.G.6.b) Modèles *in vivo*

II.G.6.b.(1) Modèles transgéniques

Deux équipes ont développé, simultanément la même année, une technique innovante afin d'étudier la propagation de tau dans des lignées de souris transgéniques. Leur technique permet l'expression inductible de la protéine tau transgénique spécifiquement dans le cortex entorhinal. Ces modèles sont basés sur un système de régulation de l'expression du transgène par la tétracycline : le système Tet-OFF. Ce système repose sur la co-expression du transgène de régulation et d'un transgène répondeur, ici le transgène tau. Cette co-expression est possible grâce au croisement de la lignée neuropsin-tTA, qui permet l'expression de la protéine transactivatrice de la tétracycline (tTA) sous promoteur spécifique d'une couche neuronale en particulier dans le cortex entorhinal, la couche II, avec la lignée Tg(P301L)4510 qui permet l'expression de la protéine tau humaine portant la mutation P301L uniquement dans les cellules exprimant la tétracycline. Ces études ont montré que la propagation de la protéine tau spatio-temporelle décrite par Braak et Braak est bien due à une propagation par régions synaptiquement connectées suite à l'initiation de la pathologie dans le cortex entorhinal, et non pas due à une cascade d'évènements individuels dans différentes régions vulnérables à la protéine tau pathologique (Santacruz et al. 2005; de Calignon et al. 2012; Liu et al. 2012).

II.G.6.b.(2) Modèles d'injections d'homogénats

Afin d'étudier spécifiquement les lésions que l'on retrouve chez l'Homme, des chercheurs ont développé des modèles reposant sur l'injection stéréotaxique d'homogénats cérébraux de patients. Ce type modèle est apparu après la mise en évidence du comportement « prion-like » de la protéine tau. De nombreuses équipes ont alors voulu tester les capacités

infectieuses de la protéine tau entre animaux de la même espèce, notamment chez la souris (Clavaguera et al. 2009; Z. Ahmed et al. 2014; Clavaguera, Grueninger, et Tolnay 2014; Jackson et al. 2016) mais également entre deux espèces différentes et notamment entre l'Homme et la souris (Lasagna-Reeves et al. 2012; Clavaguera et al. 2013; Boluda et al. 2015; Narasimhan et al. 2017; T. Saito et al. 2019; He et al. 2020) ou le rat (Smolek et al. 2019). De plus, la transmission entre la souris, le primate et l'Homme a été mise en évidence (Gary et al. 2019). Enfin, une équipe a également étudié la propagation de la protéine tau après injection de microglie purifiée de souris hTau dans le striatum de souris non transgéniques (Maphis et al. 2015). Une équipe a récemment développé un modèle d'injection d'homogénats de cerveaux dans la rétine afin de cibler les cellules ganglionnaires de la rétine, bien que ce modèle permette le développement de la tauopathie, aucune propagation n'a été mise en évidence (de Fisenne et al. 2022).

II.G.6.b.(3) Modèles d'injections de fibrilles synthétiques

Certains modèles sont basés sur l'injection de fibrilles synthétiques. Ces fibrilles sont fabriquées *in vitro* par incubation de monomères en présence d'héparine et ressemblent aux agrégats de protéine tau retrouvés chez les patients. Deux types de fibrilles sont les plus communément utilisées :

- Les fibrilles T40/PS constituées de protéine tau sous la forme 2N4R et portant la mutation P301S (Iba et al. 2013; 2015; J. L. Guo et al. 2016; Gibbons et al. 2017; He et al. 2018)
- Les fibrilles K18 contenant le domaine de liaisons aux microtubules de l'isoforme 4R et portant la mutation P301L (Peeraer et al. 2015; Stancu et al. 2015; Albert et al. 2019)

L'injection de ces fibrilles dans l'hippocampe permet l'induction de l'agrégation de ces fibrilles ainsi que leur propagation. Ces études ont notamment révélé la vulnérabilité sélective de certaines régions à la protéine tau pathologique. La limite principale de ces modèles repose sur leur hétérogénéité et leur différence structurelle avec la protéine tau retrouvée chez les patients (Fichou et al. 2018).

Plus récemment, de nombreuses équipes, dont la nôtre, se sont intéressées aux modèles d'étude de la propagation de la protéine tau, dont la surexpression est induite par injection de vecteurs viraux dans une région spécifique d'intérêt. Tous ces modèles permettent d'observer de la propagation de la protéine tau, modulée selon certains paramètres. On retrouve un modèle d'injection de lentivirus permettant la surexpression de la protéine tau chez le rat (Dujardin, Lécolle, et al. 2014; Dujardin et al. 2018). Mais aussi des modèles basés sur l'injection de rAAV (recombinant adeno-associated virus) ciblant le cortex entorhinal (Asai et al. 2015; Wegmann et al. 2019), ou encore le gyrus denté (Schultz et al. 2018). Nous avons également récemment publiés nos résultats obtenus dans un modèle ciblant les cellules ganglionnaires de la rétine et permettant l'étude de la propagation de la protéine tau dans les voies visuelles (Dawat, Léal et al. 2023).

III. Neuroinflammation

La neuroinflammation est un phénomène provoqué en réponse à une stimulation inflammatoire endogène (génétique, agrégation protéique...), ou environnementale (trauma, infection...). Elle est médiée par les cellules gliales que sont les astrocytes, la microglie et les oligodendrocytes. C'est un mécanisme de défense mis en place par ces cellules afin de protéger les neurones et de maintenir l'intégrité et l'homéostasie cérébrale. On retrouve donc ce phénomène dans les maladies neurodégénératives.

La maladie d'Alzheimer n'implique donc pas que les neurones, mais également les cellules gliales qui sont responsables de la neuroinflammation. Cette contribution inflammatoire a longtemps été considérée comme une conséquence en réaction aux plaques séniles et aux dégénérescences neurofibrillaires. Cependant, de nombreuses études ont montré un rôle prépondérant de la neuroinflammation qui peut parfois précéder la présence des lésions dans certaines régions cérébrales, montré notamment dans une étude basée sur l'IRM (Pascoal et al. 2021).

La publication de plusieurs études génétiques d'association pan-génomique (GWAS) a permis la reconsidération du rôle des cellules gliales dans la maladie. En effet, une méta-analyse menée en 2013 basée sur les résultats de 4 analyses GWAS, représentant au total l'étude du génome de 74 046 individus, a permis de mettre en évidence 20 loci dont APOE. Grâce à cette méta-analyse, 11 nouveaux gènes dont certains variants augmentent le risque de développer la maladie d'Alzheimer ont été identifiés (Figure 17). Parmi eux, on retrouve notamment des gènes impliqués dans l'homéostasie lipidique (APOE, SORL1 et ABCA7), des gènes impliqués dans l'endocytose (PICALM, CD2AP et BIN1), et enfin une majorité de gènes impliqués dans l'immunité (CR1, CD33, MS4A6A, TREM2, INPP5D, HLA et MEF2C) et exprimés par la microglie (Lambert et al. 2013). Il faut également noter que de nombreuses autres études sont parues depuis et ont permis l'identification de nouveaux loci. Par exemple une étude analysant le génome de 111 326 patients diagnostiqués Alzheimer et 677 663 personnes contrôles a permis de mettre en évidence 75 loci, dont 42 étaient nouveaux au moment de l'analyse (Bellenguez et al. 2022).

Gene with Variants Associated in Late-Onset AD

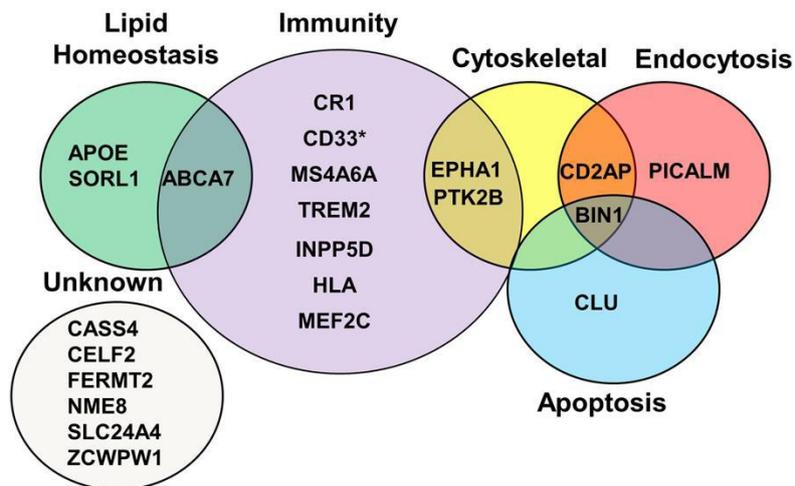


Figure 17. Gènes ayant des variants associés avec l'apparition des LOAD. D'après Eid et al. 2019

Le poids des gènes de l'inflammation identifiés lors de ces études ont entraîné un regain d'intérêt pour le rôle de la neuroinflammation et plus particulièrement de la microglie dans la maladie et une étude plus approfondie de leur rôle dans la genèse et l'aggravation de la pathologie.

III.A.1. Rôle des astrocytes dans la maladie d'Alzheimer

Les astrocytes font partie du groupe des cellules gliales, et représentent 20% des cellules gliales dans le cerveau humain (Pelvig et al. 2008). Ces cellules jouent un rôle de support et maintien des neurones, sur le plan métabolique, trophique, synaptique et sont également impliqués dans la réponse immunitaire. De manière physiologique, ces cellules n'expriment que très faiblement la protéine tau, comme nous l'avons déjà mentionné précédemment, (Figure 8 ; Perea et al. 2019). Cependant, la protéine tau hyperphosphorylée est retrouvée dans les astrocytes dans des tissus Alzheimer (Probst, Ulrich, et Heitz 1982; Ferrer 2017) et chez des souris sauvages dont la tauopathie est induite dans les neurones par transfert de gènes (Maté de Gérando et al. 2021). Plusieurs études ont par ailleurs démontré la présence de tau sous forme hyperphosphorylée, tronquée, monomérique, fibrillaire dans les astrocytes, *in vitro* et *ex vivo* (Perea et al. 2019; Martini-Stoica et al. 2018; de Calignon et al. 2012). La

présence de la protéine tau ne semble pourtant pas due à sa surexpression dans les astrocytes en condition pathologique. De plus, il a été montré que l'exposition d'astrocytes primaires en culture avec stimulation par le peptide A β ne semble pas induire une augmentation de l'expression de tau par les astrocytes (Chiarini et al. 2017). Cela suggère que les astrocytes seraient capables d'internaliser la protéine tau extracellulaire. Cependant, les mécanismes impliquant l'internalisation par les astrocytes et les conséquences pathologiques de cette dernière ne sont encore que très peu connus suggérant que les astrocytes puissent également jouer un rôle dans la propagation de la protéine tau. Une étude menée sur les astrocytes *in vitro* et *in vivo*, montre que lorsque le facteur de transcription lysosomal EB (TFEB) est surexprimé dans les astrocytes, on observe une diminution de la gravité et de la propagation de la protéine tau, démontrant un potentiel rôle des astrocytes dans ces deux phénomènes (Martini-Stoica et al. 2018).

La réponse des astrocytes aux conditions pathologiques est caractérisée par une réactivité astrocytaire. Cette réaction est complexe, en plusieurs stades et spécifique de la pathologie (Heneka et al. 2015). En effet, la réactivité astrocytaire induit un changement morphologique et transcriptomique de ces derniers. Ces changements sont spécifiques d'une pathologie. Globalement, on observe une atrophie de l'arborisation astrocytaire et une augmentation de l'expression de la GFAP (glial fibrillary acidic protein). Cette protéine du cytosquelette spécifiquement exprimée dans les astrocytes est un bon marqueur de leur réactivité car son augmentation est retrouvée dans plusieurs pathologies, et se produit de manière précoce (Escartin et al. 2021).

Par ailleurs, de nombreux liens ont été établis entre les astrocytes et la microglie. Ces deux types cellulaires sont capables de communiquer notamment via la sécrétion de cytokines (Figure 18). Il a été montré que la microglie, via la sécrétion de cytokines telles que le TNF-alpha, l'IL-1alpha et C1q, entraîne le passage des astrocytes à un état activé, qui, par analogie avec les états d'activation M1 et M2 des macrophages, a été nommé « A1 » par l'équipe de Liddel et al. qui a mis en évidence cette relation. Cependant, de la même manière que pour la microglie, cette dichotomie pro-inflammatoire/anti-inflammatoire ne fait pas consensus. Activés, les astrocytes ne participent plus à la survie neuronale, mais à l'inverse ils promeuvent la mort des neurones et des oligodendrocytes. Les cytokines citées précédemment sont nécessaires et suffisantes à ce changement de phénotype. Enfin, d'après les auteurs, les

astrocytes activés sont largement retrouvés dans les cerveaux de patients atteints de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Liddelow et al. 2017).

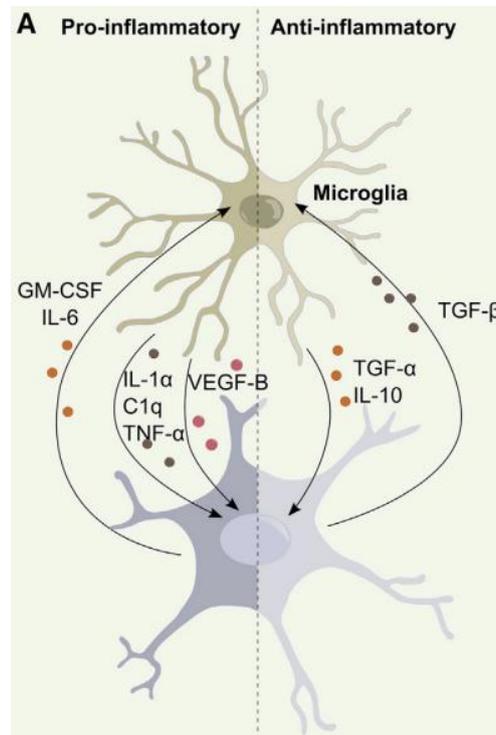


Figure 18. Interaction entre la microglie et les astrocytes. D'après Linnerbauer et al. 2020

Une étude très récente, étudiant le rôle de la réactivité astrocytaire chez les patients avec amyloïdose mais n'ayant pas de déficits cognitifs, a montré que les astrocytes jouaient un rôle important, en amont, dans le lien entre l'amyloïdose et l'initiation de la tauopathie. Cela montre l'importance des astrocytes dans le développement de la pathologie (Bellaver et al. 2023).

Les nouvelles techniques comme le séquençage haut débit du transcriptome de cellules uniques (single-cell RNAseq) permettent d'avoir de plus en plus de réponses concernant la communication entre ces deux cellules, et les changements de communication en fonction du contexte (pathologie, âge etc...) (Liddelow, Marsh, et Stevens 2020). Une très récente innovation permet d'ailleurs d'étudier le crosstalk entre les astrocytes et la microglie. Cette innovation est basée sur l'étude transcriptomique de deux cellules isolées en co-culture dans des gouttelettes, de l'ordre du picolitre, en utilisant une méthode de transcriptomique similaire au single-cell, RNAseq appelée le SPEAC-seq (Wheeler et al. 2023).

III.A.2. La réponse du système immunitaire périphérique

Le système immunitaire périphérique peut-être subdivisé en deux types de lignages cellulaires. Premièrement, les cellules du lignage myélocytaire, engendrent notamment la production de monocytes qui se différencient notamment en macrophages. Ce sont les cellules de l'immunité innée, qui permettent une réponse immédiate face aux agents pathogènes, cette réponse est la même quel que soit l'agent pathogène. Deuxièmement, le lignage lymphocytaire qui quant à lui, permet la différenciation des progéniteurs en lymphocytes T et B, ces cellules font partie de l'immunité adaptative. L'immunité adaptative est aussi appelée acquise, et est spécifique aux vertébrés. Ce type de défense est moins rapide, cependant il est spécifique de l'agent pathogène car permet la production de lymphocytes mémoires, qui constituent la mémoire immunitaire.

Pendant longtemps, le cerveau a été considéré comme un organe « immuno-privilegié » dont le système immunitaire périphérique serait totalement exclu. Cette hypothèse était basée sur une étude menée au début du 20^{ème} siècle, par Murphy et Sturm, qui ont montré l'absence de rejet de greffe de tissus étrangers ou de tumeurs dans le cerveau sans immunosuppression contrairement aux greffes dans les tissus périphériques (Murphy et Sturm 1923). Cependant de récentes études ont montré qu'après altération de l'environnement du SNC, les cellules immunitaires non résidentes du parenchyme cérébral, comme par exemple les lymphocytes, sont capables d'y migrer et d'y survivre ([Figure 19](#) ; (Laurent et al. 2017; Mrdjen et al. 2018).

En ce qui concerne la lignée myéloïde, la contribution des monocytes dérivés du sang dans la réponse immunitaire innée dans le cadre de la maladie d'Alzheimer demeure une question non résolue et un sujet d'étude important. Une infiltration de ces cellules dans le parenchyme cérébral a été montrée *in vivo* chez la souris. On retrouve notamment des monocytes infiltrant dans le cerveau lorsque l'on déplete la microglie chez des souris APP/PS1, modèle transgénique d'amyloïdose. Ces cellules prennent alors le relais de la microglie et jouent un rôle dans la phagocytose des plaques amyloïdes (Simard et Rivest 2006). Et lorsqu'on empêche l'infiltration de ces cellules dans le parenchyme cérébral, à l'aide d'inhibiteur du chémorécepteur CCR2, on observe une augmentation de la charge amyloïde dans le modèle transgénique murin Tg2576, ce qui démontre bien un rôle important de ces cellules infiltrantes, même en présence de la microglie (El Khoury et al. 2007). Cependant, dans ces

modèles utilisant la technique d'irradiation de la moelle osseuse pour transplanter ensuite des cellules fluorescentes plus facilement traçables, il faut tenir compte du potentiel rôle de l'altération de la BHE induite par l'irradiation et qui introduit sans doute un biais dans la capacité d'infiltration du SNC par les monocytes circulants. De plus, d'autres études ont montré que la contribution des monocytes dérivés du sang est peut-être minime et que la contribution du système immunitaire périphérique est plutôt attribuable aux macrophages périvasculaires (Grathwohl et al. 2009; Heneka et al. 2015).

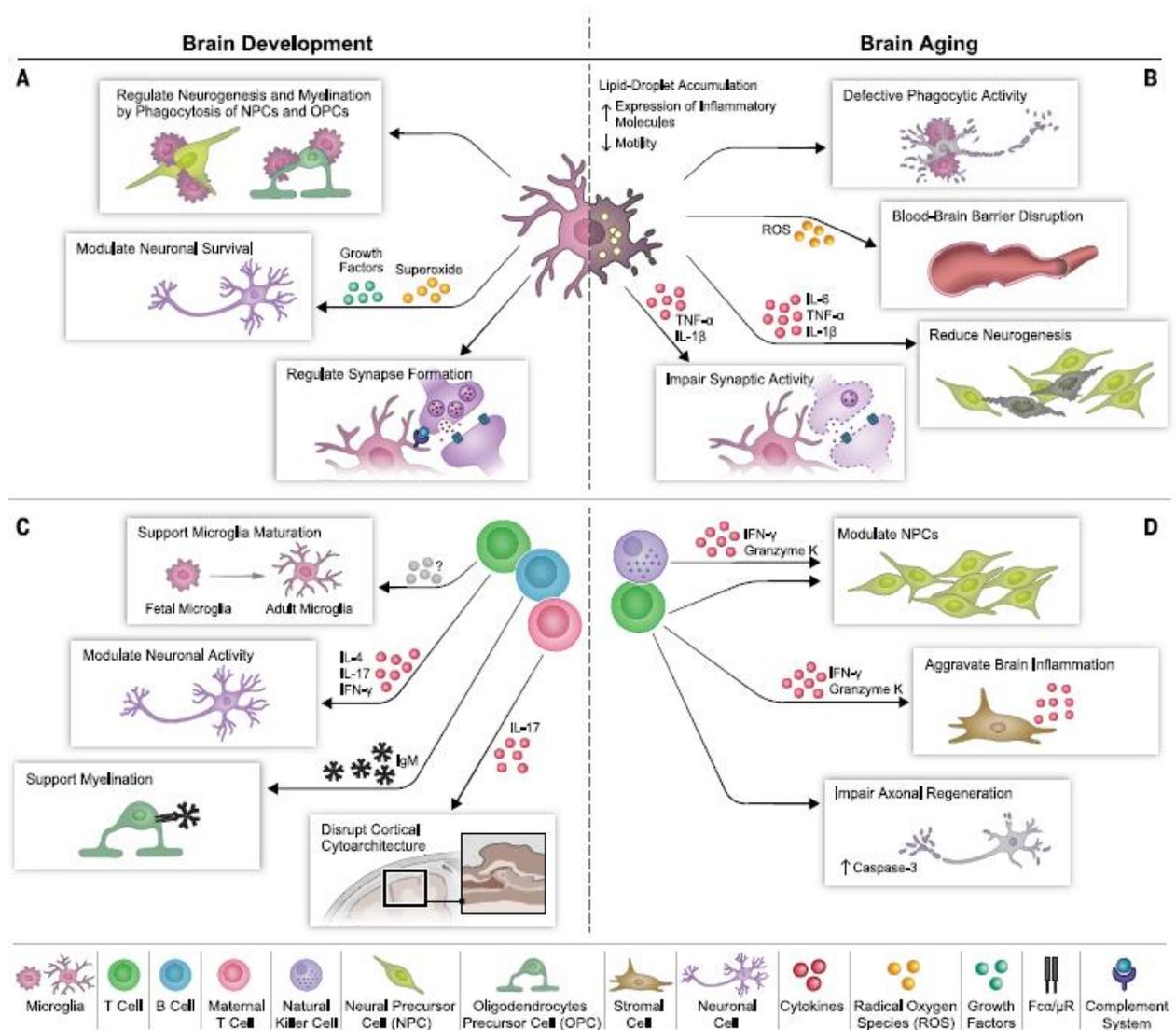


Figure 19. Fonctions du système immunitaire périphérique lors du développement et vieillissement cérébral. *D'après Castellani et al. 2023*

En ce qui concerne la lignée lymphocytaire, des études récentes ont montré la présence de lymphocytes T dans le liquide céphalo-rachidien, les méninges et l'hippocampe de patients

souffrant de la MA, et dans les modèles murins de la pathologie (Gate et al. 2020; Merlini et al. 2018; Laurent et al. 2017; S.-H. Lee et al. 2021). De plus, une étude très récente réalisée sur des modèles de tauopathie seule ou d'amyloïdose seule, s'est intéressée à l'expression génique des différentes cellules immunitaires, lymphocytaires et myéloïdes, dans ces modèles à l'aide de single-cell RNAseq. Cette étude a notamment montré une importante augmentation de l'expression de marqueurs spécifiques aux lymphocytes, et ceci uniquement dans le modèle de tauopathie. Les auteurs ont observé par tri cellulaire une augmentation du nombre de lymphocytes CD4+ et CD8+ avec une augmentation d'autant plus importante pour les lymphocytes CD8+ (Chen et al. 2023).

III.A.3. La microglie

III.A.3.a) *Origines et fonctions*

La microglie est le macrophage résident du système nerveux central (SNC). Ce type de cellules a été mise en évidence en 1919 par Pio Del Rio-Hortega. La microglie fait partie du groupe des cellules gliales, regroupant toutes les cellules non neuronales, identifiées en 1856 par Rudolf Virchow. Elle représente 10 à 15% des cellules gliales. Sa distribution est ubiquitaire au sein du cerveau.

La microglie est une cellule myéloïde qui est issue du sac vitellin. A la 5^{ème} semaine de gestation (Jour 8 du développement chez la souris) les progéniteurs microgliaux sont excrétés dans la circulation sanguine et rejoignent le parenchyme cérébral en développement avant même sa vascularisation et donc l'établissement de la BHE. A ce stade, les progéniteurs sont stockés entre le neuroectoderme et le neuroépithélium. Ensuite, les progéniteurs traversent le neuroépithélium et se différencient en microglie dans le parenchyme ([Figure 20](#) ; (Ginhoux et al. 2010)). La migration des progéniteurs peut avoir lieu de la 5^{ème} semaine de gestation chez l'Homme, jour 8 chez la souris, jusqu'à la fermeture de la barrière hémato-encéphalique (BHE), au jour 14,5 chez la souris et jusqu'à la 24^{ème} semaine de gestation chez l'Homme (Stremmel et al. 2018; Menassa et Gomez-Nicola 2018). Ainsi, le stock de progéniteurs microgliaux chez l'Homme est fini, c'est-à-dire que ce stock ne pourra pas se renouveler au cours de la vie, comme c'est le cas pour les autres cellules myéloïdes. Cependant, la microglie est douée de capacités d'auto-renouvellement dans certaines conditions. Par exemple en cas

de déplétion de la microglie avec un antagoniste du récepteur CSF1R (*Colony Stimulating Factor-1 Receptor*), qui est essentiel à la survie microgiale, et après arrêt du traitement, cette dernière est capable de repeupler le parenchyme.

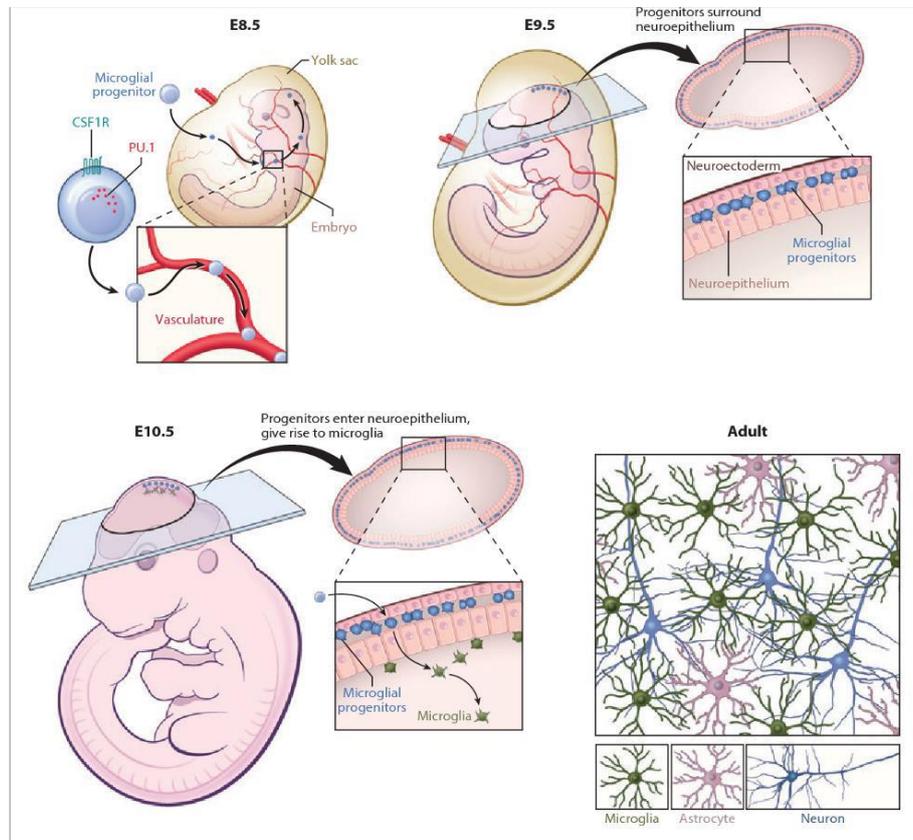


Figure 20. Origine développementale des progéniteurs microgiaux. D'après Ginhoux et al. 2010

Lors de l'invasion du parenchyme, la microglie adopte une morphologie amoéboïde, il faut attendre le jour 28 après la naissance (pour la souris) pour retrouver la morphologie ramifiée homéostatique. On divise cette période en trois stades : le stade progéniteur pendant lequel la microglie a un profil particulier qui a permis de la distinguer des monocytes (RUNX1+/CD45-/c-Kit+), le stade pré-microgial durant lequel la microglie commence à exprimer d'autres marqueurs comme PU.1 et IRF8, sa morphologie commence alors à se ramifier, et enfin le stade adulte (Salter et Stevens 2017).

La microglie a un soma de petite taille mais est hautement ramifiée. Cette morphologie et la grande mobilité de ses prolongements lui permettent de scanner son environnement de manière très efficace et ainsi de détecter rapidement une altération de l'homéostasie

cérébrale, mais également de communiquer avec les neurones, les astrocytes, les oligodendrocytes et les vaisseaux ([Figure 21](#)).

Étant donné son rôle dans le maintien de l'homéostasie cérébrale, la microglie est impliquée dans la survie neuronale via la sécrétion de facteurs trophiques, comme le brain-derived neurotrophic factor (BDNF), permettant le développement des circuits neuronaux, leur survie et la fonctionnalité des neurones, ainsi la microglie joue un rôle au cours du développement des neurones par l'élagage des circuits neuronaux, mais également à l'âge adulte pour leur maintien. En effet, nous savons que la moitié des neurones immatures ainsi que les neurones non fonctionnels vont rentrer en apoptose durant le développement et il a été montré que la microglie était non seulement en charge des débris neuronaux engendrés à la suite de la mort neuronale, mais que cette cellule pouvait être l'initiatrice de la mort programmée de ces cellules par sécrétion d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*) (Wakselman et al. 2008).

Son rôle dans le nettoyage des débris neuronaux repose sur sa capacité de phagocytose. De plus, la microglie est impliquée dans la modulation de la plasticité synaptique et est ainsi capable d'élagage ou « synaptic pruning », c'est-à-dire de la phagocytose des synapses non fonctionnelles au fur et à mesure de leur formation (Nayak, Roth, et McGavern 2014).

Par ailleurs, comme dit précédemment, la microglie est également capable d'interagir avec beaucoup d'autres types cellulaires et ainsi participer à leurs fonctions. La microglie peut interagir avec les astrocytes et participer au maintien de la barrière hémato-encéphalique, avec les cellules endothéliales et ainsi participer à la vasculogénèse, avec les cellules souches neurales et moduler la neurogénèse, et enfin interagir avec les oligodendrocytes et jouer un rôle dans la myélinisation (Sierra, Paolicelli, et Kettenmann 2019).

Enfin, au-delà de la surveillance et du maintien de l'homéostasie cérébrale, la microglie joue un rôle très important de réponse aux pathogènes : la microglie va réagir et jouer un rôle direct et participer à l'inflammation, comme nous l'expliquions tout d'abord grâce à la phagocytose, mais également via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires qui vont alerter l'environnement et permettre le recrutement d'autres cellules (Nayak, Roth, et McGavern 2014; Sierra, Paolicelli, et Kettenmann 2019).

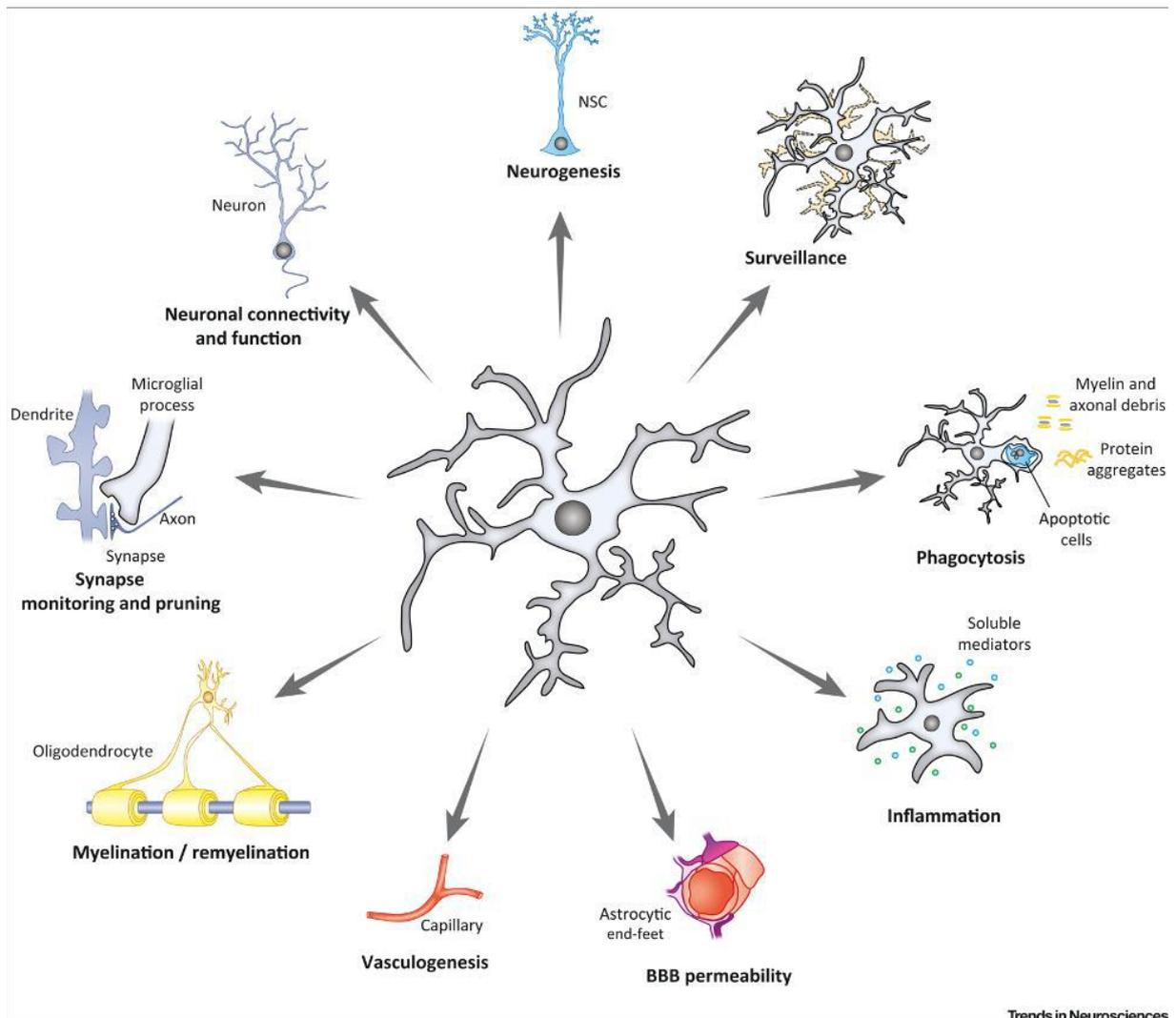
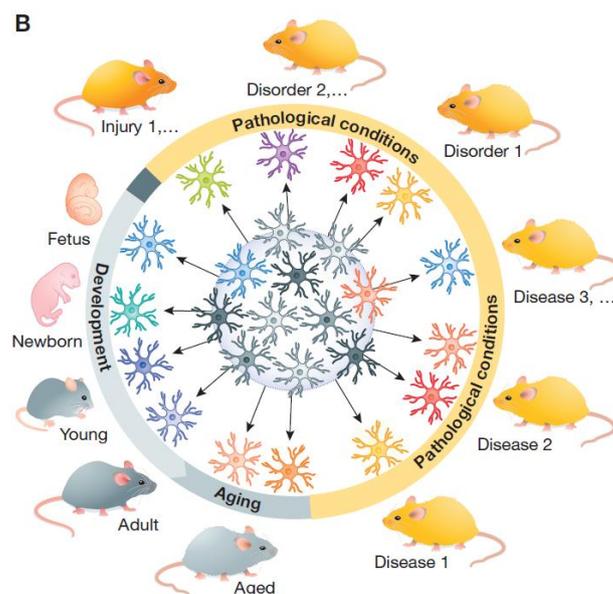


Figure 21. Diversité des fonctions microgliales en physiologie. D'après Sierra et al. 2019

III.A.3.b) Hétérogénéité microgliale

Différentes études ont montré que la microglie est en fait constituée d'une population de cellules très hétérogènes. En effet il existe plusieurs sous-populations microgliales qui se distinguent par leur morphologie, mais aussi, montré plus récemment, par leur profil transcriptomique. Cette caractéristique de la microglie est une découverte très récente qui soulève de nombreuses questions et notamment celle de l'hétérogénéité fonctionnelle de la microglie : son hétérogénéité morphologique et transcriptomique est-elle le reflet de différences fonctionnelles ?

Au-delà de son hétérogénéité au sein du parenchyme cérébral à un temps donné, de nombreuses études ont également montré une évolution différente des caractéristiques de la microglie au cours du temps, et entre différents individus ([Figure 22](#) ; Sierra, Paolicelli, et Kettenmann 2019; Stratoulis et al. 2019; Masuda et al. 2020; Paolicelli et al. 2022). Par exemple, il a été montré que la microglie est impliquée dans les différences de comportement social chez le rat femelle et le rat mâle (VanRyzin et al. 2019). D'autres études ont également montré que la microglie changeait au cours du vieillissement, comme elle le fait au cours du développement (Streit et Xue 2013; Olah et al. 2018). Tous ces éléments montrent que la microglie est une cellule au phénotype hautement dynamique qui évolue énormément en fonction du contexte. Une étude consensus sur cette cellule a d'ailleurs récemment été publiée, et relate cette hétérogénéité (Paolicelli et al. 2022). Ce point sur les connaissances actuelles concernant la microglie montre qu'il devient difficile de comprendre de quel type de microglie il est question sans décrire précisément le contexte dans lequel elle est étudiée. La dichotomie entre état microglial homéostatique versus activé devient obsolète lorsqu'on sait que la microglie dite « homéostatique » ne sera pas la même chez l'homme et la femme, l'enfant et la personne âgée, ou encore si on parle de la microglie du cervelet ou de l'hippocampe. Ainsi, comprendre la fonction associée à un état semble un pan de recherche indispensable pour les années à venir (Paolicelli et al. 2022).



[Figure 22. Hétérogénéité microgliale. D'après Stratoulis et al. 2019](#)

Enfin, l'une des plus importantes lacunes en ce qui concerne nos connaissances actuelles sur la microglie tient dans le fait que des études transcriptomiques ont mis en évidence une très importante différence entre la microglie murine et humaine (Sierra, Paolicelli, et Kettenmann 2019). Les études *in vitro* à partir d'iPSCs humaines et la capacité à intégrer la microglie reprogrammée dans les organoïdes devraient nous apporter plus d'informations durant les prochaines années sur la possibilité d'extrapoler tout le travail réalisé chez la souris, à la fonction microgliale chez l'Homme (Maksour et Ooi 2023; Cakir, Kiral, et Park 2022; Park et al. 2018).

III.A.3.c) Microglie et tau

Suite aux études GWAS, de nombreux laboratoires se sont intéressés aux bénéfices thérapeutiques que pourrait apporter un ciblage microglial. Cependant, la littérature, de plus en plus florissante à ce sujet, montre un effet ambivalent de la microglie, qui peut être bénéfique ou délétère en fonction de la pathologie, du stade de la pathologie, des régions cérébrales affectées et du modèle d'étude utilisé. Ainsi dans les stades précoces, la microglie joue son rôle de capteur de l'homéostasie cérébrale, détecte l'accumulation d'A β et phagocyte ces dépôts. Ensuite, face à l'augmentation des lésions et son incapacité à surmonter l'accélération de l'apparition de ces lésions, la microglie est dépassée et entraîne une inflammation chronique avec activation de l'inflammasome (NLRP3), sécrète massivement des cytokines, et n'est plus capable de reconnaître ce qui est délétère de ce qui ne l'est pas et phagocyte tout, même les synapses et les neurones viables. Cela conduit à une aggravation de la neurodégénérescence ([Figure 25](#), Perea, Bolós, et Avila 2020).

Il a en premier lieu été montré que l'inflammation pouvait impacter la tauopathie. Tout d'abord simplement en utilisant des modèles murins de tauopathies (P301S et hTau) qui ont été traités avec des anti-inflammatoires. Une diminution de la tauopathie était alors observée (Garwood et al. 2010; Yoshiyama et al. 2007). Au contraire une étude a montré grâce à l'injection de LPS chez des souris 3xTg, modèle transgénique de la maladie d'Alzheimer, que l'activation de l'inflammation est délétère et potentialise la tauopathie (Kitazawa et al. 2005).

Par ailleurs, la déplétion de la microglie entraîne une accumulation de la protéine tau hyperphosphorylée (Asai et al. 2015).

Enfin, l'étude de l'inflammasome NLRP3 de la microglie a mis en lumière sa potentielle implication dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer. L'inflammasome NLRP3 est un complexe qui s'assemble dans la microglie dans un contexte inflammatoire. Une étude a montré que la perte de l'inflammasome NLRP3 permettait une réduction de l'hyperphosphorylation et de l'agrégation de la protéine tau (Ising et al. 2019).

Le rôle de la microglie dans la tauopathie est complexe et n'est pas encore totalement élucidé même si de nombreuses pistes convergent vers une forte implication de ces cellules dans le processus pathologique.

Ces dernières années, l'essor des études transcriptomiques a permis de mettre en évidence certains profils transcriptomiques associés à des contextes précis. Dans le cadre des maladies neurodégénératives un type de microglie a ainsi été mis en évidence, ces cellules sont alors nommées microglie associées à la pathologie ou DAM (pour l'anglais disease-associated microglia). Une étude de 2017 a notamment montré que ces cellules contenaient des particules A β , qu'elles étaient à proximité des plaques amyloïdes, mais la découverte majeure de cette étude repose sur les mécanismes entraînant la microglie vers l'expression d'un tel profil transcriptomique (Keren-Shaul et al. 2017). En effet, cette étude a montré que l'activation de la microglie vers un profil DAM se faisait en deux étapes, la première étant indépendante de TREM2, et la deuxième dépendant de l'activation de voies de signalisation impliquant TREM2. Ce profil transcriptomique semble être bénéfique notamment en restreignant la neurodégénérescence induite (Deczkowska et al. 2018; Keren-Shaul et al. 2017).

III.A.3.c.(1) Facteurs de prédisposition génétiques et microglie

Comme nous le décrivions précédemment, l'intérêt accru de l'étude des cellules microgliales a été propulsé par la publication des études GWAS qui ont mis en évidence de nombreux gènes régulant l'immunité. Parmi ces gènes on retrouve beaucoup de gènes exprimés

spécifiquement dans la microglie et notamment TREM2. Le risque de développer la maladie associé aux polymorphismes de ce gène est très important. En effet, bien que les variants responsables de l'augmentation de ce risque soient rares au sein de la population, ils entraînent un risque de développer la maladie aussi important que le variant APOE4, qui est le facteur de risque génétique le plus important de développement de la forme sporadique de la maladie d'Alzheimer.

III.A.3.c.(2) Origine et distribution de TREM2

TREM2 (pour Triggering Receptor Expressed on myeloïd cells-2) est un gène codant pour un récepteur de l'immunité innée exprimé à la surface des cellules myéloïdes (macrophages, microglie...), des ostéoclastes et des cellules dendritiques immatures. Le gène *TREM2* est présent sur le chromosome 6 en position p21.1 chez l'Homme (Allcock et al. 2003), et sur le chromosome 17 chez la souris (Bouchon, Dietrich, et Colonna 2000). *TREM2* est une glycoprotéine membranaire de type I composée d'un domaine immunoglobuline extracellulaire, d'un domaine transmembranaire, et d'une queue cytoplasmique qui, associée à la tyrosine kinase TYROBP, forme un complexe de signalisation. Le gène *TREM2* fait partie d'une famille de gènes de structure similaire et regroupé sur le même chromosome : *TREM1*, *TREM2*, *TREM3*, et des gènes *TREM-like* comme *TREML1* et *TREML2* (Yaghmoor 2014).

Ce gène est 10 fois plus exprimé chez la souris que chez l'Homme (BrainRNAseq). Chez ce dernier, *TREM2* est plus exprimé dans la matière blanche, l'hippocampe et le néocortex, ce qui est représentatif des régions touchées par la maladie d'Alzheimer (Forabosco et al. 2013; Yaghmoor 2014).

III.A.3.c.(3) Voies de signalisation et fonctions

Dans le parenchyme cérébral, le récepteur *TREM2* est exclusivement exprimé par la microglie et bien que les études soient divergentes, il semblerait que ce soit l'un des récepteurs microgliaux les plus exprimés, mais il n'est pas encore clair si ce récepteur est exprimé par tous les sous-types de microglie (**Schmid et al 2002**).

Ce récepteur transmembranaire est donc lié à un adaptateur intracellulaire, TYROBP ou DAP12 (pour DNAX-activation protein 12) (**Bouchon et al 2011 ; Daws et al 2001**). Cet adaptateur a une partie cytoplasmique qui est nécessaire à l'initiation des voies de signalisation induites par l'activation de TREM2. En effet, l'interaction entre TREM2 et son ligand n'entraînera aucune cascade de signalisation en l'absence de DAP12 (Takahashi, Rochford, et Neumann 2005; Gratuze, Leyns, et Holtzman 2018).

L'interaction entre DAP12 et TREM2 est électrostatique et résulte de l'interaction entre une charge positive sur un résidu lysine sur TREM2, et une charge négative sur un résidu aspartate sur DAP12. La liaison d'un ligand au récepteur TREM2 entraîne la phosphorylation de DAP12 sur ses motifs d'activation ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) par les kinases de la famille Src. Cette phosphorylation permet la révélation de sites de liaisons sur le domaine SH2, ce qui permet ensuite les cascades de signalisation et la réponse immunitaire. La phosphorylation des ITAMs permet notamment le recrutement de Syk, une kinase qui active les voies de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), Akt et mitogen-activated protein kinases (MAPK). Le recrutement de la PI3K est également possible via l'interaction entre TREM2 et DAP10.

Les ligands de TREM2 sont multiples mais leur identité n'est pas encore totalement connue (Figure 23). Les premiers ligands à avoir été mis en évidence sont le LPS (anionic lipopolysaccharide), un constituant de la paroi bactérienne, ou encore Hsp60 (heat protein shock 60), une protéine chaperonne mitochondriale. On retrouve aussi des composés lipidiques comme ApoE (apolipoprotéine E), les LDL et HDL (respectivement low et high density lipoproteins), mais également le peptide A β soluble (Gratuze, Leyns, et Holtzman 2018).

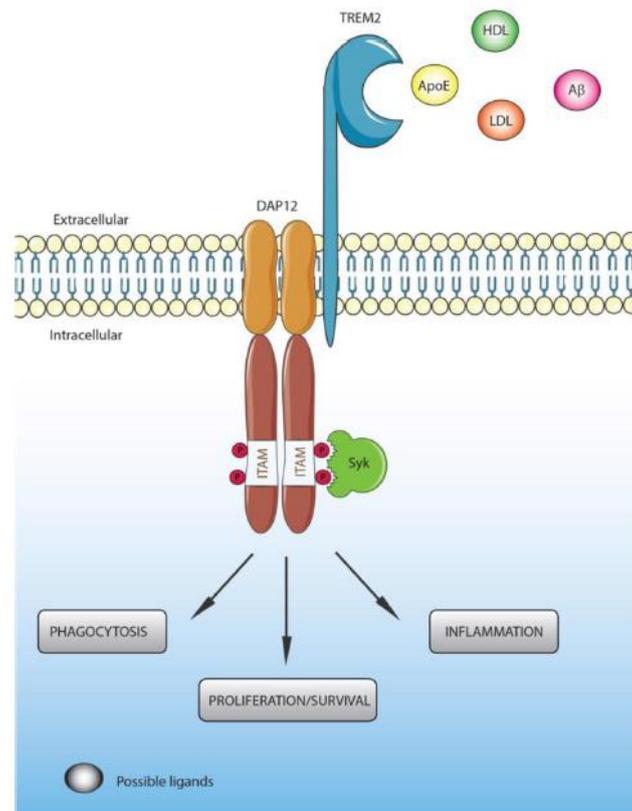


Figure 23. Voies de signalisation du récepteur microglial TREM2. D'après Gratuze et al. 2018

Le récepteur TREM2 permet l'activation de différentes voies de signalisation après liaison avec son ligand. Par exemple, après liaison au LPS, le récepteur TREM2 va induire la phagocytose et la sécrétion de substances réactives de l'oxygène (ROS). Ce rôle dans l'activation de la phagocytose microgliale est également retrouvé dans la maladie d'Alzheimer en réaction à l'exposition aux plaques amyloïdes. Le peptide A β étant un ligand de TREM2, il permet en effet la phagocytose des plaques par la microglie (Yaghmoor 2014). Le taux d'expression de TREM2 est d'ailleurs corrélé à l'activité de phagocytose de la microglie (Hsieh et al. 2009). Par ailleurs, une perte de fonction de TREM2 entraîne une diminution de l'activation microgliale chez la souris (Kawabori et al. 2015) et dans des cellules microgliales dérivées d'IPSC humaines (McQuade et al. 2020; Claes et al. 2019).

Il a également été montré que l'activation du récepteur TREM2 a des propriétés anti-inflammatoires par inhibition de la production et de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Sessa et al. 2004). Des études récentes ont, de plus, mis en évidence l'implication de TREM2 dans l'activation de la microglie vers un phénotype dit « DAM » pour disease-associated microglia. Selon ce modèle, le passage de la microglie homéostatique vers

la microglie activée associée à la pathologie se fait en 2 étapes, la deuxième ayant été décrite comme dépendante de TREM2 (Keren-Shaul et al. 2017; McQuade et al. 2020).

Enfin, l'activation du récepteur TREM2 augmente la prolifération microgliale. En effet, des études ont montré qu'en l'absence de TREM2, la prolifération microgliale est affectée (Zheng et al. 2017).

III.A.3.c.(4) TREM2 en conditions pathologiques

Comme nous l'expliquions précédemment, le gène TREM2 a été identifié par des études GWAS comme pouvant porter des mutations impliquant un plus haut risque de développer la maladie d'Alzheimer. Le variant mis en évidence est le variant R47H du gène, mais on retrouve également 6 autres variants (Q33X, Y38C, T66M, D87D, R98W et H157Y) dont trois (Q33X, Y38C et T66M) ont été identifiés comme associés à des syndromes apparentés aux démences fronto-temporales lorsqu'ils sont à l'état homozygote ([Figure 24](#) ; Guerreiro et al. 2013). Le variant R47H est associé à une perte partielle de fonction du gène (Kleinberger et al. 2014) et entraîne un risque 2 à 4 fois plus élevé de développer la MA (Jonsson et al. 2013).

La seule maladie humaine dans laquelle le gène TREM2 avait été impliquée auparavant est la maladie de Nasu-Hakola ou ostéodysplasie lipomembranaire polycystique associée à une leucoencephalopathie sclérosante (PLOSL). Cette maladie est due à une mutation homozygote du gène, la mutation Q33X, qui entraîne une perte de fonction quasi-totale du gène (Yaghmoor 2014). Elle est autosomale récessive, donc très rare, avec environ 200 cas rapportés dans le monde. Cette pathologie se caractérise par une démence présénile progressive et des fractures osseuses fréquentes, dues à des lésions osseuses polykystiques. Vers 30 ans, les patients souffriront d'affections psychiatriques suivies de démences fronto-temporales et d'une mort précoce fréquemment avant l'âge de 40 ans (Klünemann et al. 2005; Kaneko et al. 2010). Le fait que les systèmes osseux et cérébral soient tous les deux impactés dans la pathologie suggère que le récepteur TREM2 fonctionne de la même manière dans les deux systèmes.

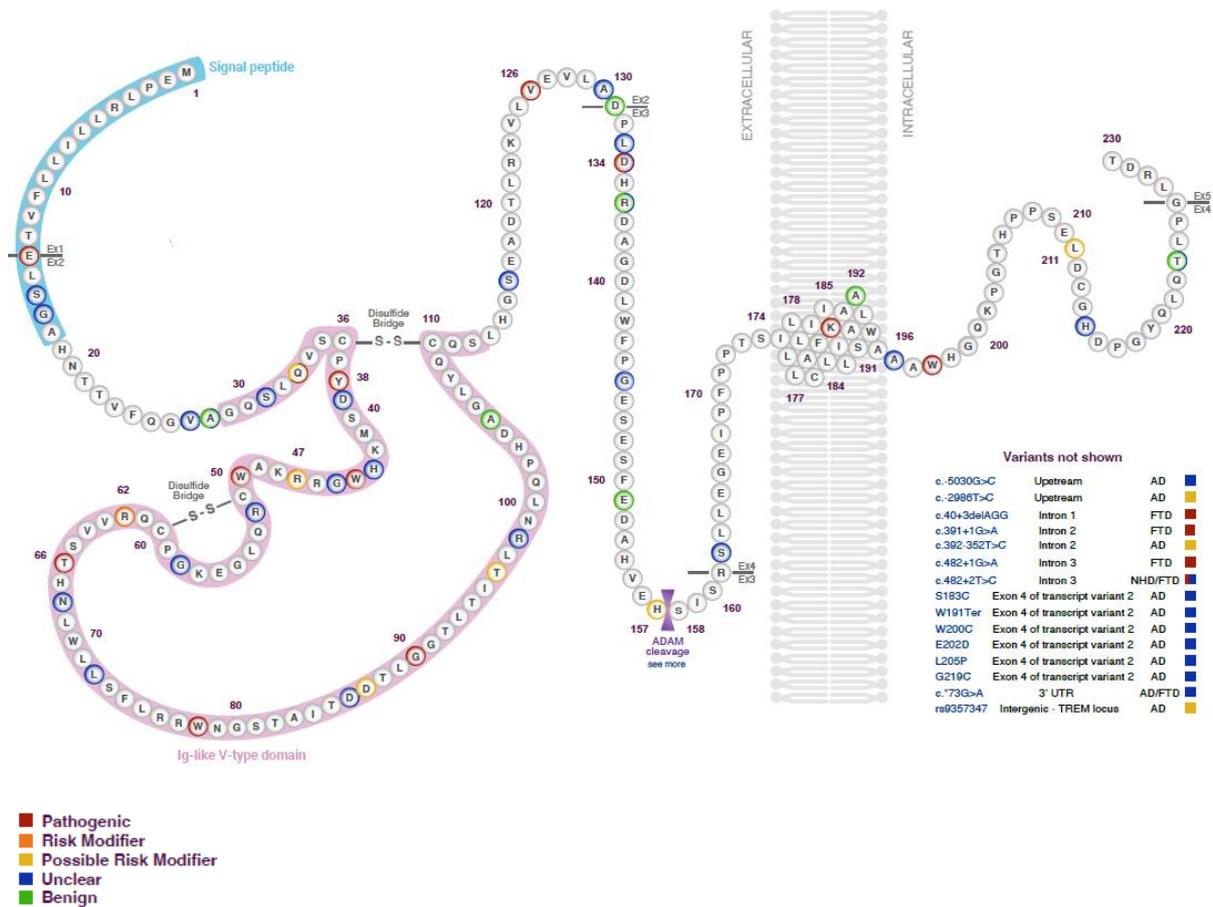


Figure 24. Variants de TREM2. D'après AlzForum

Comme nous le décrivions précédemment, il fait maintenant consensus dans la maladie d'Alzheimer que la microglie joue un rôle bénéfique dans les stades précoces de la pathologie et que son rôle devient délétère dans les stades plus tardifs. Des études récentes ont montré que la dichotomie de son effet est très fortement liée à l'expression de TREM2. En effet, en présence du variant, le rôle de la microglie s'inverse et devient délétère lors du développement de la pathologie et bénéfique dans les stades tardifs (Perea, Bolós, et Avila 2020; Parhizkar et al. 2019). Cette découverte a par la suite mené à des études visant le récepteur TREM2.

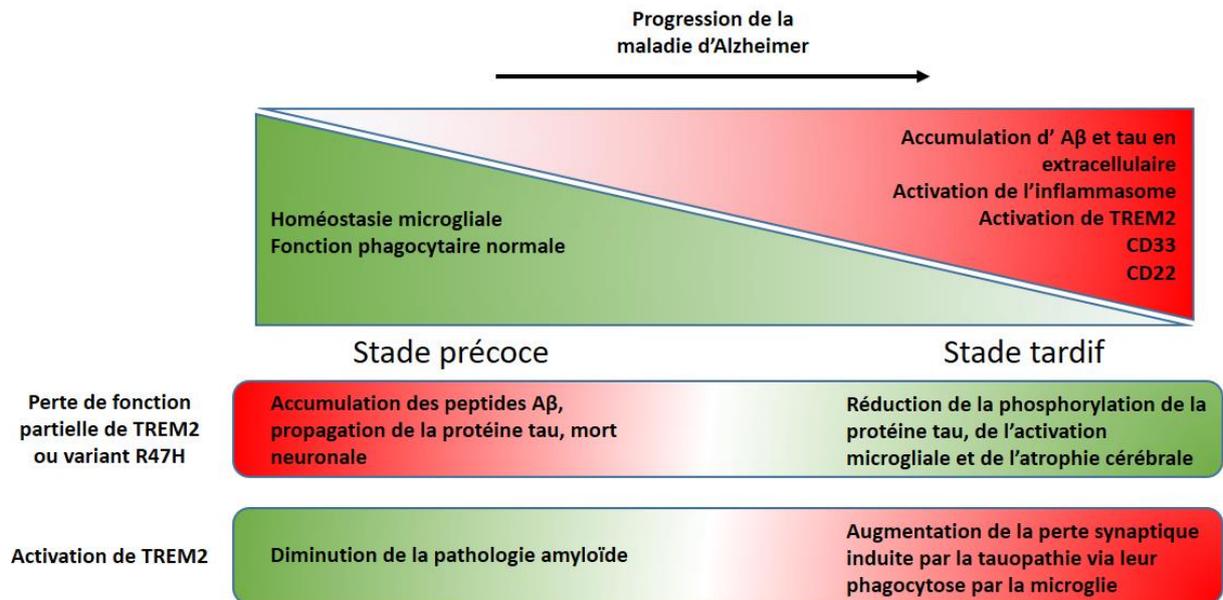


Figure 25. Dichotomie d'action de la microglie et des variants de TREM2 sur la pathologie. D'après Perea et al 2020

Le récepteur TREM2 participe donc à la dualité de réponse de la microglie en fonction du stade de la pathologie, et contribue au développement du profil DAM (disease-associated microglia) (Keren-Shaul et al. 2017). Dans le modèle murin 5xFAD d'amyloïdose, la déficience en TREM2, induite par l'inactivation du gène, ou l'expression du variant R47H, induite par un « *knock-in* » du variant, entraînent une diminution des microglies associées aux plaques amyloïdes et une augmentation des plaques dystrophiques (Song et al 2018 ; Wang et al 2016). La différence entre ces dernières repose sur leur composition, les plaques dystrophiques contenant des neurites dystrophiques ainsi que la protéine tau hyperphosphorylée en plus des agrégats du peptide Aβ, à l'inverse des plaques amyloïdes qui ne contiennent que les agrégats d'Aβ. De même, lorsqu'on utilise des cellules microgliales dérivées d'IPSCs humaines invalidées pour *TREM2*, on observe une incapacité de la microglie à répondre à la pathologie amyloïde (McQuade et al. 2020).

La recherche combinant TREM2 et ses effets sur l'amyloïdose est très riche (Yeh, Hansen, et Sheng 2017; Ulland et Colonna 2018), mais dans ce manuscrit nous nous focaliserons sur l'impact de TREM2 sur la tauopathie.

Les premières études réalisées sur le sujet montraient que chez les souris transgéniques P301Sx TREM2 KO (Jiang et al. 2015) et hTau x TREM2 (Bemiller et al. 2017), on observe une aggravation de la tauopathie. De plus, chez les souris P301SxTREM2 KO, on observe une diminution de la réactivité microgliale et une atténuation de l'atrophie cérébrale (Leyns et al. 2017; Sayed et al. 2018). De plus, un modèle innovant basé sur l'inactivation du gène TREM2 murin, et l'expression des variants communs et R47H du gène TREM2 humain chez des souris P301S, a permis de mettre en évidence la dualité de réponse de la microglie que nous décrivions précédemment (Gratuze et al. 2020). Cette étude montre un effet bénéfique de la déficience en TREM2 dans les stades tardifs de la pathologie, ici à l'âge de 9 mois chez la souris, avec une diminution de l'atrophie cérébrale, de la perte synaptique, de l'hyperphosphorylation de la protéine tau et de sa propagation (Gratuze et al. 2020). Ces données sont étonnantes lorsque l'on sait que le variant R47H utilisé a été identifié comme facteur de risque de la pathologie.

Au contraire, de récentes études ont montré que dans des modèles murins d'amyloïdose, injectés avec la protéine tau humaine pathologique et avec une déficience en TREM2 ou l'expression du variant R47H, on observe une augmentation de la propagation et de la capacité de nucléation de tau associée au peptide A β (Gratuze et al. 2021; Leyns et al. 2019; Ulrich et al. 2014).

Par ailleurs, une étude récente montre également des résultats contradictoires (Jain et al. 2023). Cette étude se base sur l'utilisation de souris transgéniques 5xFAD, modèle d'amyloïdose, à qui ont été injectées des homogénats de protéine tau pathologique provenant de cerveaux de patients Alzheimer, tout en activant TREM2 de manière chronique grâce à l'administration d'un anticorps agoniste. Cette étude montre une augmentation de la présence de microglie à proximité des plaques amyloïdes, mais pas d'effets sur la charge amyloïde, ni sur la morphologie des plaques, et on observe également une augmentation de plaques neuritiques contenant de la protéine tau pathologique, et une augmentation de la propagation de cette dernière. Ces résultats semblent à nouveau contradictoires avec les études précédentes (Gratuze et al. 2021; Leyns et al. 2019) qui montraient une amélioration de la tauopathie dans un modèle utilisant le variant R47H, et donc en condition d'hypoactivité de TREM2.

Comme démontré par ces différents résultats, la compréhension du rôle de TREM2 dans la pathologie demeure complexe, son rôle apparaît subtil et très dépendant du contexte.

III.A.3.d) Microglie et propagation de la protéine Tau

Plusieurs études ont montré que la microglie pouvait jouer un rôle clé dans la propagation de la protéine tau (Cherry et al. 2016; Luo et al. 2015; Maphis et al. 2015; Asai et al. 2015).

Maphis et collaborateurs ont étudié le rôle de la microglie dans un modèle murin exprimant uniquement la protéine tau humaine, la lignée transgénique hTau (Andorfer et al. 2003). Ils ont montré que l'activation de la microglie est fortement corrélée avec la propagation de la tauopathie (Maphis et al. 2015). En parallèle, une étude réalisée sur des souris injectées avec un AAV permettant l'expression de la protéine tau mutée P301L a montré que lorsqu'on déplète la microglie, la propagation de tau est très fortement diminuée. De plus, lorsque la synthèse d'exosomes par la microglie est inhibée dans ce modèle, la propagation est également très impactée (Asai et al. 2015).

Une autre équipe a montré que la microglie est capable d'internaliser la protéine tau soluble et agrégée, *in vitro* et *in vivo* (Bolós et al. 2016). Enfin, l'étude de la microglie issue de patients Alzheimer ou atteints d'autres tauopathies ainsi que de souris transgéniques a mis en évidence la capacité de la microglie à phagocyter la protéine tau extracellulaire, et à la dégrader partiellement sans pour autant inhiber totalement sa capacité de nucléation (pour l'anglais « *seeding* ») (Hopp et al. 2018). Ainsi, la microglie semble jouer un rôle prépondérant dans la propagation de la protéine tau, puisque sa présence potentialise voire est nécessaire et qu'elle est capable d'internaliser puis de sécréter la protéine partiellement dégradée, potentiellement plus toxique, dans le milieu extracellulaire.

Plus tard, une étude clinique réalisée chez 130 patients et basée sur l'analyse TEP de l'amyloïdose, de l'activation microgliale et de la tauopathie a montré une corrélation entre l'activation microgliale, la tauopathie et les stades de Braak. Ainsi l'activation microgliale suivrait également les stades décrits par Braak et Braak et précéderait la survenue de la tauopathie dans ces régions. Ces résultats renforcent l'idée selon laquelle la microglie est un déterminant majeur dans la propagation de la tauopathie (Pascoal et al. 2021).

Ces trois dernières années, de plus en plus d'équipes montrent que la microglie et l'amyloïdose ont un effet synergique sur la propagation de tau. Comme l'illustre le travail de Clayton et collaborateurs, avec l'étude de la propagation de tau dans quatre modèles distincts (Figure 26). Cette équipe a comparé la propagation de la protéine tau après injection d'un AAV permettant l'expression de la protéine tau mutée P301L dans le cortex entorhinal dans un modèle de souris WT avec déplétion ou non de la microglie – grâce à un inhibiteur de CSF1R, et ils ont ensuite réalisé la même étude dans un modèle d'amyloïdose avec des souris APP^{NL-G-F}, à nouveau avec déplétion ou non de la microglie. Ils ont observé que chez les souris WT, la déplétion de la microglie inhibe la sécrétion d'exosomes et diminue drastiquement la propagation de la tauopathie d'un neurone à l'autre. Dans un contexte d'amyloïdose, la propagation de tau est potentialisée par les plaques amyloïdes par rapport aux souris WT, en présence de microglie, et on observe la présence de microglies activées de phénotype DAM. Lorsqu'on déplete la microglie dans ce contexte amyloïde, à nouveau la propagation diminue et la charge amyloïde augmente. Ainsi, ces résultats semblent montrer un rôle essentiel de la microglie pour induire la propagation de la tauopathie, qui peut être potentialisé par la présence de plaques amyloïdes (Clayton et al. 2021).

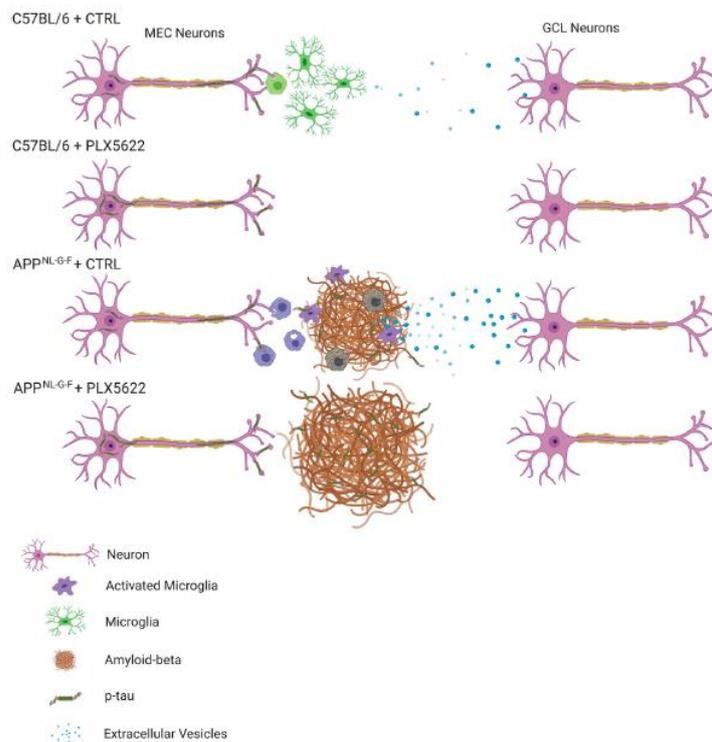


Figure 26. Influence de l'amyloïdose et de l'activation microgliale sur la propagation de la protéine tau. D'après Clayton et al. 2021

Ces études montrent un rôle incontestable de la microglie dans la propagation de la protéine tau. L'hypothèse est que la microglie phagocyte la protéine tau et favorise ainsi sa propagation, et ce phénomène est particulièrement important en présence de dépôts amyloïdes qui sont capables d'activer la microglie. L'une des hypothèses concernant les mécanismes d'activation repose sur le récepteur TREM2, qui peut avoir pour ligand le peptide A β .

De ce fait, de nombreuses équipes se sont intéressées à l'effet de TREM2 sur la propagation dans ce contexte. A l'instar des résultats obtenus lors de l'étude de l'effet de TREM2 sur l'aggravation de la tauopathie, les résultats divergent.

En effet, l'étude de souris transgéniques 5xFAD, exprimant des plaques amyloïdes, après injection d'homogénats de protéine tau humaine issus de cerveaux de patients Alzheimer, montre des résultats contradictoires. Afin d'étudier le rôle de la microglie, ces chercheurs l'ont impactée de trois manières différentes : par sa déplétion, par son inactivation via la déficience en TREM2, et enfin son repeuplement. Dans les trois conditions, dans un contexte d'amyloïdose, on observe une augmentation de la propagation de la tauopathie (Gratuze et al. 2021).

IV. Objectifs de la thèse

Notre laboratoire s'intéresse aux différents acteurs de la pathologie qui pourraient influencer la propagation de la protéine tau. Tout d'abord, notre équipe a développé des modèles rAAV (recombinant adeno associated virus) chez le rat et la souris, permettant une surexpression de la protéine tau humaine après injection stéréotaxique dans la couche CA1 de l'hippocampe. Différents vecteurs viraux ont alors été développés induisant l'expression de différentes formes de la protéine tau : hyperphosphorylée et soluble ou agrégée (d'Orange et al. 2018). L'induction d'une tauopathie dans une région spécifique d'intérêt grâce à l'injection de rAAV est un modèle optimal lorsque l'on s'intéresse à la propagation de la protéine tau. En effet un modèle focal permet l'induction de la pathologie uniquement dans une région prédéfinie. Ainsi, l'observation de la tauopathie dans d'autres régions résulte de sa propagation. Dans ce but, le modèle avec injection des vecteurs viraux dans la couche CA1 de l'hippocampe avait auparavant été utilisé au laboratoire mais ne permettait pas une bonne évaluation de la propagation. En effet, les modèles d'étude de la propagation de la protéine tau basés sur l'injection d'un vecteur viral nécessitent une bonne distinction des neurones afférents transduits et des neurones efférents, dans lesquels la protéine tau se serait propagée, ce qui n'était pas le cas avec le modèle ciblant la couche CA1. Ensuite, notre équipe a développé deux nouveaux modèles d'étude de la propagation de la protéine tau basé sur la méthode de transfert de gènes par vecteurs rAAV ciblant les voies visuelles d'une part, et le gyrus denté d'autre part.

En ce qui concerne le premier modèle, le but a été de cibler les cellules ganglionnaires de la rétine, dont les axones forment le nerf optique et projettent dans différentes aires visuelles cérébrales, et notamment les colliculi supérieurs. Cette répartition anatomique permet de mieux distinguer les neurones transduits par les vecteurs de ceux qui contiennent de la protéine tau suite à sa propagation. Le premier objectif de ce projet de thèse a été de participer à la caractérisation de ce modèle. Nous avons notamment montré que les voies visuelles sont sensibles à la tauopathie et que toutes les régions cérébrales ne permettent pas la propagation de la protéine tau de la même manière (Dawat, Léal et al. 2023).

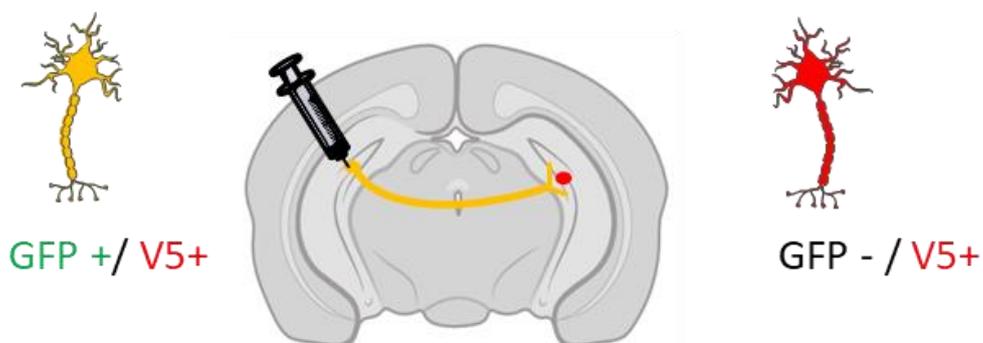
Du fait de l'absence de propagation de la protéine tau chez les souris jeunes, nous avons développé un nouveau modèle basé sur l'injection unilatérale de vecteurs rAAV dans la

couche polymorphique du gyrus denté, ce qui permet ensuite d'étudier la propagation dans le gyrus denté contralatéral grâce aux projections axonales des neurones de la couche polymorphique. Cette couche est en effet en partie composée de neurones appelés cellules moussues qui ont la particularité d'avoir des projections axonales dans le gyrus denté contralatéral. Ainsi, notre but a été d'injecter les vecteurs permettant la surexpression de la protéine tau dans le gyrus denté ipsilatéral, et d'observer la propagation de la protéine dans le gyrus denté contralatéral, et cela dans différents paradigmes expérimentaux. Pour optimiser la distinction des neurones transduits de ceux qui sont touchés par la tauopathie du fait de la propagation de la protéine tau, nous avons raffiné les constructions virales en ajoutant le gène rapporteur GFP, ainsi qu'une étiquette V5 (nommée tag V5 pour la suite du manuscrit) au sein de l'ORF de la protéine tau. Dans la construction finale, la GFP et Tau sont séparés par une séquence P2A qui induit un clivage entre les deux polypeptides lors de la traduction ([Figure 27](#)).



[Figure 27. Vecteur viral composé du gène rapporteur GFP, de la protéine tau portant un tag V5, les deux étant séparés par le peptide P2A.](#)

Ainsi, le peptide de la GFP est exprimé uniquement dans les cellules transduites, tandis que la protéine tau est exprimée dans les neurones transduits, mais pourra être suivie spécifiquement dans les neurones dans lesquelles elle propage grâce au tag V5, et notamment dans les neurones du gyrus denté contralatéral ([Figure 28](#)).



[Figure 28. Schéma d'injection et de propagation](#)

La validation de ce modèle a donc constitué le deuxième objectif de ce projet de thèse. Une fois le modèle validé, nous avons choisi d'étudier différents paramètres connus pour avoir un impact sur la tauopathie, ce qui correspond au troisième objectif de cette thèse.

Tout d'abord grâce aux différents vecteurs rAAV, nous avons étudié l'impact de l'agrégation de la protéine tau sur sa propagation en comparant la propagation des différentes formes de la protéine tau

Ensuite, nous avons évalué l'effet de la déficience en TREM2 sur la propagation de la protéine tau grâce à l'utilisation de souris transgéniques invalidées pour ce gène.

Par ailleurs, il est de plus en plus clair que l'amyloïdose est un acteur essentiel à la progression et l'aggravation de la tauopathie. Il a été montré que l'amyloïdose pouvait moduler la propagation de la protéine tau, en lien avec l'activité microgliale. Nous avons donc appliqué notre modèle de propagation de la protéine tau à un modèle d'amyloïdose grâce à l'utilisation de souris transgéniques APP/PS1dE9.

De ce fait, nous avons utilisé un modèle d'amyloïdose, les souris transgéniques APP/PS1De9, afin d'évaluer l'impact de l'amyloïdose sur la propagation des différentes formes de la protéine tau.

Enfin, l'âge est le principal facteur de risque de développement de la maladie d'Alzheimer, et il a été montré qu'on observait avec l'âge une altération de la capacité phagocytaire de la microglie (Pluvinage et al. 2019). De plus, nos résultats dans le modèle intravitréen ont montré une différence de propagation chez le modèle de souris âgées (Duwat, Léal et al. 2023). Nous avons donc étudié l'influence de l'âge sur la propagation de la protéine tau dans les circuits de l'hippocampe.

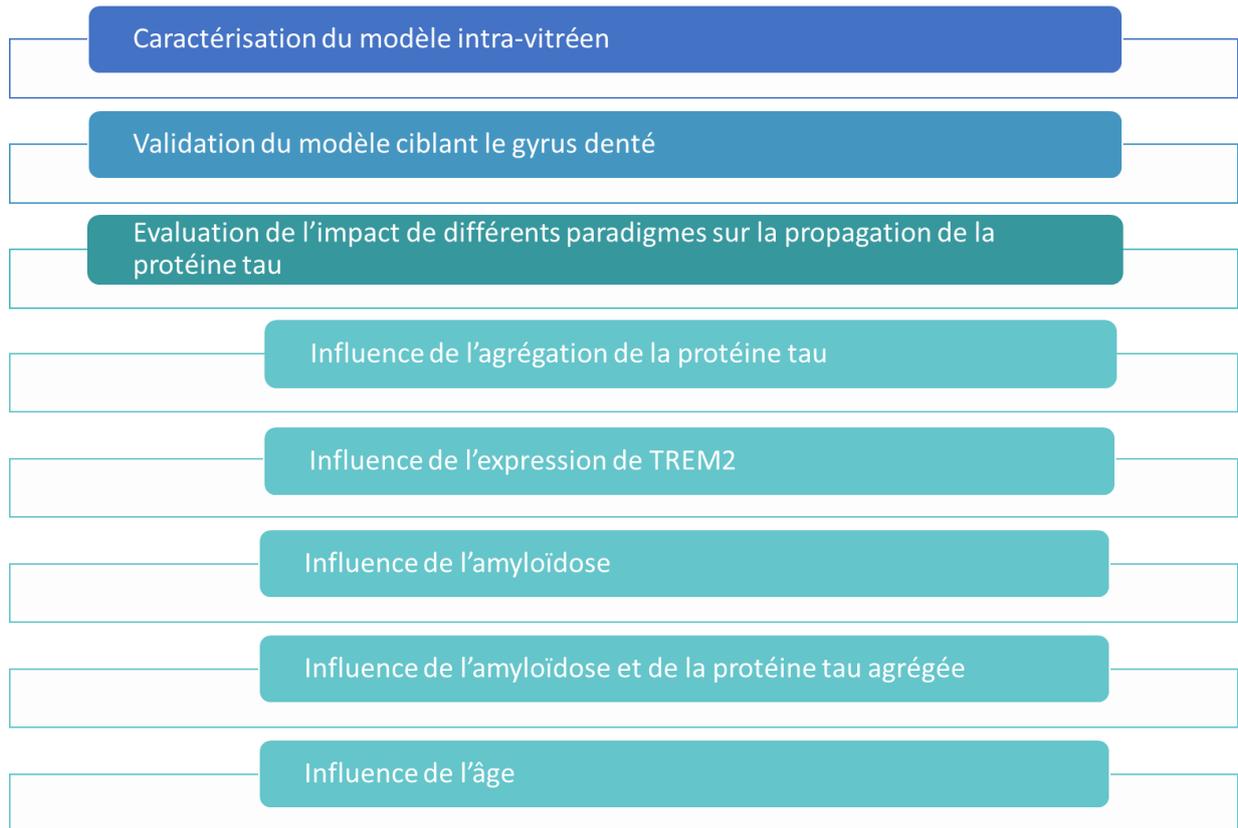


Figure 29. Récapitulatif des différents objectifs du projet

MATERIEL & METHODES

I. Animaux

Pour réaliser ce projet, différentes lignées de souris ont été utilisées en fonction du paradigme à étudier. Le détail du design expérimental sera rappelé au début de la partie résultats de chaque étude. Toutes les souris sont sous fond génétique C57BL/6J.

Pour les études de preuve de concept, de l'influence de l'agrégation de tau sur sa propagation, ainsi que la transparisation et l'étude des vésicules des souris C57BL/6J wild-type ont été injectées à l'âge de 3 ou 4 mois et euthanasiées 1 ou 3 mois post-injection.

En ce qui concerne l'étude de l'influence de TREM2, les trois génotypes ont pu être étudiés (wild-type, hétérozygote, et knock-out (pour l'anglais, expression invalidée) (Turnbull et al. 2006). Les souris ont été injectées à l'âge de 3 mois et sacrifiées 1, 3 et 6 mois post-injection. Enfin, pour l'étude de l'influence de l'amyloïdose, des souris de la lignée APP/PS1dE9 (Minkeviciene et al. 2008) ont été injectées à 15 ou 5 mois et sacrifiées 1 mois post-injection. Les procédures ont été évaluées et approuvées par un comité d'éthique local indépendant et par le Ministère français de l'Education Supérieure et de la Recherche, en conformité avec la réglementation de l'Union Européenne (Directive 2010-63/EEC).

II. Constructions AAV

II.A. Différents vecteurs utilisés

Pour la mise au point du modèle d'étude de la propagation de la tauopathie, un transgène contenant de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' (i) la GFP, (ii) une séquence de clivage P2A, et (iii) le gène Tau 1N4R contenant le Tag V5 (Dujardin, Lécolle, et al. 2014), a été introduit dans le plasmide navette AAV sous contrôle du promoteur SYN2 spécifique des neurones. Afin d'étudier l'influence de l'agrégation sur la propagation, une construction équivalente portant l'allèle mutant Tau^{P301L} ou un transgène dit pro-agrégant contenant, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', (i) un peptide constitué de la région de liaison aux microtubule de la protéine tau portant la mutation pro-agrégante delta-K280, (ii) une séquence de clivage P2A, et (iii) le gène Tau 1N4R contenant le Tag V5 ont également été produites ([Figure 30](#)).



Figure 30. Schéma du vecteur viral SYN2-GFP-P2A-TauWT-V5

Ces constructions ont également été introduites dans le plasmide navette AAV sous contrôle du promoteur PGK (Figure 31).



Figure 31. Schéma du vecteur viral PGK-GFP-P2A-TauWT-V5

Par ailleurs, ces constructions ont été introduites dans un plasmide navette lentiviral sous contrôle du promoteur CBA.

De plus, nous avons également utilisé des vecteurs viraux comprenant uniquement les transgènes Tau (forme 1N4R) dits wild-type, P301L et pro-agrégant, insérés dans le plasmide navette AAV et sous contrôle du promoteur CBA (Figure 32).



Figure 32. Schéma du vecteur viral CBA-TauWT

II.B. Production virale

Pour produire les particules AAV recombinantes, des cellules HEK-293T confluentes à 70% ont été co-transfectées par la technique de précipité au phosphate de calcium avec les différents pAAVs, un plasmide codant le gène *rep* nécessaire à la réplication du génome et la capsid du vecteur viral, et enfin, un plasmide codant les fonctions auxiliaires de l'adénovirus nécessaire à la réplication de l'AAV. Le sérotype 9 a été utilisé pour permettre une transduction efficace

des neurones. Trois jours après transfection les particules virales ont été récoltées dans le milieu de culture et le lysat cellulaire, concentrées et purifiées par ultracentrifugation sur gradient de densité, puis désalées par ultrafiltration tangentielle (cut-off : 100 Kd). Le titre des vecteurs viraux a ensuite été estimé par QPCR sur le génome viral et exprimé en molécules de génome vecteur par ml (Vg/ml).

III. Procédures chirurgicales

Les souris ont été anesthésiées par une injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine (90mg/kg, Imalgène 1000) et de xylazine (5mg/kg, Domitor).

Les injections ont été réalisées unilatéralement au niveau de la couche granulaire du gyrus denté de l'hippocampe dorsal à l'aide d'un cadre stéréotaxique à partir des coordonnées suivantes relatives au bregma : antéro-postérieur : -2,5mm ; latéral : + 1,5mm ; ventral : -2 (par rapport à l'os du crâne, au niveau du point d'injection) ([Figure 33](#)). Il y a donc une seule injection par animal : 2µL de virus, dilués dans une solution de PBS 0,1M contenant 0,001% d'acide pluronique. Une pause de 5 minutes est effectuée après chaque injection. Ces constructions ont été délivrées à l'aide d'une pompe de microdialyse (Stoelting Co., Wood Dale, USA) réglée à 0,2µL/min. Les doses de vecteurs sont exprimées en Vector genome (Vg). A la fin de la procédure la peau est à nouveau désinfectée et agrafée. Les souris sont ensuite réhydratées par injection sous-cutanée de sérum physiologique, placées dans une enceinte thermostatée, et surveillées jusqu'au réveil complet.

conservées dans une solution de stockage (glycogène, glycérol PB 1M et H₂O_d) à -20°C avant utilisation pour l'immunohistochimie.

IV.B. Immunohistochimie (IHC)

Pour réaliser les immunofluorescences, les coupes réalisées au microtome ont été rincées pendant 30 minutes dans 3 bains de PBS 1X à 0,2% de TritonX-100, puis incubées pendant 1h dans une solution de blocage contenant 4,5% de sérum de chèvre pré-immun (NGS) et 0,2% de TritonX-100 dans du PBS puis dans une solution contenant l'anticorps primaire dans une solution de PBS contenant 0,2% de TritonX-100 et 3% de NGS. Le lendemain, les coupes sont rincées 30 minutes dans 3 bains de PBS 1X à 0,2% de TritonX-100 puis incubées avec l'anticorps secondaire pendant 1h à température ambiante. Trois rinçages au PBS et un marquage DAPI sont ensuite effectués avant de monter les lames dans une solution de Mowiol.

Pour les marquages immunohistochimiques, les coupes sont d'abord traitées avec une solution PB1X et 0,3% d'H₂O₂ (Sigma 31642) afin d'inhiber les peroxydases endogènes. Les protocoles d'incubation dans les solutions de blocage, solution d'anticorps primaire et d'un anticorps secondaire biotinylés sont ensuite identiques à celui de l'immunofluorescence. Les coupes sont ensuite rincées dans plusieurs bains de PBS1X 0,2Tx pendant 30 minutes, puis incubées pendant une heure dans une solution streptavidine-peroxydase (Kit ABC, VectorLab SK-6100). Puis les coupes sont de nouveau rincées et l'activité peroxydase est ensuite révélée pendant un temps très court, environ 1 minute, par une solution de substrat chromogène, la DAB (Vector Lab SK-4100). Les coupes sont à nouveau rincées dans du PBS1X avant leur montage. Enfin, nous réalisons une déshydratation des coupes avant le montage de la lamelle : des bains successifs d'éthanol à concentration croissante (de 50° à 95°) sont réalisés, puis deux bains dans une solution pure de xylène sont réalisés. Les lamelles sont ensuite montées avec un milieu de montage type Eukitt (Sigma 03989).

Les références de tous les anticorps utilisés dans les expériences décrites dans ce mémoire, ainsi que leur dilution sont renseignées dans le Tableau 1.

Anticorps	Référence	Dilution
V5	Invitrogen, R96025	1:1000

HT7	Invitrogenetics, 90204	1:1000
Anticorps secondaire souris GAM-AF594	(Invitrogen)	1:500
Anticorps secondaire souris GAM-AF633	ThermoFisher, A11003	1:500
Tau13	BioLegend, 835201	1:1000
AT8	ThermoFisher, MN1020B	1:500
AT100	ThermoFisher, MN1060	1 :4000
PSer422	Abcam, Ab79415	1 :1000
NeuN	Milipore, MAB377	1 :1000
BAM10	Sigma, A3981	1 :2000
Iba1	Wako, 019-19741	1 :1000

Tableau 1. Références et dilutions des anticorps utilisés pour les différentes immunohistochimies.

V. Analyses d'images

V.A. Mesure du niveau de propagation en contralatéral après injection dans le GD

La mesure du niveau de propagation dans le gyrus denté contralatéral a été réalisée par comptage manuel au microscope à épifluorescence (Leica DM6000B). Cette quantification manuelle est faite par screening de toutes les coupes contenant la région de l'hippocampe d'une série marquée par un anticorps spécifique en fonction de l'étude, soit spécifique du tag inséré dans le transgène tau, le marqueur V5, soit spécifique de la protéine tau humaine comme HT7 ou Tau13. La quantification des neurones positifs pour ces marqueurs en contralatéral a été faite dans l'hippocampe en distinguant deux régions : le gyrus denté et la corne d'ammon.

V.B. Mesure du niveau de propagation en ipsilatéral après injection dans le GD

Cette quantification n'a été réalisable que pour les études reposant sur l'injection du vecteur contenant le transgène GFP et le transgène tau couplé à un tag V5 afin de pouvoir distinguer clairement les neurones marqués du fait de la transduction par le vecteur, de ceux qui sont marqués du fait de la propagation de la protéine tau transgénique. Au niveau du site d'injection, la quantification manuelle du nombre de neurones dans lesquelles la protéine tau s'est propagée n'est pas réalisable. En effet la densité des neurones transduits est telle qu'il n'est pas possible de compter manuellement les neurones marqués. Pour pallier à cela, nous avons développé un protocole de quantification de la colocalisation du marquage GFP et V5 dans les neurones en utilisant le module « colocalisation » du logiciel IMARIS 10.0©.

Les acquisitions ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser (Nikon CSU-W1©), au grossissement x20. Ces acquisitions sont des mosaïques de l'hippocampe ipsilatéral avec une pile d'images tous les 1µm sur environ 30µm d'épaisseur permettant d'imager les cellules dans toute l'épaisseur de la coupe.

Ensuite ces acquisitions sont traitées avec le logiciel IMARIS. Tout d'abord, nous traçons des volumes (nommés surface dans le logiciel) des régions d'intérêt (ROI) à analyser, notamment le gyrus denté et la corne d'ammon. Ensuite un masque de ces surfaces est réalisé à partir du marquage V5. Dans le module colocalisation les canaux A et B sont définis, dans notre cas respectivement le masque V5 et le marquage GFP, et un seuillage optimal est déterminé pour ces deux canaux.

Ensuite, un nouveau canal de colocalisation de ces deux marquages est engendré sur la base de la ROI sélectionnée (par exemple le masque V5 du gyrus denté). Ensuite, afin de déterminer un pourcentage du nombre de voxels positifs uniquement pour V5 dans la ROI, la valeur de pourcentage de matériel A (correspondant au canal A défini au préalable) qui colocalise au-dessus du seuillage est retenu. Cette valeur correspond au pourcentage de voxels positifs pour V5 qui sont également positifs pour la GFP. Pour obtenir le pourcentage de voxels positifs uniquement pour V5, cette valeur est soustraite à 100.

V.C. Acquisitions par scanner de lames

Pour les analyses de l'agrégation de la protéine tau, la neurodégénérescence et l'inflammation, les images ont été acquises à l'axioscan (Zeiss Z1) au grossissement x20, puis quantifiées à l'aide du logiciel ImageJ.

Pour l'analyse de la neurodégénérescence et de l'inflammation, une pile d'images tous les 1µm sur toute l'épaisseur a été réalisée. Pour l'analyse du marquage AT100 les acquisitions ont été réalisées sans pile d'images.

V.D. Mesure du niveau d'agrégation

Après marquage des coupes et acquisitions des images, le marquage a ensuite été quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ. Afin de quantifier le niveau d'agrégation de la protéine tau, des ROI de l'hippocampe ont été définies sur l'ensemble des coupes pour chaque animal. L'addition de l'aire des pixels positifs pour le marquage AT100 pour chacune des coupes de chaque animal permet ensuite d'obtenir le niveau d'agrégation de la protéine tau dans l'hippocampe de chaque animal.

V.E. Mesure de la neurodégénérescence

Afin de quantifier le niveau neurodégénérescence induite par la tauopathie différentes ROI ont été définies. Les ROI de l'hippocampe entier, de la couche CA1, du gyrus denté et de la couche polymorphique du gyrus denté ont été tracées sur l'ensemble des coupes pour chaque animal de -2,5mm à +3,5mm par rapport au bregma. L'addition de l'aire des ROI pour chacune des coupes de chaque animal permet ensuite d'obtenir le volume de chaque région pour chaque animal après extrapolation des résultats obtenus avec une seule série de coupe, grâce à la formule ci-dessous.

$$\text{volume} = \sum \text{aires de ROI} \times 30 \times 10 \times 16$$

V.F. Mesure du niveau d'inflammation

Le niveau d'inflammation a été quantifié à l'aide du logiciel ImageJ. Afin de quantifier le niveau d'activation de la microglie, et après définition d'un seuillage afin de s'affranchir de l'éventuel bruit de fond, des ROI de l'hippocampe ont été définies sur l'ensemble des coupes pour

chaque animal. L'addition de l'aire des pixels positifs au marquage Iba1 pour chacune des coupes de chaque animal permet ensuite d'obtenir le niveau d'inflammation dans l'hippocampe de chaque animal.

V.G. Analyse morphologique de la microglie

Les acquisitions ont été réalisées au microscope confocal à balayage laser (Nikon CSU-W1©), au grossissement x63, par mosaïque avec pile d'images sur 30µm d'épaisseur, avec un espacement de 0,3µm entre chaque image de la pile.

Les cellules que nous avons choisi de reconstruire en 3D sont situées dans la couche moléculaire, à la limite de la couche granulaire, car nous observons un amas de fibres neuronales marquées V5+ dans cette région. Environ 10 cellules microgliales par coupe sont analysées, avec deux coupes par animal et 3 animaux par groupe.

Afin de réaliser l'analyse morphométrique de la microglie, nous avons utilisé le logiciel IMARIS®9. Tout d'abord, une surface est créée, correspondant à un volume contenant le marquage Iba1 d'une cellule microgliale. Une mesure du diamètre de la microglie est effectuée. Ensuite, nous utilisons le module Filament qui permet de reconstruire les processus microgliaux. Pour la mesure des « seed points » nous avons fixé la valeur arbitraire de 0,3µm. Ensuite, nous comparons les valeurs de diamètres du soma, de l'index de ramification (qui correspond au ratio du nombre de ramifications de la cellule sur le nombre de branches primaires, la longueur moyenne des filaments, leur volume, ainsi que la distance au soma de la dernière ramification de la cellule. Nous extrayons également les données sholl de la cellule qui permettent de connaître du nombre de ramifications d'une cellule à chaque intersection avec un cercle centré sur le soma de la cellule. Les cercles sont espacés de 1mm les uns des autres. Les données concernant le territoire occupé par les cellules sont obtenues grâce au module convex hull du logiciel IMARIS. Les informations concernant l'aire et le volume sont analysées.

VI. Hybridation in situ

Afin de s'assurer que les neurones positifs pour la protéine tau du côté contralatéral à l'injection sont bien marqués du fait de la propagation de tau et non du fait de la transduction par l'AAV, nous avons réalisé une hybridation in situ avec une sonde spécifique de la séquence

de polyadénylation du génome viral, couplée à une immunohistochimie V5. Pour la réalisation de ce protocole qui repose sur l'utilisation d'une sonde ARN marquée à la digoxygénine (ribosonde), toute la verrerie doit être autoclavée, le matériel plastique doit être stérile et les solutions sont filtrées pour minimiser l'effet des RNases.

Tout d'abord les coupes sont rincées dans des bains de PBS1X, ensuite afin de saturer les sites non spécifiques une pré-hybridation est effectuée par incubation d'une heure à 68°C dans une solution SSC5Xfinal avec 50% formamide déionisé. Pendant ce temps, la sonde d'hybridation est diluée au 1/100 dans un tampon d'hybridation composé de formamide à 50%, de SSC à 5X, d'ARNt levure à 0,2mg/mL, de Tween 20 à 0,1%, de Denhardt's à 1mg/mL et complété avec de l'eau distillée stérile. La sonde d'hybridation est alors dénaturée pendant 5 minutes à 80°C, puis conservée immédiatement sur glace pour éviter son repliement. Les coupes sont alors incubées dans le tampon d'hybridation pendant une nuit à 70°C.

Le lendemain, plusieurs lavages de stringences sont opérés à des concentrations décroissantes de SSC (de 2X à 0,2X) et de formamide (de 50% à 0) ainsi qu'à température décroissante (de 70°C à 60°C). Ensuite deux rinçages sont effectués dans un tampon TNT à pH 7 à température ambiante. Cette solution contient du NaCl à 0,015M, du Tris-HCl à pH 7,5 à 0,1M, du Tween 20 à 0,1% et complétée QSP avec de l'eau distillée stérile.

Ensuite les coupes sont incubées dans une solution de blocage pendant 1 heure à température ambiante. La solution de blocage est composée de tampon TNT pH 7,5 (cf la composition décrite précédemment) ainsi que 0,5% de Blocking Powder et 2% de sérum de chèvre.

Puis, les coupes sont incubées une nuit à 4°C dans une solution similaire à celle du blocage et contenant également l'anticorps anti-digoxygénine DIG-POD au 1/400^{ème}.

Le troisième jour, trois rinçages dans une solution TNT pH 7,5 sont effectués, puis une incubation dans un révélateur TSA-CY3 pendant 10 minutes à température ambiante afin de révéler le marquage spécifique de la sonde d'hybridation. Après trois rinçages en TNT pH 7,5 et trois rinçages en PBS1X, le marquage est fixé en PFA 4% pendant 5 minutes. Enfin, une immunohistochimie en fluorescence classique peut être réalisée. Les références des produits utilisés figurent ci-dessous ([Tableau 2](#)).

Produit	Référence
SSC	Sigma S6546
Formamide	Sigma 47671-2

Tris-HCl	G Biosciences 786-476
Tween 20	Sigma P1379
ARNt de levure	10.109.223.001
Denhart	Sigma D9905
Blocking Powder	Roche, 11096176001
DIG-POD	Roche, 11207733910
TSA-CY3	PerkinElmer, NEL704A001KT

Tableau 2. Références produits pour hybridation in situ

VII. Transcriptomique

Dans le cadre d'un projet du laboratoire réalisé en collaboration avec les équipes de David Blum (UMR-S1172, Université de Lille) et Anne-Laure Boutillier (UMR 7364, Université de Strasbourg), et portant sur l'analyse transcriptomique des astrocytes dans les modèles de tauopathie induite par surexpression de la protéine tau humaine après injection de rAAV, j'ai eu l'opportunité de travailler sur les données transcriptomiques issues de la microglie de ces animaux.

Des souris sauvages ont été réparties en trois groupes : un groupe contrôle injecté par un AAV-GFP, un groupe injecté avec l'AAV-TauWT et un groupe injecté avec l'AAV-TauProAg. Ces rAAV sont sous promoteur CBA ([Figure 32](#)). Les souris ont été injectées à l'âge de 3 mois dans la couche CA1 de l'hippocampe en bilatéral. Elles ont ensuite été euthanasiées 3 mois après injection et les hippocampes gauches et droits de chaque souris ont été prélevés et poolés afin de réaliser le tri cellulaire par billes magnétiques selon le protocole de Miltenyi Biotec MACS.

Pour le tri cellulaire, les animaux ont été perfusés avec du PBS refroidi à 4°C et additionné des inhibiteurs transcriptionnels actinomycine, triptolide, anisomycine (pour rincer les cellules myéloïdes circulantes, et stopper toute activité transcriptionnel), puis les hippocampes ont été disséqués et conservés au froid dans une solution de HBSS (Hank's buffered saline solution). Ensuite les hippocampes ont été repris dans une solution enzymatique à 37°C (kit NBDK Miltenyi), découpés en petits morceaux, incubés à 37°C pendant 15 minutes sous agitation à 3 rpm, et dissociés de manière mécanique à l'aide de trois pipettes pasteur de

diamètre de plus en plus étroit afin d'obtenir une suspension monocellulaire. Le tri cellulaire a ensuite été réalisé en suivant le protocole du fournisseur (Miltenyi Biotec). Brièvement, la myéline a tout d'abord été éliminée grâce à des billes magnétiques spécifiques de la myéline et une filtration a permis de se débarrasser des gros agrégats. Puis les astrocytes et les microglies ont été successivement isolés, à l'aide respectivement de billes magnétiques anti-ACSA2 et anti-CD11b. Immédiatement après tri les ARN totaux ont été isolés à l'aide du kit RNeasy+ microkit (Qiagen). La qualité des ARN a enfin été déterminée à l'aide d'un Bioanalyzer (Agilent). Le RIN (RNA integrity Number) mesuré pour les ARN de cellules microgliales était systématiquement supérieur à 8, un score suffisant pour procéder au séquençage de ces échantillons.

Le séquençage a été réalisé par la plateforme GenomEast (Université de Strasbourg) avec le système de séquençage d'Illumina HiSeq 4000 avec une profondeur de lecture de 50 bases. Les données de séquençage ont ensuite été pré-processées afin de retirer les séquences des adaptateurs, des séquences polyA, et des séquences de faibles qualités (dont le score qualité phred était inférieur à 20). Ensuite, les reads plus petits que 40 bases étaient retirés pour la suite des analyses. Les étapes de trimming des bases de faible qualité et d'évaluation de la qualité des reads ont respectivement été réalisées à l'aide des logiciels cutadapt (version 1.10) et FastQC (version 0.11.5).

Les reads ont ensuite été alignés sur l'assemblage mm10 du génome murin *Mus musculus*, en utilisant le logiciel d'alignement STAR version 2.5.3a. La quantification de l'expression du génome a été réalisée uniquement à partir des gènes ayant été alignés à des annotations connues du génome murin *Mus musculus* en utilisant l'application htseq-count (version 0.6.1p1) avec les annotations Ensembl (version 95) et le mode « union ».

Nous avons ensuite réceptionné les données de transcriptomique sous forme de matrice de comptage pour chaque gène annoté pour chaque échantillon. J'ai ensuite travaillé les données afin de les transformer sous forme de fichier DESEQ2, à l'aide du logiciel R, afin d'analyser les données sur l'application web DEVEA, développée par une doctorante du laboratoire (Riquelme-Perez et al. 2022). Cette application permet d'analyser les données transcriptomiques de plusieurs espèces (Homme, souris, rat...) à partir d'objets DESEQ2 ou de matrices de comptage. Ensuite, il est possible de visualiser les données avec différentes représentations, mais également de réaliser l'analyse d'enrichissement des voies de

signalisation avec les analyses Kegg, GSEA et GO. Je n'ai pas participé aux expériences concernant la récupération des échantillons et le séquençage des ARNm, cette partie de l'expérience a été réalisée en collaboration avec l'équipe de Laurence Boutillier. De ce fait, le séquençage, le pré-processing des données, et l'analyse contrôle qualité du séquençage ont été réalisés par la plateforme de séquençage GenomEast, à Strasbourg.

RESULTATS

Dans cette partie nous aborderons dans un premier temps les résultats obtenus grâce au modèle de surexpression de la protéine tau par injection intravitreuse. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication qui figure en annexes.

Dans une deuxième partie nous détaillerons les résultats obtenus avec le modèle d'étude de la propagation de la protéine tau par transfert de gènes dans le gyrus denté. Cette étude représente la majeure partie du travail effectué lors de cette thèse.

Enfin, nous aborderons les résultats d'une analyse du profil transcriptomique microglial dans notre modèle d'injection de rAAV permettant la surexpression de la protéine tau humaine.

I. PARTIE 1 – Développement d'un modèle de tauopathie induite dans la rétine

I.A. Etude de la propagation de la protéine tau dans un modèle ciblant les cellules ganglionnaires de la rétine – Résultats publiés

Dans le but d'étudier les mécanismes impliqués dans la propagation des espèces toxiques de la protéine tau, notre équipe a développé un modèle innovant basé sur l'induction d'une tauopathie par transfert de gènes en ciblant le circuit des voies visuelles.

En effet, des études précédemment menées au sein de notre laboratoire ont montré que, du fait de la diffusion importante des particules virales dans le parenchyme cérébral, l'injection de vecteurs rAAV dans l'hippocampe ne permet pas une bonne distinction des neurones transduits surexprimant la protéine tau humaine de ceux qui contiennent la protéine suite à la propagation de cette dernière. Le circuit des voies visuelles s'est révélé d'intérêt pour pallier à ces difficultés d'interprétation. En effet, la rétine comporte une couche de neurones appelés les cellules ganglionnaires de la rétine (RGCs), dont les axones forment le nerf optique et projettent à distance dans les aires visuelles cérébrales et notamment dans les colliculi supérieurs. Ainsi, le neurone afférent est spatialement distinct du neurone efférent. De plus, une étude a montré que les voies visuelles sont sensibles à la tauopathie (Gasparini et al. 2011) et également que les voies visuelles peuvent être affectées chez les patients atteints de la MA (S. I. Schmidt et al. 2022). Enfin, une autre étude basée sur ce système a récemment été publiée. Cette étude repose sur l'injection d'homogénats de cerveaux de patients ciblant les RGCs et montre la propension de ce système à développer une tauopathie, en revanche ils n'observent pas de propagation de la protéine tau aux aires visuelles cérébrales (de Fisenne et al. 2022).

Notre modèle se base sur l'injection de vecteurs viraux permettant la surexpression de la protéine tau humaine pathologique dans les RGCs. Pour ce faire nous utilisons le promoteur SNCG qui permet une expression spécifiquement dans ces cellules (Chaffiol et al. 2017). Les transgènes utilisés sont dérivés de la protéine tau humaine, couplée à un tag V5 permettant de suivre spécifiquement la protéine tau exprimée par le vecteur, et pour le vecteur contrôle le transgène de la GFP ([Figure 34](#)).

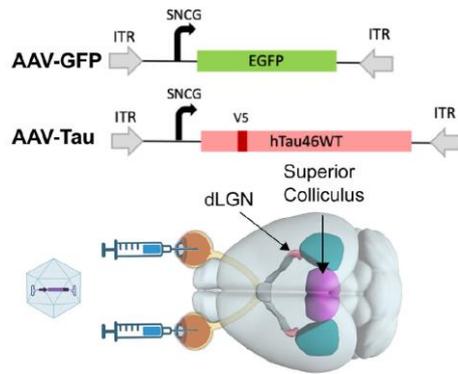


Figure 34. Schématisation du design expérimental.

Schéma représentant les vecteurs viraux utilisés lors de l'étude ainsi que le site d'injection et les sites potentiels de propagation de la protéine tau.

Lors de cette étude nous avons notamment montré que le modèle des voies visuelles est un modèle valide pour étudier la tauopathie. En effet, nous avons observé une hyperphosphorylation, mise en évidence par le marquage P_{Ser422}, de la protéine tau dans les somas des RGCs, dans leurs axones ainsi que dans leurs arborisations terminales (Figure 35). Cette hyperphosphorylation est associée à une neurodégénérescence des RGCs ainsi qu'une activation microgliale dans la rétine et le nerf optique.

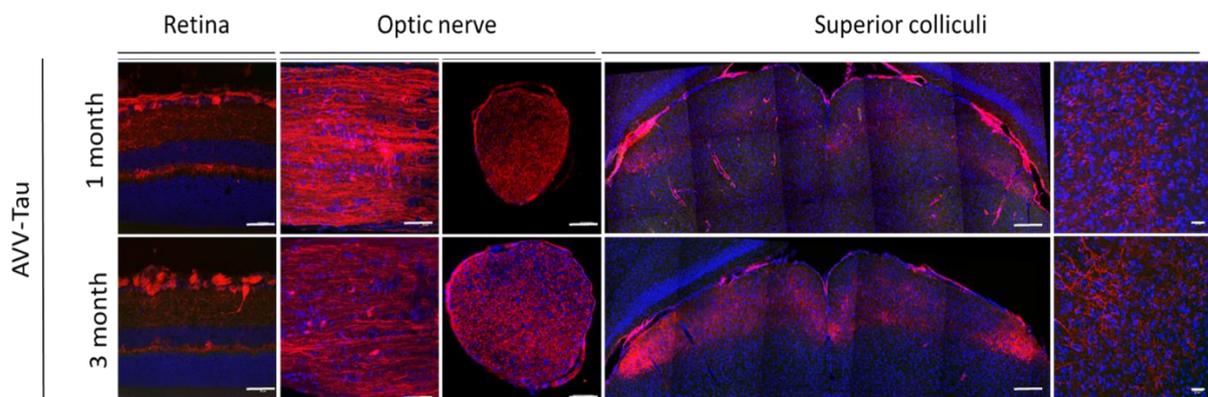


Figure 35. Expression de la protéine tau humaine dans les différentes structures anatomiques des voies visuelles.

Acquisition du marquage V5, spécifique du tag V5 couplé à la protéine tau humaine induite par les injections intra-vitréennes de rAAV, à 1 et 3 mois post-injection. Barre d'échelle : rétine et nerf optique : 50µm ; colliculi supérieurs : 20µm.

Ensuite, afin d'étudier l'impact de la microglie sur la propagation de la protéine tau, nous avons appliqué ce modèle d'étude à des souris déficientes pour le gène *Trem2* qui présentent une diminution de la réactivité microgliale. Chez ces souris, nous avons pu confirmer la diminution d'activation microgliale après injection intravitreuse d'AAV-Tau. Nos expériences suggèrent que cette diminution a un rôle protecteur face à la toxicité induite par la protéine tau pathologique.

Nous avons également étudié l'impact du vieillissement sur ce modèle puisqu'on observe une altération des capacités phagocytaires de la microglie avec l'âge (Pluvinage et al. 2019). Nous avons montré chez les souris âgées (15 mois au moment de l'injection d'AAV-Tau) une aggravation de la pathologie ainsi qu'une réactivité astrocytaire augmentée.

Enfin, le but principal de ces expériences était de développer un modèle d'étude de la propagation de la tauopathie. Malgré l'observation d'une tauopathie caractéristique associée à une neurodégénérescence et une inflammation, nous n'avons pas observé de propagation de la protéine tau dans les neurones efférents dans les colliculi supérieurs, ni chez les souris sauvages âgées de 3 mois au moment de l'injection, ni chez les souris déficientes pour le gène *Trem2* (Figure 36A). En revanche, des corps cellulaires de neurones positifs pour la protéine tau transgénique dans les colliculi supérieurs ont pu être mis en évidence chez les souris âgées de 15 mois (Figure 36B).

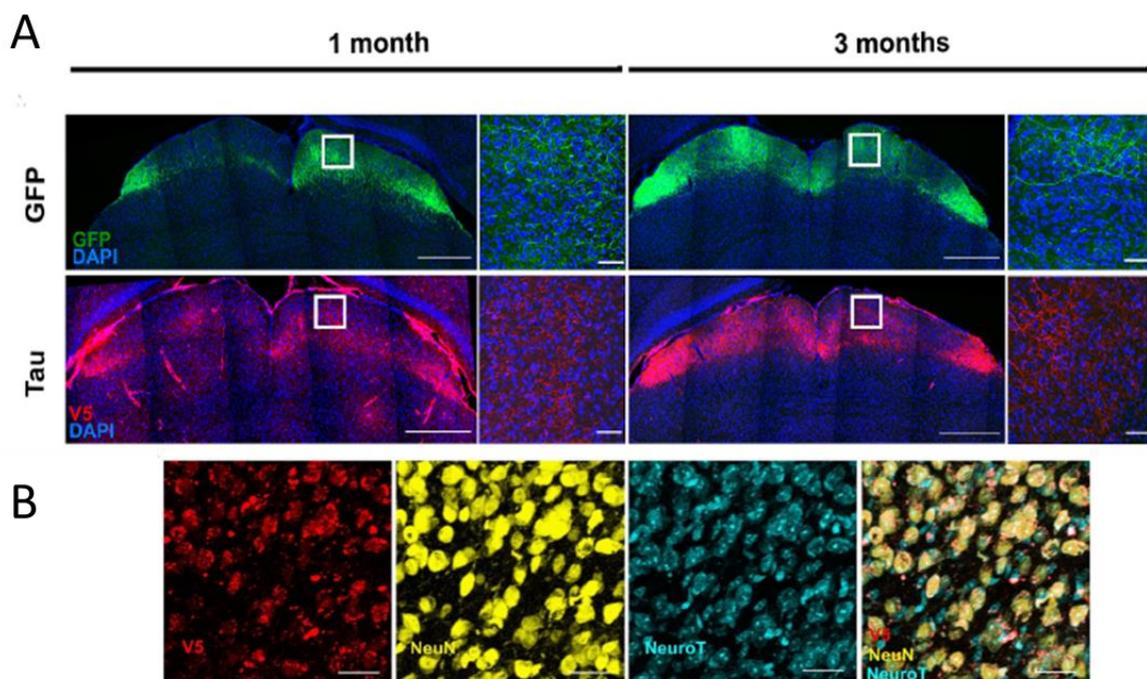


Figure 36. Propagation de la protéine tau dans le modèle d'injections intra-vitréennes.

(A) Acquisition représentant l'expression des transgènes dans les colliculi supérieurs, à 1 et 3 mois post-injection, des animaux injectés dans la rétine avec l'AAV-GFP ou l'AAV-TauV5. (B) Acquisition au confocal du marquage V5 (rouge), NeuN (jaune), Neurotrace (cyan), objectif x20, d'un animal du groupe âgé, montrant la colocalisation du marquage spécifique de la protéine tau avec deux marquages neuronaux. Barre d'échelle : 500µm et 20µm en A, et 50µm en (B).

Ces résultats démontrent que des facteurs liés à l'âge favorisent la propagation de la protéine tau, mais cela rend également ce modèle plus compliqué à exploiter, puisqu'il nécessite de disposer de souris âgées pour être mis en œuvre.

L'article intitulé « *Development of an AAV-based model of tauopathy targeting retinal ganglion cells and the mouse visual pathway to study the role of microglia in Tau pathology* » dans lequel figurent ces résultats se trouve en Annexes, il est paru en avril 2023 dans la revue *Neurobiology of disease*.

I.B. Etude de l'effet de l'altération de la matrice extracellulaire sur la propagation de la protéine tau

L'âge peut, en effet, impacter certains mécanismes cellulaires, par exemple, comme nous l'expliquions précédemment, les fonctions microgliales sont affectées par le vieillissement et on observe une altération de la phagocytose (Pluvinage et al. 2019). Il a également été montré que d'autres structures comme la matrice extracellulaire peuvent être modifiées avec l'âge. De nombreux papiers montrent une altération de la matrice extracellulaire et notamment des réseaux péri-neuronaux (de l'anglais péri-neuronal nets, ou PNN) avec l'âge (Yamada, Ohgomori, et Jinno 2017). Ces études ont notamment montré une modification de la composition des PNNs dans le cortex auditif (Brewton et al. 2016), une restauration de la plasticité et des fonctions cognitives dans des modèles murins de la MA et dans des modèles de vieillissement après modifications des PNNs (Foscarin et al. 2017). Les PNNs sont une forme de matrice extracellulaire, composée de protéoglycanes à chondroïtine-sulfate, qui enveloppe les neurones inhibiteurs et préférentiellement les interneurones à parvalbumine.

Nous avons donc étudié l'effet de l'altération des réseaux péri-neuronaux (PNN) sur la propagation de la protéine tau. Cette étude a fait l'objet du stage de Master 1 d'Enora Hervagault, sous ma supervision, et n'a pas fait partie de la publication.

I.B.1. Design expérimental

Pour tester l'hypothèse de l'implication des PNNs dans la propagation de la protéine tau, nous avons formé 4 groupes expérimentaux : des souris injectées en intravitréen avec un rAAV permettant la surexpression de la protéine tau puis injectées 1 mois après dans le colliculus gauche avec une enzyme permettant l'altération des PNNs, la chondroitinase (ChABC) ou avec une enzyme contrôle, la pénicillinase (Pen) ; et des souris non injectées en intravitréen, donc n'exprimant pas la protéine tau humaine, et injectées au même moment que le groupe expérimental avec la ChABC ou la pénicillinase. Nous avons injecté 18 souris sauvages âgées de 4 mois en intravitréen avec une construction virale permettant la surexpression de la protéine tau humaine sous forme 1N4R. Cette construction, sous promoteur SNCG spécifique des cellules ganglionnaires de la rétine, a la particularité d'être constituée de deux transgènes, la GFP et le transgène TauWT tagué V5, et d'une séquence P2A située entre ces deux transgènes. Cette dernière permet le clivage des deux peptides durant la traduction, permettant l'expression de la GFP uniquement dans les cellules transduites et le suivi spécifique de la protéine tau humaine exprimée par le vecteur grâce au tagV5. Parmi ces 18 souris, 9 ont été injectées par la ChABC et 9 par la pénicillinase dans le colliculus gauche. En ce qui concerne le groupe contrôle, il était constitué de 5 souris non injectées en intravitréen, dont 3 ont reçu la ChABC, et 2 la pénicillinase. Les analyses histologiques ont été réalisées un mois après injection dans les colliculi ([Figure 37](#)).

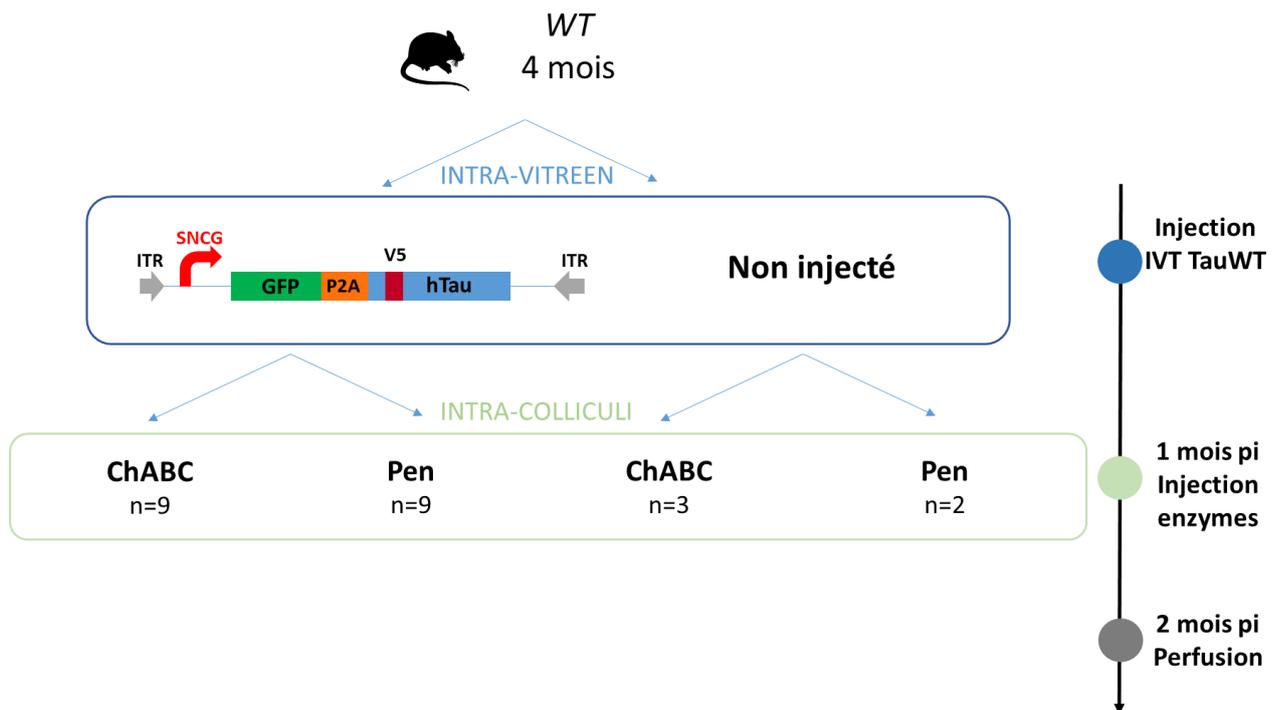


Figure 37. Design expérimental de l'étude de l'influence des PNNs sur la propagation de la protéine tau.

Injection de souris sauvages âgées de 4 mois réparties en 4 groupes : deux groupes (n=9/groupe) injectés en intravitréen avec le rAAV et soit de la chondroïtinase, soit de la pénicilline ; et deux groupes injectés uniquement avec la chondroïtinase (n=3), ou la pénicilline (n=2). Le rAAV est composé du transgène contenant la GFP, tau portant le tag V5, et la séquence P2A, sous promoteur SNCG, avec une dose faible de 5×10^{10} vg. Analyse 2 mois post-injections intravitréennes (pi).

I.B.2. Résultats

Deux mois après injection de l'AAV-TauWT, nous observons l'expression de la protéine tau humaine induite grâce au marquage V5 dans les RGCs ([Figure 38A](#), en fuchsia), ainsi que dans le nerf optique (NO) ([Figure 38B](#), en fuchsia). Les RGCs, dont les axones forment le NO, sont repartis de manière hétérogène dans la rétine et la répartition de leur axone dans le NO est fonction de la localisation du corps cellulaire sur la rétine. Ainsi, la visualisation des NO en tranche permet de s'assurer de l'homogénéité de transduction des RGCs. Ici, le marquage V5 semble homogène dans les différents axones ([Figure 38B](#)).

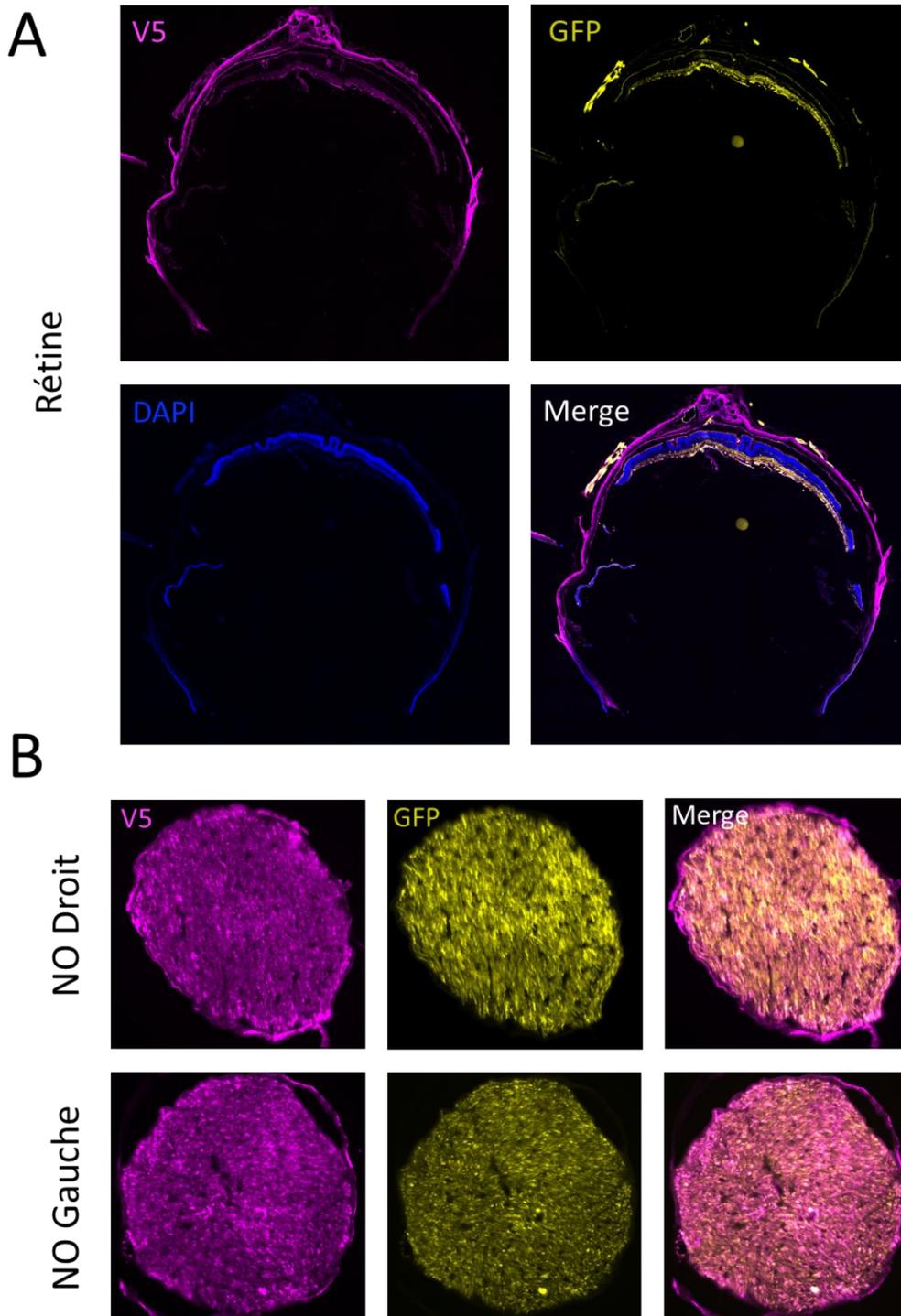
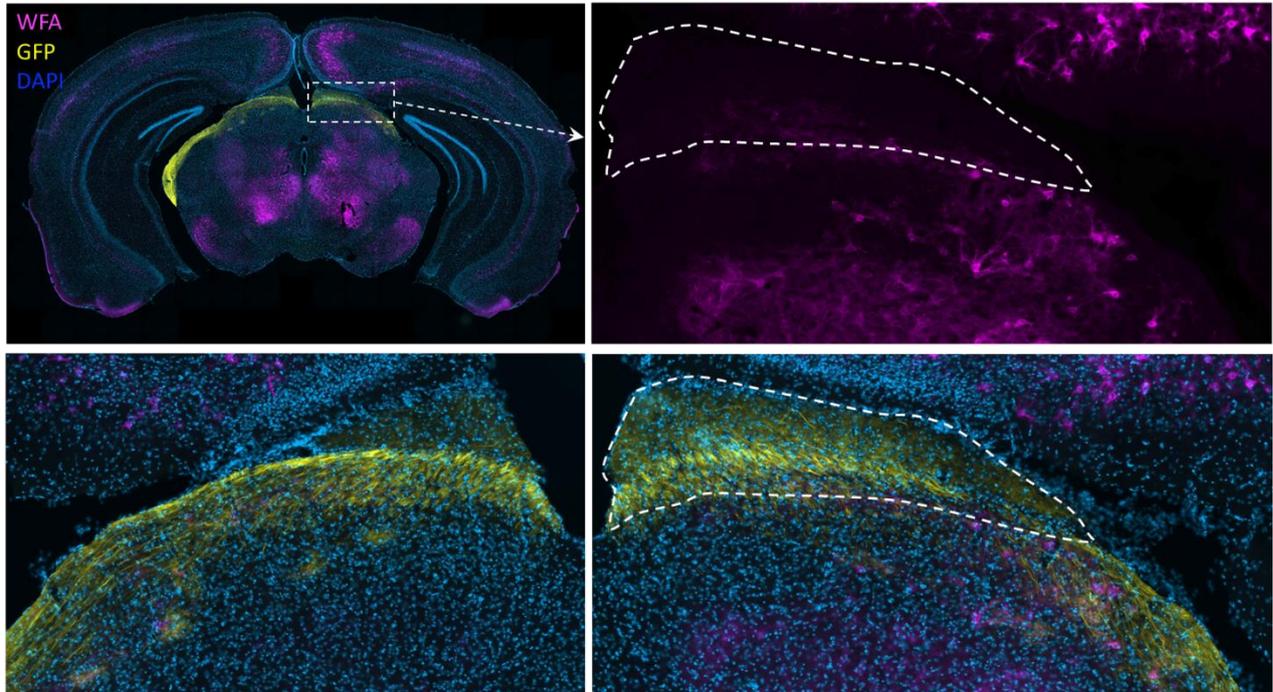


Figure 38. Développement d'une tauopathie dans les RGCs après injection de rAAV permettant la surexpression de la protéine tau humaine.

Acquisitions au microscope à épifluorescence (x20) du marquage V5 (fuchsia), GFP (jaune) et DAPI (bleu) dans la rétine (A), et dans les nerfs optiques (NO) droits et gauches (B).

Un mois après injection de la ChABC dans le colliculus supérieur gauche, une perte quasi-totale des PNNs dans cette région est observée ([Figure 39](#)).

Nous avons également noté que la répartition en PNNs dans le cerveau est très hétérogène, et que les colliculi supérieurs ne sont pas une zone à forte densité de PNNs ([Figure 39](#)).



[Figure 39](#). Altération des PNNs après injection de la ChABC dans le colliculus supérieur gauche. Acquisition au microscope à épifluorescence (x10 en mosaïque, et x20 pour les zooms), du marquage WFA, spécifique des PNNs (fuchsia), GFP (jaune), et DAPI (bleu). Le colliculus supérieur est délimité par les pointillés blancs.

Nous avons ensuite mesuré l'intensité moyenne de marquage GFP rapporté au nombre de pixels marqués, dans les colliculi supérieurs avec une distinction des colliculi gauches et droits ([Figure 40](#)). Cette quantification illustre l'intensité de marquage GFP dans les arborisations terminales des RGCs, au niveau des colliculi supérieurs et permet de rendre compte d'une potentielle différence de transduction entre les groupes et les côtés. Aucune différence de marquage n'a été observée entre les colliculi gauches et droits, ni dans le groupe injecté avec l'AAV-TauWT et la ChABC, ni dans le groupe injecté avec l'AAV-TauWT et la pénicillinase.

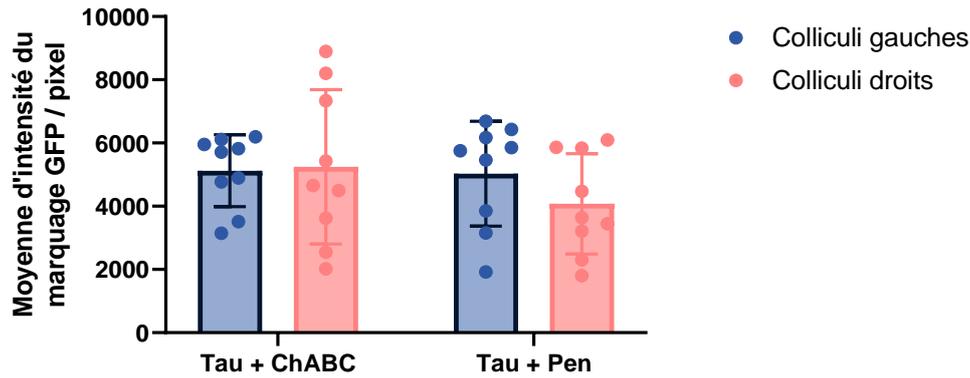


Figure 40. Quantification de l'intensité de marquage GFP dans les arborisations terminales des RGCs, au niveau des colliculi supérieurs.

Mesure de la densité intégrée d'intensité de marquage GFP rapportée au nombre de pixel marqués dans le groupe injecté par l'AAV-TauWT et la ChABC ou par l'AAV-TauWT et la pénicillinase. En rose saumon figurent les résultats des colliculi supérieurs droits, en bleu les gauches. Test statistique : ANOVA à 2 facteurs (groupe et côté) avec Test Sidak de comparaisons multiples. Moyenne \pm SD. n= 9/groupe.

Cette mesure de l'intensité du marquage GFP nous ayant permis de nous assurer de l'absence de différence de transduction entre les groupes et les colliculi, nous avons ensuite mesuré l'intensité de marquage WFA, spécifique des PNNs, dans les colliculi supérieurs gauches et droits. Cette mesure montre une diminution statistiquement significative dans les colliculi gauches par rapport aux colliculi droits dans le groupe injecté avec l'AAV-TauWT et la ChABC. Aucune différence statistique n'est mise en évidence dans les autres groupes. Une tendance similaire semble cependant se dégager dans le groupe de souris injectées uniquement avec la chondroïtinase (Figure 41). Ces résultats montrent une altération des PNNs dans les colliculi gauches suite à l'injection de chondroïtinase. Cette altération n'est pas observée dans les groupes injectés avec la pénicillinase, utilisée comme enzyme contrôle.

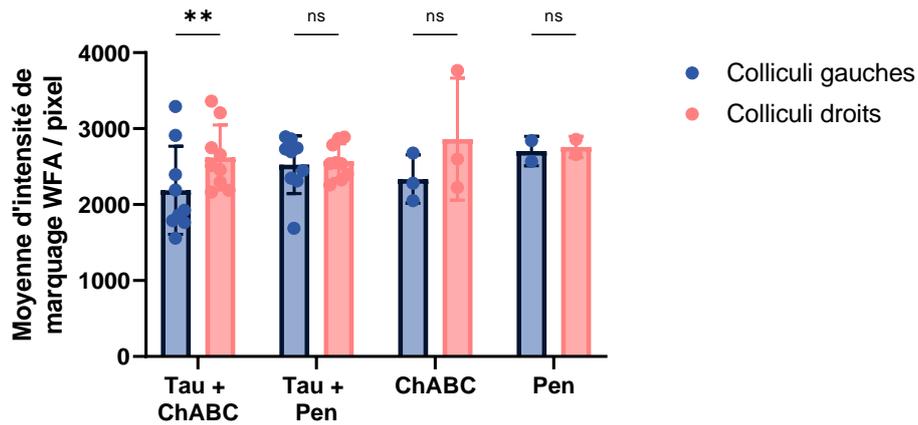


Figure 41. Quantification de l'intensité de marquage WFA dans les colliculi supérieurs.

Mesure de la densité intégrée d'intensité de marquage WFA, spécifique des PNNs, rapportée au nombre de pixel marqués dans le groupe injecté par l'AAV-TauWT et la ChABC, par l'AAV-TauWT et la pénicillinase, par la chondroïtinase ou pénicillinase seule. En rose saumon figurent les résultats des colliculi supérieurs droits, en bleu les gauches. Test statistique : ANOVA à 2 facteurs (groupe et côté) avec Test Sidak de comparaisons multiples, ** $p < 0,01$; ns : non significatif. Moyenne \pm SD. $n = 9$ /groupe pour les groupes injectés avec l'AAV-TauWT, $n = 3$ /groupe pour le groupe injecté avec la ChABC seule, $n = 2$ /groupe pour le groupe injecté avec la pénicillinase seule.

Un screening des colliculi supérieurs de chaque groupe après marquage V5 a été réalisé afin d'étudier la propagation de la protéine tau. Il semblerait que des corps cellulaires de neurones soient marqués par l'anticorps V5 dans les colliculi supérieurs des souris injectées avec l'AAV-TauWT et la chondroïtinase (Figure 42). Cependant, il serait nécessaire de réaliser un co-marquage V5/NeuN voire V5/NeuN/Neurotrace afin de s'assurer de la présence de protéine tau dans ces neurones.

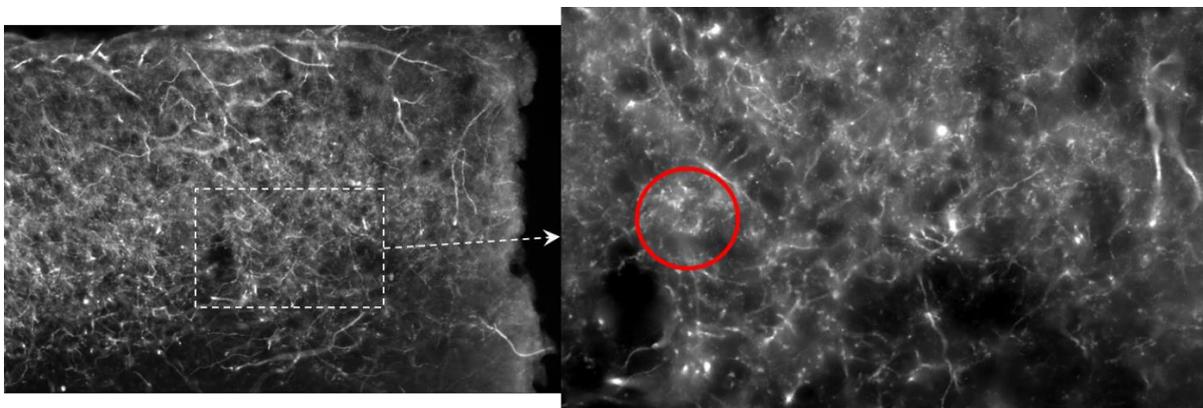


Figure 42. Observation du marquage V5 dans les colliculi supérieurs

Acquisition au microscope à épifluorescence (x10) et zoom (x20) du marquage V5 dans le colliculus supérieur gauche d'un animal injecté avec de la ChABC dans le colliculus gauche, et avec le rAAV TauWT en intravitréen. Entourée en rouge figure une cellule dans laquelle la protéine tau a potentiellement propagé.

I.B.3. Discussion

L'étude de la propagation de la protéine tau grâce à la technique de transfert de gènes, ciblant les voies visuelles, nous a permis de montrer une différence de vulnérabilité des neurones à la tauopathie avec l'âge. En effet nous avons observé une propagation de la protéine tau dans les zones de projections des RGCs, et notamment dans les colliculi supérieurs, uniquement chez les souris âgées de 15 mois. Nous avons alors émis l'hypothèse que cette différence pourrait être due à une vulnérabilité des neurones à la tauopathie différente avec l'âge, ou aux modifications de la matrice extracellulaire induite par le vieillissement qui pourrait la rendre plus perméable à la protéine tau.

Afin de comprendre les résultats obtenus, nous avons mis en place une nouvelle étude basée sur l'hypothèse que la différence de propagation de la protéine tau intervenant avec l'âge est au moins partiellement due à la modification de la matrice extracellulaire. Nos premiers résultats montrent qu'à niveau de transduction égal, démontré par la quantification du marquage GFP, l'injection de ChABC en présence de protéine tau induit une altération des PNNs dans le colliculus gauche, côté d'injection de la ChABC. Cela démontre ainsi une efficacité du modèle d'étude mis en place. L'injection de ChABC seule n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative de marquage spécifique des PNNs entre les colliculi droits et gauches. On retrouve cependant une tendance similaire au groupe injectés avec l'AAV-Tau, et il faut également noter que le nombre de souris dans ce groupe est trop faible pour pouvoir conclure. Enfin, un premier screening des lames a été effectué afin de rechercher des corps cellulaires dans les colliculi marqués V5+, pour le moment nous pouvons soupçonner des cellules positives mais des co-marquages seraient nécessaires pour confirmer nos observations. Par la suite, il serait également intéressant d'étudier la structure de la matrice extracellulaire dans d'autres régions cérébrales et la mettre en regard à la vulnérabilité de ces régions face à la tauopathie, en effet il est envisageable que la protéine tau propage

préférentiellement dans certaines régions au moins en partie du fait de la structure de la matrice extracellulaire.

II. PARTIE 2 - Développement d'un modèle de tauopathie par transfert de gènes ciblant le gyrus denté, pour étudier la propagation des espèces toxiques de la protéine tau

Le modèle d'étude basé sur les voies visuelles n'ayant montré de la propagation que chez les souris âgées, nous avons souhaité développer un nouveau modèle, permettant d'étudier l'influence microgliale sur la propagation de la protéine tau, ciblant le gyrus denté (GD).

Le but de ce projet étant de comprendre les mécanismes impliqués dans la propagation de la protéine tau, et plus particulièrement le rôle que joue la microglie dans ce phénomène, nous avons développé un modèle reposant sur l'injection de rAAV permettant une surexpression de la protéine tau humaine dans le GD et plus particulièrement la couche polymorphique du GD, en se basant sur les résultats obtenus par l'équipe de Schultz et coll qui montre une propagation de la protéine tau d'un gyrus à l'autre (Schultz et al. 2018).

II.A. Preuve de concept du modèle

La couche polymorphique est en partie composée de neurones appelés les cellules moussues qui ont la particularité de projeter dans le gyrus denté contralatéral, permettant ainsi une distinction spatiale des neurones afférents et efférents, ce qui en fait une cible intéressante dans le cas de notre étude. Cette partie concerne la validation de ce modèle pour étudier la propagation de la protéine tau.

II.A.1. Résultats avec construction Syn2- Tau WT/P301L/ProAg

Notre équipe a donc développé un modèle basé sur l'injection de rAAV permettant la surexpression de la protéine tau humaine, ciblant la couche polymorphique du GD. Afin de mieux distinguer la différence entre les neurones transduits, de ceux dans lesquels la protéine tau propage, nous avons développé un nouveau type de construction virale. Cette construction contient deux transgènes : la GFP et l'ADNc de la forme 1N4R de la protéine tau humaine. Ces deux transgènes sont sous le contrôle transcriptionnel du promoteur SYN2

(synapsine 2) afin de transduire préférentiellement les neurones, et ils sont séparés par une séquence P2A qui permet le clivage du peptide en amont de celui en aval lors de la traduction (Figure 30, Paragraphe B.1 du matériels et méthodes). Ce clivage permet d'assurer une expression équivalente des deux transgènes (J. H. Kim et al. 2011). Ainsi, la GFP sera exprimée uniquement dans les cellules transduites par le rAAV, tandis que la protéine tau humaine pourra être suivie grâce à un tag V5 inséré entre les exons 2 et 4 de l'ADNc de tau (Figure 28, Introduction, E.). L'utilisation du tag V5 *in vivo* a été validée chez le rat (Lobbestael et al. 2010) et son insertion dans l'ADNc de tau a été validée précédemment par l'équipe de Luc Buée qui a introduit le transgène tau tagué V5 dans un lentivirus injecté chez le rat (Dujardin, Lécolle, et al. 2014). Nous avons ensuite appliqué cette construction aux différents transgènes tau disponibles au laboratoire : la forme 1N4R sauvage, la version portant la mutation P301L et la version pro-agrégante, qui permettent respectivement l'expression de la protéine tau humaine hyperphosphorylée soluble et toxique, agrégée et toxique, et enfin agrégée mais moins toxique que les deux précédentes (d'Orange et al. 2018 ; Figure 32 Paragraphe B.1 du matériels et méthodes). Pour la suite du manuscrit nous nommerons ces trois transgènes respectivement TauWT, TauP301L et TauProAg.

II.A.1.a) Résultats

Pour valider notre modèle, des souris âgées de 3 mois ont été injectées dans le GD avec le vecteur contenant le transgène TauWT, à deux doses différentes, et les analyses ont été réalisées 1 mois après injection. Tout d'abord nous avons pu valider l'efficacité *in vivo* du rAAV avec la nouvelle construction virale. Nous avons observé une bonne transduction des cellules cibles ainsi que l'expression de la protéine tau humaine (Figure 43, panel de gauche). De plus, dès un mois après injection nous avons observé des neurones du côté contralatéral à l'injection du vecteur, positifs pour le marquage V5, signifiant que ces cellules contiennent la protéine tau humaine induite, taguée V5 (Figure 43, panel de droite ; indiquées par les têtes de flèches blanches). Ces cellules étant positives pour le marquage V5 uniquement, nous pouvons affirmer que leur présence est due à la propagation de la protéine tau.

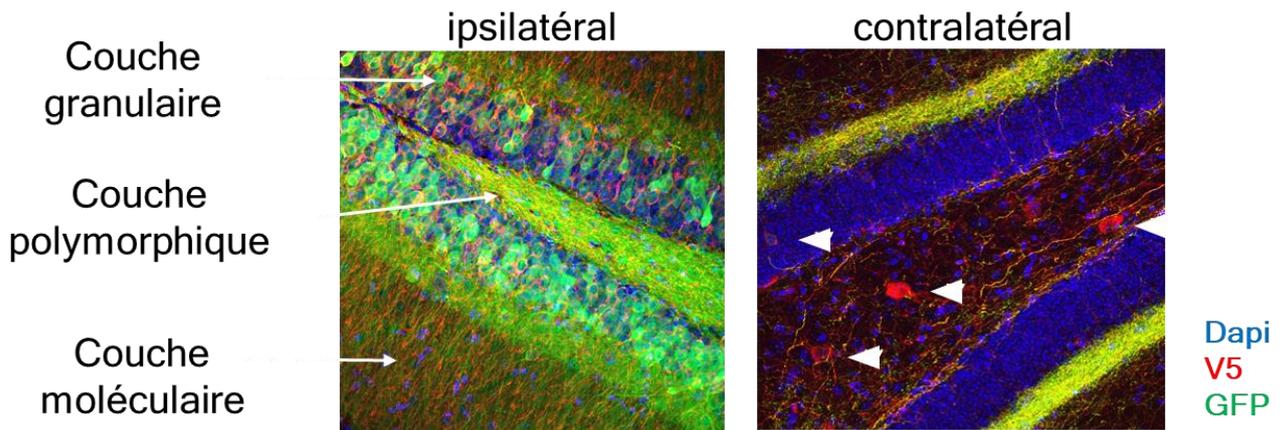


Figure 43. Propagation de la protéine tau humaine dans la couche polymorphique du gyrus denté contralatéral.

Acquisition confocal x20 du marquage V5 permettant de suivre la protéine tau humaine (rouge), GFP (vert) et DAPI (bleu). L'image représente à gauche le côté ipsilatéral au niveau du site d'injection, à droite le côté contralatéral au niveau du site préférentiel de propagation. A gauche, les flèches blanches indiquent les sous-régions du GD ; à droite les pointes de flèches blanches indiquent les neurones dans lesquels la protéine tau humaine s'est propagée. Acquisition d'une souris injectée avec une dose de rAAV de 1×10^{11} vg.

Ce rAAV a été injecté à deux doses différentes afin de choisir la dose optimale pour observer la propagation de la protéine tau : une dose faible de 5×10^{10} vg (dose 1) et une dose forte de 1×10^{11} vg (dose 2). L'étude d'effet-dose montre que plus la dose virale est importante, plus on observe de cellules positives pour V5 du côté contralatéral (Figure 44).

Ces résultats ont été obtenus lors de la thèse de Charlotte Duwat.

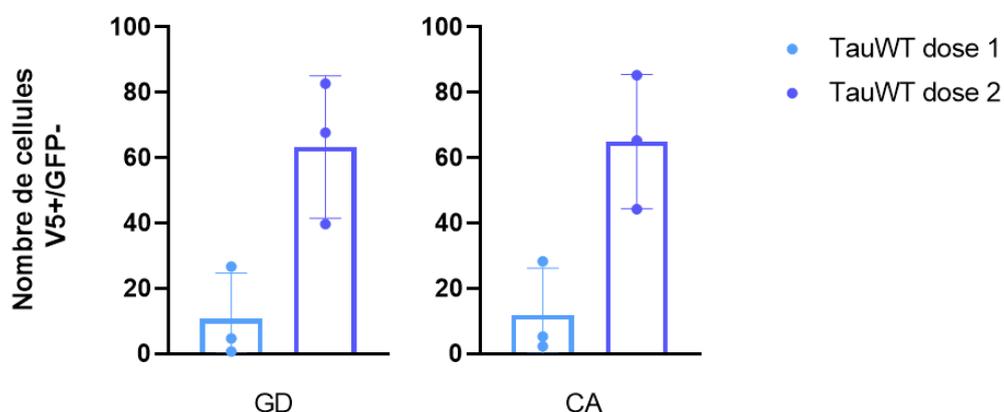


Figure 44. Propagation de la protéine tau dans le GD contralatéral en fonction de la dose de vecteur injectée

Comparaison du nombre de cellules V5+/GFP- dans le gyrus denté contralatéral après injection d'une dose faible (dose 1) ou forte (dose 2) d'AAV-TauWT. Test de Mann-Whitney. Moyenne \pm SD, n=3/groupe.

Par ailleurs, afin de confirmer par un autre moyen que les cellules positives du côté contralatéral l'étaient bien du fait de la propagation de la protéine tau et non pas du fait de la diffusion du vecteur rAAV, nous avons réalisé une hybridation in situ sur les tissus à l'aide d'une sonde spécifique du signal de polyadénylation du génome viral, et d'un co-marquage V5. Aucun marquage spécifique pour la sonde n'a été mis en évidence en contralatéral, confirmant ainsi que ces cellules ne sont pas transduites et que notre modèle est valide pour étudier la propagation de la protéine tau ([Figure 45](#)).

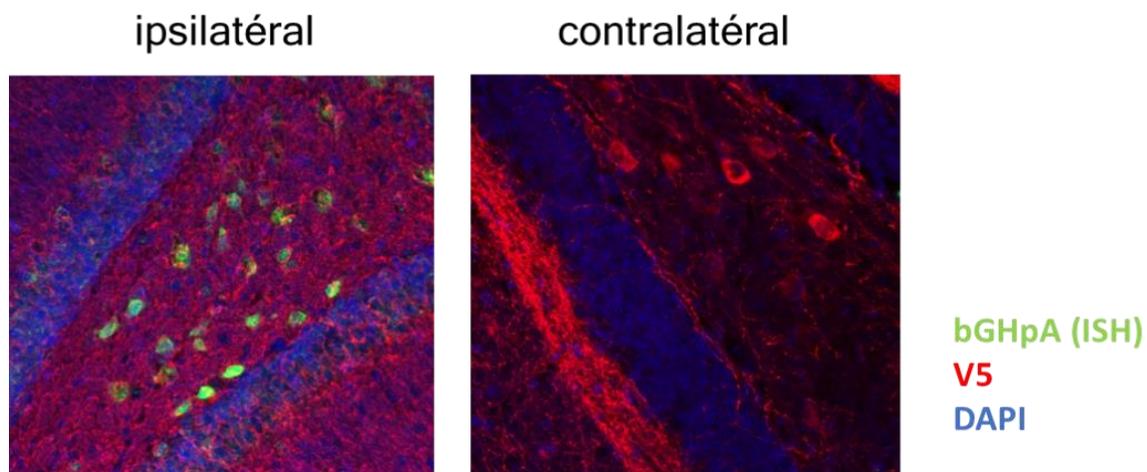


Figure 45. Validation du modèle par hybridation in situ

Acquisition confocal au x20 d'une coupe après hybridation in situ spécifique du génome viral (en vert) associée à un marquage V5 représentatif de la présence de protéine tau humaine (en rouge) et du DAPI (en bleu). Acquisition d'une souris injectée avec une dose de rAAV de 1×10^{11} vg.

Ensuite, afin d'étudier l'influence de l'agrégation de la protéine tau sur sa propagation, nous avons validé le modèle avec les autres versions de tau permettant l'expression d'une protéine tau humaine agrégée, toxique ou non (respectivement Tau-P301L et Tau-ProAg) ([Figure 46](#)).

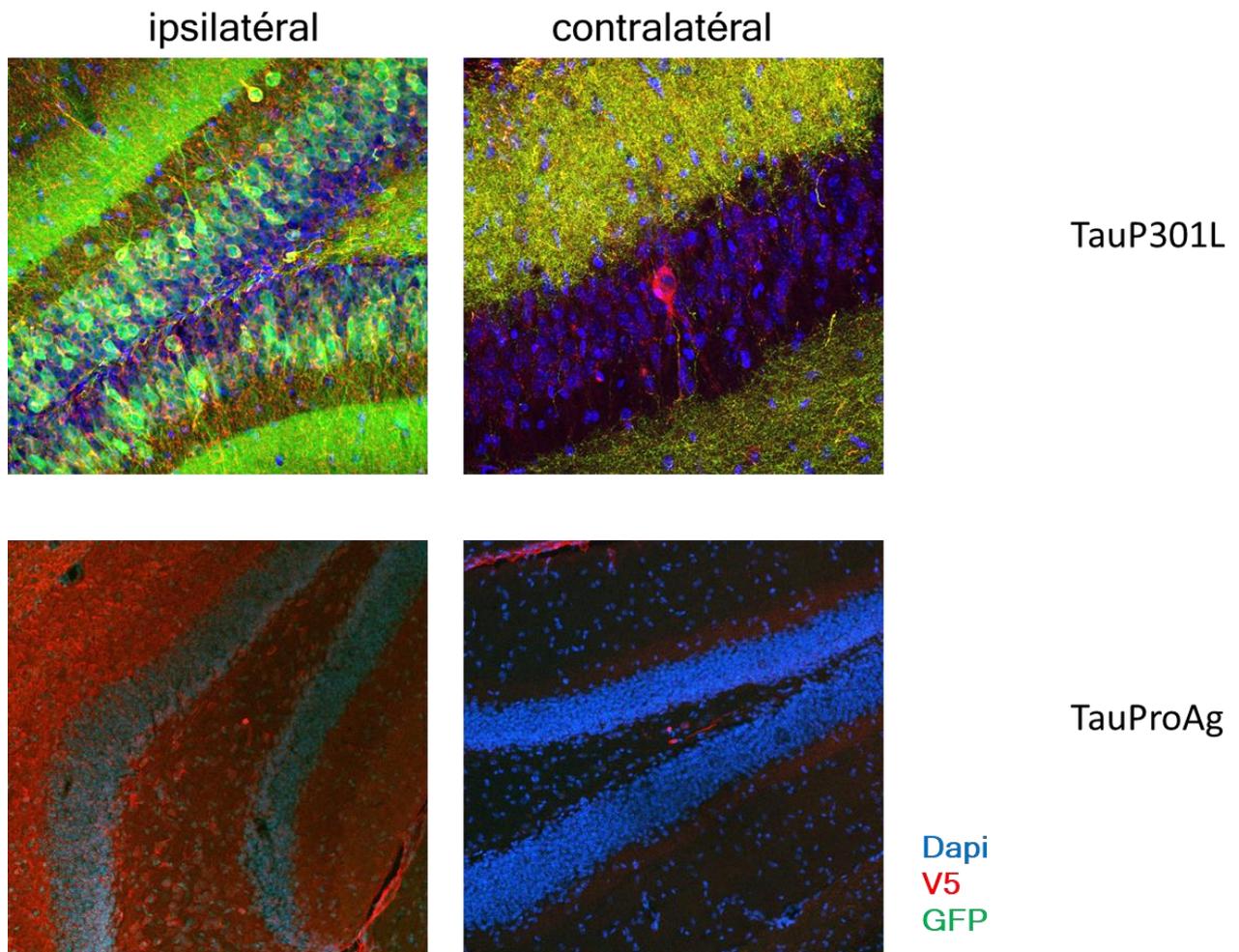


Figure 46. Propagation de la protéine tau humaine dans la couche polymorphique du gyrus denté contralatéral après injection des transgènes tau permettant son agrégation.

Acquisition confocal x20 du marquage V5 (rouge) permettant de suivre la protéine tau humaine. L'image représente à gauche le côté ipsilatéral au niveau du site d'injection, à droite le côté contralatéral au niveau du site préférentiel de propagation.

Bien que nous observions des cellules marquées pour la protéine tau humaine du côté contralatéral avec les différents transgènes tau, le niveau d'agrégation de la protéine tau obtenu avec les constructions TauP301L et TauProAg s'est révélé trop faible pour pouvoir étudier l'impact de ce facteur sur la propagation de la protéine tau (Figure 47).

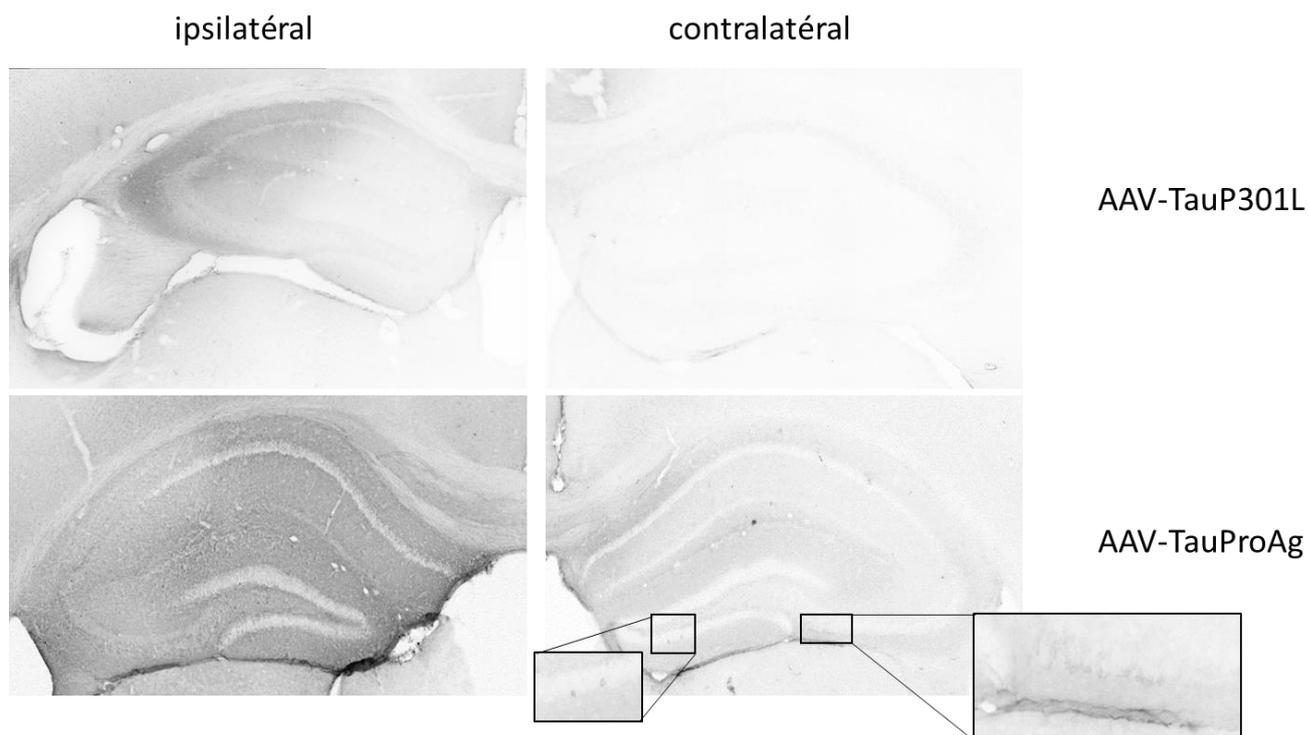


Figure 47. Niveau d'agrégation de la protéine tau après injection des AAV-TauP301L et TauProAg dans le GD chez la souris

Mosaïques au microscope à lumière transmise (x10) du marquage AT100 en ipsilatéral, à gauche, et contralatéral, à droite, dans les groupes injectés avec l'AAV-TauP301L, en haut, et l'AAV-TauProAg, en bas. Zoom au x20 sur des cellules faiblement marquées avec l'anticorps AT100.

II.A.1.b) Discussion

Nous avons développé un modèle ciblant les cellules moussues du gyrus denté après injection de rAAV permettant la surexpression de la protéine tau humaine chez la souris. Les constructions rAAV utilisées sont composées de la GFP et de l'ADNc de la protéine tau humaine taguée V5. Ce modèle a permis :

- D'une part d'obtenir une séparation spatiale des neurones transduits de ceux dans lesquels on s'attend à observer la propagation de la protéine tau,
- D'autre part une distinction de ces neurones visuellement avec la différenciation des neurones transduits qui expriment GFP et V5, contrairement aux neurones dans lesquels la protéine tau se propage qui sont marqués uniquement V5.

Nous avons validé ce modèle après avoir observé une bonne transduction des cellules ciblées, et la protéine tau dans les neurones du gyrus denté contralatéral. Cette observation a été

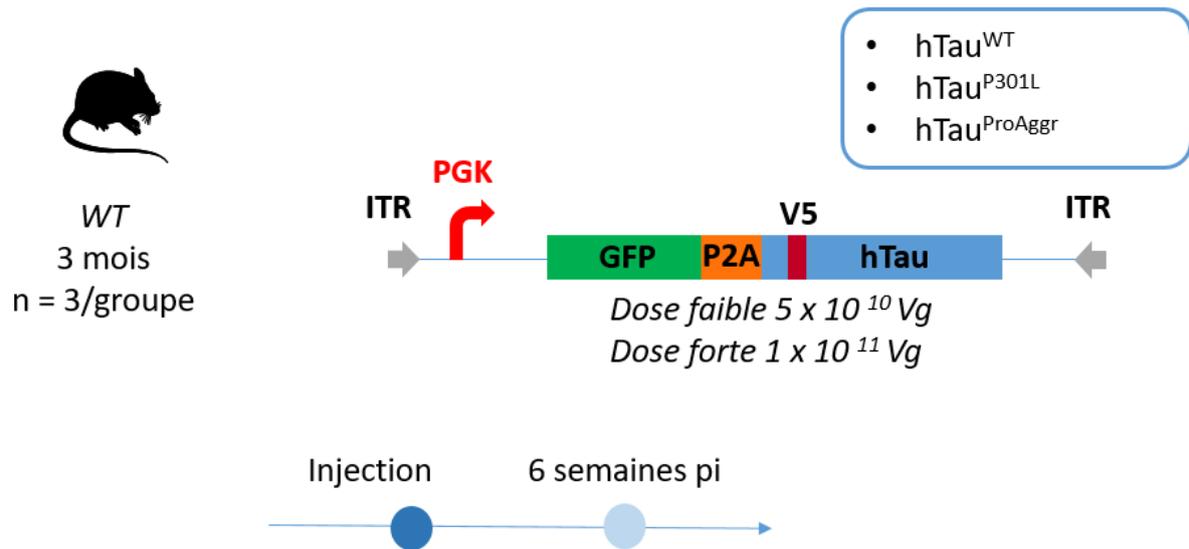
confirmée par hybridation in situ afin de s'assurer l'absence de génome viral en contralatéral, ce qui démontre l'absence de transduction de ces cellules. L'utilisation de deux doses de vecteur viral a permis la mise en évidence d'un effet-dose : plus la dose est importante, plus on observe de propagation de la protéine tau en contralatéral. Enfin, le modèle a été validé après injection des différents transgènes tau permettant l'expression de différentes formes de la protéine tau. La propagation de la protéine est observée avec les trois transgènes utilisés, cependant, seulement une très faible agrégation a été observée avec les transgènes TauP301L et TauProAg. Cela peut s'expliquer par un faible niveau d'expression induit par le promoteur SYN2. En effet le promoteur SYN2 est un promoteur neuronal spécifique dont le niveau d'expression est plus faible que le promoteur ubiquitaire CBA initialement utilisé pour développer ces constructions rAAV. Il est donc possible que l'expression du vecteur ne soit pas suffisante pour induire l'agrégation de la protéine tau. Par ailleurs, ces observations ont été effectuées seulement 1 mois après injection. Bien que nous observions de la propagation dès ce temps, il est possible que cela ne soit pas suffisant pour induire suffisamment d'agrégation. Afin de pallier à cette agrégation insuffisante de la protéine tau avec la construction virale sous promoteur SYN2, nous avons modifié nos rAAV afin d'induire l'expression sous le promoteur PGK ou CBA.

II.A.2. Résultats avec constructions PGK et lentivirus

Nous avons modifié les vecteurs afin d'induire leur expression sous des promoteurs ubiquitaires d'expression plus importante : d'une part dans des rAAV dans lesquels les transgènes ont été placés sous le contrôle transcriptionnel du promoteur PGK, un promoteur ubiquitaire dont l'expression est forte dans les neurones, et d'autre part dans des vecteurs lentiviraux, dont la capacité de packaging plus importante que celle des rAAV nous a permis l'utilisation du promoteur CBA, qui avait été précédemment utilisé au laboratoire dans la version des vecteurs rAAV surexprimant tau sans le gène rapporteur GFP, et qui avait permis l'obtention de niveau d'agrégation important avec les transgènes TauP301L et TauProAg.

II.A.2.a) Utilisation du promoteur PGK

Nous avons modifié nos rAAV afin d'induire l'expression des transgènes sous le promoteur PGK. Ces nouveaux vecteurs ont été injectés chez des souris sauvages âgées de 3 mois à deux doses différentes, une dose faible de 5×10^{10} vg et une dose forte de 1×10^{11} vg. Les analyses ont été réalisées 6 semaines après injection ([Figure 48](#)).



[Figure 48](#). Design expérimental de l'étude basée sur l'injection de rAAV sous promoteur PGK. Injection de souris sauvages âgées de 3 mois avec les rAAV composés du transgène contenant la GFP, tau portant le tag V5, et la séquence P2A, décliné avec les différents transgènes tau, sous contrôle du promoteur PGK, avec une dose faible de 5×10^{10} vg et une dose forte de 1×10^{11} vg. Répartition en 6 groupes avec 3 souris par groupe. Analyse six semaines post-injection (pi).

Malgré le bon niveau de transduction des cellules en ipsilatéral, nous n'avons pas observé de cellules dont le soma était marqué positivement par le marquage V5 en contralatéral. Il semblerait que la construction sous promoteur PGK n'ait pas permis de propagation de la protéine tau en 6 semaines. De la même manière, l'agrégation de la protéine tau est inexistante dans ce modèle ([Figure 49](#)).

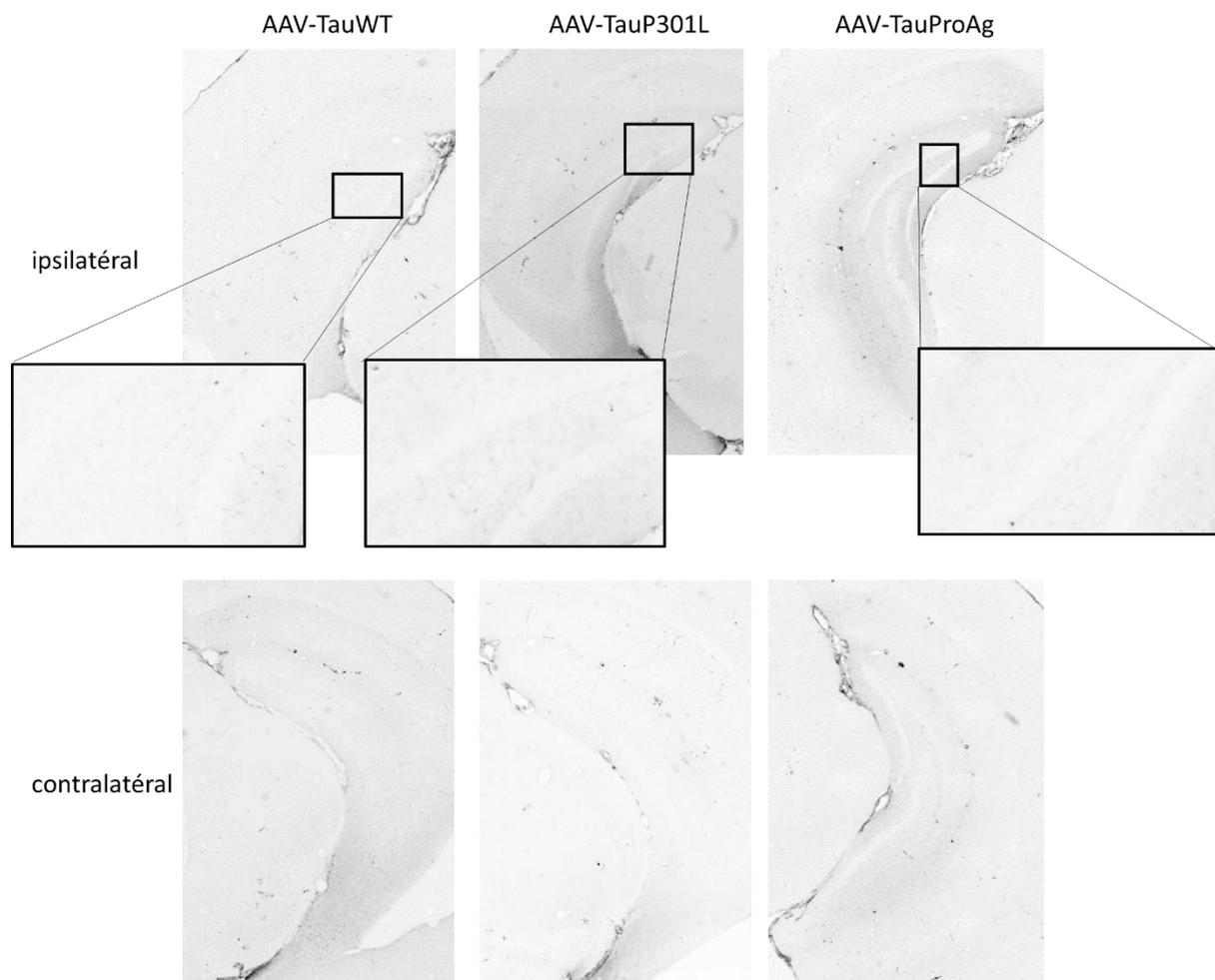


Figure 49. Niveau d'agrégation de la protéine tau après injection des rAAV portant le promoteur PGK.

Mosaïques au microscope à lumière transmise (x10) et zoom (x20) du marquage AT100 en ipsilatéral, en haut, et contralatéral, en bas, dans les groupes injectés avec l'AAV –TauWT à gauche, l'AAV-TauP301L, au milieu, et l'AAV-TauProAg, à droite. Acquisition de souris injectées à la dose de 1×10^{11} Vg.

II.A.2.b) Utilisation des lentivirus

En parallèle, la capacité de packaging d'un rAAV étant trop petite pour contenir à la fois le promoteur CBA (un promoteur ubiquitaire hybride qui présente un niveau d'expression similaire à CMV) et notre transgène contenant la GFP, tau, le tag V5 et la séquence P2A, nous avons inséré nos différents transgènes dans un plasmide navette pour la production de vecteurs lentiviraux - qui possèdent une capacité d'emport 2 fois supérieure aux rAAV - sous contrôle transcriptionnel du promoteur CBA. Les lentivirus ont été injectés à des souris âgées de 3 mois, et deux doses ont été testées : une dose faible correspondant à 150ng de protéine

p24 (une protéine de la nucléocapside classiquement utilisée pour titre ce type de vecteur) et une dose forte de 300ng. Les analyses ont été réalisées un et trois mois après injection (Figure 50).

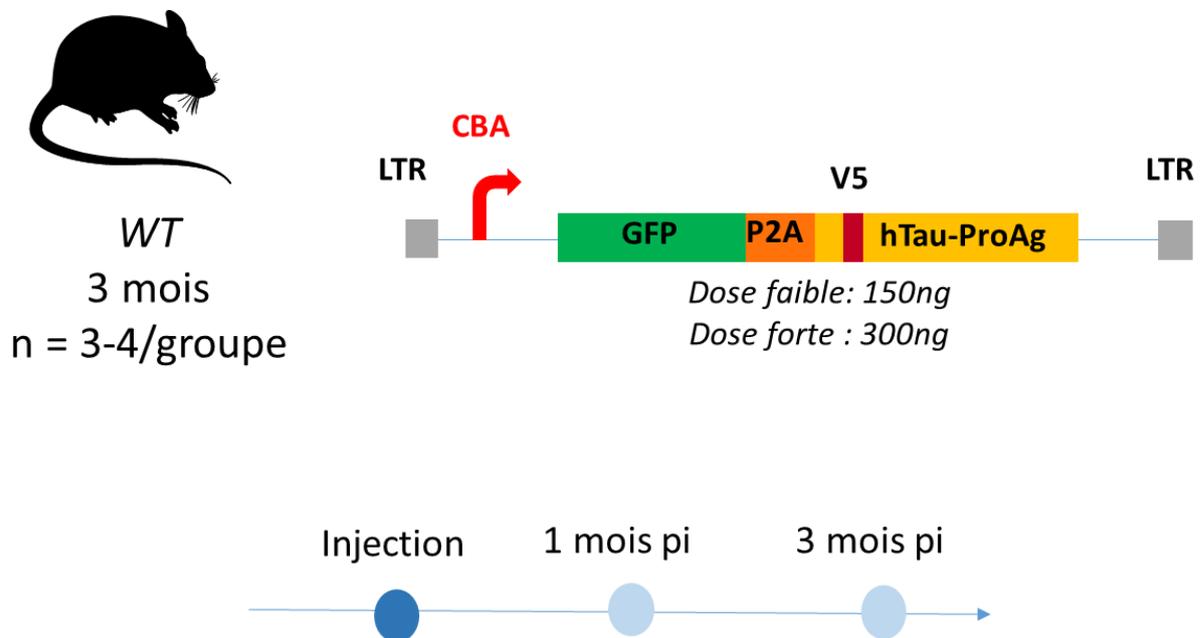


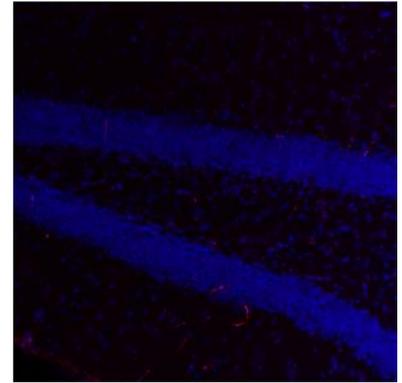
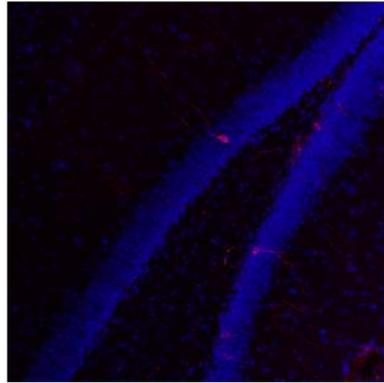
Figure 50. Design expérimental de l'étude reposant sur l'injection de lentivirus
Injection de souris sauvages âgées de 3 mois avec le lentivirus composé du transgène contenant la GFP, TauProAg portant le tag V5, et la séquence P2A, sous contrôle du promoteur CBA, avec une dose faible de 150ng et une dose forte de 300ng. Répartition en 4 groupes de 3 ou 4 souris. Analyse histologique un et trois mois post-injection (pi).

Un mois après injection, à faible dose, nous n'avons observé que très peu de cellules transduites en ipsilatéral, et aucun marquage en contralatéral, illustrant l'absence de propagation dans cette condition. Nous n'avons pas observé non plus d'agrégation de la protéine tau en ipsilatéral. A forte dose, nous observons une meilleure transduction des cellules (Figure 51), ainsi qu'une forte agrégation en ipsilatéral (Figure 52). Cependant nous n'observons toujours pas de propagation en contralatéral dans cette condition (Figure 51). Trois mois après injection, on observe une meilleure transduction, cependant aucune cellule marquée V5+ n'est mise en évidence en contralatéral (Figure 51).

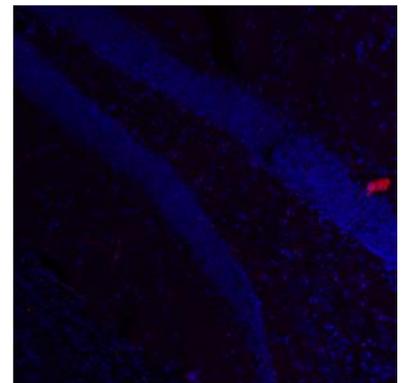
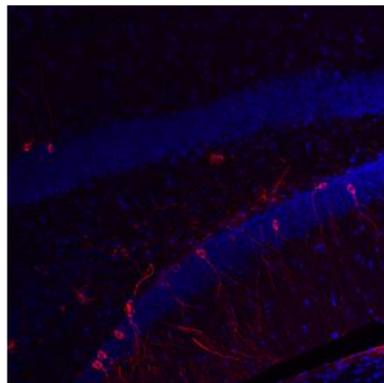
ipsilatéral

contralatéral

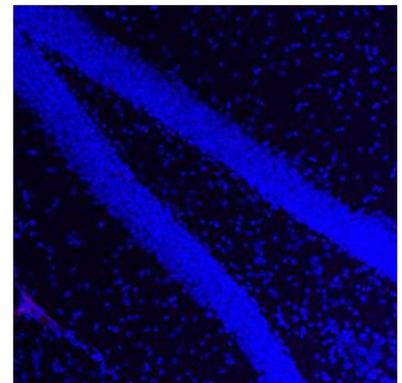
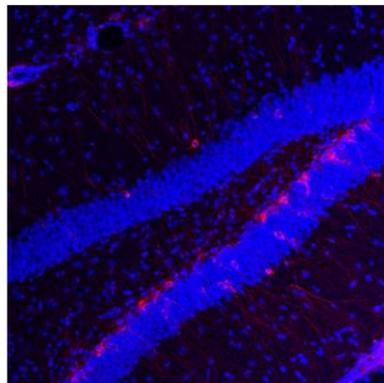
1 mois pi;
Dose
faible



3 mois pi;
Dose
faible



1 mois pi;
Dose forte



3 mois pi;
Dose forte

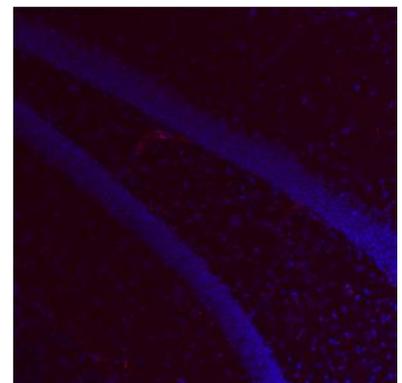
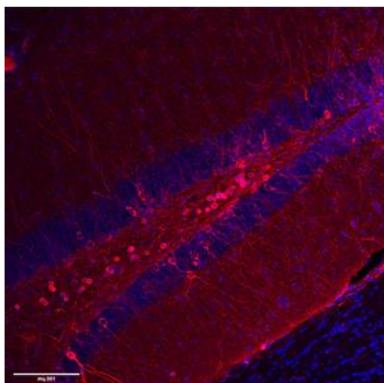


Figure 51. Propagation de la protéine tau en contralatéral après injection des lentivirus.

Acquisition au microscope confocal, objectif x20 du côté ipsilatéral (photos de gauche) et contralatéral (photos de droite) du marquage V5 (rouge) et DAPI (bleu). Barre d'échelle (en blanc en bas à gauche) : 100µm

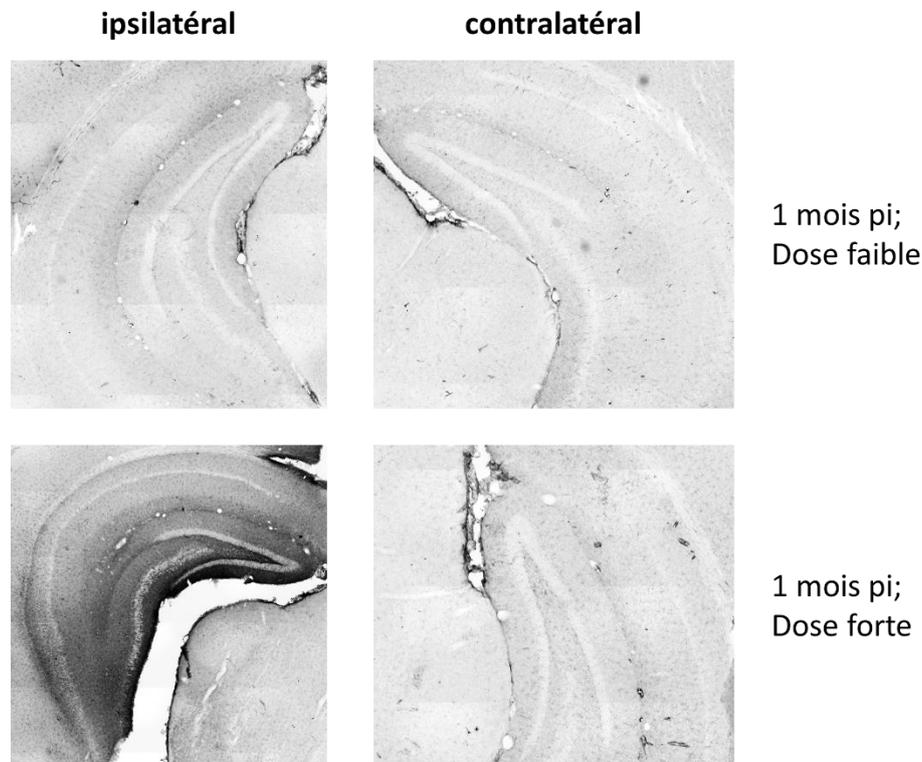


Figure 52. Niveau d'agrégation de la protéine tau après injection des lentivirus.

Mosaïques au microscope à lumière transmise (x20) du marquage AT100, 1 mois après injection des lentivirus, en ipsilatéral, panels de gauche, et contralatéral, panels de droite, dans les groupes injectés avec le lentivirus à faible dose, panels du haut, ou à forte dose, panels du bas.

II.A.2.c) Discussion

Ces études ont été réalisées dans le but de trouver une alternative à la construction virale exprimant les transgènes sous contrôle du promoteur SYN2 qui n'avait pas permis de mettre en évidence suffisamment d'agrégation de la protéine tau pour pouvoir conclure sur son impact sur la propagation de la protéine tau. L'idée de départ était d'augmenter le niveau d'expression du vecteur viral en utilisant un promoteur d'expression plus forte tels que PGK ou CBA qui sont des promoteurs ubiquitaires. Le premier a été inséré dans la cassette d'expression du rAAV. Cette construction n'a pas permis de mettre évidence, ni propagation,

ni agrégation de la protéine tau. Le deuxième, le promoteur CBA, a été inséré dans un vecteur lentiviral. Cette fois-ci nous avons observé un effet-dose : plus la dose de vecteur injectée était importante, plus la transduction était importante. Un bon niveau d'agrégation de la protéine tau en ipsilatéral, avec la forte dose, a également été observé. Cependant, nous n'avons pas observé de propagation de la protéine tau. Il est possible que cela soit dû à la faible transduction, par rapport à celle obtenue avec les rAAV, en effet les lentivirus n'ont permis la transduction que de quelques cellules, dans le GD, contrairement aux rAAV qui permettent la transduction du GD et des couches de l'hippocampe alentours comme la couche CA1. Etant donné que le niveau de transduction semble augmenter avec le temps, un troisième temps plus éloigné permettrait de valider cette hypothèse.

II.B. Etude de l'influence de l'agrégation de la protéine tau sur sa propagation

II.B.1. Design expérimental

N'ayant pas mis en évidence d'alternatives pour étudier la propagation de la protéine tau agrégée avec une construction virale contenant le transgène composé de la GFP, de tau et de la séquence P2A, nous avons décidé de réaliser cette étude avec les constructions virales déjà validées au laboratoire et permettant une agrégation significative de la protéine tau ([Figure 53](#)), c'est à dire les constructions exprimant les transgènes tau sous contrôle du promoteur CBA, et qui ne contiennent pas le gène rapporteur GFP (d'Orange et al. 2018; [Figure 32](#) Paragraphe B.1 du matériels et méthodes).

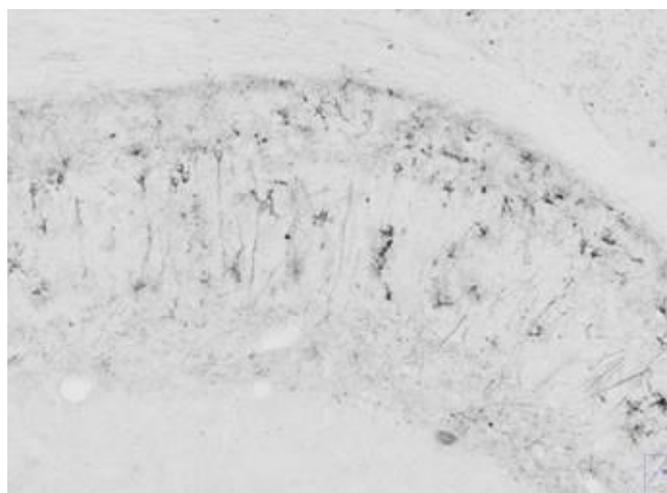


Figure 53. Marquage AT100 obtenu dans la région CA1 de l'hippocampe après injection de l'AAV-TauProAg.

Acquisition au microscope à lumière transmise (x20) du marquage AT100, 3 mois après injection dans la couche CA1 de l'hippocampe du rAAV composé du promoteur CBA et du transgène TauProAg à la dose de 5×10^{10} Vg.

Pour étudier l'impact de l'agrégation de la protéine tau sur sa propagation nous avons injecté des souris sauvages de 3 mois réparties en quatre groupes expérimentaux : un groupe injecté avec le vecteur contrôle AAV-GFP, et trois groupes injectés respectivement avec l'AAV-TauWT, l'AAV-TauP301L, l'AAV-TauProAg, à la dose de 5×10^9 vg. Les analyses *post mortem* ont été réalisées 3 mois après injection du vecteur (Figure 54).

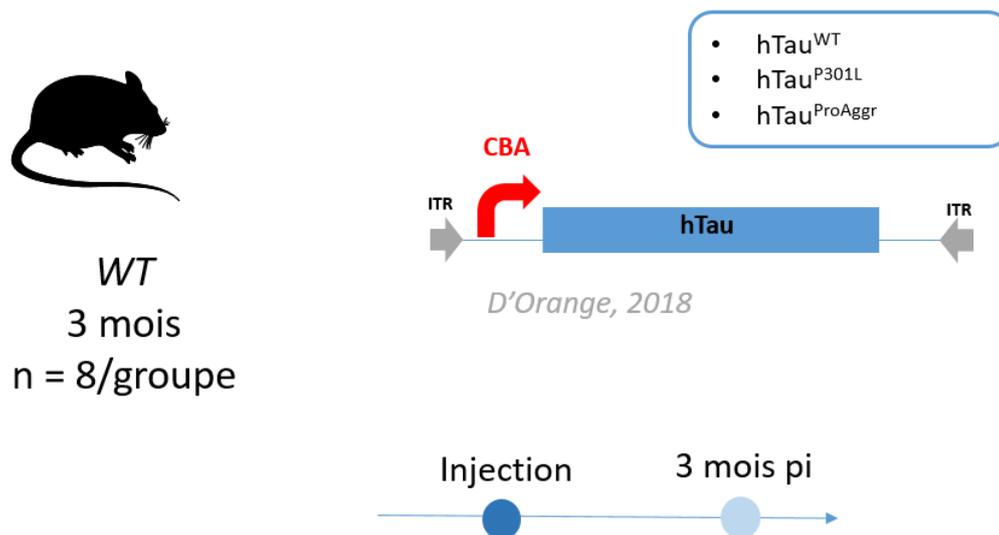


Figure 54. Design expérimental de l'étude de l'influence de l'agrégation de la protéine tau sur sa propagation.

Injection de souris sauvages âgées de 3 mois avec les rAAV contenant les différents transgènes tau. Répartition en 4 groupes dont un groupe contrôle injecté avec un AAV-GFP, avec 8 souris par groupe. Analyse histologique trois mois post-injection (pi).

II.B.2. Résultats

Après avoir vérifié que les cellules du GD ipsilatéral étaient bien transduites, la quantification du nombre de cellules positives pour la protéine tau dans l'hippocampe contralatéral a été réalisée. Cette quantification a été faite manuellement, par comptage des cellules au

microscope à épifluorescence. A défaut de pouvoir faire cette quantification grâce au marquage V5, nous avons quantifié le marquage HT7 qui est spécifique de la protéine tau humaine, et qui permet de détecter toutes les formes de la protéine (normale, hyperphosphorylée et agrégée). Lors de la quantification, nous avons distingué les régions du GD, et les trois sous-régions de la corne d'ammon (CA1, 2 et 3). La protéine tau propage dans le GD quelle que soit la condition, mais nous observons significativement plus de propagation dans le groupe de souris injectées avec l'AAV-TauProAg (Test de Kruskal-Wallis et comparaisons multiples de Dunn, $n = 8/\text{groupe}$, $*p < 0,05$, [Figure 55B](#)). Bien que le résultat n'atteigne pas le seuil de significativité statistique, la même tendance est observée dans le groupe injecté avec l'AAV-TauP301L ([Figure 55B](#)). Des résultats similaires sont observés dans les régions CA1, 2 et 3 et nous pouvons également noter qu'il y a plus de cellules positives dans le cumul de ces sous-régions que dans le GD. Par ailleurs, bien que chaque sous-région de la corne d'ammon n'aient pas été distinguées lors de la quantification, nous avons visuellement observé plus de cellules positives dans la région CA3 que dans les autres sous-régions de l'hippocampe (pointes de flèches rouges ; [Figure 55A](#)). De plus, nous avons observé des astrocytes marqués par l'anticorps HT7 dans les 3 groupes étudiés (pointes de flèches bleues ; [Figure 55A](#)). Des astrocytes tau positifs avaient déjà été mis en évidence dans une étude menée au laboratoire après injection bilatérale, dans la couche CA1 de l'hippocampe du rAAV permettant la surexpression de la protéine tau agrégée (Maté de Gérando et al. 2021).

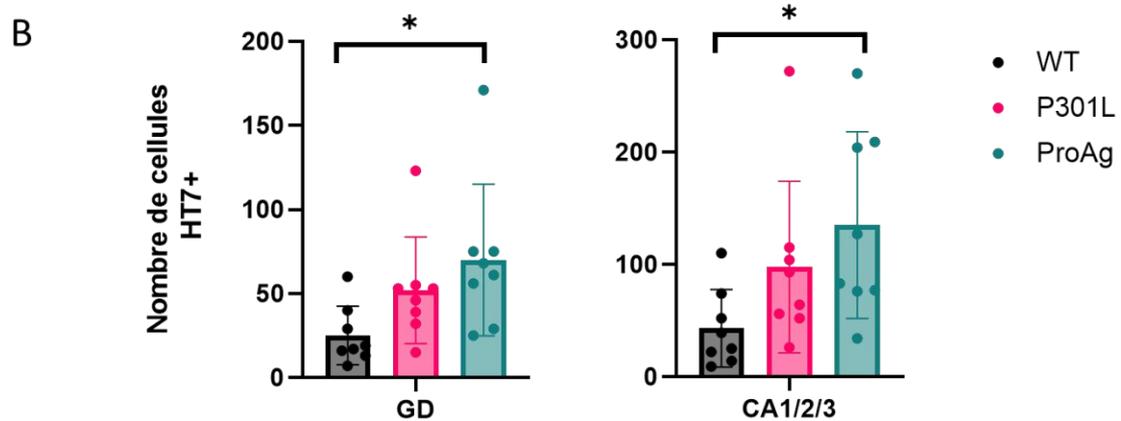
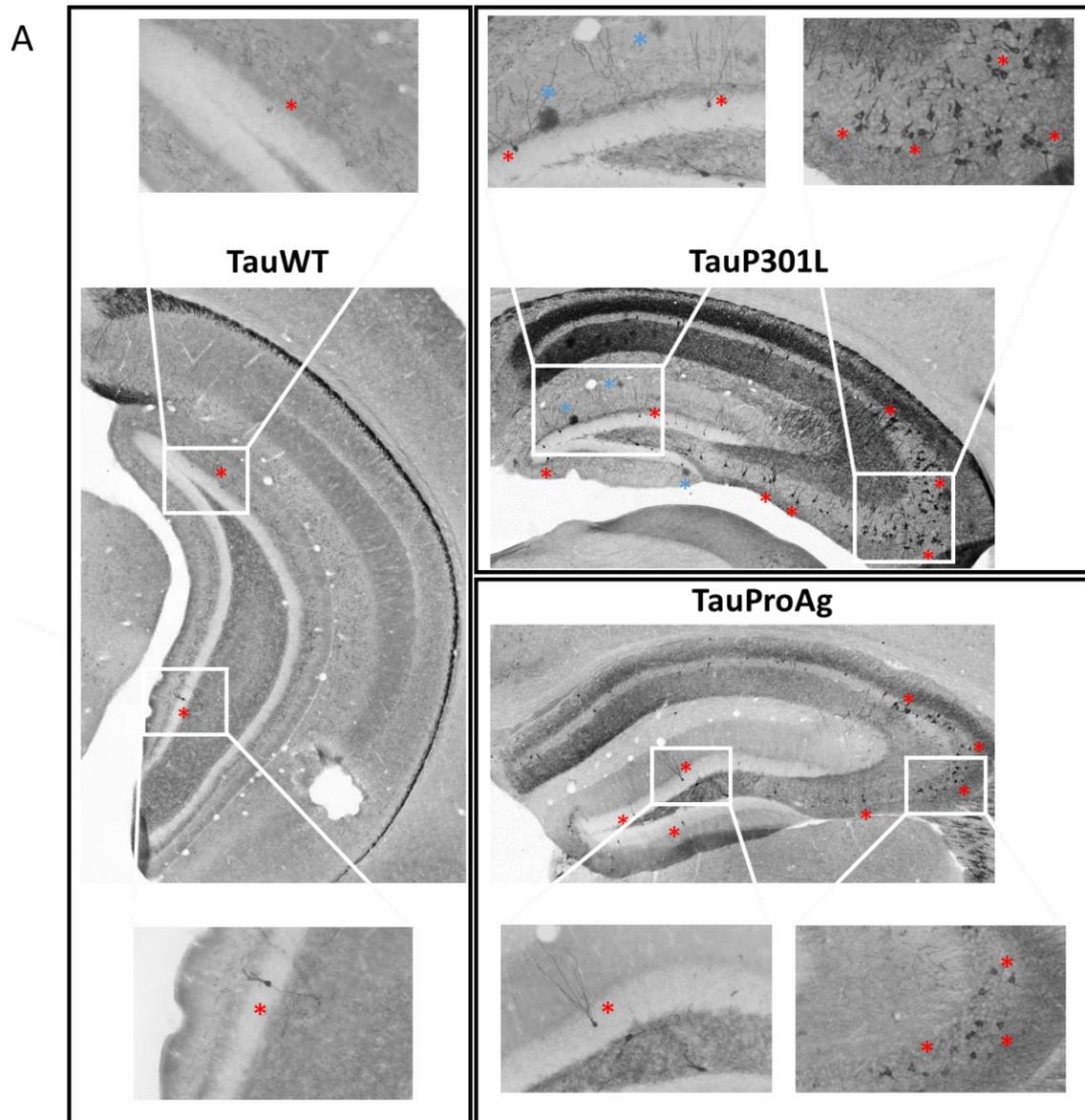


Figure 55. Propagation de la protéine tau humaine dans le gyrus denté et les régions CA1,2 et 3 de l'hippocampe contralatéral à l'injection du vecteur rAAV.

(A) Acquisition au microscope à lumière transmise (x10) et zoom (x20) de la propagation de la protéine tau dans l'hippocampe contralatéral pour chaque condition expérimentale. Les

étoiles rouges indiquent quelques cellules positives pour le marquage HT7, les étoiles bleues indiquent quelques astrocytes positifs pour le marquage HT7. Nous observons les cellules dans lesquelles la protéine tau propage mais également les fibres afférentes des neurones transduits en ipsilatéral, qui projettent en contralatéral. (B) Quantification du nombre de cellules HT7+ dans le GD et les régions CA1, 2 et 3 de l'hippocampe contralatéral. Test statistique : Kruskal Wallis, avec test Dunn de comparaisons multiples, * $p < 0,05$. Moyenne \pm SD. $n = 8$ /groupe.

Etant donné l'absence du gène rapporteur GFP dans les vecteurs tau qui aurait permis de distinguer de manière non-équivoque les neurones transduits de ceux dans lesquels la protéine tau transgénique s'est propagée, nous avons réalisé une hybridation *in situ* afin de nous assurer que les cellules comptées du côté contralatéral n'étaient effectivement pas transduites par les vecteurs. Comme le montre la [Figure 56](#), la sonde spécifique pour la séquence de polyadénylation du génome viral est détectée du côté ipsilatéral mais pas du côté contralatéral ([Figure 56](#), en jaune). Cette expérience confirme donc l'absence de diffusion virale du côté contralatéral et confirme que les cellules marquées par l'anticorps spécifique de la protéine tau humaine (ici HT7) sont des cellules receveuses de la protéine tau qui s'est propagée depuis des neurones transduits.

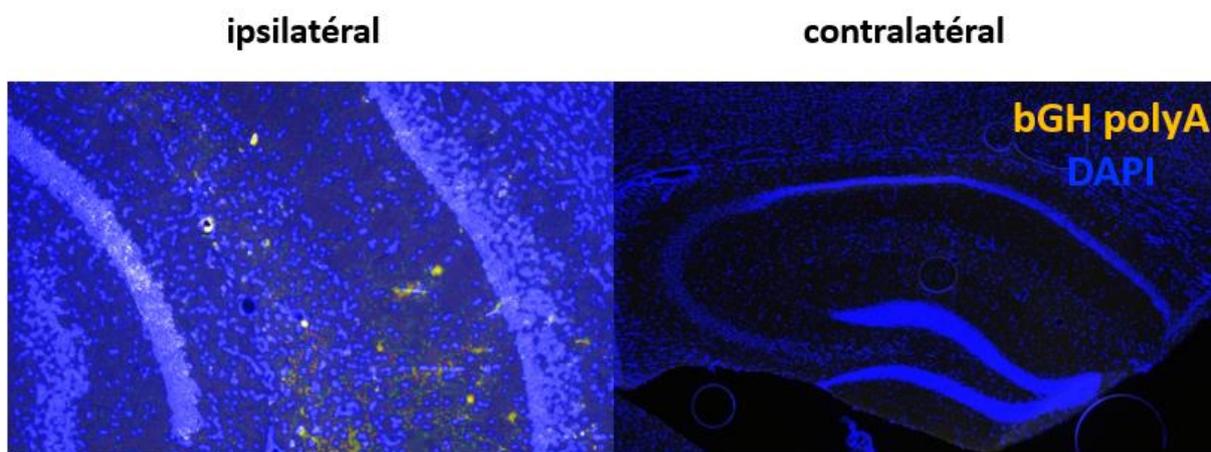
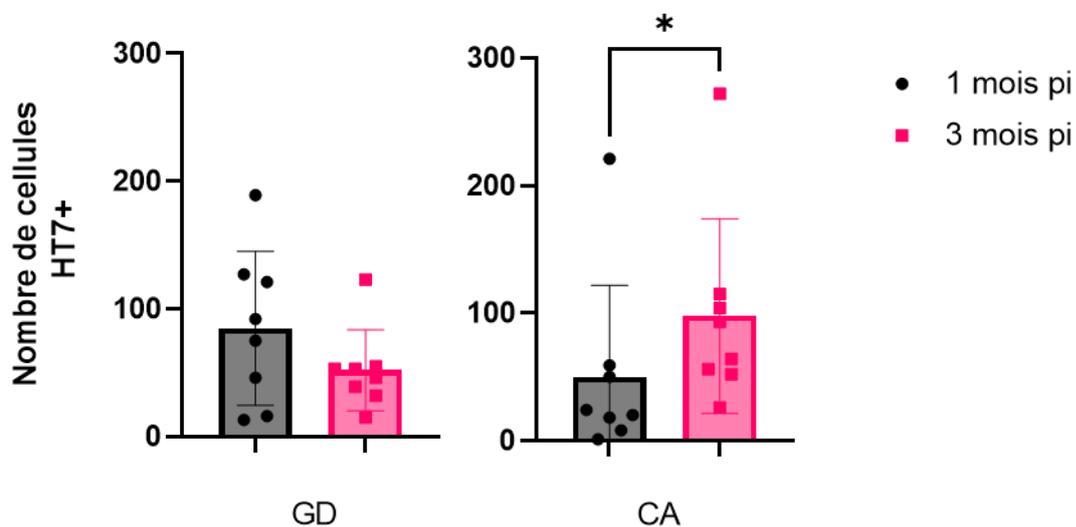


Figure 56. Hybridation in situ

Acquisition au microscope confocal (x20) d'une coupe après hybridation in situ spécifique du génome viral (en jaune) associée à un marquage DAPI (en bleu). L'hippocampe ipsilatéral, à gauche et contralatéral, à droite.

Etant donné le résultat obtenu dans le groupe injecté avec l'AAV-TauP301L, qui montre une tendance à l'augmentation de la propagation de la protéine tau avec la forme mutante

exprimée par ce vecteur rAAV, c'est-à-dire une forme agrégée et neurotoxique (D'Orange et al. 2018), nous avons réalisé une étude à 1 mois post-injection afin de nous assurer que le nombre de cellules comptées dans ce groupe n'était pas minoré par suite d'une mort plus importante des neurones transduits induite par la mutation P301L. Ainsi nous avons pu comparer le nombre de cellules HT7+ dans le GD et les régions CA1, 2 et 3 de l'hippocampe contralatéral et comparer la propagation de la protéine tau 1 et 3 mois après injection de l'AAV-P301L. Le nombre de cellules positives dans le GD contralatéral ne semble pas changer avec le temps, cependant, dans les régions CA1, 2 et 3, le nombre de cellules positives augmentent significativement à 3 mois pi (post-injection) ([Figure 57](#)).

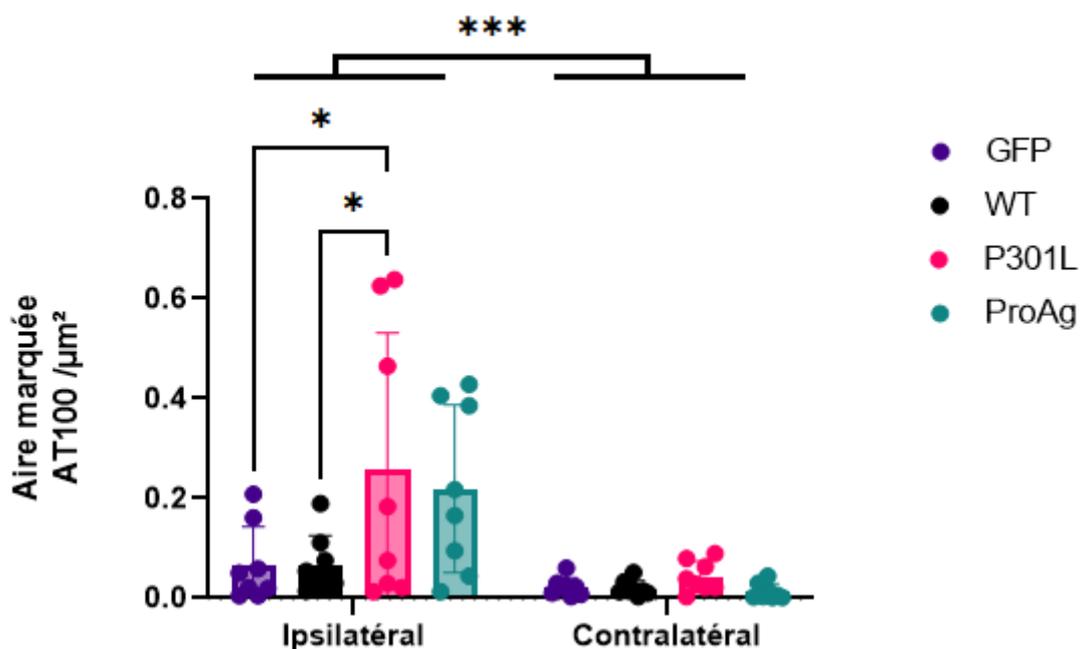


[Figure 57. Propagation de la protéine tau humaine mutée P301L un et trois mois après injection, dans le GD et les régions CA1, 2 et 3 de l'hippocampe.](#)

Quantification du nombre de cellules HT7+ dans le GD et les régions CA1,2 et 3 de l'hippocampe contralatéral. Test de Mann-Whitney, * $p < 0,05$. Moyenne \pm SD. $n = 8$ /groupe.

Afin de vérifier que les résultats de comptage montrent bien une différence de propagation de la protéine tau corrélées aux différences de niveau d'agrégation, le taux d'agrégation dans les différents groupes a été analysé. Pour ce faire, le marquage AT100, spécifique de la protéine tau anormalement conformée, a été quantifié dans l'hippocampe, sur toutes les coupes d'une série pour chaque animal, en distinguant le côté ipsilatéral du côté contralatéral. Les sommes des aires positives pour AT100 ont ensuite été comparées pour chaque groupe ([Figure 58](#)). Du côté ipsilatéral, on observe une augmentation significative de l'aire marquée

par AT100 chez les souris injectées par l'AAV-TauP301L en comparaison avec les souris injectées avec l'AAV-TauWT et le contrôle AAV-GFP (Test de Kruskal-Wallis et comparaisons multiples de Sidak ; *p <0,05) ; n=8/groupe ; [Figure 58](#)), on observe la même tendance avec l'AAV-TauProAg, ce qui est en accord avec le fait que seules les versions TauProAg et TauP301L entraînent l'agrégation de la protéine. Du côté contralatéral, on remarque une très faible agrégation de la protéine tau et aucune différence entre les groupes n'a été observée. Par ailleurs, il est notable que la moyenne des aires marquées AT100 dans le groupe contrôle, injecté avec l'AAV-GFP, n'est pas à zéro. Cela s'explique par le bruit de fond du marquage présent sur les coupes de cerveau des animaux du groupe contrôle. Pour réaliser cette analyse nous avons appliqué un seuillage faible permettant d'inclure tout le signal spécifique, mais le bruit de fond étant très marqué avec cet anticorps, nous n'avons pas souhaité normaliser par rapport au groupe GFP. La différence statistique avec le groupe TauP301 confirme malgré tout le marquage AT100 plus important dans ce groupe par rapport au groupe GFP et TauWT. Il faut également noter que le l'AAV-TauWT ne permet pas l'agrégation de la protéine tau (d'Orange et al. 2018), ce qui est confirmé ici par le fait que les valeurs observées pour ce groupe sont comparables à celles du groupe GFP.



[Figure 58. Quantification du niveau d'agrégation de la protéine tau](#)

Quantification du niveau d'agrégation de la protéine tau, dans les trois conditions, obtenue par mesure de l'aire du marquage AT100, spécifique de la protéine tau anormalement conformée, dans l'hippocampe de chaque souris du côté ipsilatéral et du côté contralatéral.

Test de Kruskal-Wallis avec test Sidak de comparaisons multiples, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.
Moyenne \pm SD. n= 8/groupe.

La neurotoxicité induite par la surexpression de la protéine tau hyperphosphorylée et soluble (TauWT) et de la protéine tau agrégée et mutée (TauP301L) ayant été démontrée précédemment au laboratoire (d'Orange et al. 2018), nous avons étudié la neurodégénérescence dans notre modèle. Des mesures de l'aire de l'hippocampe, de sa sous-région CA1, du GD et de sa couche polymorphique, cotés ipsilatéral et contralatéral, ont été effectuées. Toutes les coupes d'une série s'étageant des niveaux antéro-postérieurs -2mm à -4mm par rapport au bregma ont été analysées (Figure 59). Une fois la mesure effectuée, une extrapolation a été réalisée pour déduire le volume de chaque région anatomique (Partie B. du Matériel et Méthodes).

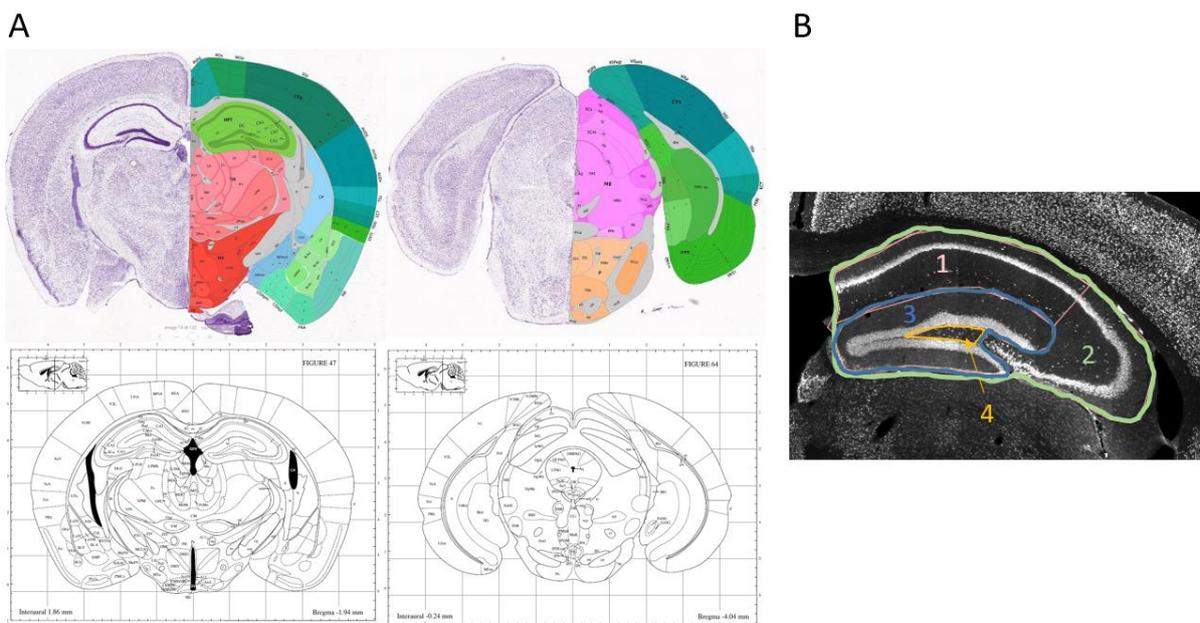


Figure 59. Méthode d'analyse de la neurodégénérescence pour l'expérience étudiant l'influence de l'agrégation de la protéine tau sur sa propagation.

La quantification du volume montre une diminution significative (* $p < 0,05$; Figure 60D) de la couche polymorphique du côté ipsilatéral, en comparaison avec le côté contralatéral, dans le groupe TauP301L. La même tendance a été mise en évidence dans le groupe TauProAg, sans toutefois atteindre le seuil de significativité statistique ($p = 0,0592$) (Figure 60D). En ce qui concerne les mesures du volume de l'hippocampe entier, on observe une diminution

significative du volume de l'hippocampe ipsilatéral par rapport au contralatéral dans les groupes TauWT (* $p < 0,05$) et TauProAg (** $p < 0,01$, [Figure 60A](#)). Aucune différence de volume entre le côté ipsilatéral et contralatéral n'a été mise en évidence concernant le volume de la sous-région CA1 pour chacun des groupes ([Figure 60B](#)). Enfin, la mesure du volume global du GD montre une diminution significative du volume du GD ipsilatéral par rapport au contralatéral, dans les groupes TauWT ([Figure 60C](#), * $p < 0,05$) et TauProAg (**** $p < 0,001$). On note également une diminution significative du côté ipsilatéral entre le volume du gyrus denté des souris injectées avec l'AAV-TauProAg par rapport à celles injectées avec l'AAV-GFP et TauP301L (donnée non montrée, $p < 0,01$) ([Figure 60C](#)). Il semblerait donc que l'injection dans la couche polymorphique de l'AAV-TauP301L induise une forte toxicité locale, qui est estompée au niveau des mesures de volumes globales (GD entier et hippocampe entier). A l'inverse, bien que la différence ne soit pas mise en évidence pour les groupes TauWT et TauProAg au niveau du site d'injection, on observe une grande diminution du volume dans le GD entier et l'hippocampe entier, traduisant une toxicité de la surexpression de la protéine tau. Enfin, il semblerait que la couche CA1 de l'hippocampe ne soit pas touchée par la toxicité induite par la surexpression de la protéine tau humaine.

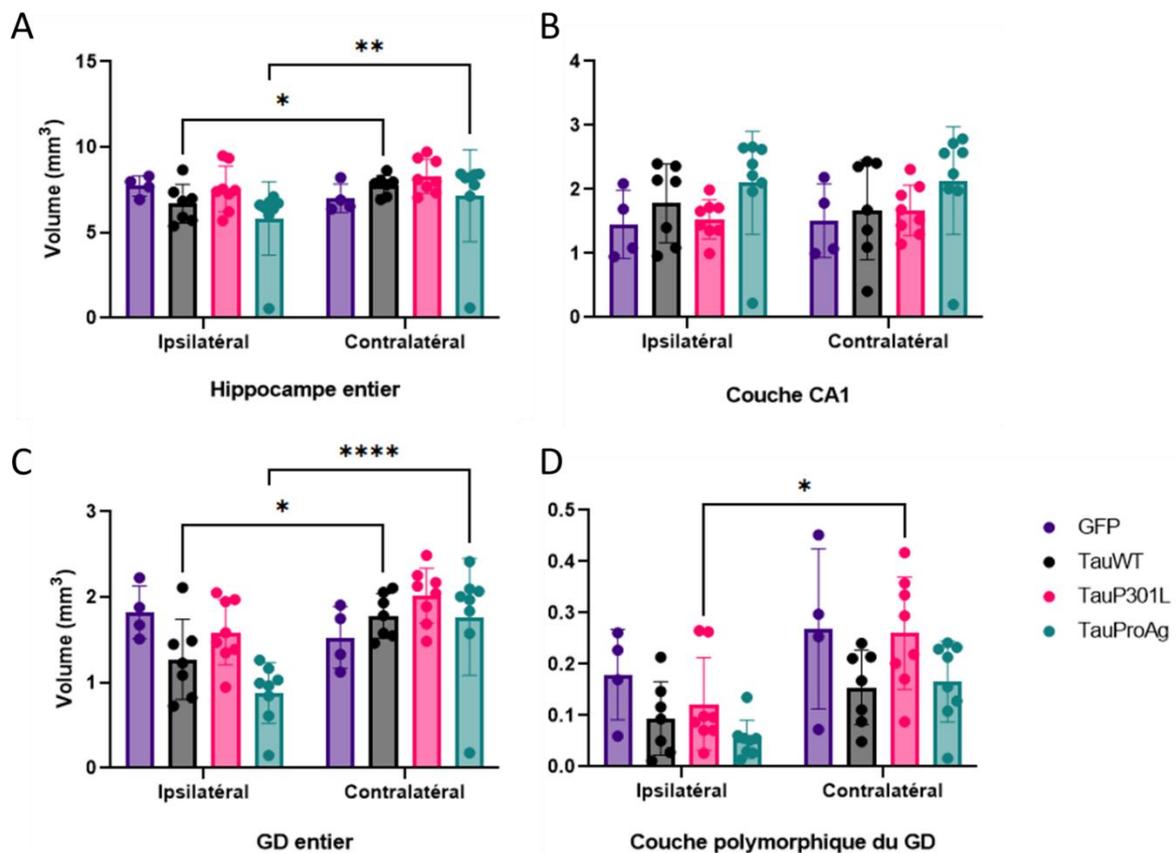


Figure 60. Analyse de la neurodégénérescence induite par la surexpression des différentes formes de tau.

Quantification du volume (en mm³) de l'hippocampe dans sa globalité, de la région CA1, du gyrus denté et enfin de la couche polymorphique du gyrus denté. Test de Kruskal-Wallis et Test de Dunn de comparaisons multiples ; *p<0,05, **p<0,01 et ****p<0,001. Moyenne ±SD. n= 4 pour le groupe GFP ; n= 7 pour le groupe TauWT et n=8 pour les groupes TauP301L et TauProAg.

Afin d'établir une corrélation entre l'activation de la microglie et la propagation de la protéine tau dans notre modèle, nous avons analysé la morphologie de la microglie, ce qui représente un bon indice de son état d'activation. A l'aide du logiciel IMARIS, nous avons analysé cette morphologie en sélectionnant les cellules microgliales dont le corps cellulaire était situé à la limite de la couche granulaire du GD, dans la couche moléculaire, du côté contralatéral à l'injection des rAAV. Cette analyse est toujours en cours de réalisation, les résultats pour cinq à dix cellules par animal avec un à deux animaux analysés par groupe seront montrés ici, sélectionnées selon ce critère de localisation. L'analyse sholl, qui permet de rendre compte du niveau de ramification de la cellule, par analyse du nombre de ramifications à une distance donnée grâce à des cercles concentriques espacés de 1 µm les uns des autres autour du soma de la cellule. A ce stade de l'analyse, aucune différence morphologique n'a été mise en évidence entre les groupes. Il semble tout de même que le groupe GFP se distingue des trois autres pour les ramifications de plus de 30µm (Figure 61).

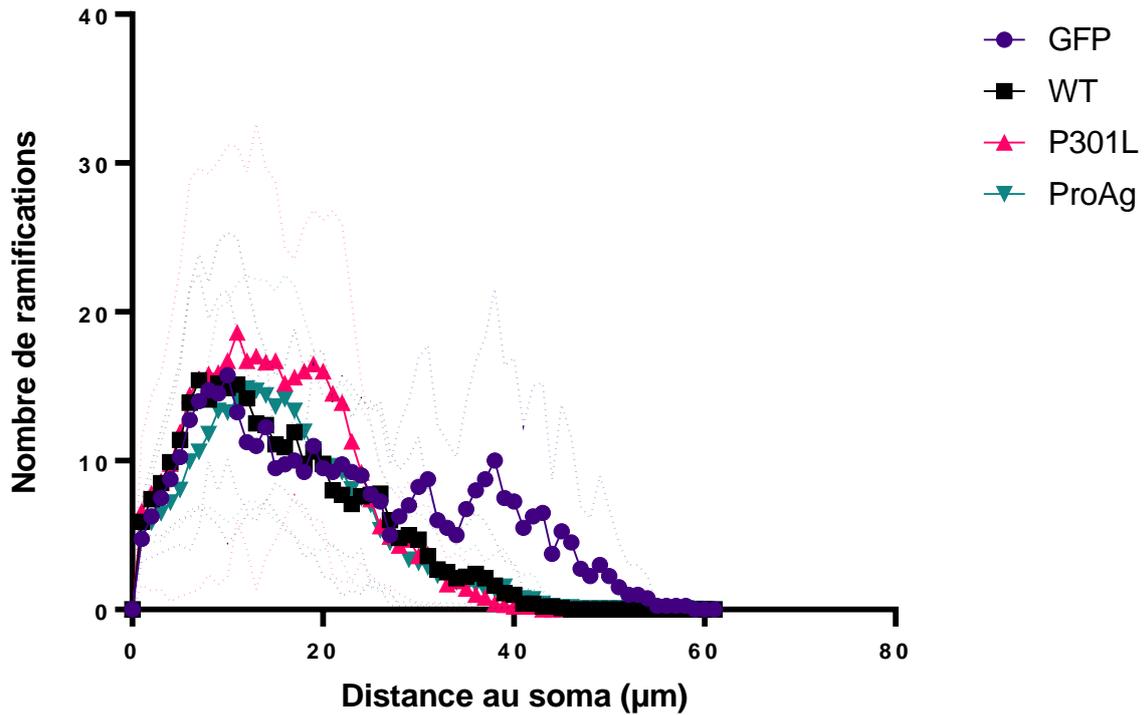


Figure 61. Analyse Sholl de la microglie dans la couche granulaire du gyrus denté contralatéral. Quantification par analyse Sholl du nombre de ramifications d'une cellule qui croisent des cercles concentriques autour du soma, espacés de 1 μm les uns des autres. Les pointillés représentent l'écart-type. Représentation de la moyenne de toutes les cellules étudiées par groupe.

Afin de compléter cette analyse morphométrique, nous avons également évalué différents paramètres comme le diamètre du soma, l'aire des ramifications (ou process), leur volume, leur longueur, et également la profondeur des ramifications c'est-à-dire la longueur de la plus longue ramification (Figure 62).

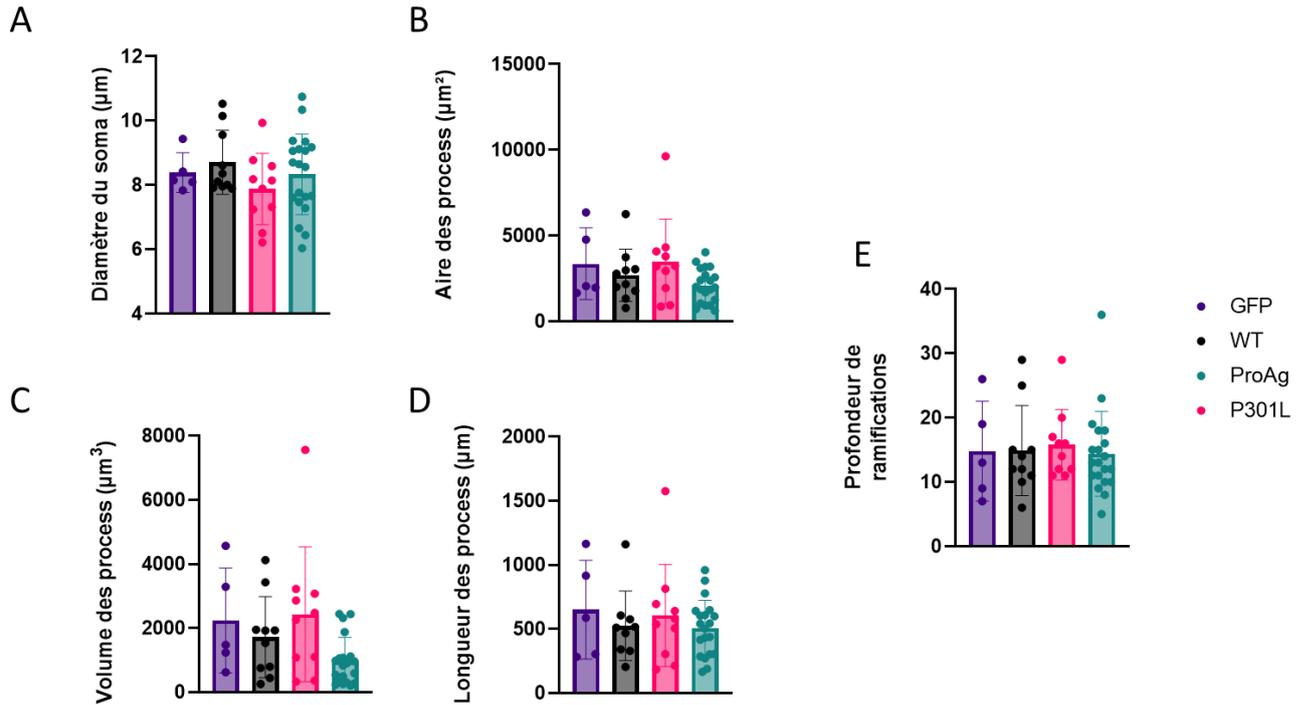


Figure 62. Analyse morphométrique de la microglie dans le GD contralatéral.

(A) Mesure du diamètre du soma ; et analyses des ramifications : de leur aire en μm^2 (B) ; de leur volume en μm^3 (C) ; de leur longueur (D) ; et comparaison de la ramification la plus longue pour chaque cellule (E).

II.B.3. Discussion

Cette expérience a permis de mettre en évidence une différence de propagation de la protéine tau en fonction de son état d'agrégation. Il semble que dans notre paradigme expérimental l'agrégation de la protéine favorise sa propagation aux neurones efférents des neurones transduits. Une analyse du niveau d'agrégation de la protéine tau a également été réalisée afin de s'assurer que la différence de propagation pouvait être imputable à l'agrégation. On observe une forte agrégation dans les groupes injectés avec l'AAV-TauP301L et Tau-ProAg du côté ipsilatéral. Cependant, la protéine tau semble très peu voire pas agrégée du côté contralatéral. Cela suggère que l'agrégation de la protéine tau favorise sa propagation, mais que ce n'est pas la forme agrégée qui propage. On peut formuler l'hypothèse que la forme agrégée de la protéine tau permettrait une libération accrue de la protéine tau sous forme de graine (ou « *seed* » en anglais), indétectables avec l'anticorps AT100, ce qui favoriserait ensuite la propagation du côté contralatéral. On peut également spéculer que l'absence de marquage AT100 du côté contralatéral est due à une faible sensibilité de cet anticorps. En

effet, lors de la réalisation de l'immunomarquage HT7 dans cette étude, nous avons rencontré des difficultés à mettre en évidence le marquage, nous avons donc réalisé un prétraitement qui a permis d'améliorer significativement la sensibilité de cet anticorps. Il est possible que le seuil de sensibilité des anticorps ne soit pas assez bas pour la faible quantité de protéine tau retrouvée du côté contralatéral.

Enfin, une étude du contenu en protéine tau des vésicules extracellulaires purifiées à partir de l'hippocampe après injection des vecteurs rAAV est en cours. Il a en effet été montré que la protéine tau peut être excrétée par les neurones dans le milieu extracellulaire de plusieurs manières et notamment par la sécrétion d'exosomes et d'ectosomes. De plus, plusieurs articles récents montrent que la microglie est également capable de relarguer la protéine tau dans le milieu extracellulaire au moins partiellement par la sécrétion d'exosomes (Asai et al. 2015; Clayton et al. 2021; Zhu et al. 2022). Nous nous sommes donc intéressés à la prise en charge des différentes formes de tau par les vésicules extracellulaires, qui pourrait également être une hypothèse expliquant la différence de propagation en fonction de la forme de la protéine tau. L'expérience en cours a pour objectif de comparer la contenance en protéine tau des vésicules extracellulaires, en fonction de l'état d'agrégation de la protéine tau. Pour ce faire nous avons injecté des souris sauvages avec l'AAV-TauWT ou avec l'AAV-TauProAg, nous quantifierons ensuite le nombre de vésicules marquées par des anticorps spécifiques de la protéine tau, sous différentes formes, grâce à des immunomarquages utilisant des anticorps couplés à des billes d'or. Nous avons récemment réalisé une expérience qui nous a confirmé qu'il est possible d'observer la protéine tau avec les marqueurs HT7 et AT100 dans des vésicules extracellulaires purifiées à partir d'hippocampe de souris.

L'étude de la neurodégénérescence dans ce modèle a mis en évidence une diminution du volume de l'hippocampe du côté ipsilatéral dans les groupes TauWT et TauProAg. Cette différence est également retrouvée dans le gyrus denté, mais pas dans la couche CA1. La différence de volume entre les côtés ipsilatéral et contralatéral peut s'expliquer par la toxicité induite par la tauopathie. Outre le fait que l'injection cible le GD et que c'est donc dans cette région que l'on obtient le plus fort niveau d'expression de la protéine tau et donc le plus de toxicité, l'absence de différence dans la couche CA1 peut, quant à elle, s'expliquer par une potentielle différence de sensibilité à la tauopathie par rapport aux cellules du GD. Cela peut également nous conforter sur la bonne injection des animaux dans la région cible. Par ailleurs,

une forte diminution de la couche polymorphique ipsilatérale est observée dans le groupe TauP301L, ce qui peut s'expliquer par une forte toxicité locale induite par cette forme de tau, toxicité qui serait donc plus diffuse pour les autres groupes surexprimant la protéine tau. Au global, cela confirme une perte neuronale induite par la surexpression de la protéine tau dans le gyrus denté et l'hippocampe au global du côté injecté avec le vecteur viral.

Les données préliminaires de l'analyse morphologique de la microglie ne montre aucune différence entre les groupes, mais il semblerait que les cellules microgliales du groupe GFP ait plus de longues ramifications que celles des autres groupes. Il est nécessaire d'analyser plus de cellules pour pouvoir conclure.

La littérature est florissante sur le sujet de la propagation de la protéine tau, et depuis quelques années, de nombreuses études ont prouvé le rôle indiscutable de la microglie dans ce phénomène. Nous avons donc souhaité implémenté notre modèle d'étude de la propagation de la protéine tau dans un modèle permettant la modulation de l'activation microgliale.

II.C. Etude de l'influence de l'activation microgliale sur la propagation de la protéine tau

II.C.1. Design expérimental

Un des objectifs de mon projet de thèse était d'étudier le rôle joué par la microglie et son activation dans la propagation des formes pathologiques de la protéine tau. Plusieurs études ont en effet montré dans des modèles animaux qu'en absence de microglie, la propagation de la tauopathie est drastiquement diminuée (Asai et al. 2015) mais également que la microglie est capable de phagocyter la protéine tau, et, après l'avoir partiellement dégradée, de la relarguer dans le milieu extracellulaire (Hopp et al. 2018; Bolós et al. 2016). De plus, des études génétiques de type pangénomique (GWAS) ont mis en évidence des variants de nombreux gènes microgliaux qui prédisposent au développement de la maladie d'Alzheimer, et notamment le gène TREM2. Ce gène codant pour un récepteur microglial responsable en particulier de l'activation des voies de la phagocytose, nous nous sommes intéressés à son implication dans la propagation des espèces toxiques de la protéine tau.

Pour ce faire, des souris homozygotes mutantes, hétérozygotes ou sauvage de la lignée *Trem2*^{-/-} ont été injectées avec le vecteur GFP-P2A-TauWT-V5, sous contrôle transcriptionnel du promoteur SYN2, à la dose de 5x10¹⁰Vg. Les groupes étaient constitués de vingt souris âgées de 3 mois avec dix souris par groupes (cinq souris mâles et cinq souris femelles) répartis sur deux temps : 3 et 6 mois après injection (Figure 63).

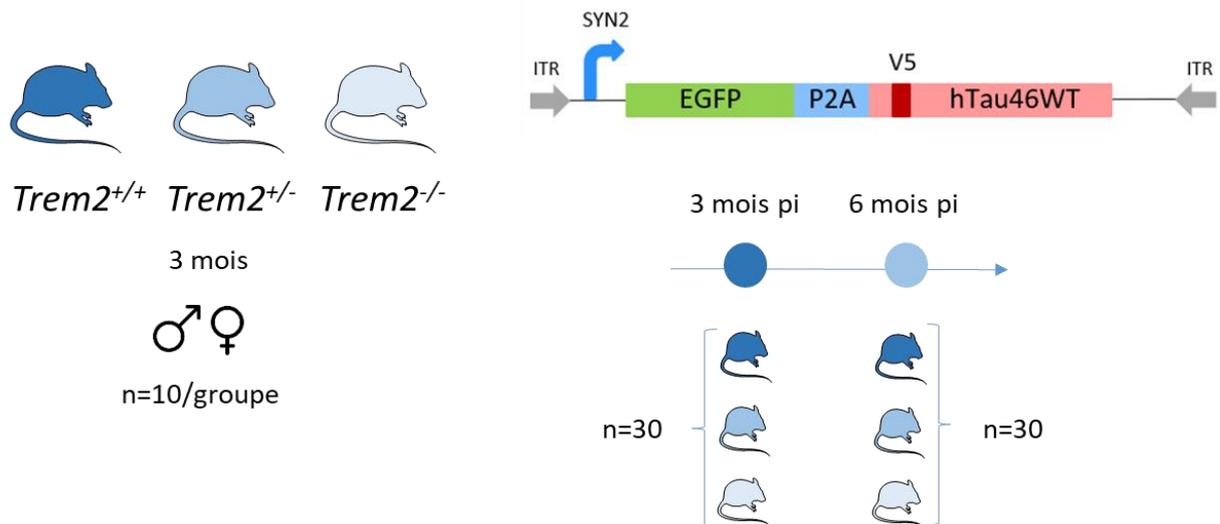


Figure 63. Design expérimental de l'étude de l'influence de l'activation microgliale, via son récepteur TREM2, sur la propagation de la protéine tau

Injections de souris déficientes, hétérozygotes et sauvages pour le gène TREM2, âgées de 3 mois avec le rAAV composé du transgène contenant la GFP, tau portant le tag V5, et la séquence P2A. Répartition en 6 groupes (3 génotypes à 2 temps après injection), avec 10 souris par groupe : 5 souris mâles et 5 femelles. Analyse à trois et six mois post-injection (pi).

II.C.2. Résultats

La présence du gène rapporteur GFP dans le vecteur a permis de s'assurer de la bonne transduction des cellules du GD au site d'injection. La quantification des cellules positives pour le marquage V5 trois mois après injection montre la présence de protéine tau dans les cellules du GD contralatéral ainsi que dans les régions CA1, 2 et 3 de l'hippocampe contralatéral (Figure 64A). Cependant, aucune différence n'est observée entre les différents groupes. De plus, nous observons les mêmes résultats six mois après injection (Figure 64B).

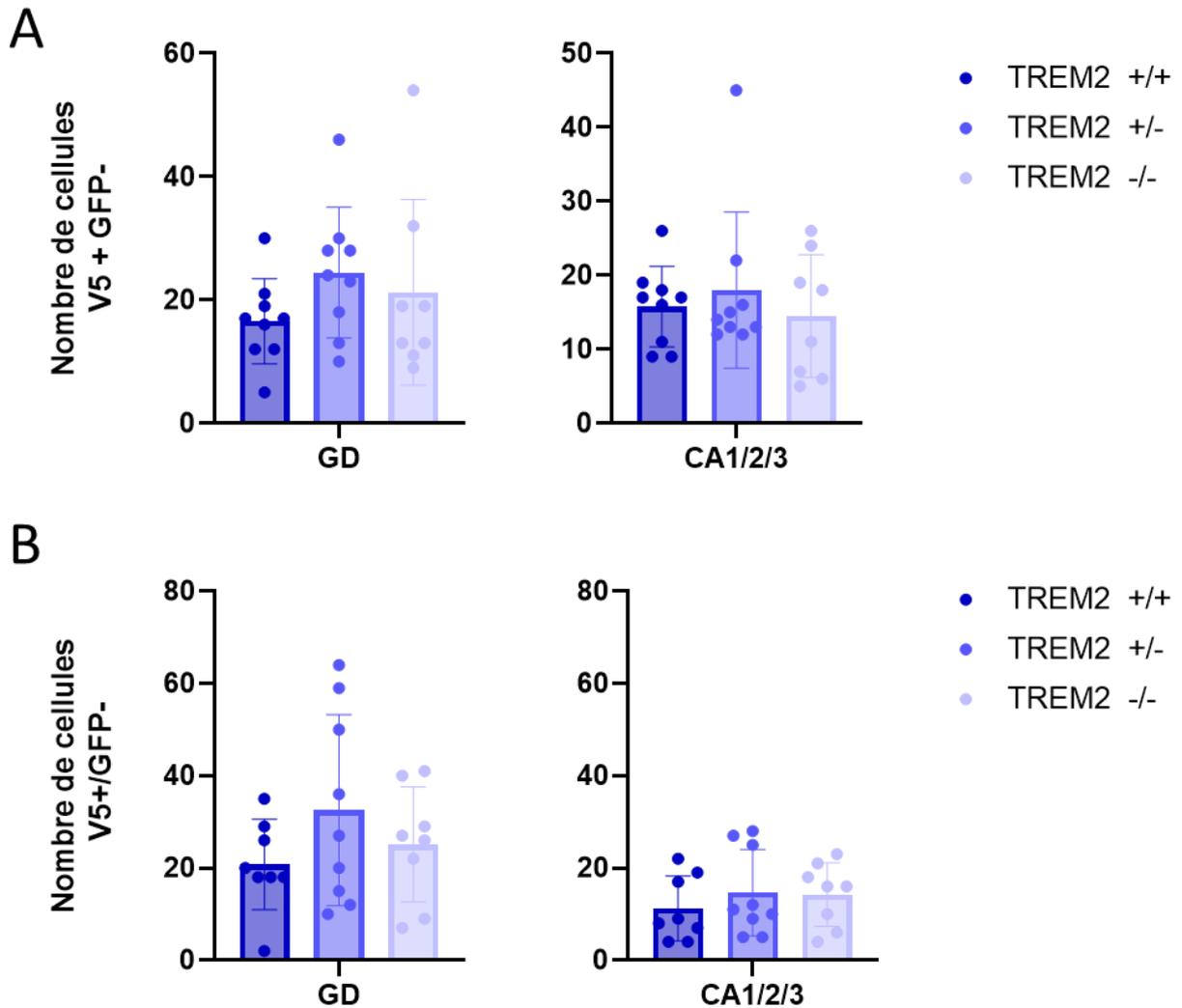
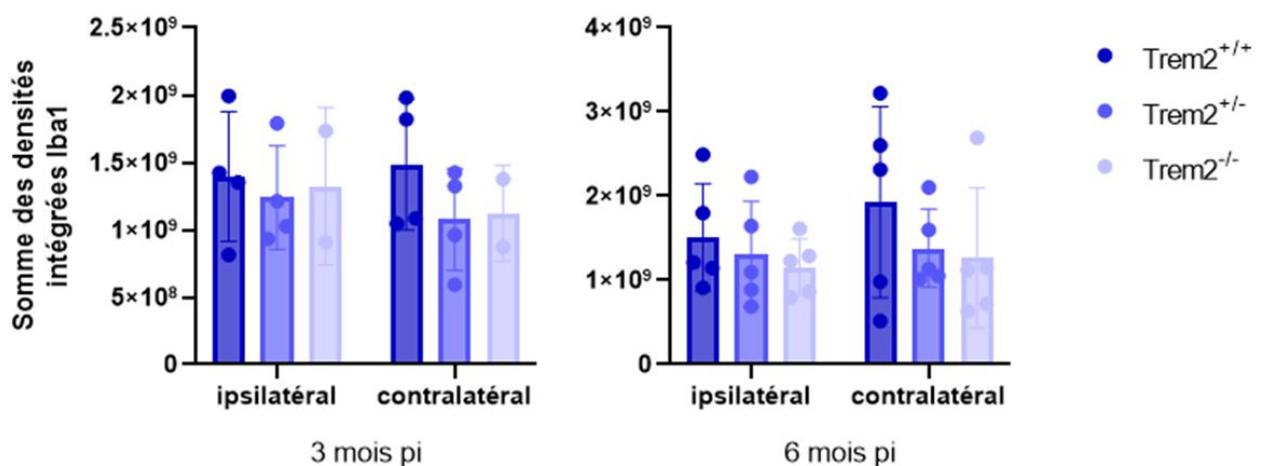


Figure 64. Propagation de la protéine tau humaine trois et six mois après injection, dans le gyrus denté et les régions CA1, 2 et 3 de l'hippocampe de souris de la lignée *Trem2*^{-/-}. Quantification du nombre de cellules V5+/GFP- dans le GD et les régions CA1, 2 et 3 de l'hippocampe contralatéral, à 3 mois pi (A) et à 6 mois pi (B). Test Kruskal Wallis, avec test Dunn de comparaisons multiples. Moyenne ±SD. n= 10/groupe (5 femelles et 5 mâles).

Afin de conclure cette étude, nous avons réalisé une quantification de l'intensité de marquage Iba1 pour nous assurer que l'état d'activation de la microglie en réponse à l'injection d'AAV-Tau est bien modulée en fonction du génotype *Trem2*^{-/-}. Malheureusement nous avons rencontré un problème technique qui ne me permet pas de conclure sur les résultats obtenus. En effet, étant donné le grand nombre d'animaux, nous avons séparé en deux la cohorte de 60 animaux lors de la réalisation de l'immunohistochimie avec l'anticorps Iba1 car il n'était pas possible de traiter autant d'échantillons en une seule fois. Nous avons randomisé les

groupes afin qu'ils soient représentés de manière équivalente et nous avons réalisé l'immunomarquage en deux sessions. Il a tout d'abord été réalisé sur les 30 premiers animaux, puis au moment de passer les coupes dans l'anticorps secondaire, nous avons réutilisé le mélange d'anticorps primaire de la première partie pour réaliser l'immunomarquage sur les 30 derniers animaux. Lors des analyses nous avons clairement constaté une intensité de fluorescence deux fois moindre chez les animaux dont l'immunomarquage a été réalisé avec la solution d'anticorps réutilisée. Suite à cela, nous avons refait l'immunomarquage sur tous les animaux sans réutiliser les solutions d'anticorps. L'analyse de cet immunomarquage est en cours de réalisation. Nous présentons malgré tout les résultats obtenus pour les 30 premiers animaux ([Figure 65](#)). Bien qu'une tendance à la diminution dans le groupe *Trem2^{-/-}* semble se dessiner, aucune différence d'expression d'Iba1 n'est mise en évidence entre les différents groupes, 3 ou 6 mois après injection des rAAV.



[Figure 65. Mesure de l'intensité du marquage Iba1](#)

Quantification de la somme des densités intégrées du marquage Iba1 par animal dans les trois conditions, à 3 (à gauche) et 6 mois pi (à droite). Test statistique : Test Kruskal-Wallis et test de Dunn de comparaisons multiples. Moyenne \pm SD. A 3 mois pi, n= 4/groupe pour *Trem2^{+/+}* et *Trem2^{+/-}*, n= 2 pour *Trem2^{-/-}*. A 6 mois pi, n=5/groupe.

II.C.3. Discussion

Bien que ces résultats soient préliminaires et que d'autres analyses soient en cours afin de les confirmer, il semblerait que le niveau d'expression de TREM2 n'influence pas la propagation de la protéine tau dans ce modèle de tauopathie focale. Ces résultats peuvent paraître en contradiction avec certaines études publiées dans la littérature qui utilisent un paradigme

expérimental comparable au notre, c'est à dire basé sur l'injection intracérébrale d'un vecteur rAAV permettant de surexprimer la protéine tau (Asai et al. 2015; Clayton et al. 2021). Cependant la plupart de ces études ont été réalisées dans des modèles présentant également une accumulation de plaques amyloïdes. Il est donc possible que l'amyloïdose ait un effet synergique sur la microglie, en l'activant via son récepteur TREM2, pour augmenter la propagation de la protéine tau. La littérature concernant l'effet de TREM2 sur la tauopathie est complexe (Gratuze et al. 2020; Leyns et al. 2017; Bemiller et al. 2017; Shi et Holtzman 2018; Sayed et al. 2018). Ce que l'on peut retirer de toutes ces études, est l'absence d'effet de l'expression du gène TREM2 murin sur la tauopathie dans le modèle de tauopathie de souris transgéniques PS19 (Leyns et al. 2017; Sayed et al. 2018). Dans le modèle transgénique murin hTau, une aggravation de la tauopathie est observée en absence de TREM2. Et dans notre modèle nous n'observons pas d'effet sur la propagation, mais dans un modèle transgénique Thy-Tau22 nous avons observé une aggravation de la tauopathie à des stades tardifs de la pathologie (Vautheny et al. 2021). Cependant, une étude réalisée dans le modèle PS19 avec une expression du variant commun de Trem2 humain, en comparaison avec l'expression du variant R47H du gène humain, a mis en évidence un effet bénéfique de la déficience en Trem2 à des stades tardifs de la pathologie. Outre les différences d'âge et de modèles utilisés, la différence majeure entre les premières études et cette dernière est l'utilisation du gène TREM2 murin ou humain (Gratuze et al. 2020). Comme Gratuze et al. le discute, il est fortement possible que les gènes induisent une différence, encore inexpliquée, d'effet sur la tauopathie. D'autres études seraient nécessaires pour totalement élucider les mécanismes impliqués dans l'influence de TREM2 sur la tauopathie. Il serait dans un premier temps intéressant d'appliquer notre modèle d'étude de la propagation de la protéine tau à un modèle murin exprimant les variants de Trem2 humains pour appuyer les observations de l'équipe d'Holtzman. Il a également été montré par cette équipe un potentiel changement de la microglie au cours de la pathologie qui n'induit pas le même effet sur la tauopathie. Il serait intéressant d'étendre notre étude longitudinale à des temps plus éloignés. Enfin, à l'issue de cette expérience, il apparaît souhaitable d'étudier l'effet de TREM2 sur la propagation de la protéine tau dans un modèle transgénique d'amyloïdose afin de se placer dans un contexte pathologique plus représentatif de la MA et avec des facteurs qui, ensemble, semblent avoir un fort effet synergique sur la propagation de tau dans d'autres études (Leyns et al. 2019; Clayton et al. 2021; Gratuze et al. 2021; Jain et al. 2023). En accord avec ces dernières

perspectives, nous avons tout d'abord évalué l'influence de l'amyloïdose dans notre modèle d'étude de la propagation de la protéine tau (Partie 2, E.).

II.D. Effet de l'âge sur la propagation de la protéine tau

Nous avons également étudié l'effet de l'âge sur la propagation de la protéine tau. La maladie apparaissant chez des sujets âgés, il est d'intérêt d'étudier les mécanismes de propagation de la protéine tau dans un contexte de vieillissement. D'autant plus que nous avons montré dans notre paradigme expérimental précédent basé sur l'injection d'AAV-Tau en intravitréen, que l'on observe de la propagation de la protéine tau uniquement chez les souris âgées. Par ailleurs, plusieurs études ont montré que les formes agrégées de la protéine tau mutée P301L propagent selon l'axe des stades de Braak dans des modèles de souris transgéniques après 15 mois (de Calignon et al. 2012; Liu et al. 2012; Wegmann et al. 2019). Et enfin, de nombreuses études montrent un effet de l'âge sur la physiologie microgliale, et notamment une altération de ses fonctions phagocytaires, fonctions qui semblent importantes pour la propagation de la protéine tau (Pluvinage et al. 2019).

Cette expérience a fait l'objet du stage de Master 2 de Cécile Adamski, qui a été réalisé sous ma supervision.

II.D.1. Design expérimental

Cette expérience repose sur la comparaison de deux groupes, composés chacun de 10 souris mâles : des souris dites « jeunes » de 4 mois, et des souris dites « âgées » de 15 mois. Ces souris ont été injectées avec le vecteur composé du transgène contenant la GFP, tau portant le tag V5, et la séquence P2A, sous contrôle du promoteur SYN2, à une dose de 5×10^{10} vg, et les analyses ont été effectuées 1 mois après injection ([Figure 66](#)).

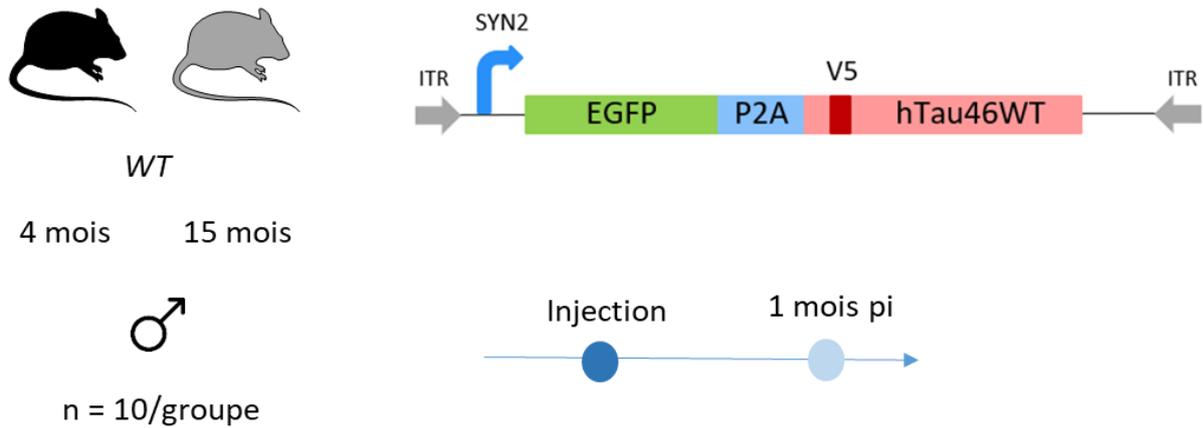


Figure 66. Design expérimental de l'étude de l'effet de l'âge sur la propagation de la protéine tau.

Injections de souris mâles sauvages âgées de 4 ou 15 mois avec le vecteur rAAV contenant le transgène composé de la GFP, de tau tagué V5 et de la séquence P2A. Analyse un mois post-injection (pi).

II.D.2. Résultats

Après vérification de la bonne transduction des cellules dans l'hippocampe injecté avec l'AAV-tau, nous avons été contraints de retirer 6 souris du groupe de souris jeunes, et 4 souris du groupe de souris âgées, du fait de la très faible, voire absence, de transduction. De ce fait, une quantification du niveau d'intensité de la GFP a été effectuée afin de s'assurer de l'homogénéité de transduction entre les groupes avec les individus restants (Figure 67)

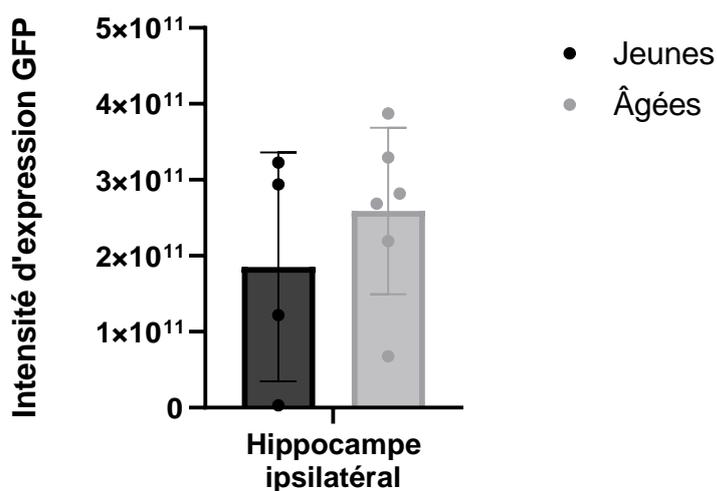


Figure 67. Niveau de transduction de l'hippocampe

Analyse de la somme des densités intégrées du signal GFP pour l'ensemble des coupes – présentant du signal - des animaux sélectionnés. Test de Mann-Whitney, $p=0.6095$. Moyenne \pm SD. $n= 4$ souris jeunes ; 6 souris âgées.

La quantification du nombre de cellules positives pour le tag V5 dans l'hippocampe contralatéral ne permet pas de mettre en évidence de différence de propagation entre les groupes de souris jeunes et âgées, ni dans le GD, ni dans les régions CA1, 2 et 3 (Figure 68).

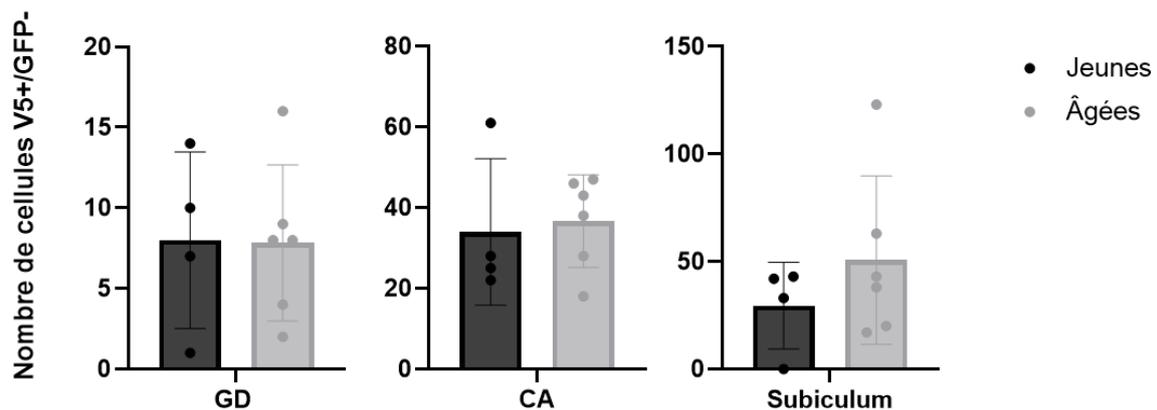


Figure 68. Quantification de la propagation de la protéine tau en fonction de l'âge.

Quantification du nombre de cellules V5+ dans le GD et les régions CA1, 2 et 3 du côté contralatéral à l'injection de l'AAV-tau. Test de Mann-Whitney, $p>0.5$. Moyenne \pm SD. $n= 4$ souris jeunes ; 6 souris âgées.

Une analyse de la neurodégénérescence a également été effectuée de la même manière que précédemment, lors de l'étude de l'effet de l'agrégation de la protéine tau sur sa propagation (PARTIE2,B.2.), à l'exception du volume de la région CA1 qui n'a pas été mesuré. Cette analyse ne montre aucune différence, ni entre les groupes, ni entre le côté ayant reçu l'AAV-tau et le côté contralatéral dans chaque groupe, suggérant que la neurodégénérescence induite par la tauopathie n'augmente pas avec l'âge, et que l'injection du vecteur AAV-tau n'induit pas non plus de neurodégénérescence significative du côté ipsilatéral (Figure 69).

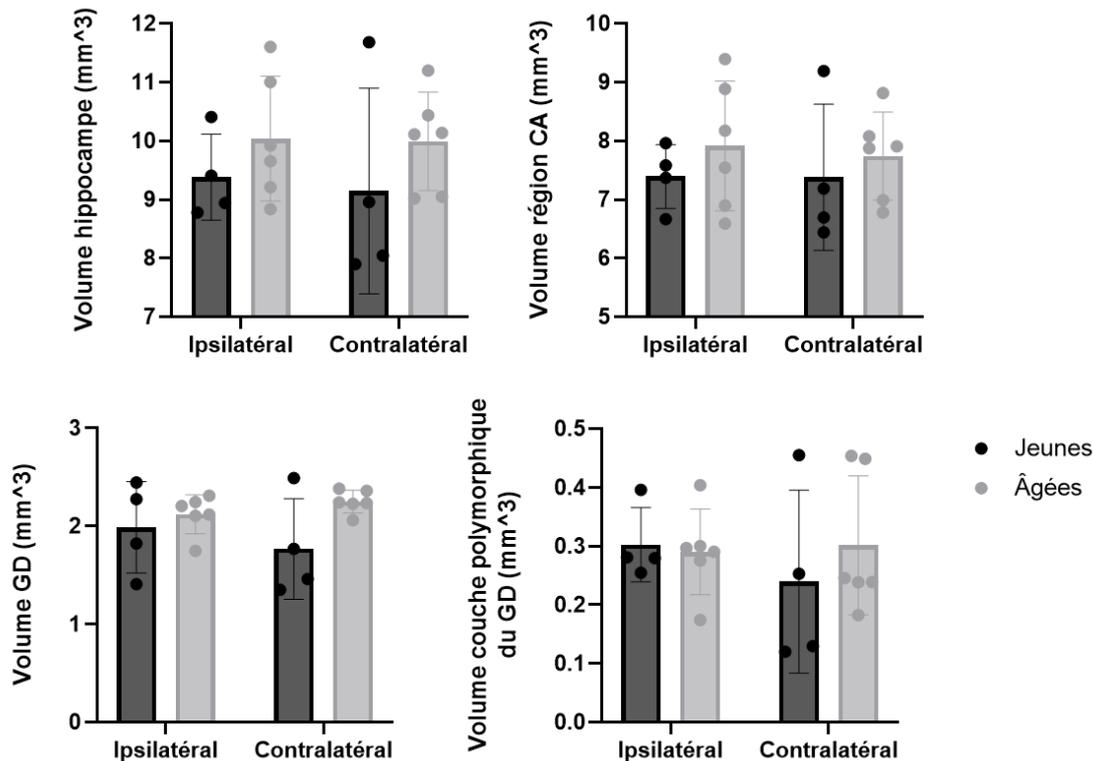


Figure 69. Quantification de la neurodégénérescence induite après injection de l'AAV-TauWT chez des souris jeunes et âgées.

Mesure du volume des régions du GD, et de l'hippocampe entier après extrapolation de la mesure de l'aire des régions. Test ANOVA à 2 facteurs et test Sidak de comparaisons multiples. Moyenne \pm SD. n= 4 souris jeunes ; 6 souris âgées.

II.D.3. Discussion

Notre modèle d'étude de la propagation, basé sur une tauopathie focale obtenue par l'injection unilatérale d'un vecteur AAV-tau, ne nous a pas permis de mettre en évidence un effet du facteur âge dans un contexte sauvage, c'est à dire en l'absence d'amyloïdose. Cette analyse a été réalisée après vérification du niveau de transduction de la zone d'intérêt qui a révélé un faible niveau, voire une absence, de transduction pour de nombreux individus. Ces individus ont de ce fait dû être écartés du reste de l'analyse de cette expérience. De plus, l'analyse de la propagation a été réalisée seulement 1 mois après injection. Bien que cela suffise pour nous permettre d'observer de la propagation, un temps plus long est peut-être nécessaire pour observer des différences. D'autres études ont montré une différence de propagation entre des souris jeunes et âgées après injection d'un AAV-TauP301L, après un temps post-injection plus long, c'est-à-dire 3 mois après injection (Wegmann et al. 2019). Il

serait donc intéressant d'étudier l'effet de l'agrégation de la protéine tau dans un modèle de vieillissement, et d'analyser la propagation 3 mois après injection ou plus tard. L'analyse de la neurodégénérescence n'a pas permis de mettre en évidence de différence entre le côté injecté et le côté contralatéral dans les deux groupes, et il ne semble pas que l'âge ait induit plus de neurodégénérescence chez les souris âgées que chez les souris jeunes. Il serait intéressant de réaliser cette étude à un temps après injection plus tardif et peut être également d'utiliser des souris plus âgées. En effet, lors de cette étude nous avons injecté des souris âgées de 15 mois, en nous basant sur la littérature (de Calignon et al. 2012; Liu et al. 2012; Wegmann et al. 2019) et nos propres expériences (Duwat, Léal et al. 2023). Dans un modèle similaire à celui utilisé ici, l'équipe d'Hyman a mis en évidence une différence de propagation de la protéine tau agrégée en comparant des souris âgées de 4 et de 22 à 24 mois. On peut donc supposer que dans ce type de modèle, utilisant des souris sauvages chez qui on induit la pathologie de manière focale, il faut probablement étudier l'effet de l'âge chez des souris beaucoup plus âgées. Afin d'aller plus loin dans l'élucidation des mécanismes impliqués chez les souris âgées il serait donc intéressant de moduler l'âge des souris, le temps après injection, et également les formes de la protéine tau utilisées.

II.E. Effet de l'amyloïdose sur la propagation de la tauopathie

II.E.1. Design expérimental

Nos modèles d'étude de la propagation de la protéine tau sont des modèles focaux implémentés sur des souris sauvages afin d'étudier différents paramètres pouvant influencer ce phénomène. Cependant, dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, l'amyloïdose a un poids important dans le développement et l'aggravation de la pathologie et notamment dans l'aggravation de la tauopathie (Leyns et al. 2019; Zhou et Fukushima 2020). De ce fait, il nous est apparu particulièrement intéressant d'évaluer l'impact de l'amyloïdose sur la propagation de la protéine tau dans notre modèle de tauopathie focale.

Nous avons donc appliqué notre modèle d'étude à des souris transgéniques APP^{swe}/PSEN1^{dE9}, modèle transgénique développant une amyloïdose (Minkeviciene et al. 2008), et nous les avons comparées à un groupe contrôle de souris sauvages, *littermates* des souris transgéniques (c'est à dire issues des mêmes portées). Les souris ont été injectées à

l'âge de 18 mois, pour étudier l'impact d'une forte amyloïdose, et sont au nombre de sept par groupe. Les souris transgéniques ont été comparées à des souris sauvages trois mois après injection du vecteur GFP-2A-TauWT-V5 à une dose de 5×10^{10} Vg (Figure 70).

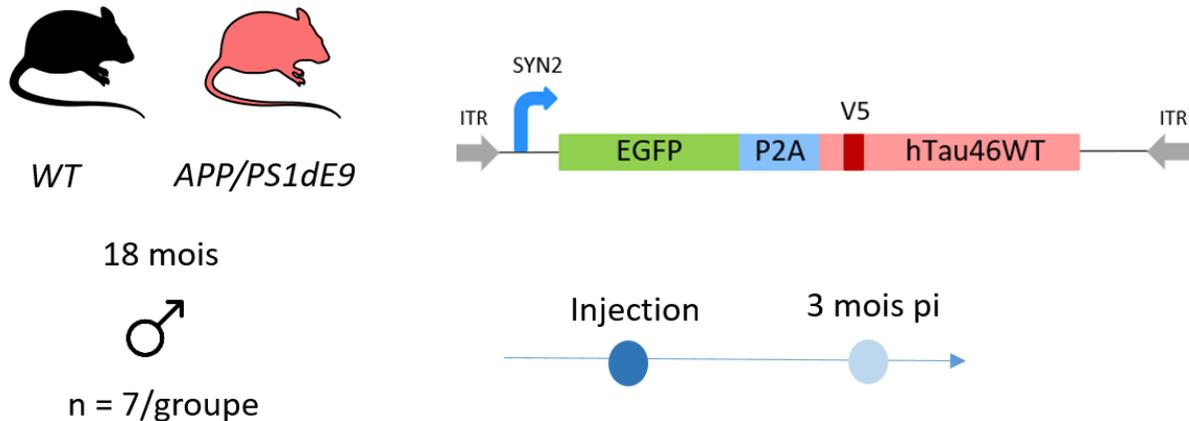


Figure 70. Design expérimental de l'étude de l'influence de l'amyloïdose sur la propagation de la protéine tau.

Injections de souris sauvages ou transgéniques APP^{swe}/PSEN1dE9 développant une amyloïdose, âgées de 18 mois au moment de l'injection par le rAAV composé du transgène contenant la GFP, tau portant le tag V5, et la séquence P2A. Analyse histologique réalisée à trois mois post-injection (pi).

II.E.2. Résultat

Après avoir vérifié la bonne transduction des cellules du GD au site d'injection du vecteur, nous avons quantifié manuellement le nombre de cellules positives pour le marquage V5 dans l'hippocampe contralatéral. La quantification dans le GD contralatéral montre une augmentation statistiquement significative du nombre de cellules V5+ chez les souris APP^{swe}/PSEN1dE9 par comparaison avec les souris sauvages (Figure 71). Des résultats similaires sont observés dans les régions CA1,2 et 3 de l'hippocampe contralatéral (Figure 71).

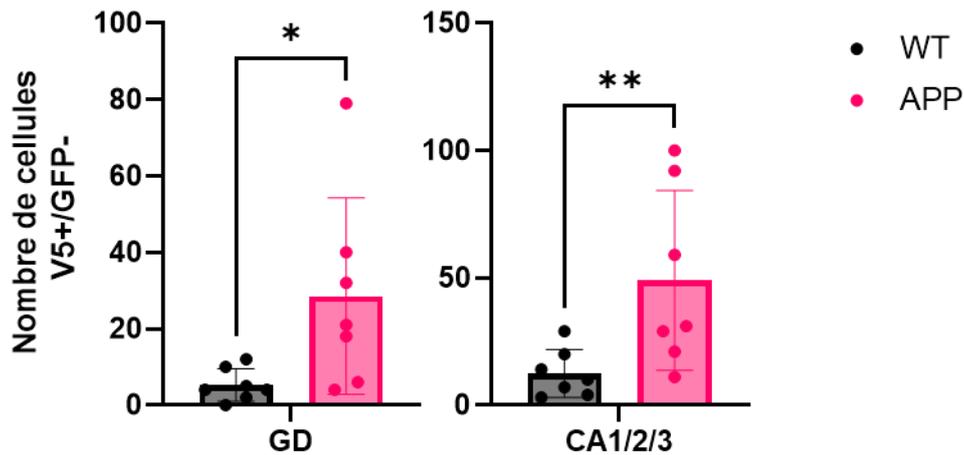


Figure 71. Influence de l'amyloïdose sur la propagation de la protéine tau dans l'hippocampe contralatéral

Quantification par comptage manuel du nombre de cellules V5+ dans le GD et les régions CA1, 2 et 3 de l'hippocampe du côté contralatéral. Les souris APP^{swe}/PSEN1^{dE9} figurent en rose, les souris sauvages en noir. Test de Mann-Whitney * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Moyenne \pm SD. $n=7$ /groupe.

Toujours dans un souci de nous assurer que les résultats obtenus sont bien la conséquence de la propagation de la protéine tau, et non de la diffusion du vecteur rAAV, nous avons réalisé une hybridation *in situ* sur les tissus d'une partie des animaux inclus dans cette étude. Nous avons à nouveau observé l'absence de marquage spécifique de la sonde, ciblant le génome viral, dans l'hippocampe contralatéral ce qui nous permet de confirmer que le marquage observé en contralatéral est la conséquence de la propagation de la protéine tau (Figure 72).

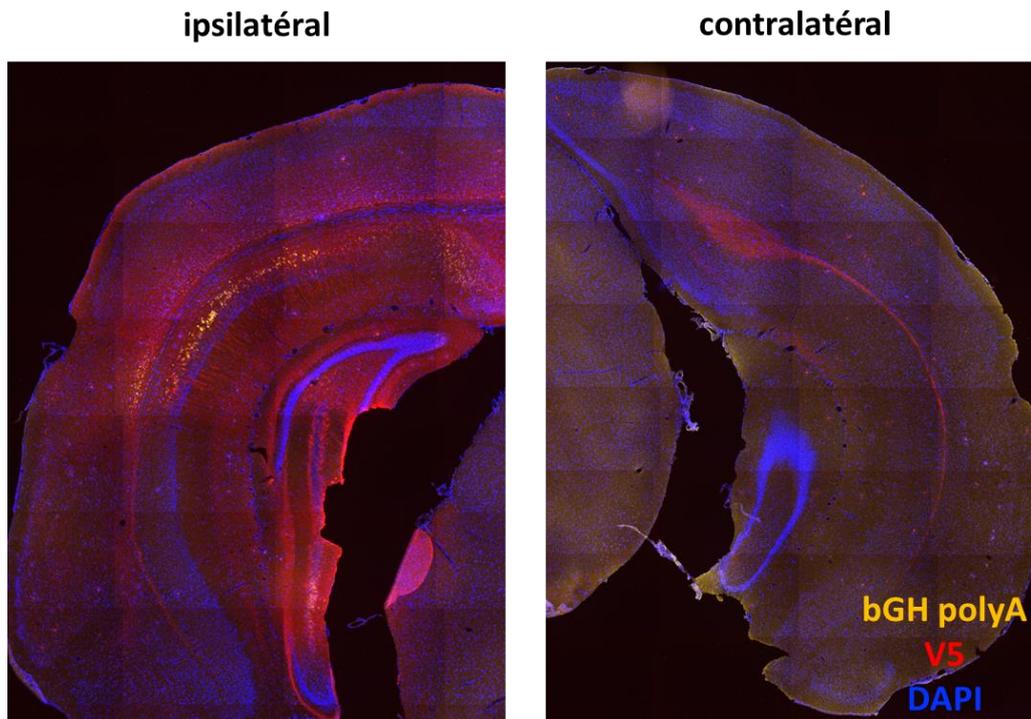


Figure 72. Hybridation in situ

Acquisition confocal au x20 d'une coupe après hybridation in situ spécifique du génome viral (en jaune) associée à un marquage V5 (en rouge) et DAPI (en bleu). L'hippocampe ipsilatéral ayant reçu le vecteur viral est à gauche.

L'une des principales raisons pour laquelle nous avons développé ce modèle d'étude de la propagation de la protéine tau, basé sur l'injection dans le GD ipsilatéral et la quantification de la propagation dans l'hippocampe contralatéral, est qu'il permet une bonne distinction spatiale des neurones transduits de ceux dans lesquels la protéine tau se propage. Cependant étant donné la capacité de large diffusion des rAAV, il est clair que d'autres cellules que les cellules mossues, celles que nous avons voulu cibler originellement, sont transduites, comme l'illustre les différentes images du site d'injection des AAV-tau montrées jusqu'ici. Les neurones de la couche granulaire et moléculaire du GD, mais également des sous-régions de la corne d'ammon comme CA1, 2 et 3 (Figure 43, panel de gauche). Il est donc probable que la protéine tau exprimée dans ces neurones est également capable de se propager à d'autres neurones auxquels ils sont synaptiquement connectés. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à la propagation de la protéine tau du côté ipsilatéral. En effet, ayant une bonne transduction de l'hippocampe en général (CA1,2,3, subiculum, GD) et ces régions étant fortement connectées entre elles, il nous est apparu intéressant de quantifier le nombre de

cellules qui sont marquées par l'anticorps V5 du fait de la propagation de la protéine tau. Cependant, une difficulté technique complique cette analyse. La forte densité des couches contenant le soma des neurones et le fort niveau de transduction de ces cellules transduites ne permet pas de distinguer à l'œil nu celles qui sont marquées uniquement par V5. Pour cette raison, nous avons souhaité développer un protocole non-biaisé d'analyse automatisée, basé sur l'utilisation du module colocalisation d'IMARIS. Grâce à cette méthode, plutôt que de dénombrer le nombre de neurones V5 positifs manuellement ou automatiquement, le signal de fluorescence est pris en compte dans sa globalité afin de déterminer un pourcentage de colocalisation et permettant la distinction des voxels GFP+ et V5+ de ceux qui sont uniquement V5+.

La quantification du nombre de voxels uniquement V5 positifs met en évidence une diminution de la propagation en ipsilatéral dans un contexte d'amyloïdose (Figure 73Figure 73).

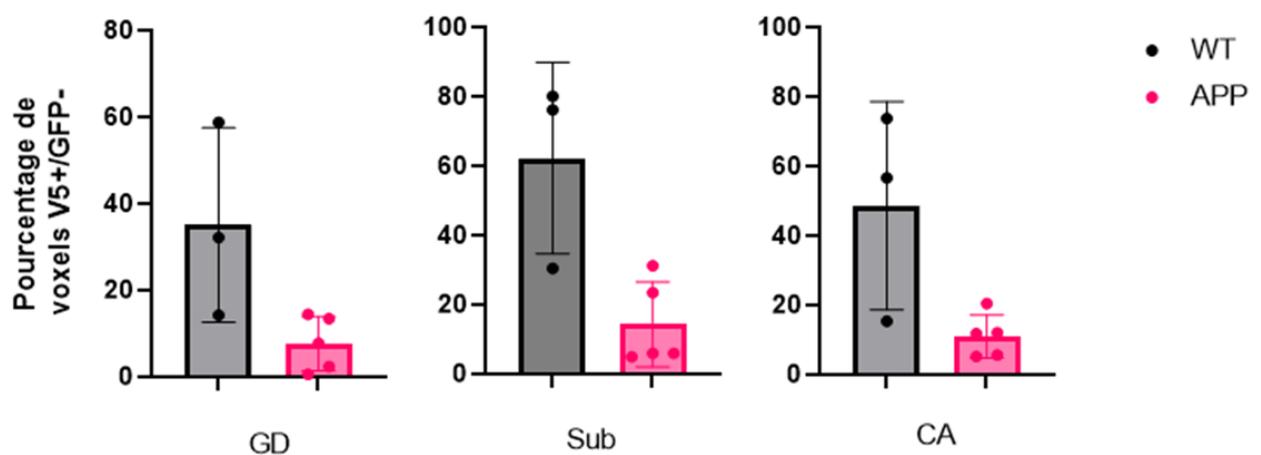
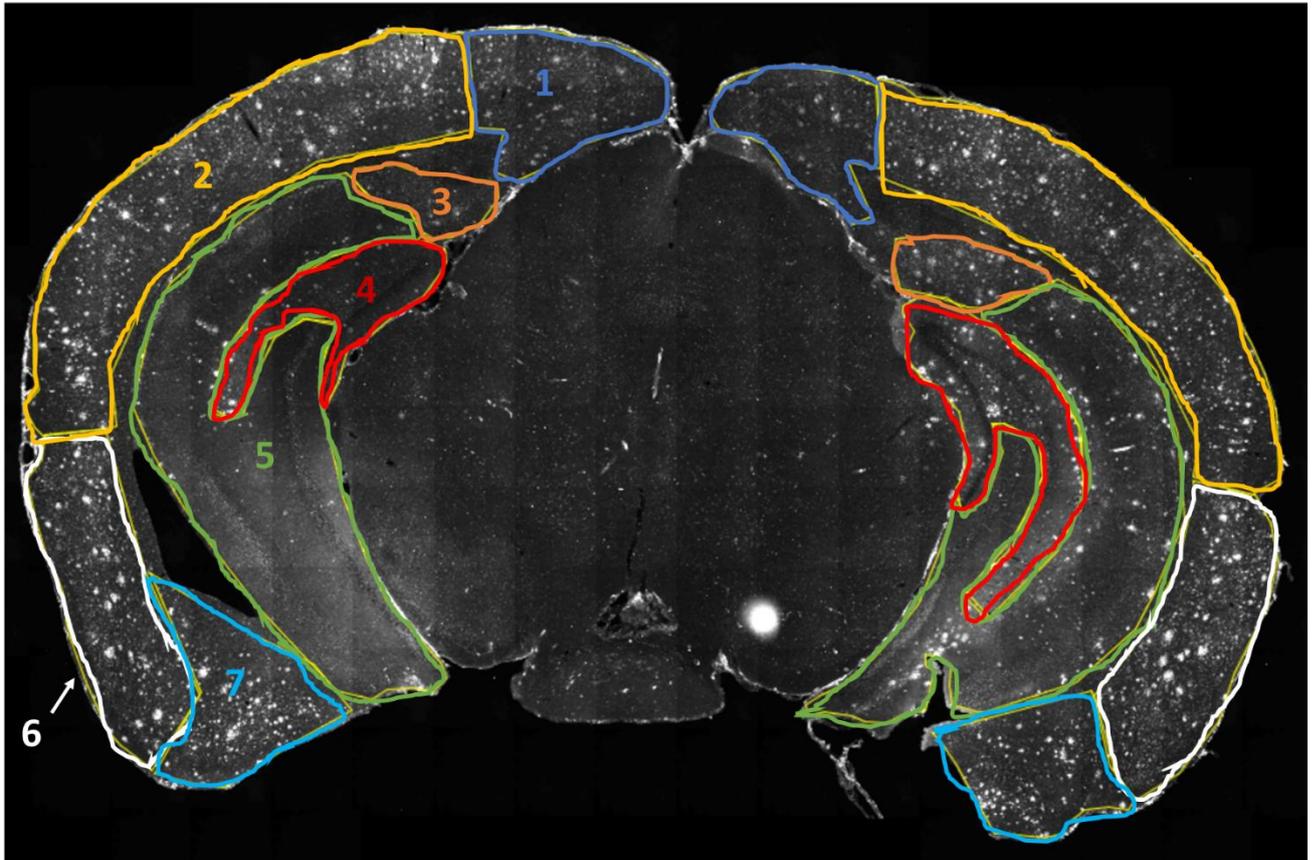


Figure 73. Propagation de la protéine tau dans l'hippocampe ipsilatéral
 Pourcentage de voxels uniquement V5+ (par rapport au nombre total de voxels V5+) dans le gyrus denté, le subiculum et la corne d'ammon au niveau antéropostérieur +/- 700 µm du site d'injection du vecteur rAAV. Chaque point représente la moyenne de trois coupes pour un animal. Test statistique : Test de Mann-Whitney, $p=0,0714$ pour les trois comparaisons. Moyenne \pm SD. $n=3$ pour le groupe WT ; $n=5$ pour le groupe APP.

Afin d'évaluer si l'injection de rAAV entraînant la surexpression de la protéine tau humaine à un quelconque effet sur les plaques amyloïdes, nous avons analysé la taille et le nombre de plaques dans différentes régions cérébrales du côté injecté par le vecteur et du côté

contralatéral. Les régions suivantes ont été analysées : hippocampe, GD, cortex rétrosplénial, cortex piriforme, cortex entorhinal, amygdale, et enfin nous avons regroupé le reste des sous-régions corticales en une région nommée cortex ([Figure 74](#)).

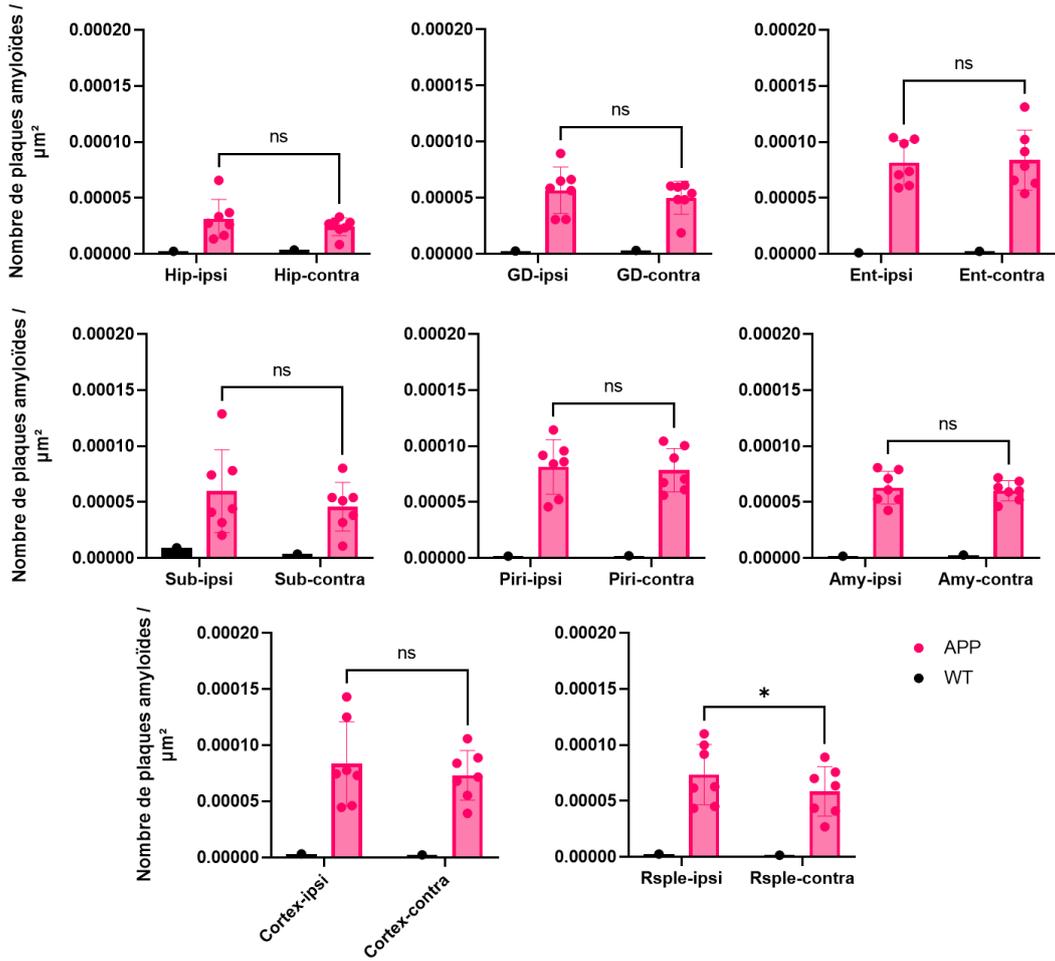


[Figure 74. Délimitation des régions analysées pour la quantification des plaques amyloïdes](#)
Régions cérébrales analysées pour l'étude de la taille et du nombre de plaques amyloïdes du côté injecté avec l'AAV-tau (ici, côté droit) et du côté contralatéral. 1 : Cortex rétrosplénial ; 2 : Cortex ; 3 : Subiculum ; 4 : Gyrus denté ; 5 : Hippocampe ; 6 : Cortex entorhinal ; 7 : Amygdale

Les résultats montrent une hétérogénéité de la répartition des plaques amyloïdes en fonction des régions cérébrales ([Figure 75A](#)), et cette répartition est identique en ipsilatéral et en contralatéral pour chacune des sous-régions analysées ([Figure 75B](#)). De plus, le ratio du nombre de plaques sur la surface de la région étudiée ([Figure 76A](#)), rendant compte de la densité en plaques, ainsi que le ratio de la surface des plaques dans une région donnée sur la surface de cette région ([Figure 76B](#)), rendant compte du territoire occupé par les plaques, ne sont pas significativement différents entre le côté injecté avec l'AAV-tau et le côté contralatéral dans aucune des sous-régions étudiées ([Figure 76](#)). Hormis pour le ratio du nombre de plaques

(A) Nombre absolu de plaques amyloïdes dans toutes les sous-régions étudiées des souris APP, du côté injecté avec l'AAV-tau et du côté contralatéral chez les souris APP^{swe}/PSEN1^{dE9}. Hip : hippocampe ; DG : gyrus denté ; Rsplé : cortex rétrosplénial ; Sub : subiculum ; Ent : cortex entorhinal ; Piri : cortex piriforme ; Amy : Amygdale ; Cortex : reste du cortex sur les coupes étudiées. (B) Représentations par sous-région, Tests de Kruskal-Wallis avec test de Dunn de comparaisons multiples, ns : non significatif. Moyenne \pm SD. n= 7 souris APP, 1 souris WT.

A



B

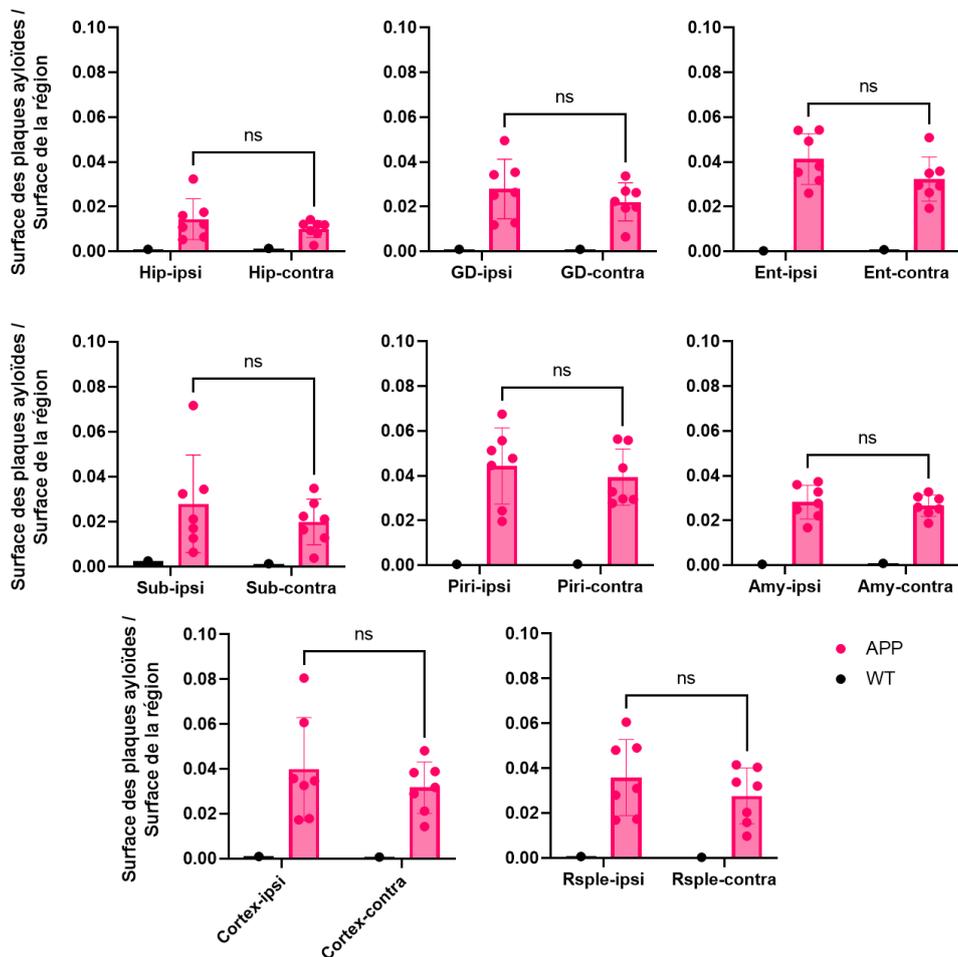


Figure 76. Influence de l'injection de rAAV permettant la surexpression de la protéine tau humaine sur la taille et le nombre de plaques amyloïdes dans différentes régions cérébrales. (A) Densité en plaques amyloïdes pour chaque sous-région analysée : rapport du nombre de plaques amyloïdes dans une sous-région par rapport à la surface de cette sous-région ; (B) Territoire occupé par les plaques amyloïdes : rapport de la surface occupée par les plaques amyloïdes dans une sous-région par rapport à la surface totale de cette sous-région. Hip : hippocampe ; DG : gyrus denté ; Rsplé : cortex rétrosplénial ; Sub : subiculum ; Ent : cortex entorhinal ; Piri : cortex piriforme ; Amy : Amygdale ; Cortex : reste du cortex sur les coupes étudiées. Tests de Kruskal-Wallis avec test de Dunn de comparaisons multiples ; *p<0,05. Moyenne ±SD. n= 7 souris APP, 1 souris WT.

II.E.3. Discussion

L'étude de l'influence de l'amyloïdose sur la propagation de la protéine tau montre une augmentation significative du nombre de cellules positives pour le marquage spécifique de la protéine tau transgénique du côté contralatéral par rapport aux souris sauvages, illustrant une forte influence de l'amyloïdose sur cette propagation. Ces résultats sont concordants avec d'autres études publiées ces dernières années dans différents modèles et qui montrent que la charge amyloïde a un effet synergique sur la propagation de la protéine tau (Clayton et al. 2021; Pascoal et al. 2021; Leyns et al. 2019).

L'analyse de la propagation du côté ipsilatéral donne, quant à elle, des résultats contradictoires. Il semble en effet que du côté de l'injection la propagation soit moindre chez les souris transgéniques APP^{swe}/PSEN1^{dE9} que chez les souris sauvages. Il sera nécessaire de compléter les cohortes avec tous les animaux pour conclure (analyses en cours), mais il est envisageable que l'amyloïdose entraîne une mort précoce des neurones au niveau du site d'injection et ainsi une diminution du nombre de neurones dans lesquels on observe une propagation à proximité immédiate du site d'injection du vecteur. Une étude de la neurodégénérescence avec mesure du volume des régions d'intérêts est en cours.

L'étude des plaques amyloïdes a permis de confirmer que la surexpression de la protéine tau humaine n'entraînait pas de changements de taille ou de nombre de ces plaques. Ainsi, les résultats qui montrent une propagation plus importante dans un contexte amyloïde sont imputables à la présence de plaques amyloïdes, qui ne sont pas modifiées par l'injection de vecteurs viraux.

Il serait également intéressant d'étudier la proximité des neurones dans lesquels la protéine tau propage avec les plaques amyloïdes ce qui nous permettrait d'avoir un élément de plus en faveur ou non de l'action directe des plaques amyloïdes sur la propagation de la protéine tau. Pour cela nous pouvons tout de même nous appuyer sur la quantité de plaques dans les différentes régions étudiées, on observe que les régions où la protéine tau propage préférentiellement ne sont pas forcément les régions où on observe la plus forte densité en plaques. L'hypothèse selon laquelle les plaques ont un effet direct sur la propagation de la tauopathie vient du fait que l'amyloïdose précède la tauopathie. Mais il a également été montré récemment que l'activation microgliale précédait également la tauopathie et suivait exactement la même progression spatiotemporelle (Pascoal et al. 2021). Ainsi, l'hypothèse majeure actuelle repose sur un effet synergique entre l'amyloïdose et la microglie qui potentialise la propagation de la protéine tau. Cette hypothèse est appuyée par les résultats de l'équipe d'Ikezu qui a utilisé un modèle de souris transgéniques d'amyloïdose et qui a montré que cet effet synergique est aboli lorsque la microglie est déplétée (Clayton et al. 2021).

Ces résultats apparaissant prometteurs et concordants avec la littérature dans un contexte d'amyloïdose, nous avons souhaité appliquer notre première hypothèse, selon laquelle la protéine tau ne propage pas de la même manière en fonction de sa forme (agrégée ou non), hypothèse que nous avons par ailleurs confirmée dans un contexte normal (Partie 2,B.), au modèle transgénique d'amyloïdose APP^{swe}/PSEN1^{dE9}.

II.F. Effet de l'agrégation de la protéine tau, dans un contexte d'amyloïdose, sur sa propagation

Ayant mis en évidence une différence de propagation de la protéine tau en fonction de son niveau d'agrégation chez des souris sauvages mais également une augmentation de la propagation de la protéine tau humaine chez des souris APP^{swe}/PSEN1^{dE9}, nous avons voulu étudier l'effet de l'agrégation de la protéine tau sur sa propagation dans un contexte d'amyloïdose.

II.F.1. Design expérimental

Des souris APP^{swe}/PSEN1^{dE9} et des souris *littermates* contrôles ont été injectées à 5 mois avec les différents vecteurs rAAV décrits précédemment et permettant l'expression de la protéine tau sous différentes formes, sans GFP ni tag V5 afin d'obtenir un niveau d'agrégation suffisant. Les souris utilisées étaient des femelles uniquement, injectées à la dose de $2,5 \times 10^9$ Vg et les analyses ont été effectuées 1 mois après injection (Figure 77).

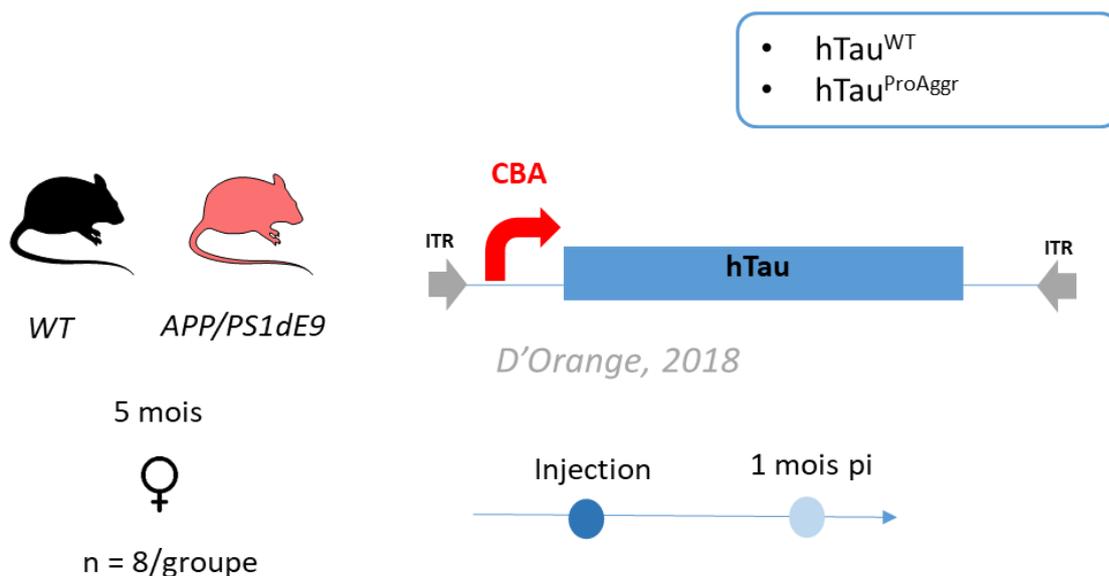


Figure 77. Design expérimental de l'étude de l'influence de l'agrégation de la protéine tau humaine sur sa propagation dans un contexte d'amyloïdose.

Des souris femelles sauvages ou transgéniques APP^{swe}/PSEN1^{dE9} âgées de 5 mois ont été injectées avec les AAV-Tau^{WT} ou Tau^{ProAg} qui induisent respectivement l'expression d'une forme hyperphosphorylée et soluble, et d'une forme fortement agrégée de tau. La propagation a ensuite été analysée un mois post-injection (pi).

Ce design expérimental se distingue des précédents de plusieurs manières. Tout d'abord, nous avons utilisé uniquement des femelles (seul ce sexe était disponible car les mâles étaient utilisés pour d'autres projets du laboratoire), injectées à l'âge de 5 mois, et nous avons analysé la propagation seulement 1 mois après injection. De plus, la dose utilisée était deux fois moindre que celle utilisée pour l'étude de l'effet de l'agrégation de la protéine tau sur sa propagation (Paragraphe B.1. ; page 121). Ces ajustements ont été effectués car les souris transgéniques APP^{swe}/PSEN1^{dE9} sont connues pour avoir un taux de mortalité de 20% aux alentours de l'âge de 3 mois, les femelles étant particulièrement sensibles. Pour illustration, vous trouverez la courbe de survie des souris issues de la lignée du laboratoire avant toute

utilisation pour l'étude ci-après (Figure 78). Nous avons noté une forte mortalité des souris APPswe/PSEN1dE9 avant injection (=jour 150) autour de l'âge critique (Figure 78),

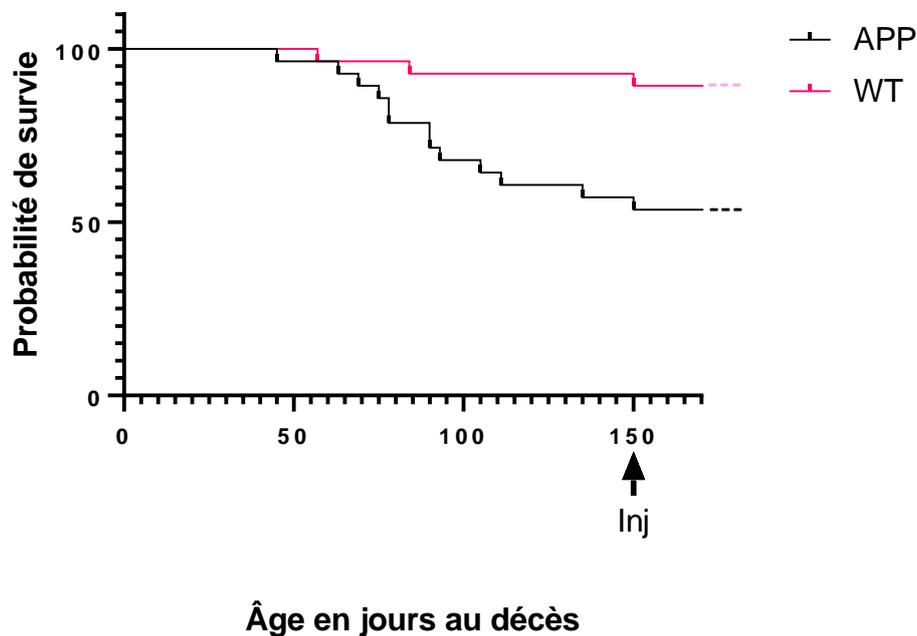


Figure 78. Courbe de survie des souris utilisées lors de cette étude AVANT leur utilisation pour l'étude.

Représentation graphique Kaplan-Meier de la survie des souris décédées avant injection (à 150 jours) et n'ayant pas été intégrées dans des groupes.

De plus, d'autres expériences menées au laboratoire avaient conduit à une mortalité plus importante après injection de vecteurs permettant la surexpression de la protéine tau. Nous avons donc choisi de nous éloigner au maximum de cette période critique, espérant ainsi limiter les effets délétères de l'injection d'AAV-tau chez ces souris. Nous avons établi une courbe de survie (graphique de Kaplan-Meier) pour les différents groupes de souris inclus dans l'expérience (Figure 79), les animaux décédés avant injection ne figure donc pas dans l'analyse de survie. Nous avons noté une forte mortalité des souris APPswe/PSEN1dE9 après injection de l'AAV-TauWT (groupe « APP_TauWT »), ce qui n'est pas le cas après injection de l'AAV-TauProAg (groupe « APP_TauProAg »).

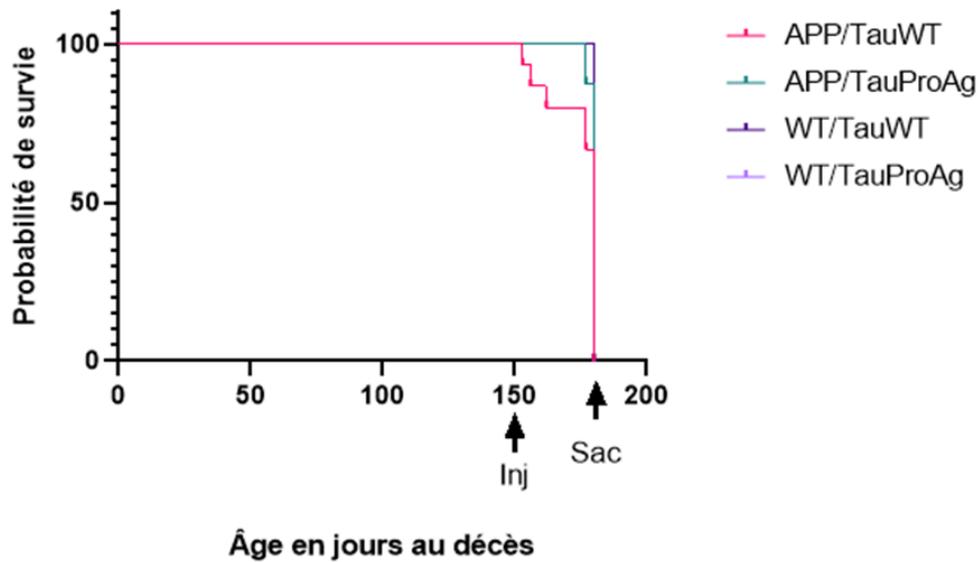


Figure 79. Courbe de survie des souris de l'étude de l'agrégation de la protéine tau dans un contexte d'amyloïdose.

Représentation graphique Kaplan-Meier de la survie des souris après injection, à 150 jours (notifié « Inj »), des différents rAAV, et avant sacrifice, à 180 jours (notifié « Sac »).

II.F.2. Résultats

Après s'être assuré de la bonne transduction des neurones cibles du côté ipsilatéral, nous avons quantifié les cellules positives pour le marquage Tau13, un anticorps ciblant la protéine tau humaine quelle que soit sa forme (physiologique, hyperphosphorylée, ou agrégée), dans l'hippocampe contralatéral. Aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence entre les groupes, ni dans le gyrus denté, ni dans les sous-régions CA1, 2 et 3. Cependant, malgré la forte variabilité interindividuelle, on peut observer une tendance à l'augmentation dans les deux groupes de souris, sauvages et transgéniques, injectées avec l'AAV-TauProAg (Figure 80).

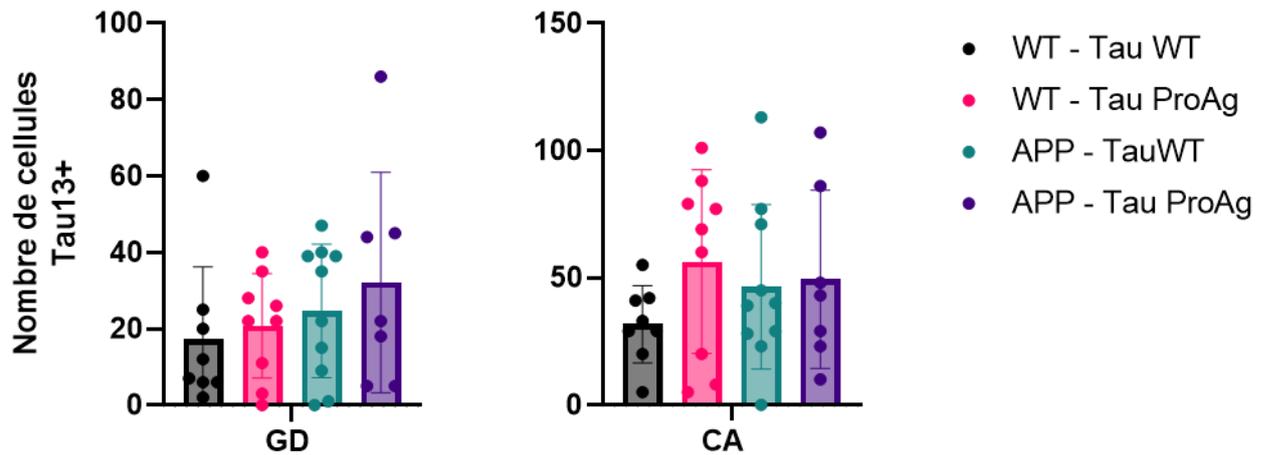


Figure 80. Propagation de la protéine tau en fonction de son agrégation et de la présence ou non de plaques amyloïdes.

Quantification du nombre de cellules Tau13+ dans le GD et les régions CA1, 2 et 3 de l'hippocampe du côté contralatéral à l'injection de l'AAV-tau. Test de Kruskal-Wallis et Test de Dunn de comparaisons multiples. Moyenne \pm SD. n= 8/groupe excepté pour le groupe de souris sauvages injectées avec l'AAV-TauProAg (n=9), et pour le groupe de souris transgéniques injectées avec l'AAV-TauWT (n= 4).

Nous avons également noté, lors du comptage du nombre de cellules Tau13 positives du côté contralatéral, la présence de cellules positives dans d'autres régions que celles étudiées auparavant, et notamment dans le subiculum, le cortex rétrospécial, et le cortex entorhinal (Figure 81). Nous observons la même tendance que dans l'hippocampe, c'est-à-dire une augmentation du nombre de cellules positives dans les groupes injectés avec l'AAV-TauProAg, dans le subiculum et le cortex entorhinal. De plus, cette différence entre les deux vecteurs semble plus marquée chez les souris transgéniques APP^{swe}/PSEN1^{dE9} que chez les souris sauvages.

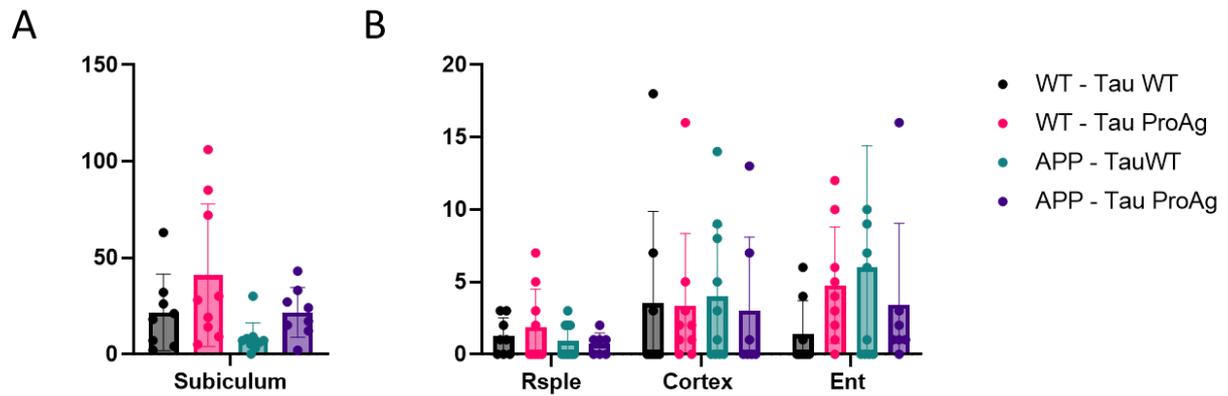


Figure 81. Propagation de la protéine tau en fonction de son agrégation et de la présence ou non de plaques amyloïdes en dehors de l'hippocampe.

(A) Test de Kruskal-Wallis et Test de Dunn de comparaisons multiples. Moyenne \pm SD. (B) Test Anova 2 facteurs et Test Tukey de comparaisons multiples. $n= 8$ /groupe excepté pour le groupe de souris sauvages injectées avec l'AAV-TauProAg ($n= 9$), et pour le groupe de souris transgéniques injectées avec l'AAV-TauWT ($n= 4$).

II.F.3. Discussion

Dans cette étude, nous avons souhaité comparer la propagation de la protéine tau selon son niveau d'agrégation dans un contexte amyloïde, avec un groupe contrôle de souris *littermates* sauvages. Nous avons en effet auparavant mis en évidence une augmentation de la propagation de la protéine tau avec son agrégation dans un modèle de souris sauvages, ainsi qu'une augmentation de la propagation de la protéine tau chez les souris APP^{swe}/PSEN1^{dE9} en comparaison avec les souris sauvages. Nous avons donc voulu combiner les deux effets afin de déterminer si l'influence de l'agrégation de la protéine tau sur sa propagation était retrouvée dans un contexte amyloïde. Cette expérience n'a pas permis de mettre en évidence de différence de propagation de la protéine tau entre les groupes. Ces résultats sont préliminaires car, du fait de la mortalité importante des souris, nous avons réalisé les injections au fur et à mesure de leur disponibilité, et la cohorte APP^{swe}/PSEN1^{dE9} injectée avec l'AAV-TauWT n'est pas encore complète à ce jour. Il sera également nécessaire de quantifier le niveau d'agrégation de la protéine tau dans les groupes injectés avec l'AAV-TauProAg. Comme décrit précédemment, bien que cela ne soit pas statistiquement significatif, nous observons une tendance à l'augmentation dans les groupes de souris sauvages et transgéniques injectées avec l'AAV-TauProAg. L'absence de différence statistiquement significative entre les groupes injectés avec l'AAV-TauWT et l'AAV-TauProAg est étonnante

étant donné les résultats précédemment obtenus lors de l'étude de l'effet de l'agrégation de la protéine tau sur sa propagation (PARTIE 2, B.2, page 122). Cependant, il est difficile de comparer les résultats de ces deux études étant donné les nombreuses différences de design expérimental mentionnées ci-dessus. Tout d'abord, la dose de vecteur viral injectée étant deux fois moindre, et ayant démontré un effet-dose lors de l'étude princeps (PARTIE 2, A.1.a, page 110 ; [Figure 44](#)), il est possible que la plus faible expression amoindrisse les écarts de propagation entre les groupes. De plus, ici, nous avons étudié la propagation de la protéine tau seulement un mois après injection, contrairement aux autres expériences. Dans l'étude de l'influence de l'agrégation de la protéine tau sur sa propagation (PARTIE 2, B, page 121) nous avons observé une différence de propagation en fonction du niveau d'agrégation de la protéine tau, 3 mois après injection. Si nous reprenons notre hypothèse précédente selon laquelle la différence de propagation peut être due à la cinétique de propagation des différentes formes de la protéine tau (PARTIE 2, B.3, page 142), il est possible que les différentes formes de la protéine tau ne propagent pas à la même vitesse ce qui mène aux résultats observés dans l'étude de l'influence de l'agrégation chez des souris sauvages (PARTIE 2, B.3, page 142 ; [Figure 55](#)).

Enfin, l'une des différences majeures entre les deux études est l'âge des animaux. Il est probable que l'absence de significativité statistique observée dans cette expérience, alors qu'elle était présente dans l'étude de l'influence de l'amyloïdose (PARTIE 2, E.2, page 144), est que les souris ont ici été injectées plus jeunes et ont donc moins de plaques amyloïdes, diminuant ainsi l'influence de l'amyloïdose par rapport à l'expérience réalisées avec des souris âgées de 18 mois.

Par ailleurs, nous avons noté, lors du comptage du nombre de cellules Tau13 positives du côté contralatéral, la présence de cellules positives dans d'autres régions que celles étudiées auparavant, et notamment dans le subiculum, le cortex rétrosplénial, et le cortex entorhinal, ce qui nous a conduit à injecter quelques animaux supplémentaires pour caractériser les voies neuronales transduites in toto après transparasitisation des tissus. Cela devrait nous permettre de suivre dans un cerveau entier les voies de projections empruntées par la protéine tau lors de sa propagation. Pour cette expérience, nous avons injecté des souris avec le vecteur viral GFP-2A-TauWT-V5 afin d'étudier la propagation de la protéine tau dans l'ensemble du cerveau, après injection dans le gyrus denté en unilatéral. Grâce au marquage de la GFP nous

pourrons visualiser les neurones transduits, et grâce au marquage V5 nous pourrons suivre la protéine tau dans les neurones dans lesquels elle s'est propagée, et cela dans le cerveau entier. Nous pourrons ainsi visualiser l'ensemble des voies de projection empruntées par la protéine tau. De plus, une hybridation *in situ* sur les coupes de cerveau issues de cette expérience est en cours de réalisation afin de s'assurer que les cellules positives observées dans d'autres régions que l'hippocampe le sont bien du fait de la propagation de la protéine tau transgénique, et non d'une transduction à distance par le vecteur.

III. PARTIE 3 – Analyse du profil transcriptomique de la microglie dans un modèle murin d'induction d'une tauopathie par transfert de gènes

Afin de comprendre les résultats obtenus après injection de vecteur rAAV dans l'hippocampe des souris, nous avons réalisé une étude transcriptomique par RNAseq sur les astrocytes triés et les microglies triées de l'hippocampe. Cette étude a été menée dans le cadre d'un projet portant sur les modifications morphologiques et transcriptomiques des astrocytes suite à des injections de rAAV, entraînant la surexpression de la protéine tau, en bilatéral, dans la couche CA1 de l'hippocampe. En parallèle des expériences spécifiques à mon projet de thèse, j'ai eu l'opportunité de réaliser les analyses transcriptomiques de la microglie dans ce modèle. Cette étude a donc été menée sans parti pris initial quant à l'effet des différents paramètres étudiés pendant ma thèse, mais l'utilisation de deux vecteurs viraux permettant l'expression de deux formes de la protéine tau nous a permis de tirer des conclusions sur l'effet de ce facteur sur le profil transcriptomique de la microglie.

III.A. Design expérimental

Pour cette expérience trois groupes de souris C57Bl6J âgées de trois mois (n=5) ont été injectées bilatéralement dans la couche CA1 de l'hippocampe avec respectivement l'AAV-GFP, l'AAV-TauWT ou l'AAV-TauProAg. Trois mois après injection, les hippocampes ont été disséqués et le tri cellulaire a été réalisé par billes magnétiques recouvertes d'anticorps spécifiques de CD11b pour purifier la microglie (Figure 823). L'ARN a été extrait immédiatement après le tri et envoyé pour séquençage à la plateforme GenomEast (Université de Strasbourg). J'ai ensuite eu l'opportunité d'analyser les données de transcriptomique de la microglie.

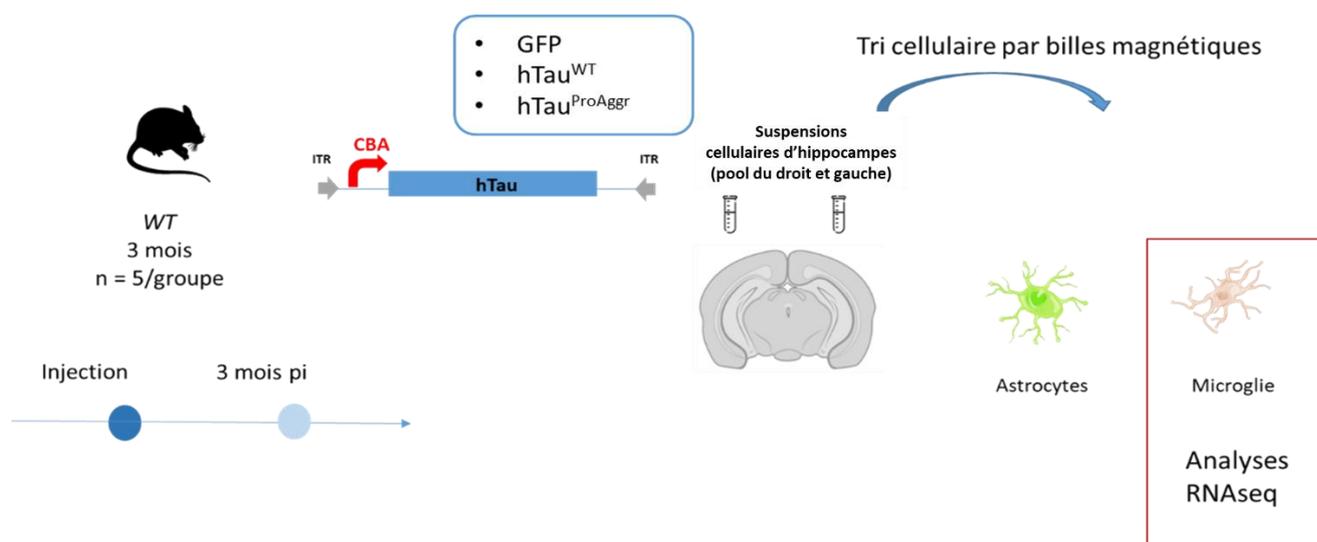


Figure 82. Design expérimental de l'étude transcriptomique des astrocytes et microglies dans le modèle d'injection de rAAV permettant la surexpression de la protéine tau humaine dans l'hippocampe.

III.B. Résultats

Lors du séquençage, l'échantillon n°1 du groupe injecté avec l'AAV-TauProAg a dû être écarté de l'analyse car les résultats de séquençage ne satisfaisaient pas aux critères de contrôle qualité car les ARN étaient de trop faible qualité.

Le design de l'expérience nous a permis de comparer trois conditions :

- GFP vs TauWT
- GFP vs TauProAg
- TauWT vs TauProAg

Pour réaliser ces analyses nous nous sommes servis du logiciel développé par une doctorante du laboratoire dont le travail a été publié et qui permet d'analyser des données de RNAseq à partir d'une interface web (Riquelme-Perez et al. 2022).

La première étape de l'analyse des données de transcriptomique a consisté en une visualisation des données par une analyse en composante principale (ou PCA), réalisée sur les 500 premiers gènes qui varient le plus, parmi les 33210 gènes annotés, entre les différents groupes, nous observons la répartition des groupes en fonction des composantes principales 1 et 2, la première étant responsable de 39% de la variance entre les groupes, et

la seconde de 20% (Figure 83). Cette analyse permet de rendre compte de la variabilité entre les échantillons d'un même groupe expérimental, mais également de la variabilité intergroupe. Il est apparu que les échantillons du groupe GFP sont assez hétérogènes, ce qui n'est pas le cas pour les deux autres groupes expérimentaux. De plus, les groupes GFP et TauWT semblent très similaires tandis que le groupe TauProAg est bien distinct des deux autres groupes.

Cette analyse est confirmée par le nombre de gènes différentiellement exprimés (*differentially-expressed genes* ou DEG) entre chaque condition. En effet, lorsqu'on applique des seuils de de [-0.5 ;0.5] pour le log2foldChange (niveau de surexpression ou de baisse d'expression par rapport à la condition contrôle) et une valeur de p de 0,05 (p-value avec correction de Benjamini-Hochberg et correction FDR (False discovery rate)), les nombres de DEG entre chaque condition sont les suivants :

- WT vs GFP seulement 23 gènes sont différentiellement exprimés (20 uprégulés et 3 downrégulés)
- TauProAg vs GFP nous retrouvons 1643 DEG (904 uprégulés et 739 downrégulés)
- WT vs TauProAg il y a 1945 DEG (1036 uprégulés et 910 downrégulés)

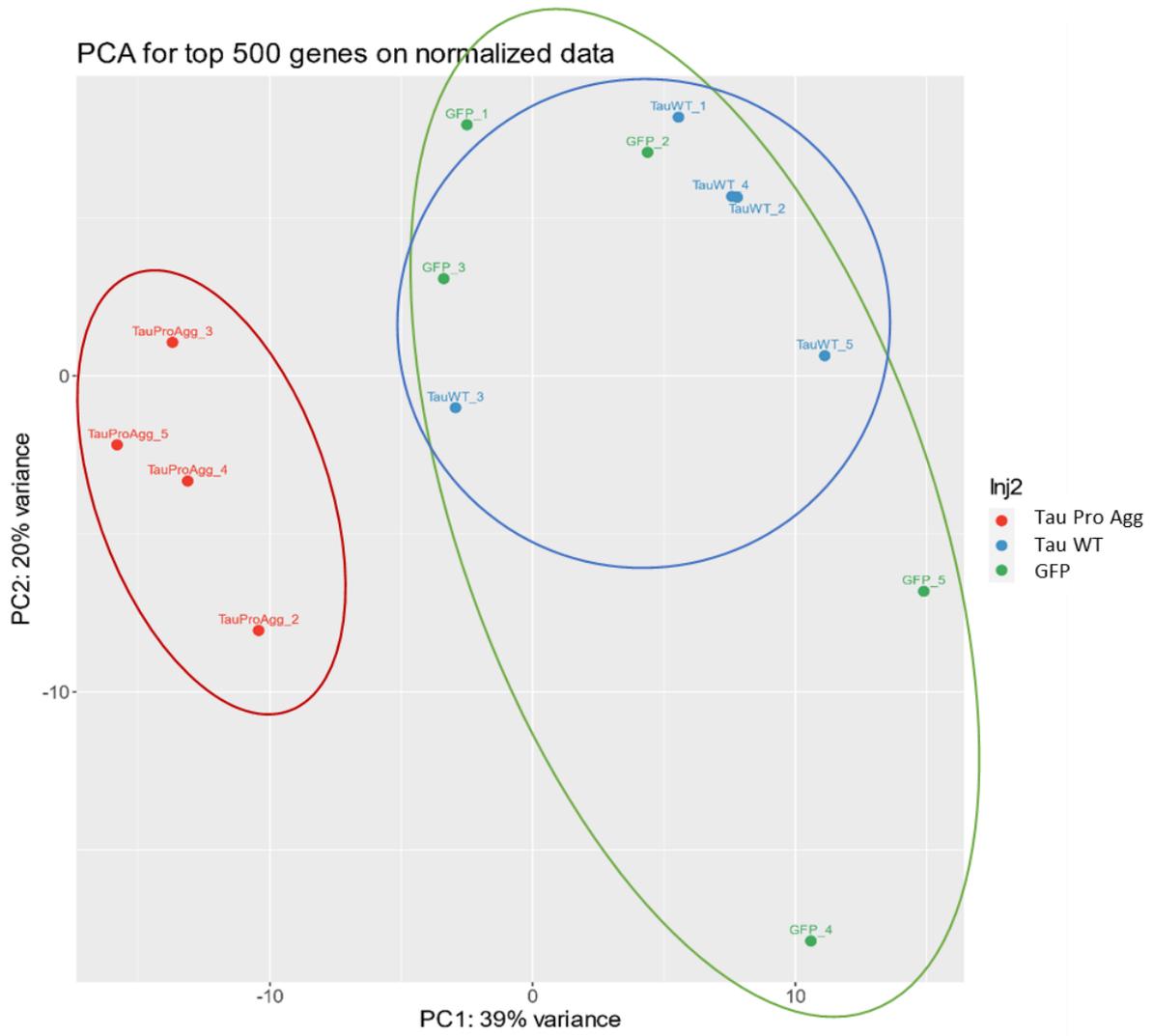


Figure 83. Analyse en composantes principales des échantillons.

Analyse PCA des échantillons, le groupe GFP figurant en vert, le groupe TauWT en bleu et le groupe TauProAgg en rouge. La composante principale 1 représente 39% de la variance inter-individus, et la composante principale 2, 20% de la variance inter-individus.

Pour visualiser les DEG qui pourraient être en communs entre les conditions expérimentales, nous avons réalisé un diagramme de Venn avec tous les DEG mis en évidence dans les trois conditions, c'est-à-dire surexprimés (ou uprégulés) et réprimés (ou downrégulés) (Figure 84).

La forte similarité entre les groupes GFP et TauWT, soupçonnée lors de la visualisation des données par analyse PCA (Figure 83) est confirmée par le nombre de DEG mis en évidence dans cette condition avec seulement 23 DEG, dont 1 seul est spécifique de la comparaison de ces deux groupes (Figure 84).

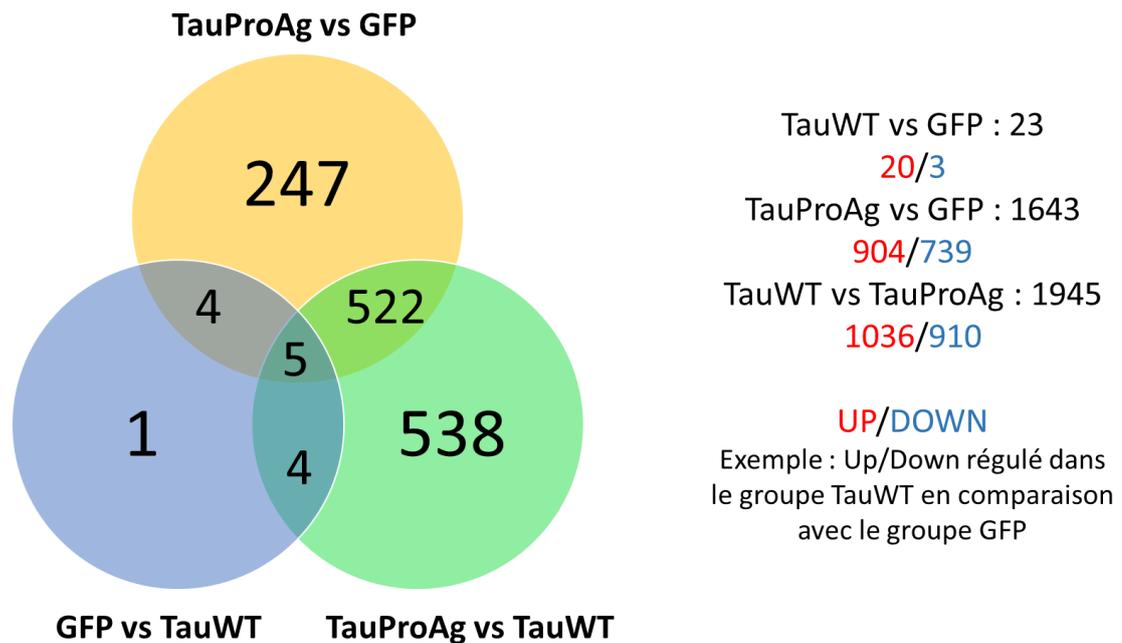


Figure 84. Diagramme de Venn des DEG permettant la visualisation des données.
 Diagramme de Venn des DEG des trois conditions expérimentales (graphe de gauche) et répartition des DEG surexprimés (chiffres en rouge) et des DEG réprimés (chiffres en bleu) pour la comparaison entre les trois conditions expérimentales.

Etant donné la faible différence entre les groupes WT et GFP mise en évidence, nous avons décidé de nous concentrer sur l'analyse de la comparaison du groupe TauProAg avec le groupe contrôle GFP.

Nous avons alors réalisé l'étude des voies de signalisation impactées par l'expression différentielle de ces DEG en réalisant une analyse d'enrichissement (ou enrichment analysis en anglais). Selon l'analyse de la cartographie KEGG, la voie de signalisation la plus significativement différente entre les groupes TauProAg et GFP est la voie de la phosphorylation oxydative. Dans cette condition on retrouve 48 DEG parmi les 135 gènes impliqués dans cette voie, soit plus du tiers des gènes. Et lorsqu'on regarde la voie de signalisation dont le plus de gènes sont différentiellement exprimés, en valeur absolue, on retrouve le groupe des voies métaboliques avec 176 DEG parmi les 1621 gènes impliqués dans ces voies.

Par ailleurs, les voies de signalisation les plus représentées sont des voies qui implique la phagocytose avec des gènes majoritairement surexprimés dans les voies du phagosome et

du lysosome (Figure 85). Au contraire, les voies de signalisation concernant le métabolisme semblent majoritairement réprimées dans le groupe TauProAg par rapport au groupe GFP, notamment la voie de la phosphorylation oxydative (Figure 85).

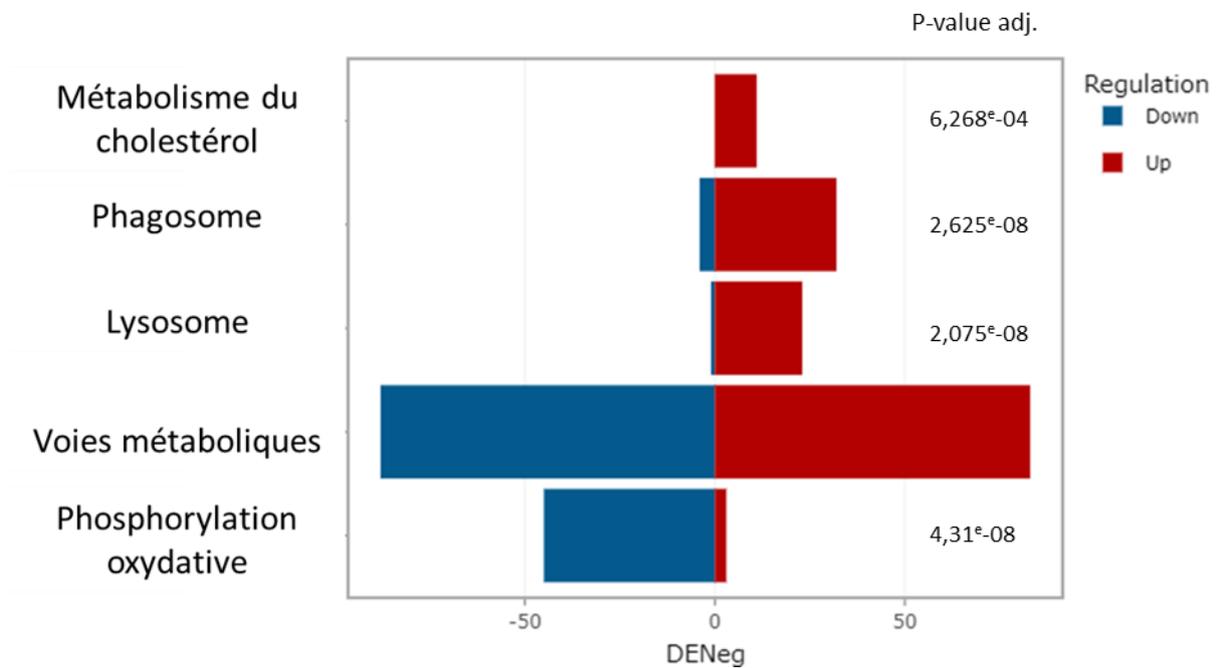
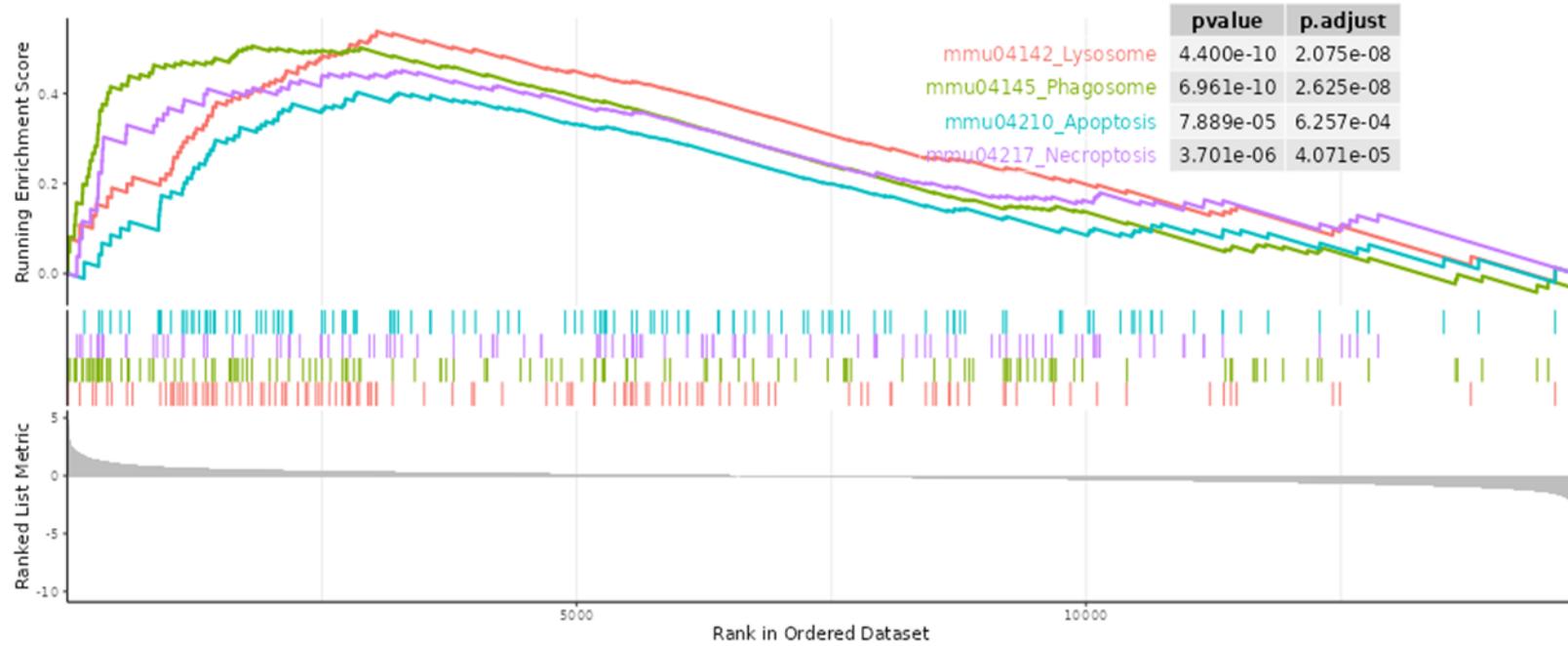
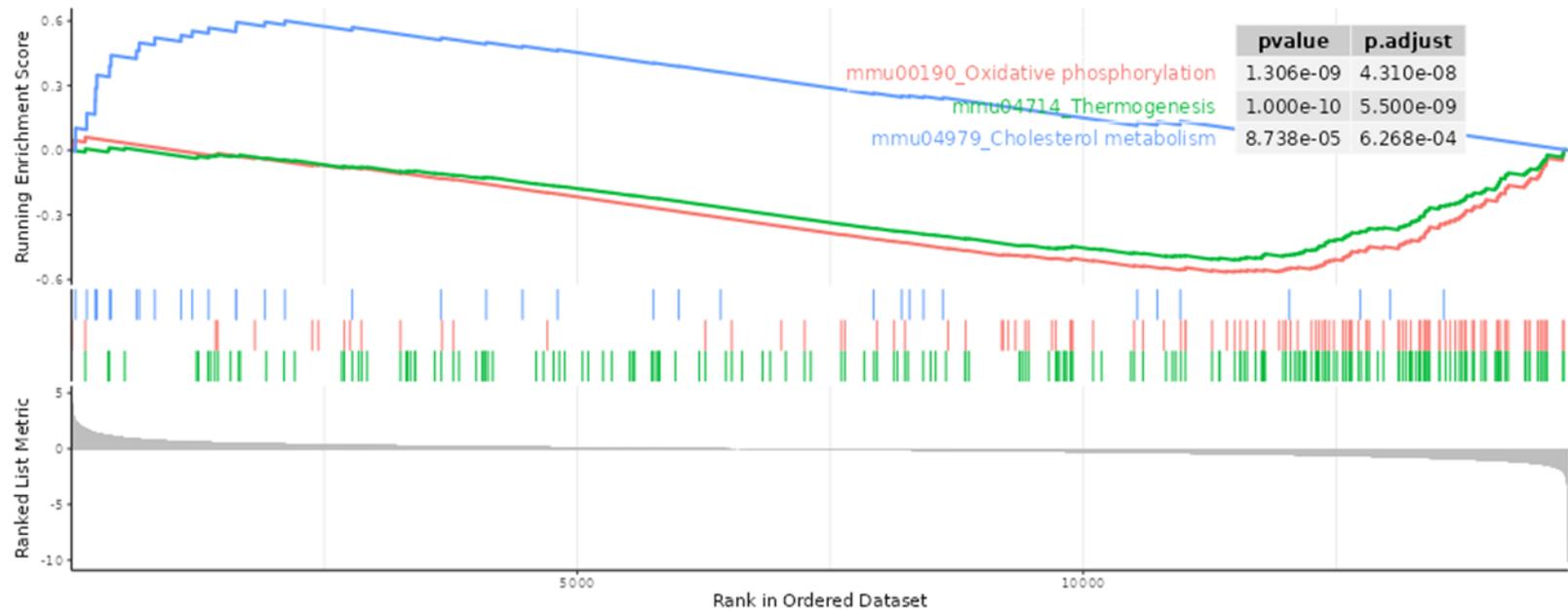


Figure 85. Voies de signalisation les plus représentées dans l'analyse d'enrichissement Kegg.

Nous avons également analysé certaines voies de signalisation par analyse GSEA (pour *gene set enrichment analysis*). Cette analyse repose sur l'étude d'une liste de gènes ordonnés selon leur niveau d'expression, lors de l'étude d'une voie de signalisation. Cette méthode permet d'évaluer si les gènes d'une voie de signalisation sont ordonnés de manière aléatoires ou s'ils sont plutôt aux extrêmes de la liste de gènes. Dès qu'un gène de la liste est surexprimé, l'ES (pour *enrichment score*) augmente, jusqu'à atteindre un maximum, et dès qu'un gène n'est pas exprimé ou réprimé, l'ES diminue, ce coefficient étant pondéré par le rang du gène en question. Ici, les analyses ont été réalisées à partir de la base de données KeggDataGSEA. Lorsque l'on compare les groupes GFP et TauProAg, on observe une forte uprégulation des voies impliquées dans la phagocytose et la mort cellulaire dans le groupe TauProAg par rapport au groupe GFP (Figure 86A). On peut également voir que le métabolisme du cholestérol et la voie de la phosphorylation oxydative ne vont pas dans le même sens : le

métabolisme du cholestérol est uprégulé dans le groupe TauProAg, tandis que la voie de la phosphorylation oxydative est downrégulée (Figure 86B). Enfin, cette analyse met en évidence que les voies concernant la matrice extracellulaire et les glycosaminoglycans sont uprégulées dans le groupe TauProAg (Figure 86C).

A**B**

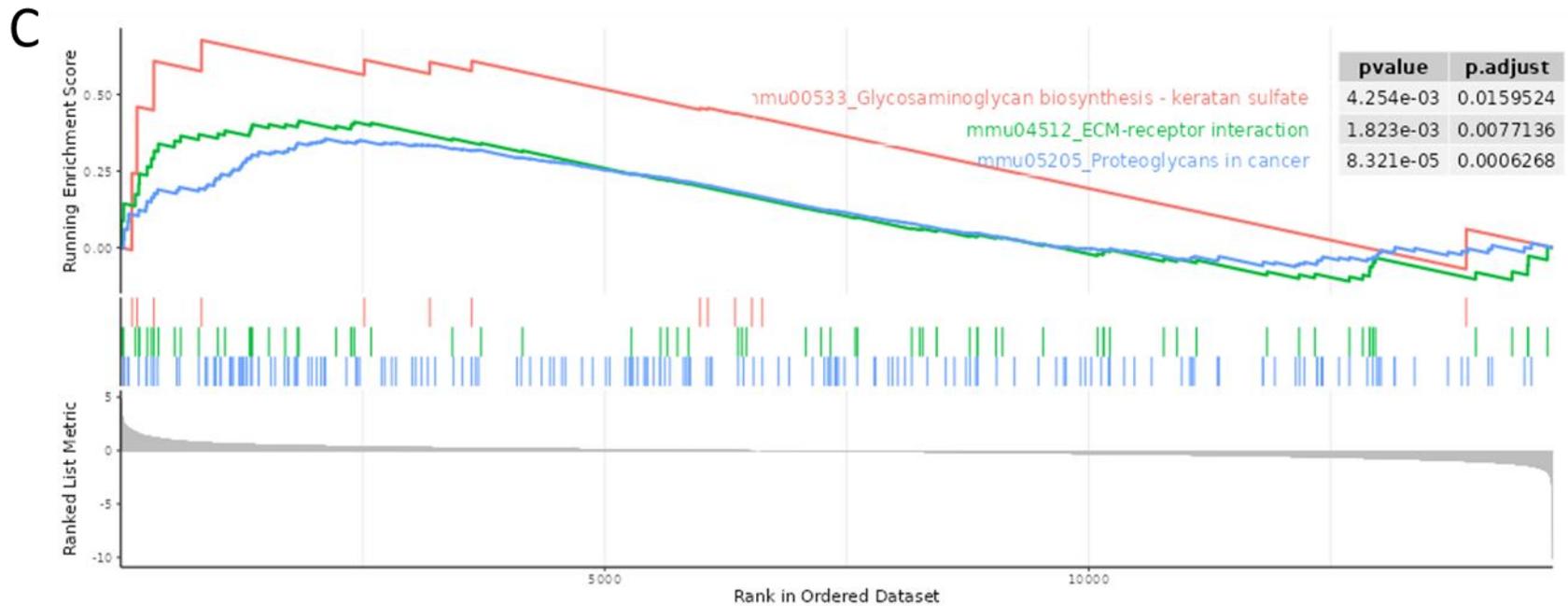


Figure 86. Analyse GSEA

(A) Analyse GSEA des voies de signalisation concernant la phagocytose et les voies de morts cellulaires ; (B) Analyse GSEA des voies de signalisation concernant le métabolisme ; (C) Analyse GSEA des voies de signalisation portant sur la matrice extracellulaire.

Par ailleurs, nous avons également analysé les termes GO (ou *GO terms* pour *gene ontology*) qui pouvaient être mis en évidence. Dans l'analyse par composants cellulaires, nous avons notamment pu observer une forte représentation de termes concernant la mitochondrie (Figure 87).

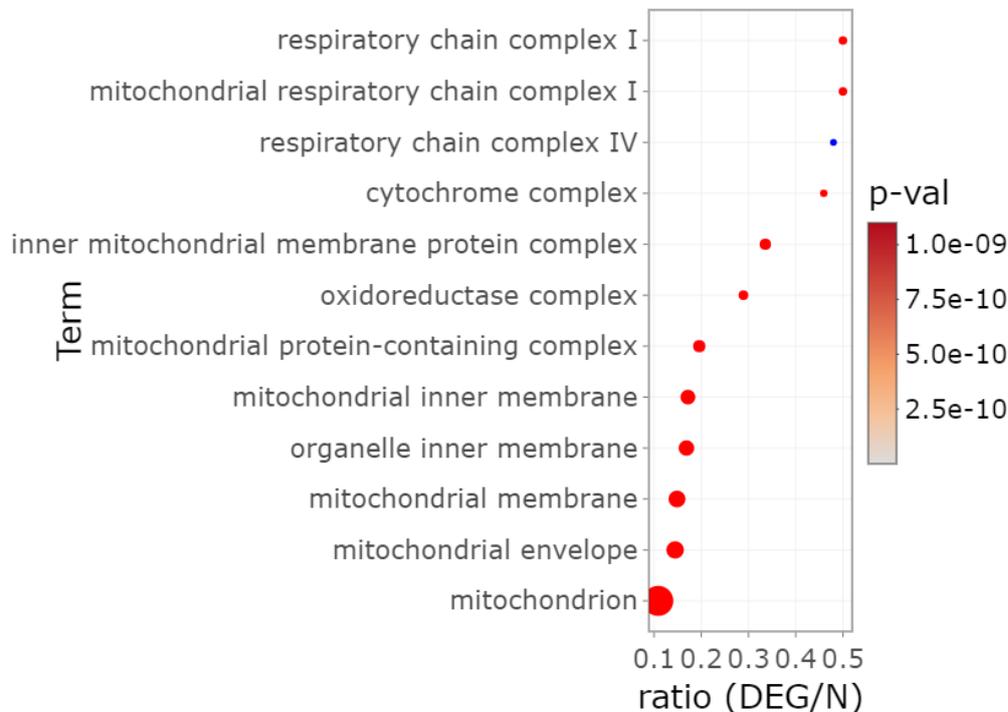


Figure 87. Analyse des termes de la composante cellulaire par gene ontology.

Les termes de la composante cellulaire sont figurés sur l'axe des ordonnées, et le ratio du nombre de gènes dont l'expression est dérégulée (DEG) rapporté au nombre de gènes impliqués dans la voie figure en abscisses. Plus ce ratio est important, plus la part de DEG dans la voie est importante. La graduation colorée indique la classification selon la p-value (plus les voies sont indiquées en rouge, moins cela est significatif) mais toute la gamme concerne des valeurs de p-value statistiquement significative ($p < 0,001$).

Nous avons ensuite regroupé les voies majoritairement dérégulées dans le groupe TauProAg par rapport aux groupes GFP et TauWT (Tableau 3).

	hTauProAg
Lysosome	↗↗
Mitochondrie	↘
Phosphorylation oxydative	↘
Glycolyse	↗

Métabolisme des lipides	↗↗
Transport des lipides	↗
Vacuole / Vésicules	↗
Métabolisme du cholestérol	↗
Glycosaminoglycans	↗

Tableau 3. Récapitulatif des voies dérégulées dans le groupe TauProAg par rapport aux groupes GFP et TauWT.

III.C. Discussion

La comparaison avec le groupe contrôle GFP semble indiquer que, 3 mois après injection, la microglie soit revenue à un profil transcriptomique basal dans le groupe injecté avec le vecteur AAV-TauWT. Il est possible que la toxicité induite par les formes solubles de la protéine tau entraîne une réponse de la microglie de manière aigüe. À l'inverse, le nombre important de DEG mis en évidence dans le groupe TauProAg, en comparaison avec les deux autres groupes, traduit une grande différence de profil transcriptomique microglial, induit par la protéine tau agrégée trois mois après injection. Il semblerait donc que la forme agrégée de la protéine tau induise toujours des modifications importantes du transcriptome microglial trois mois après administration du vecteur.

En ce qui concerne les voies de signalisation mises en évidence dans le groupe TauProAg, une étude de la littérature montre des modifications similaires dans d'autres modèles d'études de la maladie d'Alzheimer. En effet, le métabolisme microglial est de plus en plus étudié ces dernières années, et des changements drastiques des voies métaboliques principales utilisées par la microglie ont été mis en évidence (Fairley, Wong, et Barron 2021). Il semblerait que l'exposition au peptide A β participe à une reprogrammation métabolique de la microglie qui se trouve caractérisé par une diminution de la voie de la phosphorylation oxydative, et une augmentation de la glycolyse, s'accompagnant par ailleurs d'une augmentation de l'activité phagocytaire (Baik et al. 2019; Bennett et Liddelow 2019). Lors d'une exposition prolongée aux lésions amyloïdes, la microglie est activée de manière chronique et devient tolérante face aux lésions, avec une diminution de la réponse immunitaire et de la phagocytose.

Par ailleurs, la reprogrammation de la microglie vers une activité glycolytique plus importante, entraîne également une dérégulation du métabolisme mitochondrial avec une altération du

cycle de Krebs qui favorise la production de lactate, de cytokines pro-inflammatoires mais également la formation de vésicules lipidiques (Fairley, Wong, et Barron 2021).

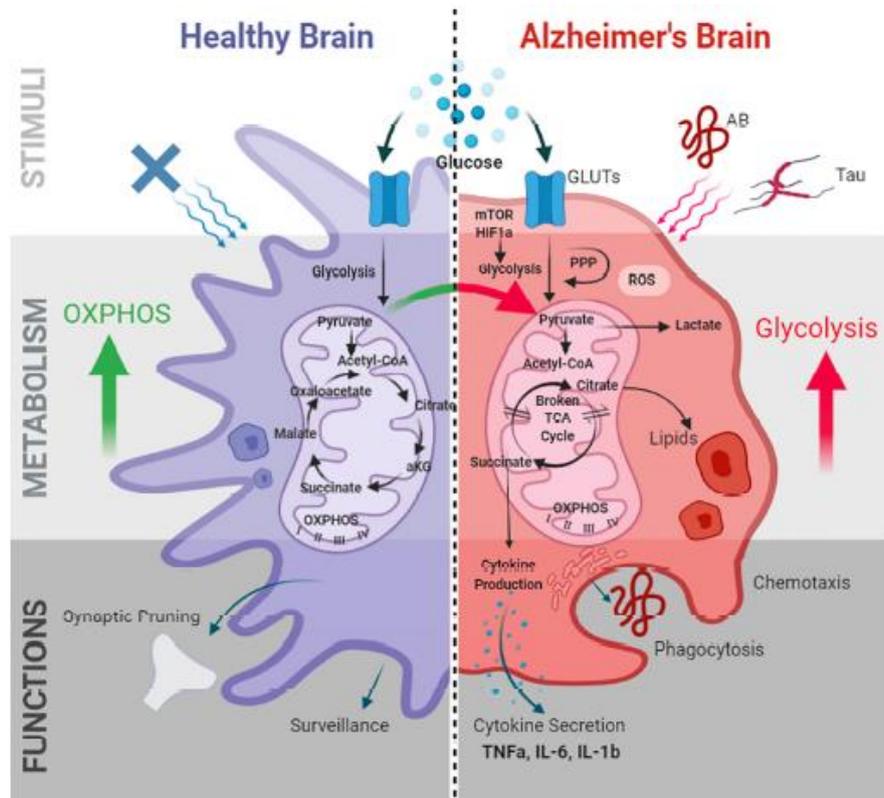


Figure 88. Reprogrammation métabolique de la microglie dans le cadre de la Maladie d'Alzheimer.

D'après Fairley et al. 2021

Dans l'ensemble, il semblerait donc que notre modèle de surexpression de la protéine tau pro-agrégeante entraîne un phénotype métabolique semblable à celui retrouvé dans des modèles de la maladie d'Alzheimer avec les composantes amyloïdose et tauopathie.

Par ailleurs, un autre type de modification mitochondriale a pu être mise en évidence dans le domaine des maladies neurodégénératives. Il a été montré, *in vitro*, que la microglie était capable de transmettre ses mitochondries, via des nanotubes, aux neurones en souffrance dans un modèle de maladie de Parkinson (Scheiblich et al. 2021). Il serait intéressant d'approfondir l'activité mitochondriale de la microglie et son rôle dans la pathologie.

En ce qui concerne les voies de signalisation de la matrice extracellulaire mises en évidence dans cette expérience, cela confirme notre hypothèse énoncée plus haut (PARTIE 1, B.3., page 107) selon laquelle la modification de la matrice extracellulaire par l'âge et la tauopathie est

un domaine d'étude intéressant, et à mettre en rapport avec un potentiel rôle de la microglie dans ces modifications.

DISCUSSION GENERALE

La recherche sur l'étiologie de la MA demeure d'intérêt public. En effet les données prévisionnelles estiment que le nombre de cas triplera d'ici 2050. Il est donc primordial de comprendre les mécanismes sous-jacents au développement de la pathologie afin de développer des traitements efficaces. Malgré des avancées majeures dans ce domaine avec la mise sur le marché américain de deux anticorps anti-A β , et les résultats très prometteurs d'un troisième, le besoin n'est toujours pas totalement couvert.

La recherche sur la tauopathie a explosé ces dernières décennies après la mise en évidence de la forte corrélation entre la progression spatio-temporelle de la tauopathie et les symptômes cognitifs dans le cadre de la MA.

Dans ce contexte, notre projet s'est intéressé aux mécanismes qui sont à l'origine de la propagation de la protéine tau. Pour ce faire nous avons développé deux nouveaux modèles *in vivo* basés sur le transfert de gènes par injection de vecteurs rAAV. Les modèles induits par injection de vecteurs rAAV sont en effet particulièrement intéressants pour étudier les mécanismes de la propagation car ce sont des modèles focaux qui permettent l'induction de la pathologie dans une région définie et ainsi d'étudier la propagation à partir de cette région, contrairement aux modèles transgéniques pour lesquels la pathologie se développe de manière concomitante dans différentes régions. Cela permet de choisir la région cible et ainsi d'optimiser la distance entre les neurones afférents et efférents afin de bien distinguer les neurones transduits par le vecteur viral, de ceux qui sont affectés dans un second temps après propagation de la protéine tau.

I. Rappel des principaux résultats

I.A. Le modèle intravitréen

Nous avons tout d'abord montré que le ciblage du circuit des voies visuelles peut être un bon outil pour étudier la tauopathie car on retrouve les caractéristiques connues de la tauopathie dans les RGCs transduites, à savoir de la protéine tau hyperphosphorylée dans la rétine, le nerf optique et les arborisations terminales du neurone, ainsi qu'une réactivité astrocytaire et microgliale. Ce modèle a ensuite été appliqué à des souris déficientes pour le gène *Trem2* qui

présente un défaut d'activation microgliale. Cela a permis de mettre en évidence un potentiel rôle protecteur de la déficience en *Trem2* face à la toxicité induite par la tauopathie.

Ce modèle d'injection intravitréenne a également été utilisé pour étudier la tauopathie et sa propagation chez des souris âgées de 15 mois. Une aggravation de la tauopathie ainsi qu'une augmentation de la réactivité astrocytaire ont été mises en évidence dans ce contexte.

En ce qui concerne la propagation de la protéine tau, aucun corps cellulaire marqué V5, spécifique de la protéine tau induite, n'a été mis en évidence chez les souris sauvages jeunes, ni les souris déficientes pour *Trem2*. En revanche, des cellules V5+ ont été retrouvées dans les colliculi supérieurs des souris âgées de 15 mois.

Nos résultats obtenus sur des souris âgées de 15 mois suggèrent une différence de sensibilité pour la protéine tau chez les souris âgées, qui pourrait s'expliquer par des différences de composition de la matrice extracellulaire ou une vulnérabilité des neurones plus importante.

D'après la littérature, des modifications de la matrice extracellulaire peuvent être observées avec le vieillissement (Brewton et al. 2016; Foscarin et al. 2017; Yamada, Ohgomori, et Jinno 2017), ainsi qu'après interaction avec la protéine tau (S. Schmidt et al. 2022). Nous avons donc étudié l'effet des réseaux péri-neuronaux (PNN) sur la propagation de la protéine tau. Pour ce faire, nous avons injecté de la chondroïtinase, une enzyme permettant la dégradation de la chondroïtine-sulfate, dans le colliculus supérieur gauche, un mois après l'injection des AAV-TauWT en intravitréen. Cette étude a permis de mettre en évidence une dégradation des PNN dans le colliculus supérieur gauche en présence de la protéine tau après injection de la chondroïtinase. De plus, il semblerait que des cellules V5+ soient observées dans le colliculus supérieur de ces souris. Cependant, lors de ces analyses nous avons remarqué une faible densité en PNN dans cette sous-région cérébrale. Il serait donc intéressant d'étendre cette expérience à d'autres régions cérébrales, contenant plus de PNN, pour pouvoir conclure sur le lien entre la matrice extracellulaire et la propagation de la protéine tau.

I.B. Le modèle du gyrus denté

Le but initial de mon projet était d'étudier le rôle de la microglie dans la propagation de la tauopathie, et les résultats obtenus avec le modèle ciblant les voies visuelles, ne montrant de la propagation que chez des souris âgées, ne facilitait pas la mise en place des expériences.

Pour cette raison, nous avons voulu développer un second modèle présentant une propagation plus importante et facilement quantifiable de la tauopathie. Nous nous sommes pour cela tournés vers l'injection unilatérale de vecteurs dans le GD afin de cibler les cellules moussues.

Ce modèle a été validé avec les différentes versions de tau dont nous disposons au laboratoire et qui permettent l'expression de différentes formes de la protéine tau humaine : TauWT pour la protéine tau sauvage hyperphosphorylée et soluble, TauP301L pour la protéine tau mutée P301L agrégée et neurotoxique et enfin TauProAg qui permet l'agrégation de la forme sauvage grâce à l'ajout d'une seed dans le transgène, ce qui diminue sa neurotoxicité. Nous avons observé des cellules marquées par différents anticorps spécifiques de la protéine tau dans le gyrus denté contralatéral, et dans l'hippocampe contralatéral après injection de ces trois AAV, illustrant la propagation de la protéine tau dans l'hippocampe contralatéral. De plus, des expériences d'hybridation *in situ* ont montré l'absence de génome viral du côté contralatéral, confirmant ainsi la propagation de la protéine tau.

Après avoir testé en vain plusieurs alternatives afin d'obtenir une agrégation suffisante de la protéine tau après injection d'un vecteur contenant la GFP et le tag V5, nous avons décidé d'utiliser les vecteurs CBA-Tau développés et validés précédemment au laboratoire (D'Orange et al. 2018). La protéine tau induite après expression de ces vecteurs est d'une part détectable par les anticorps HT7 et Tau13, qui sont spécifiques de la protéine tau humaine totale, et permettent de s'affranchir du tag V5, et d'autre part, l'hybridation *in situ* et la présence d'un groupe contrôle injecté avec le transgène GFP nous permet d'être suffisamment confiants dans le fait que les cellules positives pour le marquage tau, observées en contralatéral, ne sont pas des cellules transduites par les vecteurs.

Ayant ainsi démontré que notre modèle ciblant la couche polymorphique du gyrus denté permet l'étude de la propagation de la protéine tau, nous l'avons ensuite appliqué à différents paradigmes expérimentaux :

- L'effet de l'agrégation de la protéine tau sur sa propagation avec des souris WT injectées avec les différentes versions du transgène tau.
- L'étude de l'effet de l'activation microgliale avec l'utilisation de souris transgéniques invalidées pour *Trem2*.

- L'étude de l'effet de l'âge avec des souris âgées de 15 mois.
- L'étude de l'influence de l'amyloïdose avec l'utilisation de souris transgéniques APP/PS1dE9 âgées de 18 mois.
- L'effet de l'agrégation de la protéine tau dans un contexte d'amyloïdose.

Dans l'ensemble tous nos résultats montrent que la protéine tau, peu importe sa forme, est capable de propager du GD ipsilatéral vers le GD contralatéral. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence d'impact du vieillissement et de l'activation microgliale via TREM2 sur la propagation de la protéine tau dans un contexte de tauopathie pure. Au contraire, l'agrégation de la protéine tau et l'amyloïdose semblent potentialiser la propagation de la protéine tau (Tableau 4).

Etude	Âge	Sexe	Modèle	Vecteur viral	Temps post-injection	Résultat principal
Influence de l'agrégation de la protéine tau	3 mois	Mâles	Souris sauvages	CBA-Tau	3 mois pi Et 1 mois pour TauP301L	L'agrégation de la protéine tau potentialise sa propagation
Influence du niveau d'expression microglial de TREM2	3 mois	Mâles Et Femelles	Souris de la lignée <i>Trem2^{-/-}</i>	SYN2-GFP-2A-TauWT-V5	3 et 6 mois pi	Pas d'influence sur la propagation de la protéine tau
Influence de l'amyloïdose	18 mois	Mâles	Souris APP ^{swe} /PSEN1dE9	SYN2-GFP-2A-TauWT-V5	3 mois pi	L'amyloïdose potentialise la propagation de la protéine tau
Influence de l'agrégation de la protéine tau dans un contexte d'amyloïdose	5 mois	Femelles	Souris APP ^{swe} /PSEN1dE9	CBA-Tau	1 mois pi	Tendance à l'augmentation de la propagation avec les formes agrégées
Influence de l'âge	15 mois	Mâles	Souris sauvages	SYN2-GFP-2A-TauWT-V5	1 mois pi	Pas d'influence sur la propagation de la protéine tau

Tableau 4. Tableau récapitulatif des paradigmes expérimentaux étudiés dans le modèle d'injections des vecteurs rAAV dans le GD et résultats principaux.

Plus spécifiquement, nous avons étudié l'impact de l'activation microgliale via son récepteur TREM2 sur la propagation de la tauopathie, notamment car il a été montré que le niveau d'expression de *Trem2* joue un rôle dans l'aggravation de la tauopathie, cependant, aucune différence de propagation n'a pu être mise en évidence. Comme nous le discutons précédemment (PARTIE 2 ; C.3, page 137), trois pistes majeures ressortent des résultats publiés ces dernières années. Tout d'abord, il serait intéressant d'implémenter notre modèle d'étude de la propagation de la protéine tau, ciblant le GD, chez des souris exprimant le gène *TREM2* humain afin de valider, ou d'infirmer les résultats que nous avons obtenus dans notre étude. De plus, afin de nous assurer que nous n'avons pas quantifié la propagation trop tôt dans ce modèle, par rapport à l'effet « stade de la pathologie-dépendant » de la microglie, il serait intéressant d'étendre notre étude à des temps plus tardifs après l'injection des vecteurs viraux. Enfin, nous aimerions évaluer la propagation de la protéine tau dans un modèle transgénique d'amyloïdose couplé à une déficience en *Trem2*.

En ce qui concerne l'étude de l'influence du vieillissement sur la propagation de la protéine tau, cette étude n'a pas permis de mettre en évidence de différence de propagation de la protéine tau entre les deux groupes. De plus, la tauopathie n'a pas induit de différence d'atrophie cérébrale entre les groupes. Comme nous le discutons précédemment (PARTIE 2, D.3), il est envisageable que la surexpression de la protéine tau hyperphosphorylée et soluble n'entraîne pas de différence de propagation entre les deux groupes, un mois après injection, car la cinétique de propagation de la forme soluble est plus lente que celle des formes agrégées. Afin d'élucider cette question, il serait intéressant de réitérer l'expérience en mettant en place une étude longitudinale avec injection des vecteurs viraux induisant l'expression des différentes formes de la protéine tau, et des analyses de la propagation à différents temps après injection.

En revanche, nous avons montré, grâce à l'injection de différentes versions de tau, que l'agrégation de la protéine semble favoriser sa propagation ([Figure 55](#) ; PARTIE 2. B.2., page 122). Or, notre analyse de l'agrégation de la protéine montre une très faible voire absence d'agrégation du côté contralatéral à l'injection du vecteur, ce qui suggère que ce ne sont pas les formes agrégées qui propagent. Il semblerait que la forte densité en agrégats de protéine tau en ipsilatéral favorise et accélère la formation de seeds et leur propagation en contralatéral. Ces résultats concordent avec l'étude de l'équipe d'Hyman qui a comparé la

propagation de la protéine tau après injection d'AAV permettant la surexpression de la protéine tau humaine sauvage (TauWT) ou agrégée mutée P301L (TauP301L). Cette étude montre que les formes agrégées propagent plus vite que les formes solubles (Wegmann et al. 2019). Notre étude permet d'apporter l'information que des formes agrégées non mutées, qui sont celles que l'on retrouve dans le contexte de la maladie d'Alzheimer, permettent la même observation.

Nos résultats concordent également avec l'hypothèse selon laquelle la protéine tau propage davantage quand elle est capable de seeding et donc d'agrégation, ce qui rejoint l'hypothèse selon laquelle la tauopathie est une pathologie « prion-like », dont la propagation fonctionne selon le même modèle que celui de la protéine prion (Falcon et al. 2015; Michel Goedert, Eisenberg, et Crowther 2017; Michel Goedert, Masuda-Suzukake, et Falcon 2017).

De nombreux articles ont montré l'importance des exosomes dans les mécanismes de propagation de la protéine tau : d'une part les exosomes excrétés par les neurones (Dujardin, Bégard, et al. 2014) ; d'autre part ceux excrétés par la microglie (Zhu et al. 2022; Clayton et al. 2021; Asai et al. 2015). Une des hypothèses pour expliquer la différence de propagation de la protéine tau en fonction de son niveau d'agrégation pourrait donc être sa prise en charge par ces vésicules. Comme aucune étude actuellement ne montre quelles formes de tau sont contenues dans les vésicules extracellulaires et s'il y a une différence de prise en charge en fonction des formes qui y sont contenues, nous avons commencé à étudier, au cours de la dernière année de mon projet de thèse, la contenance en protéine tau des vésicules extracellulaires, en fonction des formes de la protéine tau, hyperphosphorylée et soluble, ou fortement agrégée. L'étude est en cours de réalisation au laboratoire.

En résumé, plusieurs hypothèses peuvent être déduites de nos résultats (Figure 89). Tout d'abord il est possible que la capacité de propagation des seed de tau, produit à partir des agrégats de tau, soient plus aptes à la propagation que la protéine tau soluble, ou plus rapides. Ensuite on peut imaginer que ces différentes formes induisent une production de vésicules extracellulaires différente, que ce soit par la microglie ou par les neurones, ce qui faciliterait ensuite la propagation. Et enfin, on peut faire l'hypothèse que ces différentes formes de tau sont prises en charge différemment par la microglie : la protéine tau soluble est plus facile à dégrader, et la dégradation incomplète des agrégats mène à la production de plus de seed de tau.

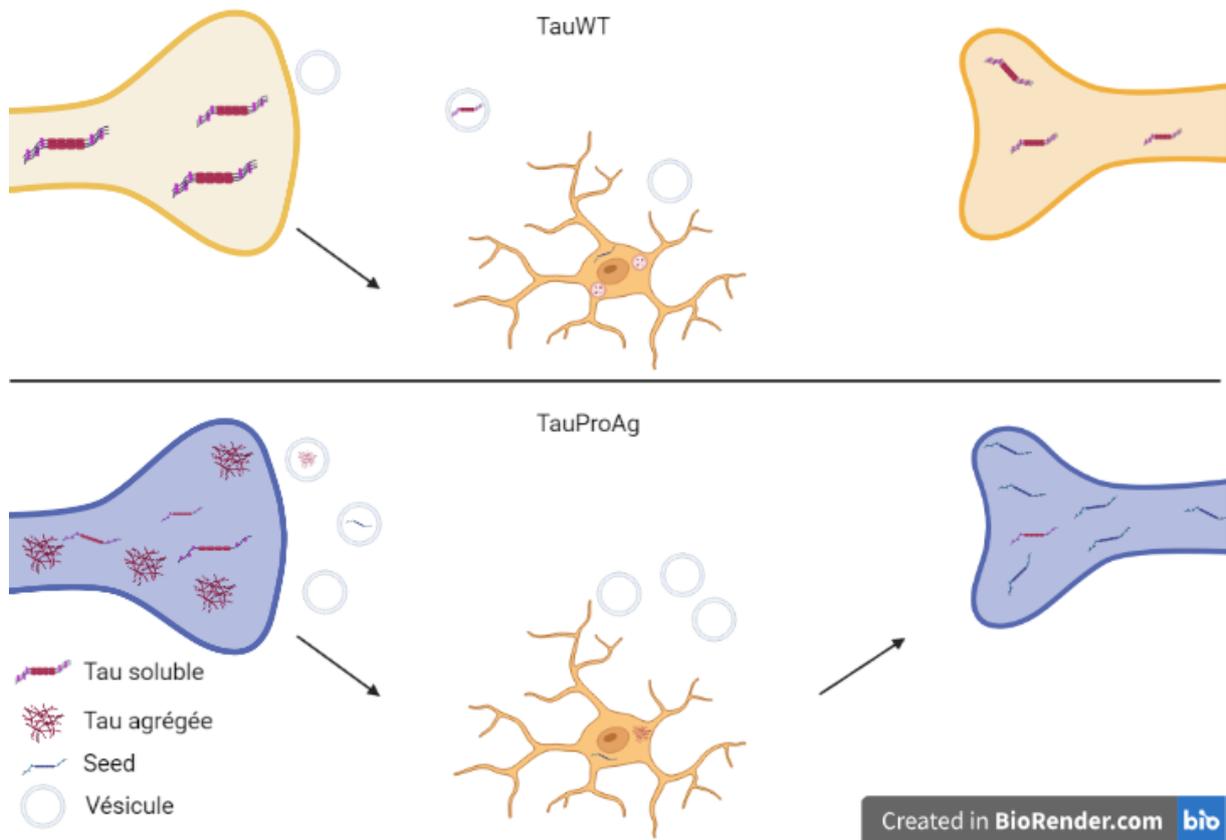


Figure 89. Schéma récapitulatif des hypothèses issues de l'étude de l'agrégation de la protéine tau.

Par ailleurs, la comparaison de souris transgéniques APP^{swe}/PSEN1^{dE9} âgées de 18 mois avec des souris sauvages du même âge a montré une augmentation d'un facteur 3 de la propagation de la protéine tau, dans le GD, en présence de plaques amyloïdes. Ces résultats sont en adéquation avec de nombreux résultats publiés récemment (Pascoal et al. 2021; Clayton et al. 2021; Gratuze et al. 2021; Leyns et al. 2019). Nous avons également montré que l'injection de rAAV n'induit pas de changement de taille ou de nombre de plaques amyloïdes dans différentes régions cérébrales. Une étude de la propagation de la protéine tau du côté ipsilatéral est actuellement en cours, et les premiers résultats semblent montrer une propagation de la protéine tau du côté ipsilatéral moindre chez les souris APP^{swe}/PSEN1^{dE9} que chez les souris sauvages. Des études complémentaires seront nécessaires afin de comprendre les mécanismes sous-jacents, mais il est envisageable que cela soit dû à une mort neuronale, induite par le contexte pathologique, qui aurait lieu de manière précoce du côté ipsilatéral et entrainerait la mort des neurones dans lesquels la protéine tau a propagé. Une

analyse histologique des neurofilaments et de la neurodégénérescence permettra d'étayer cette hypothèse. Il serait intéressant d'évaluer la distance entre les plaques amyloïdes et les neurones dans lesquels la protéine tau propage afin de rendre compte de l'impact direct ou indirect des plaques amyloïdes sur la propagation de la protéine tau.

Enfin, étant donné les résultats intéressants obtenus lors de l'étude de l'influence de l'agrégation de la protéine tau sur sa propagation et l'étude de l'influence de l'amyloïdose, nous avons voulu vérifier l'effet de l'amyloïdose sur les formes agrégées de la protéine tau. Cette étude montre une tendance à l'augmentation de la propagation dans les groupes injectés avec l'AAV-TauProAg, cependant aucun résultat significatif n'a été mis en évidence pour le moment. Des études complémentaires sont nécessaires pour caractériser ce modèle. Il est notamment prévu, dans les derniers mois de ce projet de thèse, de finaliser l'analyse de la propagation avec la dernière cohorte de souris APP^{swe}/PSEN1^{dE9} injectées avec l'AAV-TauWT, mais aussi d'étudier la morphologie de la microglie dans la couche granulaire du GD contralatéral.

II. Limites de notre étude

Dans l'ensemble, le modèle ciblant le gyrus denté est un modèle innovant pour étudier la propagation de la protéine tau de par le choix de la région cible combiné au choix du vecteur. Cependant il faut noter que pour ce projet nous n'avons étudié la propagation de la protéine uniquement sur des coupes recouvrant la région de l'hippocampe (coupes de 30 à 40 μm d'épaisseur s'étageant entre les niveaux antéro-postérieurs -0,8 mm à -4,5 mm par rapport à la référence du bregma). Nous avons cependant observé des cellules positives après marquage de la protéine tau totale dans d'autres régions cérébrales que l'hippocampe contralatéral. Des cellules positives ont notamment été observées dans le cortex rétrosplénial et le cortex entorhinal. Pour cette raison, nous avons réalisé des hybridations *in situ* sur les expériences où ce type d'observation était le plus fréquent, en particulier les études de l'influence de l'agrégation de la protéine tau sur sa propagation, dans un contexte d'amyloïdose ou non. Une dernière expérience d'hybridation *in situ* est en cours afin de nous assurer de l'absence de génome viral dans tout l'hémisphère contralatéral, et non plus

simplement dans l'hippocampe contralatéral. De plus, une expérience de transposition de cerveaux injectés avec le vecteur GFP-2A-TauWT-V5 est également en cours afin d'analyser les régions transduites sur un cerveau entier ainsi que toutes les zones de projection depuis ce volume transduit.

Pour aller plus loin avec ce modèle, il serait intéressant de l'implanter dans d'autres souches murines. Deux publications récentes ont en effet montré que toutes les souches de souris n'ont pas la même sensibilité à la propagation de la protéine tau (Dujardin et al. 2022; Welikovitch et al. 2023). Ces études ont permis de rendre compte de niveaux de transduction après injection dans le cortex entorhinal de rAAV comparables à ceux que nous avons utilisés. Ils montrent que selon la souche de souris utilisées, le niveau de transduction n'est pas le même, et par conséquent le niveau de propagation de la protéine tau n'est pas le même.

Par ailleurs une étude très récente analysant les voies de propagation de la protéine tau dans un modèle transgénique de tauopathie, le modèle PS19, par analyse longitudinale sur des cerveaux entiers de souris âgées de 3 à 12 mois, a montré la capacité de la protéine tau à propager de manière rétrograde (Ramirez et al. 2023). Cette étude montre en effet que la protéine tau mutée P301S est capable de propager avec l'âge sur l'axe rostro-caudal, allant des régions rostrales vers les caudales. Cette analyse poussée de la connectivité des régions cérébrales a par ailleurs mis en évidence que la propagation de la protéine tau dans les modèles transgéniques de tauopathie suit également des régions synaptiquement connectée. Cela interroge sur la possibilité que ce phénomène de propagation rétrograde ait lieu dans notre modèle. Bien que nous ayons réalisé des expériences d'hybridation in situ pour confirmer que la protéine tau observée en contralatéral est présente du fait de sa propagation et non du fait de la diffusion du virus, il serait intéressant également d'étudier la possibilité d'une propagation rétrograde, dans d'autres régions.

L'une des principales limites du modèle d'étude de propagation de la tauopathie par transfert de gène que nous avons développé au cours de mon projet de thèse est le manque de reproductibilité du site d'injection des vecteurs viraux. En effet, nous avons mis en évidence lors de cette thèse une hétérogénéité des régions transduites. Cela nous a notamment posé problème dans l'étude de l'influence de l'âge pour laquelle nous avons été contraints de retirer des animaux de l'analyse. Cette hétérogénéité est très sensible mais peut induire des différences de propagation de la protéine tau. En effet, lorsqu'on met en relation les faits

précédemment énoncés, qui montrent une propagation selon des axes fortement connectés synaptiquement, si certaines cellules sont transduites chez une souris et pas l'autre on peut ensuite observer de la protéine tau dans des régions cérébrales différentes. Cette observation et critique sur notre modèle n'enlève en rien son intérêt pour étudier la propagation, cependant cela peut expliquer pourquoi nous observons des cellules positives pour la protéine tau dans d'autres régions receveuses que l'hippocampe contralatéral, comme le cortex rétrosplénial ou entorhinal par exemple.

Ces derniers éléments de discussion confortent notre idée de réaliser une transparasitisation sur cerveau entier avec un marquage spécifique de V5 et GFP afin d'évaluer visuellement les régions transduites, et les régions dans lesquels la protéine tau propage dans un cerveau entier, et non plus seulement dans l'hippocampe.

III. Perspectives

Au-delà des pistes d'expériences supplémentaires déjà mentionnées précédemment nécessaires pour vérifier certains mécanismes comme l'étude de la propagation de la protéine tau, sous différentes formes, dans les modèles de déficience en *Trem2* et de vieillissement, il serait intéressant de comprendre les résultats obtenus avec les formes agrégées de la protéine tau et en présence de plaques amyloïdes.

Nous avons discuté de plusieurs pistes qui pourraient étayer certains mécanismes.

Tout d'abord une étude plus fine de la contenance des vésicules extracellulaires permettrait peut-être d'expliquer la différence de propagation entre les formes agrégées et solubles de la protéine tau. On peut imaginer que si les formes agrégées sont davantage prises en charge par des vésicules que la protéine tau soluble cela permet une protection face à la dégradation et ainsi une propagation plus rapide, ou alors au contraire cela permet davantage la phagocytose par la microglie et la dégradation partielle (Hopp et al. 2018) qui améliore les capacités de seeding de la protéine tau.

Il serait également intéressant d'approfondir l'étude de la matrice extracellulaire et ses modifications avec le vieillissement, ainsi que sa dégradation par la microglie, potentiellement par une étude de transcriptomique spatiale, mais également ses interactions avec les différentes formes de protéine tau.

De nombreuses études et nos résultats concordent vers un effet important de l'amyloïdose sur la propagation de la protéine tau, de plus cet effet semble synergique avec l'activation microgliale. Il serait intéressant d'approfondir l'étude des mécanismes impliqués dans cette synergie et notamment de comprendre si le peptide A β sert de ligand au récepteur TREM2 ce qui permet l'activation de la microglie et potentialise la phagocytose de la protéine tau. Mais le fait que le peptide A β joue le rôle de ligand n'est pas encore démontré. Il est également possible que la microglie, en phagocytant les dépôts amyloïdes, devienne réactive et ainsi favorise la phagocytose de la protéine tau. Il serait intéressant de comprendre si l'amyloïdose a un effet direct sur la microglie et sur la propagation de la protéine tau, ou si cet effet est indirect.

Enfin, il serait intéressant d'étudier le profil transcriptomique de la microglie dans ce modèle afin de mettre en évidence les changements induits par la propagation de la protéine tau. Ce modèle étant idéal pour une étude de transcriptomique spatiale il serait intéressant de réaliser l'analyse transcriptomique avec cette technique pour identifier clairement le profil transcriptomique de la microglie à proximité des neurones dans lesquels la protéine tau propage.

BIBLIOGRAPHIE

- Abounit, Saida, Jessica W. Wu, Karen Duff, Guiliana Soraya Victoria, et Chiara Zurzolo. 2016. « Tunneling Nanotubes: A Possible Highway in the Spreading of Tau and Other Prion-like Proteins in Neurodegenerative Diseases ». *Prion* 10 (5): 344-51. <https://doi.org/10.1080/19336896.2016.1223003>.
- Ahmed, Tariq, Ann Van der Jeugd, David Blum, Marie-Christine Galas, Rudi D'Hooge, Luc Buee, et Detlef Balschun. 2014. « Cognition and Hippocampal Synaptic Plasticity in Mice with a Homozygous Tau Deletion ». *Neurobiology of Aging* 35 (11): 2474-78. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.05.005>.
- Ahmed, Zeshan, Jane Cooper, Tracey K. Murray, Katya Garn, Emily McNaughton, Hannah Clarke, Samira Parhizkar, et al. 2014. « A Novel in Vivo Model of Tau Propagation with Rapid and Progressive Neurofibrillary Tangle Pathology: The Pattern of Spread Is Determined by Connectivity, Not Proximity ». *Acta Neuropathologica* 127 (5): 667-83. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1254-6>.
- Albert, Marie, Georges Mairet-Coello, Clément Danis, Sarah Lieger, Raphaëlle Caillierez, Sébastien Carrier, Emilie Skrobala, et al. 2019. « Prevention of Tau Seeding and Propagation by Immunotherapy with a Central Tau Epitope Antibody ». *Brain: A Journal of Neurology* 142 (6): 1736-50. <https://doi.org/10.1093/brain/awz100>.
- Allcock, Richard J. N., Alexander D. Barrow, Simon Forbes, Stephan Beck, et John Trowsdale. 2003. « The Human TREM Gene Cluster at 6p21.1 Encodes Both Activating and Inhibitory Single IgV Domain Receptors and Includes NKp44 ». *European Journal of Immunology* 33 (2): 567-77. <https://doi.org/10.1002/immu.200310033>.
- Andorfer, Cathy, Yvonne Kress, Marisol Espinoza, Rohan de Silva, Kerry L. Tucker, Yves-Alain Barde, Karen Duff, et Peter Davies. 2003. « Hyperphosphorylation and Aggregation of Tau in Mice Expressing Normal Human Tau Isoforms ». *Journal of Neurochemistry* 86 (3): 582-90. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01879.x>.
- Asai, Hirohide, Seiko Ikezu, Satoshi Tsunoda, Maria Medalla, Jennifer Luebke, Tarik Haydar, Benjamin Wolozin, Oleg Butovsky, Sebastian Kügler, et Tsuneya Ikezu. 2015. « Depletion of Microglia and Inhibition of Exosome Synthesis Halt Tau Propagation ». *Nature Neuroscience* 18 (11): 1584-93. <https://doi.org/10.1038/nn.4132>.
- Ashton, Nicholas J., Andréa L. Benedet, Tharick A. Pascoal, Thomas K. Karikari, Juan Lantero-Rodriguez, Wagner S. Brum, Sulantha Mathotaarachchi, et al. 2022. « Cerebrospinal Fluid P-Tau231 as an Early Indicator of Emerging Pathology in Alzheimer's Disease ». *EBioMedicine* 76 (février): 103836. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103836>.
- Ayers, Jacob I., Benoit I. Giasson, et David R. Borchelt. 2018. « Prion-like Spreading in Tauopathies ». *Biological Psychiatry* 83 (4): 337-46. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.04.003>.
- Baas, Peter W., et Liang Qiang. 2019. « Tau: It's Not What You Think ». *Trends in Cell Biology* 29 (6): 452-61. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.02.007>.
- Baik, Sung Hoon, Seokjo Kang, Woochan Lee, Hayoung Choi, Sunwoo Chung, Jong-Il Kim, et Inhee Mook-Jung. 2019. « A Breakdown in Metabolic Reprogramming Causes Microglia Dysfunction in Alzheimer's Disease ». *Cell Metabolism* 30 (3): 493-507.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.06.005>.
- Barakos, J., D. Purcell, J. Suhy, S. Chalkias, P. Burkett, C. Marsica Grassi, C. Castrillo-Viguera, I. Rubino, et E. Vijverberg. 2022. « Detection and Management of Amyloid-Related Imaging Abnormalities in Patients with Alzheimer's Disease Treated with Anti-Amyloid Beta Therapy ». *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease* 9 (2): 211-20. <https://doi.org/10.14283/jpad.2022.21>.

- Barnes, Deborah E., et Kristine Yaffe. 2011. « The Projected Effect of Risk Factor Reduction on Alzheimer's Disease Prevalence ». *The Lancet. Neurology* 10 (9): 819-28. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70072-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70072-2).
- Bednarski, E., et G. Lynch. 1996. « Cytosolic Proteolysis of Tau by Cathepsin D in Hippocampus Following Suppression of Cathepsins B and L ». *Journal of Neurochemistry* 67 (5): 1846-55. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67051846.x>.
- Bejanin, Alexandre, Daniel R Schonhaut, Renaud La Joie, Joel H Kramer, Suzanne L Baker, Natasha Sosa, Nagehan Ayakta, et al. 2017. « Tau Pathology and Neurodegeneration Contribute to Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease ». *Brain* 140 (12): 3286-3300. <https://doi.org/10.1093/brain/awx243>.
- Bellaver, Bruna, Guilherme Povala, Pamela C. L. Ferreira, João Pedro Ferrari-Souza, Douglas T. Leffa, Firoza Z. Lussier, Andréa L. Benedet, et al. 2023. « Astrocyte Reactivity Influences Amyloid- β Effects on Tau Pathology in Preclinical Alzheimer's Disease ». *Nature Medicine* 29 (7): 1775-81. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02380-x>.
- Bellenguez, Céline, Fahri Küçükali, Iris E. Jansen, Luca Kleindam, Sonia Moreno-Grau, Najaf Amin, Adam C. Naj, et al. 2022. « New Insights into the Genetic Etiology of Alzheimer's Disease and Related Dementias ». *Nature Genetics* 54 (4): 412-36. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01024-z>.
- Bemiller, Shane M., Tyler J. McCray, Kevin Allan, Shane V. Formica, Guixiang Xu, Gina Wilson, Olga N. Kokiko-Cochran, et al. 2017. « TREM2 Deficiency Exacerbates Tau Pathology through Dysregulated Kinase Signaling in a Mouse Model of Tauopathy ». *Molecular Neurodegeneration* 12 (1): 74. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0216-6>.
- Benedet, Andréa L., Marta Milà-Alomà, Agathe Vrillon, Nicholas J. Ashton, Tharick A. Pascoal, Firoza Lussier, Thomas K. Karikari, et al. 2021. « Differences Between Plasma and Cerebrospinal Fluid Glial Fibrillary Acidic Protein Levels Across the Alzheimer Disease Continuum ». *JAMA Neurology* 78 (12): 1-13. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2021.3671>.
- Bennett, F. Chris, et Shane A. Liddelow. 2019. « Microglia Metabolic Breakdown Drives Alzheimer's Pathology ». *Cell Metabolism* 30 (3): 405-6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.08.017>.
- Billioti de Gage, Sophie, Yola Moride, Thierry Ducruet, Tobias Kurth, Hélène Verdoux, Marie Tournier, Antoine Pariente, et Bernard Bégaud. 2014. « Benzodiazepine Use and Risk of Alzheimer's Disease: Case-Control Study ». *BMJ (Clinical Research Ed.)* 349 (septembre): g5205. <https://doi.org/10.1136/bmj.g5205>.
- Bobinski, M., M. J. de Leon, A. Convit, S. De Santi, J. Wegiel, C. Y. Tarshish, L. A. Saint Louis, et H. M. Wisniewski. 1999. « MRI of Entorhinal Cortex in Mild Alzheimer's Disease ». *Lancet (London, England)* 353 (9146): 38-40. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)74869-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)74869-8).
- Bolós, Marta, María Llorens-Martín, Jerónimo Jurado-Arjona, Félix Hernández, Alberto Rábano, et Jesús Avila. 2016. « Direct Evidence of Internalization of Tau by Microglia In Vitro and In Vivo ». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 50 (1): 77-87. <https://doi.org/10.3233/JAD-150704>.
- Boluda, Susana, Michiyo Iba, Bin Zhang, Kevin M. Raible, Virginia M.-Y. Lee, et John Q. Trojanowski. 2015. « Differential Induction and Spread of Tau Pathology in Young PS19 Tau Transgenic Mice Following Intracerebral Injections of Pathological Tau from

- Alzheimer's Disease or Corticobasal Degeneration Brains ». *Acta Neuropathologica* 129 (2): 221-37. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1373-0>.
- Bouchon, A., J. Dietrich, et M. Colonna. 2000. « Cutting Edge: Inflammatory Responses Can Be Triggered by TREM-1, a Novel Receptor Expressed on Neutrophils and Monocytes ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 164 (10): 4991-95. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.10.4991>.
- Braak, H., et E. Braak. 1991. « Neuropathological Stageing of Alzheimer-Related Changes ». *Acta Neuropathologica* 82 (4): 239-59. <https://doi.org/10.1007/BF00308809>.
- Brewton, Dustin H., Jamiela Kokash, Oliva Jimenez, Eloy R. Pena, et Khaleel A. Razak. 2016. « Age-Related Deterioration of Perineuronal Nets in the Primary Auditory Cortex of Mice ». *Frontiers in Aging Neuroscience* 8: 270. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00270>.
- Brunello, Cecilia A., Maria Merezhko, Riikka-Liisa Uronen, et Henri J. Huttunen. 2020. « Mechanisms of Secretion and Spreading of Pathological Tau Protein ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 77 (9): 1721-44. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03349-1>.
- Cacace, Rita, Kristel Slegers, et Christine Van Broeckhoven. 2016. « Molecular Genetics of Early-Onset Alzheimer's Disease Revisited ». *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 12 (6): 733-48. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.01.012>.
- Cakir, Bilal, Ferdi Ridvan Kiral, et In-Hyun Park. 2022. « Advanced in Vitro Models: Microglia in Action ». *Neuron* 110 (21): 3444-57. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.10.004>.
- Calafate, Sara, Arjan Buist, Katarzyna Miskiewicz, Vinoy Vijayan, Guy Daneels, Bart de Strooper, Joris de Wit, Patrik Verstreken, et Diederik Moechars. 2015. « Synaptic Contacts Enhance Cell-to-Cell Tau Pathology Propagation ». *Cell Reports* 11 (8): 1176-83. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.043>.
- Camero, Sergio, María J. Benítez, Alejandro Barrantes, José M. Ayuso, Raquel Cuadros, Jesús Avila, et Juan S. Jiménez. 2014. « Tau Protein Provides DNA with Thermodynamic and Structural Features Which Are Similar to Those Found in Histone-DNA Complex ». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 39 (3): 649-60. <https://doi.org/10.3233/JAD-131415>.
- Castellani, Giulia, Tommaso Croese, Javier M. Peralta Ramos, et Michal Schwartz. 2023. « Transforming the Understanding of Brain Immunity ». *Science (New York, N.Y.)* 380 (6640): eabo7649. <https://doi.org/10.1126/science.abo7649>.
- Chaffiol, Antoine, Romain Caplette, Céline Jaillard, Elena Brazhnikova, Mélissa Desrosiers, Elisabeth Dubus, Laëtitia Duhamel, et al. 2017. « A New Promoter Allows Optogenetic Vision Restoration with Enhanced Sensitivity in Macaque Retina ». *Molecular Therapy* 25 (11): 2546-60. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.07.011>.
- Chen, Xiaoying, Maria Firulyova, Melissa Manis, Jasmin Herz, Igor Smirnov, Ekaterina Aladyeva, Chanung Wang, et al. 2023. « Microglia-Mediated T Cell Infiltration Drives Neurodegeneration in Tauopathy ». *Nature* 615 (7953): 668-77. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05788-0>.
- Cherry, Jonathan D., Yorghos Tripodis, Victor E. Alvarez, Bertrand Huber, Patrick T. Kiernan, Daniel H. Daneshvar, Jesse Mez, et al. 2016. « Microglial Neuroinflammation Contributes to Tau Accumulation in Chronic Traumatic Encephalopathy ». *Acta*

- Neuropathologica Communications* 4 (1): 112. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0382-8>.
- Chiarini, Anna, Ubaldo Armato, Emanuela Gardenal, Li Gui, et Ilaria Dal Prà. 2017. « Amyloid β -Exposed Human Astrocytes Overproduce Phospho-Tau and Overrelease It within Exosomes, Effects Suppressed by Calcilytic NPS 2143-Further Implications for Alzheimer's Therapy ». *Frontiers in Neuroscience* 11: 217. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00217>.
- Claes, Christel, Johanna Van Den Daele, Ruben Boon, Sarah Schouteden, Alessio Colombo, Laura Sebastian Monasor, Mark Fiers, et al. 2019. « Human Stem Cell-Derived Monocytes and Microglia-like Cells Reveal Impaired Amyloid Plaque Clearance upon Heterozygous or Homozygous Loss of TREM2 ». *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 15 (3): 453-64. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.09.006>.
- Clavaguera, Florence, Hiroyasu Akatsu, Graham Fraser, R. Anthony Crowther, Stephan Frank, Jürgen Hench, Alphonse Probst, et al. 2013. « Brain Homogenates from Human Tauopathies Induce Tau Inclusions in Mouse Brain ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (23): 9535-40. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301175110>.
- Clavaguera, Florence, Tristan Bolmont, R. Anthony Crowther, Dorothee Abramowski, Stephan Frank, Alphonse Probst, Graham Fraser, et al. 2009. « Transmission and Spreading of Tauopathy in Transgenic Mouse Brain ». *Nature Cell Biology* 11 (7): 909-13. <https://doi.org/10.1038/ncb1901>.
- Clavaguera, Florence, Fiona Grueninger, et Markus Tolnay. 2014. « Intercellular Transfer of Tau Aggregates and Spreading of Tau Pathology: Implications for Therapeutic Strategies ». *Neuropharmacology* 76 Pt A (janvier): 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.08.037>.
- Clayton, Kevin, Jean Christophe Delpech, Shawn Herron, Naotoshi Iwahara, Maria Ericsson, Takashi Saito, Takaomi C. Saido, Seiko Ikezu, et Tsuneya Ikezu. 2021. « Plaque Associated Microglia Hyper-Secrete Extracellular Vesicles and Accelerate Tau Propagation in a Humanized APP Mouse Model ». *Molecular Neurodegeneration* 16 (1): 18. <https://doi.org/10.1186/s13024-021-00440-9>.
- Cleveland, D. W., S. Y. Hwo, et M. W. Kirschner. 1977. « Purification of Tau, a Microtubule-Associated Protein That Induces Assembly of Microtubules from Purified Tubulin ». *Journal of Molecular Biology* 116 (2): 207-25. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(77\)90213-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(77)90213-3).
- Cummings, Jeffrey L., Gary Tong, et Clive Ballard. 2019. « Treatment Combinations for Alzheimer's Disease: Current and Future Pharmacotherapy Options ». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 67 (3): 779-94. <https://doi.org/10.3233/JAD-180766>.
- David, Della C., Robert Layfield, Louise Serpell, Yolanda Narain, Michel Goedert, et Maria Grazia Spillantini. 2002. « Proteasomal Degradation of Tau Protein ». *Journal of Neurochemistry* 83 (1): 176-85. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01137.x>.
- de Calignon, Alix, Manuela Polydoro, Marc Suárez-Calvet, Christopher William, David H. Adamowicz, Kathy J. Kopeikina, Rose Pitstick, et al. 2012. « Propagation of Tau Pathology in a Model of Early Alzheimer's Disease ». *Neuron* 73 (4): 685-97. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.033>.
- Deczkowska, Aleksandra, Hadas Keren-Shaul, Assaf Weiner, Marco Colonna, Michal Schwartz, et Ido Amit. 2018. « Disease-Associated Microglia: A Universal Immune

- Sensor of Neurodegeneration ». *Cell* 173 (5): 1073-81.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.003>.
- Delrieu, J., et B. Vellas. 2020. « Les nouveaux traitements de la maladie d'Alzheimer ». *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* 204 (3): 237-47.
<https://doi.org/10.1016/j.banm.2020.01.018>.
- Dillon, Christian, et Yukiko Goda. 2005. « The Actin Cytoskeleton: Integrating Form and Function at the Synapse ». *Annual Review of Neuroscience* 28: 25-55.
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.28.061604.135757>.
- Dixit, Ram, Jennifer L. Ross, Yale E. Goldman, et Erika L. F. Holzbaur. 2008. « Differential Regulation of Dynein and Kinesin Motor Proteins by Tau ». *Science* 319 (5866): 1086-89. <https://doi.org/10.1126/science.1152993>.
- Doecke, James D., Larry Ward, Samantha C. Burnham, Victor L. Villemagne, Qiao-Xin Li, Steven Collins, Christopher J. Fowler, et al. 2020. « Elecsys CSF Biomarker Immunoassays Demonstrate Concordance with Amyloid-PET Imaging ». *Alzheimer's Research & Therapy* 12 (1): 36. <https://doi.org/10.1186/s13195-020-00595-5>.
- Dujardin, Simon, Séverine Bégard, Raphaëlle Caillierez, Cédric Lachaud, Sébastien Carrier, Sarah Lieger, Jose A. Gonzalez, et al. 2018. « Different Tau Species Lead to Heterogeneous Tau Pathology Propagation and Misfolding ». *Acta Neuropathologica Communications* 6 (1): 132. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0637-7>.
- Dujardin, Simon, Séverine Bégard, Raphaëlle Caillierez, Cédric Lachaud, Lucie Delattre, Sébastien Carrier, Anne Loyens, et al. 2014. « Ectosomes: A New Mechanism for Non-Exosomal Secretion of Tau Protein ». *PLoS One* 9 (6): e100760.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100760>.
- Dujardin, Simon, Analiese Fernandes, Riley Bannon, Caitlin Commins, Mark De Los Santos, Tarun V. Kamath, Mansuo Hayashi, et Bradley T. Hyman. 2022. « Tau Propagation Is Dependent on the Genetic Background of Mouse Strains ». *Brain Communications* 4 (2): fcac048. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcac048>.
- Dujardin, Simon, Katia Lécolle, Raphaëlle Caillierez, Séverine Bégard, Nadège Zommer, Cédric Lachaud, Sébastien Carrier, et al. 2014. « Neuron-to-Neuron Wild-Type Tau Protein Transfer through a Trans-Synaptic Mechanism: Relevance to Sporadic Tauopathies ». *Acta Neuropathologica Communications* 2 (janvier): 14.
<https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-14>.
- Duwat, Charlotte, Pauline Léal, Audrey Vautheny, Gwennaëlle Aurégan, Charlène Joséphine, Marie-Claude Gaillard, Anne-Sophie Hérard, et al. 2023. « Development of an AAV-Based Model of Tauopathy Targeting Retinal Ganglion Cells and the Mouse Visual Pathway to Study the Role of Microglia in Tau Pathology ». *Neurobiology of Disease* 181 (juin): 106116. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106116>.
- Dyck, Christopher H. van, Chad J. Swanson, Paul Aisen, Randall J. Bateman, Christopher Chen, Michelle Gee, Michio Kanekiyo, et al. 2023. « Lecanemab in Early Alzheimer's Disease ». *The New England Journal of Medicine* 388 (1): 9-21.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2212948>.
- Eid, Aseel, Isha Mhatre, et Jason R. Richardson. 2019. « Gene-Environment Interactions in Alzheimer's Disease: A Potential Path to Precision Medicine ». *Pharmacology & Therapeutics* 199 (juillet): 173-87.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.03.005>.
- El Khoury, Joseph, Michelle Toft, Suzanne E. Hickman, Terry K. Means, Kinya Terada, Changiz Geula, et Andrew D. Luster. 2007. « Ccr2 Deficiency Impairs Microglial Accumulation

- and Accelerates Progression of Alzheimer-like Disease ». *Nature Medicine* 13 (4): 432-38. <https://doi.org/10.1038/nm1555>.
- Escartin, Carole, Elena Galea, András Lakatos, James P. O'Callaghan, Gabor C. Petzold, Alberto Serrano-Pozo, Christian Steinhäuser, et al. 2021. « Reactive Astrocyte Nomenclature, Definitions, and Future Directions ». *Nature Neuroscience* 24 (3): 312-25. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4>.
- Espinoza, Marisol, Rohan de Silva, Dennis W. Dickson, et Peter Davies. 2008. « Differential Incorporation of Tau Isoforms in Alzheimer's Disease ». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 14 (1): 1-16. <https://doi.org/10.3233/jad-2008-14101>.
- Fairley, Lauren H., Jia Hui Wong, et Anna M. Barron. 2021. « Mitochondrial Regulation of Microglial Immunometabolism in Alzheimer's Disease ». *Frontiers in Immunology* 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.624538>.
- Falcon, Benjamin, Annalisa Cavallini, Rachel Angers, Sarah Glover, Tracey K. Murray, Luanda Barnham, Samuel Jackson, et al. 2015. « Conformation Determines the Seeding Potencies of Native and Recombinant Tau Aggregates ». *Journal of Biological Chemistry* 290 (2): 1049-65. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.589309>.
- Ferrer, Isidro. 2017. « Diversity of Astroglial Responses across Human Neurodegenerative Disorders and Brain Aging ». *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 27 (5): 645-74. <https://doi.org/10.1111/bpa.12538>.
- Feuillette, Sébastien, Laetitia Miguel, Thierry Frébourg, Dominique Campion, et Magalie Lecourtois. 2010. « Drosophila Models of Human Tauopathies Indicate That Tau Protein Toxicity in Vivo Is Mediated by Soluble Cytosolic Phosphorylated Forms of the Protein ». *Journal of Neurochemistry* 113 (4): 895-903. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06663.x>.
- Fichou, Yann, Michael Vigers, Andrew K. Goring, Neil A. Eschmann, et Songi Han. 2018. « Heparin-Induced Tau Filaments Are Structurally Heterogeneous and Differ from Alzheimer's Disease Filaments ». *Chemical Communications (Cambridge, England)* 54 (36): 4573-76. <https://doi.org/10.1039/c8cc01355a>.
- Fisenne, M.-A. de, Z. Yilmaz, R. De Decker, V. Suain, L. Buée, K. Ando, J.-P. Brion, et K. Leroy. 2022. « Alzheimer PHF-Tau Aggregates Do Not Spread Tau Pathology to the Brain via the Retino-Tectal Projection after Intraocular Injection in Male Mouse Models ». *Neurobiology of Disease* 174 (novembre): 105875. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105875>.
- Forabosco, Paola, Adaikalavan Ramasamy, Daniah Trabzuni, Robert Walker, Colin Smith, Jose Bras, Adam P. Levine, et al. 2013. « Insights into TREM2 Biology by Network Analysis of Human Brain Gene Expression Data ». *Neurobiology of Aging* 34 (12): 2699-2714. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.05.001>.
- Foscarin, Simona, Ruma Raha-Chowdhury, James W. Fawcett, et Jessica C. F. Kwok. 2017. « Brain Ageing Changes Proteoglycan Sulfation, Rendering Perineuronal Nets More Inhibitory ». *Aging* 9 (6): 1607-22. <https://doi.org/10.18632/aging.101256>.
- Frost, Bess, Rachel L. Jacks, et Marc I. Diamond. 2009. « Propagation of Tau Misfolding from the Outside to the inside of a Cell ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (19): 12845-52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808759200>.
- Fuster-Matanzo, Almudena, Félix Hernández, et Jesús Ávila. 2018. « Tau Spreading Mechanisms; Implications for Dysfunctional Tauopathies ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (3): 645. <https://doi.org/10.3390/ijms19030645>.

- Garwood, Claire J., Jonathan D. Cooper, Diane P. Hanger, et Wendy Noble. 2010. « Anti-Inflammatory Impact of Minocycline in a Mouse Model of Tauopathy ». *Frontiers in Psychiatry* 1: 136. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2010.00136>.
- Gary, Charlotte, Suzanne Lam, Anne-Sophie Hérard, James E. Koch, Fanny Petit, Pauline Gipchtein, Stephen J. Sawiak, et al. 2019. « Encephalopathy Induced by Alzheimer Brain Inoculation in a Non-Human Primate ». *Acta Neuropathologica Communications* 7 (1): 126. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0771-x>.
- Gasparini, Laura, R. Anthony Crowther, Keith R. Martin, Nicola Berg, Michael Coleman, Michel Goedert, et Maria Grazia Spillantini. 2011. « Tau Inclusions in Retinal Ganglion Cells of Human P301S Tau Transgenic Mice: Effects on Axonal Viability ». *Neurobiology of Aging* 32 (3): 419-33. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.03.002>.
- Gate, David, Naresha Saligrama, Olivia Leventhal, Andrew C. Yang, Michael S. Unger, Jinte Middeldorp, Kelly Chen, et al. 2020. « Clonally Expanded CD8 T Cells Patrol the Cerebrospinal Fluid in Alzheimer's Disease ». *Nature* 577 (7790): 399-404. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1895-7>.
- Gibbons, Garrett S., Rachel A. Banks, Bumjin Kim, Hong Xu, Lakshmi Changolkar, Susan N. Leight, Dawn M. Riddle, et al. 2017. « GFP-Mutant Human Tau Transgenic Mice Develop Tauopathy Following CNS Injections of Alzheimer's Brain-Derived Pathological Tau or Synthetic Mutant Human Tau Fibrils ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 37 (47): 11485-94. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2393-17.2017>.
- Gibbons, Garrett S., Virginia M. Y. Lee, et John Q. Trojanowski. 2019. « Mechanisms of Cell-to-Cell Transmission of Pathological Tau: A Review ». *JAMA Neurology* 76 (1): 101. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.2505>.
- Ginhoux, Florent, Melanie Greter, Marylene Leboeuf, Sayan Nandi, Peter See, Solen Gokhan, Mark F. Mehler, et al. 2010. « Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages ». *Science (New York, N.Y.)* 330 (6005): 841-45. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>.
- Goedert, M., et R. Jakes. 1990. « Expression of Separate Isoforms of Human Tau Protein: Correlation with the Tau Pattern in Brain and Effects on Tubulin Polymerization ». *The EMBO Journal* 9 (13): 4225-30. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07870.x>.
- Goedert, M., M. G. Spillantini, R. Jakes, D. Rutherford, et R. A. Crowther. 1989. « Multiple Isoforms of Human Microtubule-Associated Protein Tau: Sequences and Localization in Neurofibrillary Tangles of Alzheimer's Disease ». *Neuron* 3 (4): 519-26. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90210-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90210-9).
- Goedert, Michel, David S. Eisenberg, et R. Anthony Crowther. 2017. « Propagation of Tau Aggregates and Neurodegeneration ». *Annual Review of Neuroscience* 40 (1): 189-210. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-072116-031153>.
- Goedert, Michel, Masami Masuda-Suzukake, et Benjamin Falcon. 2017. « Like prions: the propagation of aggregated tau and α -synuclein in neurodegeneration ». *Brain* 140 (2): 266-78. <https://doi.org/10.1093/brain/aww230>.
- Grathwohl, Stefan A., Roland E. Kälin, Tristan Bolmont, Stefan Prokop, Georg Winkelmann, Stephan A. Kaeser, Jörg Odenthal, et al. 2009. « Formation and Maintenance of Alzheimer's Disease Beta-Amyloid Plaques in the Absence of Microglia ». *Nature Neuroscience* 12 (11): 1361-63. <https://doi.org/10.1038/nn.2432>.

- Gratuze, Maud, Yun Chen, Samira Parhizkar, Nimansha Jain, Michael R. Strickland, Javier Remolina Serrano, Marco Colonna, Jason D. Ulrich, et David M. Holtzman. 2021. « Activated Microglia Mitigate A β -Associated Tau Seeding and Spreading ». *The Journal of Experimental Medicine* 218 (8): e20210542. <https://doi.org/10.1084/jem.20210542>.
- Gratuze, Maud, Cheryl E. G. Leyns, et David M. Holtzman. 2018. « New Insights into the Role of TREM2 in Alzheimer's Disease ». *Molecular Neurodegeneration* 13 (1): 66. <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0298-9>.
- Gratuze, Maud, Cheryl Eg Leyns, Andrew D. Sauerbeck, Marie-Kim St-Pierre, Monica Xiong, Nayeon Kim, Javier Remolina Serrano, et al. 2020. « Impact of TREM2R47H Variant on Tau Pathology-Induced Gliosis and Neurodegeneration ». *The Journal of Clinical Investigation* 130 (9): 4954-68. <https://doi.org/10.1172/JCI138179>.
- Gratuze, Maud, et Emmanuel Planel. 2017. « Regulation of Brain Insulin Signaling: A New Function for Tau ». *The Journal of Experimental Medicine* 214 (8): 2171-73. <https://doi.org/10.1084/jem.20170979>.
- Guerreiro, Rita, Aleksandra Wojtas, Jose Bras, Minerva Carrasquillo, Ekaterina Rogaeva, Elisa Majounie, Carlos Cruchaga, et al. 2013. « TREM2 Variants in Alzheimer's Disease ». *The New England Journal of Medicine* 368 (2): 117-27. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211851>.
- Guo, Jing L., Sneha Narasimhan, Lakshmi Changolkar, Zhuohao He, Anna Stieber, Bin Zhang, Ronald J. Gathagan, et al. 2016. « Unique Pathological Tau Conformers from Alzheimer's Brains Transmit Tau Pathology in Nontransgenic Mice ». *The Journal of Experimental Medicine* 213 (12): 2635-54. <https://doi.org/10.1084/jem.20160833>.
- Guo, Tong, Wendy Noble, et Diane P. Hanger. 2017. « Roles of Tau Protein in Health and Disease ». *Acta Neuropathologica* 133 (5): 665-704. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1707-9>.
- Hampel, Harald, John Hardy, Kaj Blennow, Christopher Chen, George Perry, Seung Hyun Kim, Victor L. Villemagne, et al. 2021. « The Amyloid- β Pathway in Alzheimer's Disease ». *Molecular Psychiatry* 26 (10): 5481-5503. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01249-0>.
- Hampel, Harald, Yan Hu, Jeffrey Cummings, Soeren Mattke, Takeshi Iwatsubo, Akinori Nakamura, Bruno Vellas, et al. 2023. « Blood-Based Biomarkers for Alzheimer's Disease: Current State and Future Use in a Transformed Global Healthcare Landscape ». *Neuron*, juin, S0896-6273(23)00390-2. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.05.017>.
- Harada, A., K. Oguchi, S. Okabe, J. Kuno, S. Terada, T. Ohshima, R. Sato-Yoshitake, Y. Takei, T. Noda, et N. Hirokawa. 1994. « Altered Microtubule Organization in Small-Calibre Axons of Mice Lacking Tau Protein ». *Nature* 369 (6480): 488-91. <https://doi.org/10.1038/369488a0>.
- Hardy, John, et David Allsop. s. d. « Amyloici Deposition as the Central Event in the Aetiology of Alzheimer's Disease », 6.
- Harris, Julie A., Akihiko Koyama, Sumihiro Maeda, Kaitlyn Ho, Nino Devidze, Dena B. Dubal, Gui-Qiu Yu, Eliezer Masliah, et Lennart Mucke. 2012. « Human P301L-Mutant Tau Expression in Mouse Entorhinal-Hippocampal Network Causes Tau Aggregation and Presynaptic Pathology but No Cognitive Deficits ». *PloS One* 7 (9): e45881. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045881>.

- Hatch, Robert John, Yan Wei, Di Xia, et Jürgen Götz. 2017. « Hyperphosphorylated Tau Causes Reduced Hippocampal CA1 Excitability by Relocating the Axon Initial Segment ». *Acta Neuropathologica* 133 (5): 717-30. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1674-1>.
- He, Zhuohao, Jing L. Guo, Jennifer D. McBride, Sneha Narasimhan, Hyesung Kim, Lakshmi Changolkar, Bin Zhang, et al. 2018. « Amyloid- β Plaques Enhance Alzheimer's Brain Tau-Seeded Pathologies by Facilitating Neuritic Plaque Tau Aggregation ». *Nature Medicine* 24 (1): 29-38. <https://doi.org/10.1038/nm.4443>.
- He, Zhuohao, Jennifer D. McBride, Hong Xu, Lakshmi Changolkar, Soo-Jung Kim, Bin Zhang, Sneha Narasimhan, et al. 2020. « Transmission of Tauopathy Strains Is Independent of Their Isoform Composition ». *Nature Communications* 11 (1): 7. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13787-x>.
- Heneka, Michael T, Monica J Carson, Joseph El Khoury, Gary E Landreth, Frederic Brosseron, Douglas L Feinstein, Andreas H Jacobs, et al. 2015. « Neuroinflammation in Alzheimer's Disease ». *The Lancet Neurology* 14 (4): 388-405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5).
- Höglinger, G.U., G. Respondek, et G.G. Kovacs. 2018. « New Classification of Tauopathies ». *Revue Neurologique* 174 (9): 664-68. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2018.07.001>.
- Hong, M., V. Zhukareva, V. Vogelsberg-Ragaglia, Z. Wszolek, L. Reed, B. I. Miller, D. H. Geschwind, et al. 1998. « Mutation-Specific Functional Impairments in Distinct Tau Isoforms of Hereditary FTDP-17 ». *Science (New York, N.Y.)* 282 (5395): 1914-17. <https://doi.org/10.1126/science.282.5395.1914>.
- Hopp, Sarah C., Yang Lin, Derek Oakley, Allyson D. Roe, Sarah L. DeVos, David Hanlon, et Bradley T. Hyman. 2018. « The role of microglia in processing and spreading of bioactive tau seeds in Alzheimer's disease ». *Journal of Neuroinflammation* 15 (1): 269. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1309-z>.
- Hsieh, Christine L., Maya Koike, Steve C. Spusta, Erene C. Niemi, Midori Yenari, Mary C. Nakamura, et William E. Seaman. 2009. « A Role for TREM2 Ligands in the Phagocytosis of Apoptotic Neuronal Cells by Microglia ». *Journal of Neurochemistry* 109 (4): 1144-56. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06042.x>.
- Iba, Michiyo, Jing L. Guo, Jennifer D. McBride, Bin Zhang, John Q. Trojanowski, et Virginia M.-Y. Lee. 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 (3): 1024-37. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2642-12.2013>.
- Iba, Michiyo, Jennifer D. McBride, Jing L. Guo, Bin Zhang, John Q. Trojanowski, et Virginia M.-Y. Lee. 2015. « Tau Pathology Spread in PS19 Tau Transgenic Mice Following Locus Coeruleus (LC) Injections of Synthetic Tau Fibrils Is Determined by the LC's Afferent and Efferent Connections ». *Acta Neuropathologica* 130 (3): 349-62. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1458-4>.
- Irwin, David J. 2016. « Tauopathies as Clinicopathological Entities ». *Parkinsonism & Related Disorders* 22 Suppl 1 (0 1): S29-33. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2015.09.020>.
- Irwin, David J., Johannes Brettschneider, Corey T. McMillan, Felicia Cooper, Christopher Olm, Steven E. Arnold, Vivianna M. Van Deerlin, et al. 2016. « Deep Clinical and Neuropathological Phenotyping of Pick Disease ». *Annals of Neurology* 79 (2): 272-87. <https://doi.org/10.1002/ana.24559>.

- Ising, Christina, Carmen Venegas, Shuangshuang Zhang, Hannah Scheiblich, Susanne V. Schmidt, Ana Vieira-Saecker, Stephanie Schwartz, et al. 2019. « NLRP3 Inflammasome Activation Drives Tau Pathology ». *Nature* 575 (7784): 669-73. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1769-z>.
- Ismael, Sazan, Ghadir Sindi, Robert A. Colvin, et Daewoo Lee. 2021. « Activity-Dependent Release of Phosphorylated Human Tau from Drosophila Neurons in Primary Culture ». *The Journal of Biological Chemistry* 297 (4): 101108. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101108>.
- Ittner, Arne, et Lars M. Ittner. 2018. « Dendritic Tau in Alzheimer's Disease ». *Neuron* 99 (1): 13-27. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.06.003>.
- Ittner, Arne, Yazı D. Ke, Janet van Eersel, Amadeus Gladbach, Jürgen Götz, et Lars M. Ittner. 2011. « Brief Update on Different Roles of Tau in Neurodegeneration ». *IUBMB Life* 63 (7): 495-502. <https://doi.org/10.1002/iub.467>.
- Jackson, Samuel J., Caroline Kerridge, Jane Cooper, Annalisa Cavallini, Benjamin Falcon, Claire V. Cella, Alessia Landi, et al. 2016. « Short Fibrils Constitute the Major Species of Seed-Competent Tau in the Brains of Mice Transgenic for Human P301S Tau ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 36 (3): 762-72. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3542-15.2016>.
- Jain, Nimansha, Caroline A. Lewis, Jason D. Ulrich, et David M. Holtzman. 2023. « Chronic TREM2 Activation Exacerbates A β -Associated Tau Seeding and Spreading ». *The Journal of Experimental Medicine* 220 (1): e20220654. <https://doi.org/10.1084/jem.20220654>.
- Janning, Dennis, Maxim Igaev, Frederik Sündermann, Jörg Brühmann, Oliver Beutel, Jürgen J. Heinisch, Lidia Bakota, Jacob Piehler, Wolfgang Junge, et Roland Brandt. 2014. « Single-Molecule Tracking of Tau Reveals Fast Kiss-and-Hop Interaction with Microtubules in Living Neurons ». *Molecular Biology of the Cell* 25 (22): 3541-51. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-06-1099>.
- Jarero-Basulto, Jose J., Jose Luna-Muñoz, Raul Mena, Zdena Kristofikova, Daniela Ripova, George Perry, Lester I. Binder, et Francisco Garcia-Sierra. 2013. « Proteolytic Cleavage of Polymeric Tau Protein by Caspase-3: Implications for Alzheimer Disease ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 72 (12): 1145-61. <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000013>.
- Jiang, Teng, Lan Tan, Xi-Chen Zhu, Jun-Shan Zhou, Lei Cao, Meng-Shan Tan, Hui-Fu Wang, Qi Chen, Ying-Dong Zhang, et Jin-Tai Yu. 2015. « Silencing of TREM2 Exacerbates Tau Pathology, Neurodegenerative Changes, and Spatial Learning Deficits in P301S Tau Transgenic Mice ». *Neurobiology of Aging* 36 (12): 3176-86. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.08.019>.
- Jonsson, Thorlakur, Hreinn Stefansson, Stacy Steinberg, Ingileif Jonsdottir, Palmi V. Jonsson, Jon Snaedal, Sigurbjorn Bjornsson, et al. 2013. « Variant of TREM2 Associated with the Risk of Alzheimer's Disease ». *The New England Journal of Medicine* 368 (2): 107-16. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211103>.
- Jucker, Mathias, et Lary C. Walker. 2013. « Self-Propagation of Pathogenic Protein Aggregates in Neurodegenerative Diseases ». *Nature* 501 (7465): 45-51. <https://doi.org/10.1038/nature12481>.
- Kaneko, Minoru, Kenji Sano, Jun Nakayama, et Naoji Amano. 2010. « Nasu-Hakola Disease: The First Case Reported by Nasu and Review: The 50th Anniversary of Japanese Society of Neuropathology ». *Neuropathology: Official Journal of the Japanese*

- Society of Neuropathology* 30 (5): 463-70. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2010.01127.x>.
- Katsinelos, Taxiarchis, Marcel Zeitler, Eleni Dimou, Andromachi Karakatsani, Hans-Michael Müller, Eliana Nachman, Julia P. Steringer, Carmen Ruiz de Almodovar, Walter Nickel, et Thomas R. Jahn. 2018. « Unconventional Secretion Mediates the Trans-Cellular Spreading of Tau ». *Cell Reports* 23 (7): 2039-55. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.056>.
- Kawabori, Masahito, Rachid Kacimi, Tiina Kauppinen, Cyrus Calosing, Jong Youl Kim, Christine L. Hsieh, Mary C. Nakamura, et Midori A. Yenari. 2015. « Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2 (TREM2) Deficiency Attenuates Phagocytic Activities of Microglia and Exacerbates Ischemic Damage in Experimental Stroke ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 35 (8): 3384-96. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2620-14.2015>.
- Ke, Yazi D., Alexandra K. Suchowerska, Julia van der Hoven, Dineeka M. De Silva, Christopher W. Wu, Janet van Eersel, Arne Ittner, et Lars M. Ittner. 2012. « Lessons from Tau-Deficient Mice ». *International Journal of Alzheimer's Disease* 2012: 873270. <https://doi.org/10.1155/2012/873270>.
- Keck, Susi, Robert Nitsch, Tilman Grune, et Oliver Ullrich. 2003. « Proteasome Inhibition by Paired Helical Filament-Tau in Brains of Patients with Alzheimer's Disease ». *Journal of Neurochemistry* 85 (1): 115-22. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01642.x>.
- Keren-Shaul, Hadas, Amit Spinrad, Assaf Weiner, Orit Matcovitch-Natan, Raz Dvir-Szternfeld, Tyler K. Ulland, Eyal David, et al. 2017. « A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease ». *Cell* 169 (7): 1276-1290.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.018>.
- Kfoury, Najla, Brandon B. Holmes, Hong Jiang, David M. Holtzman, et Marc I. Diamond. 2012. « Trans-Cellular Propagation of Tau Aggregation by Fibrillar Species* ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (23): 19440-51. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.346072>.
- Kim, Jin Hee, Sang-Rok Lee, Li-Hua Li, Hye-Jeong Park, Jeong-Hoh Park, Kwang Youl Lee, Myeong-Kyu Kim, Boo Ahn Shin, et Seok-Yong Choi. 2011. « High Cleavage Efficiency of a 2A Peptide Derived from Porcine Teschovirus-1 in Human Cell Lines, Zebrafish and Mice ». *PLoS One* 6 (4): e18556. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018556>.
- Kim, Youbin, Hyejin Park, Youngwon Kim, Seo-Hyun Kim, Jae Hoon Lee, Hanseul Yang, Seo Jin Kim, et al. 2023. « Pathogenic Role of RAGE in Tau Transmission and Memory Deficits ». *Biological Psychiatry* 93 (9): 829-41. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2022.10.015>.
- Kimura, Tetsuya, Daniel J. Whitcomb, Jihoon Jo, Philip Regan, Thomas Piers, Seonghoo Heo, Christopher Brown, et al. 2014. « Microtubule-Associated Protein Tau Is Essential for Long-Term Depression in the Hippocampus ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 369 (1633): 20130144. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0144>.
- Kitazawa, Masashi, Salvatore Oddo, Tertia R. Yamasaki, Kim N. Green, et Frank M. LaFerla. 2005. « Lipopolysaccharide-Induced Inflammation Exacerbates Tau Pathology by a Cyclin-Dependent Kinase 5-Mediated Pathway in a Transgenic Model of Alzheimer's Disease ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (39): 8843-53. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2868-05.2005>.

- Kleinberger, Gernot, Yoshinori Yamanishi, Marc Suárez-Calvet, Eva Czirr, Ebba Lohmann, Elise Cuyvers, Hanne Struyfs, et al. 2014. « TREM2 Mutations Implicated in Neurodegeneration Impair Cell Surface Transport and Phagocytosis ». *Science Translational Medicine* 6 (243): 243ra86. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009093>.
- Klünemann, H. H., B. H. Ridha, L. Magy, J. R. Wherrett, D. M. Hemelsoet, R. W. Keen, J. L. De Bleecker, et al. 2005. « The Genetic Causes of Basal Ganglia Calcification, Dementia, and Bone Cysts: DAP12 and TREM2 ». *Neurology* 64 (9): 1502-7. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000160304.00003.CA>.
- Knopman, David S., David T. Jones, et Michael D. Greicius. 2021. « Failure to Demonstrate Efficacy of Aducanumab: An Analysis of the EMERGE and ENGAGE Trials as Reported by Biogen, December 2019 ». *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 17 (4): 696-701. <https://doi.org/10.1002/alz.12213>.
- Kobayashi, Shunsuke, Toru Tanaka, Yoshiyuki Soeda, Osborne F. X. Almeida, et Akihiko Takashima. 2017. « Local Somatodendritic Translation and Hyperphosphorylation of Tau Protein Triggered by AMPA and NMDA Receptor Stimulation ». *EBioMedicine* 20 (juin): 120-26. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.05.012>.
- Kovacs, G. G. 2015. « Invited Review: Neuropathology of Tauopathies: Principles and Practice ». *Neuropathology and Applied Neurobiology* 41 (1): 3-23. <https://doi.org/10.1111/nan.12208>.
- Kovacs, Gabor G., Isidro Ferrer, Lea T. Grinberg, Irina Alafuzoff, Johannes Attems, Herbert Budka, Nigel J. Cairns, et al. 2016. « Aging-Related Tau Astroglipathy (ARTAG): Harmonized Evaluation Strategy ». *Acta Neuropathologica* 131 (1): 87-102. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1509-x>.
- Krüger, Ulrike, Yipeng Wang, Satish Kumar, et Eva-Maria Mandelkow. 2012. « Autophagic Degradation of Tau in Primary Neurons and Its Enhancement by Trehalose ». *Neurobiology of Aging* 33 (10): 2291-2305. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.11.009>.
- Lagarde, Julien, Pauline Olivieri, Matteo Tonietto, Cecile Tissot, Isabelle Rivals, Philippe Gervais, Fabien Caillé, Martin Mousson, Michel Bottlaender, et Marie Sarazin. 2022. « Tau-PET Imaging Predicts Cognitive Decline and Brain Atrophy Progression in Early Alzheimer's Disease ». *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 93 (5): 459-67. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2021-328623>.
- Lambert, J. C., C. A. Ibrahim-Verbaas, D. Harold, A. C. Naj, R. Sims, C. Bellenguez, A. L. DeStafano, et al. 2013. « Meta-Analysis of 74,046 Individuals Identifies 11 New Susceptibility Loci for Alzheimer's Disease ». *Nature Genetics* 45 (12): 1452-58. <https://doi.org/10.1038/ng.2802>.
- Lasagna-Reeves, Cristian A., Diana L. Castillo-Carranza, Urmi Sengupta, Marcos J. Guerrero-Munoz, Takaki Kiritoshi, Volker Neugebauer, George R. Jackson, et Rakez Kaye. 2012. « Alzheimer Brain-Derived Tau Oligomers Propagate Pathology from Endogenous Tau ». *Scientific Reports* 2: 700. <https://doi.org/10.1038/srep00700>.
- Laurent, Cyril, Guillaume Dorothée, Stéphane Hunot, Elodie Martin, Yann Monnet, Marie Duchamp, Yuan Dong, et al. 2017. « Hippocampal T Cell Infiltration Promotes Neuroinflammation and Cognitive Decline in a Mouse Model of Tauopathy ». *Brain: A Journal of Neurology* 140 (1): 184-200. <https://doi.org/10.1093/brain/aww270>.

- « Lecanemab Sweeps Up Toxic A β Protofibrils, Catches Eyes of Trialists | ALZFORUM ». s. d. Consulté le 10 juillet 2023. <https://www.alzforum.org/news/conference-coverage/lecanemab-sweeps-toxic-av-protofibrils-catches-eyes-trialists>.
- Lee, Seung-Hye, Mitchell G. Rezzonico, Brad A. Friedman, Melanie H. Huntley, William J. Meilandt, Shristi Pandey, Ying-Jiun J. Chen, et al. 2021. « TREM2-Independent Oligodendrocyte, Astrocyte, and T Cell Responses to Tau and Amyloid Pathology in Mouse Models of Alzheimer Disease ». *Cell Reports* 37 (13): 110158. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110158>.
- Lee, V. M., et J. Q. Trojanowski. 1999. « Neurodegenerative Tauopathies: Human Disease and Transgenic Mouse Models ». *Neuron* 24 (3): 507-10. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)81106-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)81106-x).
- Leyns, Cheryl E. G., Maud Gratuze, Sneha Narasimhan, Nimansha Jain, Lauren J. Koscal, Hong Jiang, Melissa Manis, et al. 2019. « TREM2 Function Impedes Tau Seeding in Neuritic Plaques ». *Nature Neuroscience* 22 (8): 1217-22. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0433-0>.
- Leyns, Cheryl E. G., Jason D. Ulrich, Mary B. Finn, Floy R. Stewart, Lauren J. Koscal, Javier Remolina Serrano, Grace O. Robinson, Elise Anderson, Marco Colonna, et David M. Holtzman. 2017. « TREM2 Deficiency Attenuates Neuroinflammation and Protects against Neurodegeneration in a Mouse Model of Tauopathy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (43): 11524-29. <https://doi.org/10.1073/pnas.1710311114>.
- Li, Xiaoyu, Yatender Kumar, Hans Zempel, Eva-Maria Mandelkow, Jacek Biernat, et Eckhard Mandelkow. 2011. « Novel Diffusion Barrier for Axonal Retention of Tau in Neurons and Its Failure in Neurodegeneration ». *The EMBO Journal* 30 (23): 4825-37. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.376>.
- Li, Yuxia, Xiaoni Wang, Yongqiu Li, Yu Sun, Can Sheng, Hongyan Li, Xuanyu Li, et al. 2016. « Abnormal Resting-State Functional Connectivity Strength in Mild Cognitive Impairment and Its Conversion to Alzheimer's Disease ». *Neural Plasticity* 2016: 4680972. <https://doi.org/10.1155/2016/4680972>.
- Liddel, Shane A., Samuel E. Marsh, et Beth Stevens. 2020. « Microglia and Astrocytes in Disease: Dynamic Duo or Partners in Crime? ». *Trends in Immunology* 41 (9): 820-35. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.006>.
- Linnerbauer, Mathias, Michael A. Wheeler, et Francisco J. Quintana. 2020. « Astrocyte Crosstalk in CNS Inflammation ». *Neuron* 108 (4): 608-22. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.08.012>.
- Liu, Li, Valerie Drouet, Jessica W. Wu, Menno P. Witter, Scott A. Small, Catherine Clelland, et Karen Duff. 2012. « Trans-Synaptic Spread of Tau Pathology In Vivo ». *PLOS ONE* 7 (2): e31302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031302>.
- Lobbestael, Evy, Veerle Reumers, Abdelilah Ibrahim, Kirsten Paesen, Irina Thiry, Rik Gijssbers, Chris Van den Haute, Zeger Debyser, Veerle Baekelandt, et Jean-Marc Taymans. 2010. « Immunohistochemical Detection of Transgene Expression in the Brain Using Small Epitope Tags ». *BMC Biotechnology* 10 (février): 16. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-10-16>.
- Luo, Wenjie, Wencheng Liu, Xiaoyan Hu, Mary Hanna, April Caravaca, et Steven M. Paul. 2015. « Microglial Internalization and Degradation of Pathological Tau Is Enhanced by an Anti-Tau Monoclonal Antibody ». *Scientific Reports* 5 (juin): 11161. <https://doi.org/10.1038/srep11161>.

- Ma, Jiyan, et Fei Wang. 2014. « Prion Disease and the “Protein-Only Hypothesis” ». *Essays in Biochemistry* 56: 181-91. <https://doi.org/10.1042/bse0560181>.
- Maksour, Simon, et Lezanne Ooi. 2023. « Innovations Advancing Our Understanding of Microglia in Alzheimer’s Disease: From in Vitro to in Vivo Models ». *Journal of Neurochemistry* 166 (3): 497-516. <https://doi.org/10.1111/jnc.15885>.
- Maphis, Nicole, Guixiang Xu, Olga N. Kokiko-Cochran, Shanya Jiang, Astrid Cardona, Richard M. Ransohoff, Bruce T. Lamb, et Kiran Bhaskar. 2015. « Reactive Microglia Drive Tau Pathology and Contribute to the Spreading of Pathological Tau in the Brain ». *Brain* 138 (6): 1738-55. <https://doi.org/10.1093/brain/awv081>.
- Marciniak, Elodie, Antoine Leboucher, Emilie Caron, Tariq Ahmed, Anne Tailleux, Julie Dumont, Tarik Issad, et al. 2017. « Tau Deletion Promotes Brain Insulin Resistance ». *The Journal of Experimental Medicine* 214 (8): 2257-69. <https://doi.org/10.1084/jem.20161731>.
- Marin, Miguel A., Jokubus Ziburkus, Joanna Jankowsky, et Matthew N. Rasband. 2016. « Amyloid- β Plaques Disrupt Axon Initial Segments ». *Experimental Neurology* 281 (juillet): 93-98. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.04.018>.
- Martin, Ludovic, Xenia Latypova, et Faraj Terro. 2011. « Post-Translational Modifications of Tau Protein: Implications for Alzheimer’s Disease ». *Neurochemistry International* 58 (4): 458-71. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.12.023>.
- Martin, Ludovic, Xenia Latypova, Cornelia M. Wilson, Amandine Magnaudeix, Marie-Laure Perrin, Catherine Yardin, et Faraj Terro. 2013. « Tau Protein Kinases: Involvement in Alzheimer’s Disease ». *Ageing Research Reviews* 12 (1): 289-309. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.06.003>.
- Martini-Stoica, Heidi, Allysa L. Cole, Daniel B. Swartzlander, Fading Chen, Ying-Wooi Wan, Lakshya Bajaj, David A. Bader, et al. 2018. « TFEB Enhances Astroglial Uptake of Extracellular Tau Species and Reduces Tau Spreading ». *The Journal of Experimental Medicine* 215 (9): 2355-77. <https://doi.org/10.1084/jem.20172158>.
- Masuda, Takahiro, Roman Sankowski, Ori Staszewski, et Marco Prinz. 2020. « Microglia Heterogeneity in the Single-Cell Era ». *Cell Reports* 30 (5): 1271-81. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.010>.
- Maté de Gérando, Anastasie, Marie d’Orange, Emma Augustin, Charlène Joséphine, Gwénaëlle Aurégan, Mylène Gaudin-Guérif, Martine Guillermier, et al. 2021. « Neuronal tau species transfer to astrocytes and induce their loss according to tau aggregation state ». *Brain* 144 (4): 1167-82. <https://doi.org/10.1093/brain/awab011>.
- Mattsson, Niklas, Ulf Andreasson, Henrik Zetterberg, Kaj Blennow, et Alzheimer’s Disease Neuroimaging Initiative. 2017. « Association of Plasma Neurofilament Light With Neurodegeneration in Patients With Alzheimer Disease ». *JAMA Neurology* 74 (5): 557-66. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.6117>.
- McAllister, Brendan B., Sean G. Lacoursiere, Robert J. Sutherland, et Majid H. Mohajerani. 2020. « Intracerebral Seeding of Amyloid- β and Tau Pathology in Mice: Factors Underlying Prion-like Spreading and Comparisons with α -Synuclein ». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 112 (mai): 1-27. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.01.026>.
- McQuade, Amanda, You Jung Kang, Jonathan Hasselmann, Amit Jairaman, Alexandra Sotelo, Morgan Coburn, Sepideh Kiani Shabestari, et al. 2020. « Gene Expression and Functional Deficits Underlie TREM2-Knockout Microglia Responses in Human Models

- of Alzheimer's Disease ». *Nature Communications* 11 (1): 5370.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-19227-5>.
- « Médicaments de la maladie d'Alzheimer : un intérêt médical insuffisant pour justifier leur prise en charge par la solidarité nationale ». s. d. Haute Autorité de Santé. Consulté le 8 août 2023. https://www.has-sante.fr/jcms/c_2679466/fr/medicaments-de-la-maladie-d-alzheimer-un-interet-medical-insuffisant-pour-justifier-leur-prise-en-charge-par-la-solidarite-nationale.
- Menassa, David A., et Diego Gomez-Nicola. 2018. « Microglial Dynamics During Human Brain Development ». *Frontiers in Immunology* 9.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01014>.
- Merlini, Mario, Tunahan Kirabali, Luka Kulic, Roger M. Nitsch, et Maria Teresa Ferretti. 2018. « Extravascular CD3+ T Cells in Brains of Alzheimer Disease Patients Correlate with Tau but Not with Amyloid Pathology: An Immunohistochemical Study ». *Neuro-Degenerative Diseases* 18 (1): 49-56. <https://doi.org/10.1159/000486200>.
- Minkeviciene, R., J. Ihalainen, T. Malm, O. Matilainen, V. Keksa-Goldsteine, G. Goldsteins, H. Iivonen, et al. 2008. « Age-Related Decrease in Stimulated Glutamate Release and Vesicular Glutamate Transporters in APP/PS1 Transgenic and Wild-Type Mice ». *Journal of Neurochemistry* 105 (3): 584-94. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05147.x>.
- Mrdjen, Dunja, Anto Pavlovic, Felix J. Hartmann, Bettina Schreiner, Sebastian G. Utz, Brian P. Leung, Iva Lelios, et al. 2018. « High-Dimensional Single-Cell Mapping of Central Nervous System Immune Cells Reveals Distinct Myeloid Subsets in Health, Aging, and Disease ». *Immunity* 48 (2): 380-395.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.011>.
- Mullard, Asher. 2021. « Landmark Alzheimer's Drug Approval Confounds Research Community ». *Nature* 594 (7863): 309-10. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-01546-2>.
- Müller, R., M. Heinrich, S. Heck, D. Blohm, et C. Richter-Landsberg. 1997. « Expression of Microtubule-Associated Proteins MAP2 and Tau in Cultured Rat Brain Oligodendrocytes ». *Cell and Tissue Research* 288 (2): 239-49.
<https://doi.org/10.1007/s004410050809>.
- Mummery, Catherine J., Anne Börjesson-Hanson, Daniel J. Blackburn, Everard G. B. Vijverberg, Peter Paul De Deyn, Simon Ducharme, Michael Jonsson, et al. 2023. « Tau-Targeting Antisense Oligonucleotide MAPTRx in Mild Alzheimer's Disease: A Phase 1b, Randomized, Placebo-Controlled Trial ». *Nature Medicine* 29 (6): 1437-47.
<https://doi.org/10.1038/s41591-023-02326-3>.
- Murphy, J. B., et E. Sturm. 1923. « CONDITIONS DETERMINING THE TRANSPLANTABILITY OF TISSUES IN THE BRAIN ». *The Journal of Experimental Medicine* 38 (2): 183-97.
<https://doi.org/10.1084/jem.38.2.183>.
- Nakamura, Akinori, Naoki Kaneko, Victor L. Villemagne, Takashi Kato, James Doecke, Vincent Doré, Chris Fowler, et al. 2018. « High Performance Plasma Amyloid- β Biomarkers for Alzheimer's Disease ». *Nature* 554 (7691): 249-54.
<https://doi.org/10.1038/nature25456>.
- Narasimhan, Sneha, Jing L. Guo, Lakshmi Changolkar, Anna Stieber, Jennifer D. McBride, Luisa V. Silva, Zhuohao He, et al. 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 (47): 11406-23. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1230-17.2017>.
- Nayak, Debasis, Theodore L. Roth, et Dorian B. McGavern. 2014. « Microglia Development and Function ». *Annual Review of Immunology* 32: 367-402. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120240>.
- Neve, Rachael L, Gordon D Stewart, Patricia Newcomb, Margaret L Van Keuren, David Patterson, H.A Drabkin, et David M Kurnit. 1986. « Human Chromosome 21-Encoded CDNA Clones ». *Gene* 49 (3): 361-69. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(86\)90372-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(86)90372-0).
- Niewiadomska, Grazyna, Wiktor Niewiadomski, Marta Steczkowska, et Anna Gasiorowska. 2021. « Tau Oligomers Neurotoxicity ». *Life* 11 (1): 28. <https://doi.org/10.3390/life11010028>.
- Olah, Marta, Ellis Patrick, Alexandra-Chloe Villani, Jishu Xu, Charles C. White, Katie J. Ryan, Paul Piehowski, et al. 2018. « A Transcriptomic Atlas of Aged Human Microglia ». *Nature Communications* 9 (1): 539. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02926-5>.
- « OMS | Démence ». s. d. WHO. World Health Organization. Consulté le 24 avril 2020. <http://www.who.int/topics/dementia/fr/>.
- Orange, Marie d', Gwénaelle Aurégan, Dimitri Cheramy, Mylène Gaudin-Guérif, Sarah Lieger, Martine Guillermier, Lev Stimmer, et al. 2018. « Potentiating Tangle Formation Reduces Acute Toxicity of Soluble Tau Species in the Rat ». *Brain* 141 (2): 535-49. <https://doi.org/10.1093/brain/awx342>.
- Palmqvist, Sebastian, Philip S. Insel, Erik Stomrud, Shorena Janelidze, Henrik Zetterberg, Britta Brix, Udo Eichenlaub, et al. 2019. « Cerebrospinal Fluid and Plasma Biomarker Trajectories with Increasing Amyloid Deposition in Alzheimer's Disease ». *EMBO Molecular Medicine* 11 (12): e11170. <https://doi.org/10.15252/emmm.201911170>.
- Paolicelli, Rosa C., Amanda Sierra, Beth Stevens, Marie-Eve Tremblay, Adriano Aguzzi, Bahareh Ajami, Ido Amit, et al. 2022. « Microglia States and Nomenclature: A Field at Its Crossroads ». *Neuron* 110 (21): 3458-83. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.10.020>.
- Parhizkar, Samira, Thomas Arzberger, Matthias Brendel, Gernot Kleinberger, Maximilian Deussing, Carola Focke, Brigitte Nuscher, et al. 2019. « Loss of TREM2 Function Increases Amyloid Seeding but Reduces Plaque-Associated ApoE ». *Nature Neuroscience* 22 (2): 191-204. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0296-9>.
- Park, Joseph, Isaac Wetzel, Ian Marriott, Didier Dréau, Carla D'Avanzo, Doo Yeon Kim, Rudolph E. Tanzi, et Hansang Cho. 2018. « A 3D Human Triculture System Modeling Neurodegeneration and Neuroinflammation in Alzheimer's Disease ». *Nature Neuroscience* 21 (7): 941-51. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0175-4>.
- Pascoal, Tharick A., Andrea L. Benedet, Nicholas J. Ashton, Min Su Kang, Joseph Therriault, Mira Chamoun, Melissa Savard, et al. 2021. « Microglial Activation and Tau Propagate Jointly across Braak Stages ». *Nature Medicine* 27 (9): 1592-99. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01456-w>.
- Peeraer, Eve, Astrid Bottelbergs, Kristof Van Kolen, Ilie-Cosmin Stancu, Bruno Vasconcelos, Michel Mahieu, Hilde Duytschaever, et al. 2015. « Intracerebral Injection of Preformed Synthetic Tau Fibrils Initiates Widespread Tauopathy and Neuronal Loss in the Brains of Tau Transgenic Mice ». *Neurobiology of Disease* 73 (janvier): 83-95. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.08.032>.

- Pelvig, D. P., H. Pakkenberg, A. K. Stark, et B. Pakkenberg. 2008. « Neocortical Glial Cell Numbers in Human Brains ». *Neurobiology of Aging* 29 (11): 1754-62. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.013>.
- Perea, Juan Ramón, Marta Bolós, et Jesús Avila. 2020. « Microglia in Alzheimer's Disease in the Context of Tau Pathology ». *Biomolecules* 10 (10): 1439. <https://doi.org/10.3390/biom10101439>.
- Perea, Juan Ramón, Esther López, José Carlos Díez-Ballesteros, Jesús Ávila, Félix Hernández, et Marta Bolós. 2019. « Extracellular Monomeric Tau Is Internalized by Astrocytes ». *Frontiers in Neuroscience* 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2019.00442>.
- Perez, Mar, Ismael Santa-Maria, Elena Gomez de Barreda, Xiongwei Zhu, Raquel Cuadros, Jose Roman Cabrero, Francisco Sanchez-Madrid, et al. 2009. « Tau--an Inhibitor of Deacetylase HDAC6 Function ». *Journal of Neurochemistry* 109 (6): 1756-66. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06102.x>.
- Pluvinage, John V., Michael S. Haney, Benjamin A. H. Smith, Jerry Sun, Tal Iram, Liana Bonanno, Lulin Li, et al. 2019. « CD22 Blockade Restores Homeostatic Microglial Phagocytosis in Ageing Brains ». *Nature* 568 (7751): 187-92. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1088-4>.
- Pooler, Amy M., Wendy Noble, et Diane P. Hanger. 2014. « A Role for Tau at the Synapse in Alzheimer's Disease Pathogenesis ». *Neuropharmacology* 76 Pt A (janvier): 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.09.018>.
- Probst, A., J. Ulrich, et P. U. Heitz. 1982. « Senile Dementia of Alzheimer Type: Astroglial Reaction to Extracellular Neurofibrillary Tangles in the Hippocampus. An Immunocytochemical and Electron-Microscopic Study ». *Acta Neuropathologica* 57 (1): 75-79. <https://doi.org/10.1007/BF00688880>.
- Ramirez, Denise M. O., Jennifer D. Whitesell, Nikhil Bhagwat, Talitha L. Thomas, Apoorva D. Ajay, Ariana Nawaby, Benoît Delatour, et al. 2023. « Endogenous Pathology in Tauopathy Mice Progresses via Brain Networks ». *BioRxiv: The Preprint Server for Biology*, mai, 2023.05.23.541792. <https://doi.org/10.1101/2023.05.23.541792>.
- Rauch, Jennifer N., Gabriel Luna, Elmer Guzman, Morgane Audouard, Collin Challis, Youssef E. Sibih, Carolina Leshuk, et al. 2020. « LRP1 Is a Master Regulator of Tau Uptake and Spread ». *Nature* 580 (7803): 381-85. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2156-5>.
- « recommandation_maladie_d_alzheimer_et_maladies_apparentees_diagnostic_et_prsie_en_charge.pdf ». s. d. Consulté le 8 août 2023. https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2011-12/recommandation_maladie_d_alzheimer_et_maladies_apparentees_diagnostic_et_prsie_en_charge.pdf.
- Regan, Philip, Daniel J. Whitcomb, et Kwangwook Cho. 2017. « Physiological and Pathophysiological Implications of Synaptic Tau ». *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* 23 (2): 137-51. <https://doi.org/10.1177/1073858416633439>.
- Riquelme-Perez, Miriam, Fernando Perez-Sanz, Jean-François Deleuze, Carole Escartin, Eric Bonnet, et Solène Brohard. 2022. « DEVEA: An Interactive Shiny Application for Differential Expression Analysis, Data Visualization and Enrichment Analysis of Transcriptomics Data ». *F1000Research* 11: 711. <https://doi.org/10.12688/f1000research.122949.2>.

- Rubin, Rita. 2021. « CMS Considers Controversial Alzheimer Drug Coverage ». *JAMA* 326 (8): 690. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.13728>.
- Saito, Takashi, Naomi Mihira, Yukio Matsuba, Hiroki Sasaguri, Shoko Hashimoto, Sneha Narasimhan, Bin Zhang, et al. 2019. « Humanization of the Entire Murine Mapt Gene Provides a Murine Model of Pathological Human Tau Propagation ». *The Journal of Biological Chemistry* 294 (34): 12754-65. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009487>.
- Saito, Yuko, Nyoka N. Ruberu, Motoji Sawabe, Tomio Arai, Noriko Tanaka, Yukio Kakuta, Hiroshi Yamanouchi, et Shigeo Murayama. 2004. « Staging of Argyrophilic Grains: An Age-Associated Tauopathy ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 63 (9): 911-18. <https://doi.org/10.1093/jnen/63.9.911>.
- Salter, Michael W., et Beth Stevens. 2017. « Microglia Emerge as Central Players in Brain Disease ». *Nature Medicine* 23 (9): 1018-27. <https://doi.org/10.1038/nm.4397>.
- Santacruz, K., J. Lewis, T. Spire, J. Paulson, L. Kotilinek, M. Ingelsson, A. Guimaraes, et al. 2005. « Tau Suppression in a Neurodegenerative Mouse Model Improves Memory Function ». *Science (New York, N.Y.)* 309 (5733): 476-81. <https://doi.org/10.1126/science.1113694>.
- Sato, Chihiro, Nicolas R. Barthélemy, Kwasi G. Mawuenyega, Bruce W. Patterson, Brian A. Gordon, Jennifer Jockel-Balsarotti, Melissa Sullivan, et al. 2018. « Tau Kinetics in Neurons and the Human Central Nervous System ». *Neuron* 97 (6): 1284-1298.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.02.015>.
- Sayed, Faten A., Maria Telpoukhovskaia, Lay Kodama, Yaqiao Li, Yungui Zhou, David Le, Axel Hauduc, et al. 2018. « Differential Effects of Partial and Complete Loss of TREM2 on Microglial Injury Response and Tauopathy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (40): 10172-77. <https://doi.org/10.1073/pnas.1811411115>.
- Scheiblich, Hannah, Cira Dansokho, Dilek Mercan, Susanne V. Schmidt, Luc Bousset, Lena Wischhof, Frederik Eikens, et al. 2021. « Microglia Jointly Degrade Fibrillar Alpha-Synuclein Cargo by Distribution through Tunneling Nanotubes ». *Cell* 184 (20): 5089-5106.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.09.007>.
- Schmidt, Sissel Ida, Morten Blaabjerg, Kristine Freude, et Morten Meyer. 2022. « RhoA Signaling in Neurodegenerative Diseases ». *Cells* 11 (9): 1520. <https://doi.org/10.3390/cells11091520>.
- Schmidt, Sophie, Max Holzer, Thomas Arendt, Mandy Sonntag, et Markus Morawski. 2022. « Tau Protein Modulates Perineuronal Extracellular Matrix Expression in the TauP301L-Acan Mouse Model ». *Biomolecules* 12 (4): 505. <https://doi.org/10.3390/biom12040505>.
- Schultz, M. K., R. Gentzel, M. Usenovic, C. Gretzula, C. Ware, S. Parmentier-Batteur, J. B. Schachter, et H. A. Zariwala. 2018. « Pharmacogenetic Neuronal Stimulation Increases Human Tau Pathology and Trans-Synaptic Spread of Tau to Distal Brain Regions in Mice ». *Neurobiology of Disease* 118 (octobre): 161-76. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.07.003>.
- Scott-Hewitt, Nicole, Fabio Perrucci, Raffaella Morini, Marco Erreni, Matthew Mahoney, Agata Witkowska, Alanna Carey, et al. 2020. « Local Externalization of Phosphatidylserine Mediates Developmental Synaptic Pruning by Microglia ». *The EMBO Journal* 39 (16): e105380. <https://doi.org/10.15252/embj.2020105380>.
- Seemiller, Joseph, Gérard N. Bischof, Merle C. Hoenig, Masoud Tahmasian, Thilo van Eimeren, Alexander Drzezga, et al. 2018. « The Alzheimer's Disease Neuroimaging

- Initiative. 2021. « Indication of Retrograde Tau Spreading along Braak Stages and Functional Connectivity Pathways ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 48 (7): 2272-82. <https://doi.org/10.1007/s00259-020-05183-1>.
- Sessa, Giuseppina, Paola Podini, Margherita Mariani, Alessandra Meroni, Roberto Spreafico, Francesco Sinigaglia, Marco Colonna, Paola Panina, et Jacopo Meldolesi. 2004. « Distribution and Signaling of TREM2/DAP12, the Receptor System Mutated in Human Polycystic Lipomembraneous Osteodysplasia with Sclerosing Leukoencephalopathy Dementia ». *The European Journal of Neuroscience* 20 (10): 2617-28. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03729.x>.
- Shi, Yang, et David M. Holtzman. 2018. « Interplay between Innate Immunity and Alzheimer Disease: APOE and TREM2 in the Spotlight ». *Nature Reviews. Immunology* 18 (12): 759-72. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0051-1>.
- Sierra, Amanda, Rosa C. Paolicelli, et Helmut Kettenmann. 2019. « Cien Años de Microglía: Milestones in a Century of Microglial Research ». *Trends in Neurosciences* 42 (11): 778-92. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.09.004>.
- Sigurdson, Christina J., Jason C. Bartz, et Markus Glatzel. 2019. « Cellular and Molecular Mechanisms of Prion Disease ». *Annual Review of Pathology* 14 (janvier): 497-516. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-013109>.
- Silva, R. de, T. Lashley, G. Gibb, D. Hanger, A. Hope, A. Reid, R. Bandopadhyay, et al. 2003. « Pathological Inclusion Bodies in Tauopathies Contain Distinct Complements of Tau with Three or Four Microtubule-Binding Repeat Domains as Demonstrated by New Specific Monoclonal Antibodies ». *Neuropathology and Applied Neurobiology* 29 (3): 288-302. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2990.2003.00463.x>.
- Simard, A. R., et S. Rivest. 2006. « Neuroprotective Properties of the Innate Immune System and Bone Marrow Stem Cells in Alzheimer's Disease ». *Molecular Psychiatry* 11 (4): 327-35. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001809>.
- Sjöberg, Marcela K., Elena Shestakova, Zeyni Mansuroglu, Ricardo B. Maccioni, et Eliette Bonnefoy. 2006. « Tau Protein Binds to Pericentromeric DNA: A Putative Role for Nuclear Tau in Nucleolar Organization ». *Journal of Cell Science* 119 (Pt 10): 2025-34. <https://doi.org/10.1242/jcs.02907>.
- Smolek, Tomas, Santosh Jadhav, Veronika Brezovakova, Veronika Cubinkova, Bernadeta Valachova, Petr Novak, et Norbert Zilka. 2019. « First-in-Rat Study of Human Alzheimer's Disease Tau Propagation ». *Molecular Neurobiology* 56 (1): 621-31. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1102-0>.
- Sotiropoulos, Ioannis, Marie-Christine Galas, Joana M. Silva, Efthimios Skoulakis, Susanne Wegmann, Mahmoud Bukar Maina, David Blum, et al. 2017. « Atypical, Non-Standard Functions of the Microtubule Associated Tau Protein ». *Acta Neuropathologica Communications* 5 (1): 91. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0489-6>.
- Srivastava, Sukriti, Razi Ahmad, et Sunil Kumar Khare. 2021. « Alzheimer's Disease and Its Treatment by Different Approaches: A Review ». *European Journal of Medicinal Chemistry* 216 (avril): 113320. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113320>.
- Stancu, Ilie-Cosmin, Bruno Vasconcelos, Laurence Ris, Peng Wang, Agnès Villers, Eve Peeraer, Arjan Buist, et al. 2015. « Templated Misfolding of Tau by Prion-like Seeding along Neuronal Connections Impairs Neuronal Network Function and Associated Behavioral Outcomes in Tau Transgenic Mice ». *Acta Neuropathologica* 129 (6): 875-94. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1413-4>.

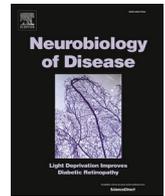
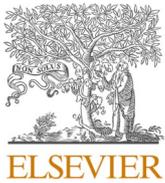
- Stratoulia, Vassilis, Jose Luis Venero, Marie-Ève Tremblay, et Bertrand Joseph. 2019. « Microglial Subtypes: Diversity within the Microglial Community ». *The EMBO Journal* 38 (17): e101997. <https://doi.org/10.15252/embj.2019101997>.
- Streit, Wolfgang J., et Qing-Shan Xue. 2013. « Microglial Senescence ». *CNS & Neurological Disorders Drug Targets* 12 (6): 763-67. <https://doi.org/10.2174/18715273113126660176>.
- Stremmel, C., R. Schuchert, F. Wagner, R. Thaler, T. Weinberger, R. Pick, E. Mass, et al. 2018. « Yolk Sac Macrophage Progenitors Traffic to the Embryo during Defined Stages of Development ». *Nature Communications* 9 (1): 75. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02492-2>.
- Suárez-Calvet, Marc, Thomas K. Karikari, Nicholas J. Ashton, Juan Lantero Rodríguez, Marta Milà-Alomà, Juan Domingo Gispert, Gemma Salvadó, et al. 2020. « Novel Tau Biomarkers Phosphorylated at T181, T217 or T231 Rise in the Initial Stages of the Preclinical Alzheimer's Continuum When Only Subtle Changes in A β Pathology Are Detected ». *EMBO Molecular Medicine* 12 (12): e12921. <https://doi.org/10.15252/emmm.202012921>.
- Sultan, Audrey, Fabrice Nessler, Marie Violet, Séverine Bégard, Anne Loyens, Smail Talahari, Zeyni Mansuroglu, et al. 2011. « Nuclear Tau, a Key Player in Neuronal DNA Protection ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (6): 4566-75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.199976>.
- Tai, Hwan-Ching, Alberto Serrano-Pozo, Tadafumi Hashimoto, Matthew P. Frosch, Tara L. Spires-Jones, et Bradley T. Hyman. 2012. « The Synaptic Accumulation of Hyperphosphorylated Tau Oligomers in Alzheimer Disease Is Associated with Dysfunction of the Ubiquitin-Proteasome System ». *The American Journal of Pathology* 181 (4): 1426-35. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.06.033>.
- Takahashi, Kazuya, Christian D. P. Rochford, et Harald Neumann. 2005. « Clearance of Apoptotic Neurons without Inflammation by Microglial Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-2 ». *The Journal of Experimental Medicine* 201 (4): 647-57. <https://doi.org/10.1084/jem.20041611>.
- Tapia-Rojas, Cheril, Fabian Cabezas-Opazo, Carol A. Deaton, Erick H. Vergara, Gail V.W. Johnson, et Rodrigo A. Quintanilla. 2019. « It's All about Tau ». *Progress in Neurobiology* 175 (avril): 54-76. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.12.005>.
- Tardivel, Meryem, Séverine Bégard, Luc Bousset, Simon Dujardin, Audrey Coens, Ronald Melki, Luc Buée, et Morvane Colin. 2016. « Tunneling Nanotube (TNT)-Mediated Neuron-to-Neuron Transfer of Pathological Tau Protein Assemblies ». *Acta Neuropathologica Communications* 4 (1): 117. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0386-4>.
- Tracy, Tara E., et Li Gan. 2018. « Tau-Mediated Synaptic and Neuronal Dysfunction in Neurodegenerative Disease ». *Current Opinion in Neurobiology* 51 (août): 134-38. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.04.027>.
- Turnbull, Isaiah R., Susan Gilfillan, Marina Cella, Taiki Aoshi, Mark Miller, Laura Piccio, Maristela Hernandez, et Marco Colonna. 2006. « Cutting Edge: TREM-2 Attenuates Macrophage Activation ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177 (6): 3520-24. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.6.3520>.
- Ulland, Tyler K., et Marco Colonna. 2018. « TREM2 — a Key Player in Microglial Biology and Alzheimer Disease ». *Nature Reviews Neurology* 14 (11): 667-75. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0072-1>.

- Ulrich, Jason D., Mary Beth Finn, Yaming Wang, Alice Shen, Thomas E. Mahan, Hong Jiang, Floy R. Stewart, Laura Piccio, Marco Colonna, et David M. Holtzman. 2014. « Altered Microglial Response to A β Plaques in APPPS1-21 Mice Heterozygous for TREM2 ». *Molecular Neurodegeneration* 9 (juin): 20. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-20>.
- Usenovic, Marija, Shahriar Niroomand, Robert E. Drolet, Lihang Yao, Renee C. Gaspar, Nathan G. Hatcher, Joel Schachter, John J. Renger, et Sophie Parmentier-Batteur. 2015. « Internalized Tau Oligomers Cause Neurodegeneration by Inducing Accumulation of Pathogenic Tau in Human Neurons Derived from Induced Pluripotent Stem Cells ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 35 (42): 14234-50. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1523-15.2015>.
- VanRyzin, Jonathan W., Ashley E. Marquardt, Kathryn J. Argue, Haley A. Vecchiarelli, Sydney E. Ashton, Sheryl E. Arambula, Matthew N. Hill, et Margaret M. McCarthy. 2019. « Microglial Phagocytosis of Newborn Cells Is Induced by Endocannabinoids and Sculptures Sex Differences in Juvenile Rat Social Play ». *Neuron* 102 (2): 435-449.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.02.006>.
- Vautheny, Audrey, Charlotte Duwat, Gwennaëlle Aurégan, Charlène Joséphine, Anne-Sophie Hérard, Caroline Jan, Julien Mitja, et al. 2021. « THY-Tau22 Mouse Model Accumulates More Tauopathy at Late Stage of the Disease in Response to Microglia Deactivation through TREM2 Deficiency ». *Neurobiology of Disease* 155 (juillet): 105398. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105398>.
- Vaz, Miguel, Vítor Silva, Cristina Monteiro, et Samuel Silvestre. 2022. « Role of Aducanumab in the Treatment of Alzheimer's Disease: Challenges and Opportunities ». *Clinical Interventions in Aging* 17: 797-810. <https://doi.org/10.2147/CIA.S325026>.
- Wai, Maria Sen Mun, Yong Liang, Chun Shi, Eric Y. P. Cho, Hsiang-Fu Kung, et David T. Yew. 2009. « Co-Localization of Hyperphosphorylated Tau and Caspases in the Brainstem of Alzheimer's Disease Patients ». *Biogerontology* 10 (4): 457-69. <https://doi.org/10.1007/s10522-008-9189-8>.
- Wakselman, Shirley, Catherine Béchade, Anne Roumier, Delphine Bernard, Antoine Triller, et Alain Bessis. 2008. « Developmental Neuronal Death in Hippocampus Requires the Microglial CD11b Integrin and DAP12 Immunoreceptor ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28 (32): 8138-43. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1006-08.2008>.
- Walsh, Sebastian, Richard Merrick, Richard Milne, et Carol Brayne. 2021. « Aducanumab for Alzheimer's Disease? ». *BMJ (Clinical Research Ed.)* 374 (juillet): n1682. <https://doi.org/10.1136/bmj.n1682>.
- Wang, Rui, et P. Hemachandra Reddy. 2017. « Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease ». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 57 (4): 1041-48. <https://doi.org/10.3233/JAD-160763>.
- Wang, Yipeng, Varun Balaji, Senthilvelrajan Kaniyappan, Lars Krüger, Stephan Irsen, Katharina Tepper, RamReddy Chandupatla, et al. 2017. « The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes ». *Molecular Neurodegeneration* 12 (1): 5. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0143-y>.
- Wegmann, Susanne, Rachel E. Bennett, Louis Delorme, Ashley B. Robbins, Miwei Hu, Danny McKenzie, Molly J. Kirk, et al. 2019. « Experimental Evidence for the Age Dependence of Tau Protein Spread in the Brain ». *Science Advances* 5 (6): eaaw6404. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw6404>.

- Wegmann, Susanne, Jacek Biernat, et Eckhard Mandelkow. 2021. « A Current View on Tau Protein Phosphorylation in Alzheimer's Disease ». *Current Opinion in Neurobiology* 69 (août): 131-38. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2021.03.003>.
- Welikovitsh, Lindsay A., Simon Dujardin, Amy R. Dunn, Analiese R. Fernandes, Anita Khasnavis, Lori B. Chibnik, Catherine C. Kaczorowski, et Bradley T. Hyman. 2023. « Rate of Tau Propagation Is a Heritable Disease Trait in Genetically Diverse Mouse Strains ». *iScience* 26 (2): 105983. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.105983>.
- Wheeler, Michael A., Iain C. Clark, Hong-Gyun Lee, Zhaorong Li, Mathias Linnerbauer, Joseph M. Rone, Manon Blain, et al. 2023. « Droplet-Based Forward Genetic Screening of Astrocyte-Microglia Cross-Talk ». *Science (New York, N.Y.)* 379 (6636): 1023-30. <https://doi.org/10.1126/science.abq4822>.
- Whitwell, Jennifer L., Dennis W. Dickson, Melissa E. Murray, Stephen D. Weigand, Nirubol Tosakulwong, Matthew L. Senjem, David S. Knopman, et al. 2012. « Neuroimaging Correlates of Pathologically Defined Subtypes of Alzheimer's Disease: A Case-Control Study ». *The Lancet. Neurology* 11 (10): 868-77. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70200-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70200-4).
- Williams, David R., Janice L. Holton, Catherine Strand, Alan Pittman, Rohan de Silva, Andrew J. Lees, et Tamas Revesz. 2007. « Pathological Tau Burden and Distribution Distinguishes Progressive Supranuclear Palsy-Parkinsonism from Richardson's Syndrome ». *Brain: A Journal of Neurology* 130 (Pt 6): 1566-76. <https://doi.org/10.1093/brain/awm104>.
- Wolfe, Michael S. 2012. « The Role of Tau in Neurodegenerative Diseases and Its Potential as a Therapeutic Target ». *Scientifica* 2012 (décembre): e796024. <https://doi.org/10.6064/2012/796024>.
- Wu, Jessica W., S. Abid Hussaini, Isle M. Bastille, Gustavo A. Rodriguez, Ana Mrejeru, Kelly Rilett, David W. Sanders, et al. 2016. « Neuronal Activity Enhances Tau Propagation and Tau Pathology in Vivo ». *Nature Neuroscience* 19 (8): 1085-92. <https://doi.org/10.1038/nn.4328>.
- Yaghmoor, Faris. 2014. « The Role of TREM2 in Alzheimer's Disease and Other Neurological Disorders ». *Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism* 04 (05). <https://doi.org/10.4172/2161-0460.1000160>.
- Yamada, Jun, Tomohiro Ohgomori, et Shozo Jinno. 2017. « Alterations in Expression of Cat-315 Epitope of Perineuronal Nets during Normal Ageing, and Its Modulation by an Open-Channel NMDA Receptor Blocker, Memantine ». *The Journal of Comparative Neurology* 525 (9): 2035-49. <https://doi.org/10.1002/cne.24198>.
- Yeh, Felix L., David V. Hansen, et Morgan Sheng. 2017. « TREM2, Microglia, and Neurodegenerative Diseases ». *Trends in Molecular Medicine* 23 (6): 512-33. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.03.008>.
- Yoshiyama, Yasumasa, Makoto Higuchi, Bin Zhang, Shu-Ming Huang, Nobuhisa Iwata, Takaomi C. Saido, Jun Maeda, Tetsuya Suhara, John Q. Trojanowski, et Virginia M.-Y. Lee. 2007. « Synapse Loss and Microglial Activation Precede Tangles in a P301S Tauopathy Mouse Model ». *Neuron* 53 (3): 337-51. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.01.010>.
- Zetterberg, Henrik, Tobias Skillbäck, Niklas Mattsson, John Q. Trojanowski, Erik Portelius, Leslie M. Shaw, Michael W. Weiner, Kaj Blennow, et Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. 2016. « Association of Cerebrospinal Fluid Neurofilament

- Light Concentration With Alzheimer Disease Progression ». *JAMA Neurology* 73 (1): 60-67. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.3037>.
- Zhang, X.-X., Y. Tian, Z.-T. Wang, Y.-H. Ma, L. Tan, et J.-T. Yu. 2021. « The Epidemiology of Alzheimer's Disease Modifiable Risk Factors and Prevention ». *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease* 8 (3): 313-21. <https://doi.org/10.14283/jpad.2021.15>.
- Zhang, Ye, Kenian Chen, Steven A. Sloan, Mariko L. Bennett, Anja R. Scholze, Sean O'Keeffe, Hemali P. Phatnani, et al. 2014. « An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 34 (36): 11929-47. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014>.
- Zhang, Ye, Steven A. Sloan, Laura E. Clarke, Christine Caneda, Colton A. Plaza, Paul D. Blumenthal, Hannes Vogel, et al. 2016. « Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse ». *Neuron* 89 (1): 37-53. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.013>.
- Zheng, Honghua, Lin Jia, Chia-Chen Liu, Zhouyi Rong, Li Zhong, Longyu Yang, Xiao-Fen Chen, et al. 2017. « TREM2 Promotes Microglial Survival by Activating Wnt/ β -Catenin Pathway ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 37 (7): 1772-84. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2459-16.2017>.
- Zhou, Bin, et Masanori Fukushima. 2020. « Clinical Utility of the Pathogenesis-Related Proteins in Alzheimer's Disease ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (22): 8661. <https://doi.org/10.3390/ijms21228661>.
- Zhu, Bing, Yan Liu, Spring Hwang, Kailey Archuleta, Huijie Huang, Alex Campos, Rabi Murad, Juan Piña-Crespo, Huaxi Xu, et Timothy Y. Huang. 2022. « Trem2 Deletion Enhances Tau Dispersion and Pathology through Microglia Exosomes ». *Molecular Neurodegeneration* 17 (1): 58. <https://doi.org/10.1186/s13024-022-00562-8>.

ANNEXES



Development of an AAV-based model of tauopathy targeting retinal ganglion cells and the mouse visual pathway to study the role of microglia in Tau pathology

Charlotte Duwat^{a,1}, Pauline Léal^{a,1}, Audrey Vautheny^{a,2}, Gwennaëlle Aurégan^a, Charène Joséphine^a, Marie-Claude Gaillard^a, Anne-Sophie Hérard^a, Caroline Jan^a, Pauline Gipchtein^a, Julien Mitja^a, Stéphane Fouquet^b, Marie-Laure Niepon^b, Philippe Hantraye^a, Emmanuel Brouillet^a, Gilles Bonvento^a, Karine Cambon^a, Alexis-Pierre Bemelmans^{a,*}

^a Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Laboratoire des Maladies Neurodégénératives: mécanismes, thérapies, imagerie, 92265 Fontenay-aux-Roses, France

^b Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, Paris, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Tauopathy
Animal model
AAV (adeno-associated virus)
Microglia
TREM2
Aging

ABSTRACT

Tauopathy is a typical feature of Alzheimer's disease of major importance because it strongly correlates with the severity of cognitive deficits experienced by patients. During the pathology, it follows a characteristic spatio-temporal course which takes its origin in the transentorhinal cortex, and then gradually invades the entire forebrain. To study the mechanisms of tauopathy, and test new therapeutic strategies, it is necessary to set-up relevant and versatile *in vivo* models allowing to recapitulate tauopathy. With this in mind, we have developed a model of tauopathy by overexpression of the human wild-type Tau protein in retinal ganglion cells in mice (RGCs). This overexpression led to the presence of hyperphosphorylated forms of the protein in the transduced cells as well as to their progressive degeneration. The application of this model to mice deficient in TREM2 (*Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-2*, an important genetic risk factor for AD) as well as to 15-month-old mice showed that microglia actively participate in the degeneration of RGCs. Surprisingly, although we were able to detect the transgenic Tau protein up to the terminal arborization of RGCs at the level of the superior colliculi, spreading of the transgenic Tau protein to post-synaptic neurons was detected only in aged animals. This suggests that there may be neuron-intrinsic- or microenvironment mediators facilitating this spreading that appear with aging.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) presents two types of histological lesions, amyloid plaques composed of extracellular deposits of β -amyloid peptide resulting from cleavage of the APP protein by endopeptidases of the amyloidogenic pathway, and neurofibrillary tangles (NFTs) which result from intraneuronal aggregation of hyperphosphorylated Tau protein (DeTure and Dickson, 2019). These two lesions typical of AD are always accompanied by a neuroinflammatory component which is

characterized by astrocytic activation and microgliosis (Heppner et al., 2015). All these lesions do not appear concomitantly and the hypothesis which currently prevails to explain the etiology of the disease implies an initial development of amyloid plaques which subsequently triggers neuroinflammation and promotes NFTs development, without the mechanisms linking these two phenomena being clearly established. For this reason, one of the most explored therapeutic avenues currently aims to reduce plaques in the patients' brain, in particular using monoclonal antibodies specific for aggregated A β peptide. This strategy has yielded

* Corresponding author at: MIRGen / CEA, 18 route du Panorama, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France.

E-mail address: alexis.bemelmans@cea.fr (A.-P. Bemelmans).

¹ CD and PL contributed equally to this work.

² Present address: Neuroscience Discovery, Roche Pharma Research & Early Development, Roche Innovation Center Basel, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland.

very encouraging results in animal models of the disease. However, despite some encouraging recent advances, the conclusions of the numerous clinical trials conducted in the field remain globally disappointing. On the other hand, it is now established that the cognitive symptoms of the disease are strongly correlated with tauopathy, but also that there are people with a significant cerebral amyloid load in the absence of any cognitive symptoms (Aizenstein et al., 2008; Delaère et al., 1990; Katzman et al., 1988; Villemagne et al., 2011). Countering the formation of NFTs therefore also appears to be a major therapeutic strategy for AD. Braak et al. demonstrated that, in AD, tauopathy follows a typical spatiotemporal course characterized by a pathology onset in the transentorhinal cortex in the early stages, before spreading first to the limbic regions, and then invading the entire neocortex in the terminal stages of the disease (Braak et al., 2006; Braak and Braak, 1991). These histological studies carried out post-mortem were more recently confirmed by in vivo imaging thanks to the emergence of PET radioligands specific for aggregated forms of Tau (Bejanin et al., 2017). All these data have made it possible to establish the correlation between the severity of the symptoms and the extent of the tauopathy, and also to reveal the Prion-like character of this type of lesion which involves a spread of the toxic Tau species between interconnected neurons or cerebral regions (Dujardin and Hyman, 2019). Thus, stopping or even only slowing down the spread of tauopathy in the brain of patients should make it possible to very significantly reduce the progression of cognitive deficits.

To test this type of therapeutic strategy, but also to study the cellular and molecular players involved in the inter-neuronal propagation of pathological forms of the Tau protein, it is necessary to set-up relevant in vivo models. There are many mouse transgenic lines that model tauopathy (reviewed in (Dujardin et al., 2015)), but their use to study propagation phenomena faces various obstacles. In particular, the fact that the expression of the transgene is diffuse does not make it possible to easily distinguish the initial event leading to intrinsic neuronal tauopathy from a secondary event due to the propagation of Tau seeds in an anatomically connected area of the brain. For this reason, several groups, including ours, have developed models of focal tauopathy obtained by targeted gene transfer in the central nervous system (Asai et al., 2015; d'Orange et al., 2018; Dujardin et al., 2014b, 2018; Klein et al., 2008a, 2010; Schultz et al., 2018; Wegmann et al., 2019). Most of these models rely on the use of recombinant adeno-associated virus (rAAV), a very versatile vector for gene transfer in the central nervous system (Haggerty et al., 2020). These models of focal tauopathy obtained by rAAV injection seem at first glance ideal to study propagation, but have nevertheless a major drawback: the very efficient diffusion of viral particles in the cerebral parenchyma (Burger et al., 2004; Cearley et al., 2008; Klein et al., 2008b). Because of this, it is often difficult to accurately determine whether a neuron is affected in an area of the brain connected to the injected region as a result of the spread of tauopathy or of the diffusion of viral particles during the injection. To overcome this drawback, we have chosen to transduce neural networks whose connections are well characterized and for which the anatomical organization prevents the transduction of the efferent regions of the injected area. For this, the retinal ganglion cells (RGCs) appear as an ideal model. These cells are located in the retina and mainly project in two retinorecipient areas in the brain, the superior colliculus and the dorsal lateral geniculate nucleus (Martersteck et al., 2017). Furthermore, serotype 2 rAAV, or their Tyr-mutant versions like the 2-Y444F that we used in this study, can transduce them with great efficiency in mice (Martin et al., 2003; Petrs-Silva et al., 2009). In addition, it is now established that the retina is one of the areas of the central nervous system that is affected in AD (Ashok et al., 2020; Hart de Ruyter et al., 2023), and in particular that RGCs naturally express the different isoforms of the Tau protein (den Haan et al., 2018) and can be affected by tauopathy (Chiasseu et al., 2016, 2017; Mazzaro et al., 2016; Oku et al., 2019).

In the present study, we report the development of a model of overexpression of the 1N4R isoform of wild-type human Tau protein in

mouse RGCs. For this, we have used an rAAV construct to specifically target these cells thanks to a specific promoter / serotype combination (Chaffiol et al., 2017). Our results show that this overexpression causes progressive degeneration of RGCs accompanied by microglial activation characterized by an increase in the specific marker Iba-1. The transgenic Tau protein is found all along the axons of RGCs to the primary visual brain areas such as the superior colliculi. However, in these areas, we could demonstrate the passage of the Tau protein in RGCs' efferent neurons only in aged mice. To determine the influence of microglial activation on the progression of tauopathy, we applied our model to TREM2-deficient mice. *Trem2* is expressed by the myeloid lineage, and specifically by microglia in the CNS. In humans, *Trem2* variants strongly increase the risk of developing various neurodegenerative diseases, and AD in particular. It was subsequently shown that a deficiency in TREM2 aggravates the phenotype of various models of AD developed in mice, and that this aggravation is linked to a defect in the activation of microglia (Deczkowska et al., 2020). We have also explored the role of microglial aging which results in a decrease in phagocytic activity (Pluvinage et al., 2019), by applying our model to aged mice. These experiments showed that microglial activation is deleterious for tauopathic neurons and that the sensitivity of RGCs to tauopathy increases with age and microglial activation.

2. Material and methods

2.1. Animals

Animal procedures were performed in accordance with the French regulation (EU directive 86/609 – French Act Rural Code R214-87 to 131). The animal facility was approved by veterinarian inspections (authorization n°B92-032-02) and complied with Standards for Humane Care and Use of Laboratory Animals of the Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW – n°#A5826-01). All procedures received approval from the local ethical committee (Comité d'Éthique en Expérimentation Animale CEA) and the French Ministry of Research (APAFIS#612-2,015,050,514,376,362 v3). Adult male C57Bl/6 J mice (3-month-old, JANVIER laboratories) were used for AAV transduction. Female *Trem2*^{+/+}, *Trem2*^{+/-} and *Trem2*^{-/-} mice [34] were used to assess the role of TREM2 in tauopathy. Aged female C57Bl/6 J mice (15-month-old) were used to study the impact of age on tauopathy.

2.2. Viral vectors

To drive specific transgene expression in RGCs, we placed the different transgenes in a rAAV shuttle plasmid under the transcriptional control of the gamma-synuclein (SNCG) promoter (Chaffiol et al., 2017), and we generated rAAV particles with AAV2 capsids bearing a tyrosine to phenylalanine mutation in position 444 (AAV2-Y444F). The Tyr-mutant versions of serotype 2 have indeed been shown to be more effective in different experimental paradigms in vitro and in vivo (Zhong et al., 2008), and in particular for the transduction of mouse RGCs (Petrs-Silva et al., 2009). Recombinant viral particles were generated by transient co-transfection of HEK-293T cells with a three-plasmids system as previously described (Berger et al., 2015). Briefly, 3 days following transfection, viral particles were harvested in cell supernatant and cell lysate, concentrated by polyethylene glycol precipitation, purified by ultracentrifugation on an Iodixanol discontinuous density gradient, and desalted and concentrated by tangential flow ultrafiltration. The resulting rAAV vector batches were stored at 4 °C until further use. rAAV concentration in the viral batches was estimated by QPCR using a plasmid of known concentration for the standard curve (Aurnhammer et al., 2012), and expressed as genome content by mL (GC/ml).

2.3. Intravitreal injections of rAAV vectors

For intravitreal delivery of rAAV, mice were anesthetized by

intraperitoneal injection of ketamine (90 mg/kg, Imalgene 1000, Merial, Lyon, France) and xylazine (5 mg/kg, Rompun® 2%, Bayer SAS, La-Garenne-Colombes, France). Pupil dilation, allowing to visualize and insure correct placement of the tip of the injection needle inside the vitreous, was achieved by topical administration of a mixture of neosynephrine and mydriaticum on the cornea, followed by local analgesia with oxybuprocaine. rAAV vectors were administered in the vitreous chamber through a small incision made in the sclera at the limit of the limbus using a 10 µl Hamilton syringe adapted with a 33-gauge micro-needle (total volume: 1.2 µl delivered at 120 nL.sec⁻¹). A deposit of mineral oil on the cornea then allowed the experimenter to assess correct placement of the needle tip in the vitreous. Following injection, the needle was then left in place for 10s and slowly removed to avoid reflux of the viral solution. Ophthalmic ointment was then applied to the cornea and the animals were monitored until complete recovery from the anesthesia.

2.4. Immunohistology

One, three or six months after injection, mice were deeply anesthetized with a lethal dose of pentobarbital (ExagonVR, Axience, 400 mg/kg). Tissues were fixed by intra-cardiac perfusion with 15 ml of 0.9% NaCl followed by 100 ml of PBS containing 4% paraformaldehyde (PFA).

After enucleation, eyes and optic nerves were then post-fixed for 1 h in the same fixative. The posterior chamber was then separated from the rest of the eye, and tissues were incubated over-night in PBS containing 30% sucrose before being embedded in a gelatin (7%) sucrose (30%) medium, frozen in -40 °C isopentane, and sectioned with a cryostat in 14 µm (retina) or 10 µm (optic nerve) thick sections that were collected onto superfrost® plus slides (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France) and stored at -20 °C until further processing.

Brains were extracted following PFA perfusion and post-fixed for 24 h in the same fixative before being transferred in PBS containing 30% sucrose for cryoprotection and stored at 4 °C until sectioning. Brains were cut coronally into 10 series of 30-µm thick sections on a freezing sliding microtome (SM1020R; Leica™) and stored in cryoprotectant solution at -20 °C until further processing.

For immunostaining of retinæ and optic nerves, slides were maintained at room temperature during 5 min before being rehydrated in PBS. After rehydration, slides were incubated 1 h with a blocking solution containing 10% normal goat serum in PBS with 0.2% Triton X-100 and then incubated with primary antibody overnight at +4 °C. After rinsing, slides were incubated for 1 h at room temperature with the appropriate secondary antibody diluted 1/1000 into PBS containing 1% NGS. Slides were then mounted with Mowiol.

For free-floating immunofluorescence, brain sections were incubated directly in blocking solution before transfer into primary antibody solutions for incubation overnight at +4 °C. After rinsing with 0.01 M PBS, sections were incubated for 1 h at RT into blocking solution containing 1/1000 Alexa-coupled secondary antibodies (ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France). Sections were then mounted on slides with Mowiol. Dilutions and providers of all the primary antibodies are indicated in Supp Table 1. NeuroTrace™ 640/660 staining (ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France) was performed following V5 and NeuN immunostaining following recommendations of the manufacturer.

2.5. Image analysis

Images of retinæ and optic nerves sections were acquired at 20× magnification using an epifluorescence microscope (DM600, Leica, Germany). Images of superior colliculi (except for NeuN immunostaining, see below) were acquired at 20× magnification using a slide scanner (Nanozoomer 2.0HT associated to the NDPView nanozoomer software, Hamamatsu Photonics, Japan). NDPI files were open with the Image J Bioformat plugin. NeuN labelling of superior colliculi were acquired at

20× magnification with the mosaic mode of a Leica SP8 confocal microscope. For each immunostaining, all images were taken with a fixed setting of the acquisition parameters to ensure reliability between animals and groups of the subsequent immunofluorescence quantification. For analysis of RGCs survival, Brn3a-positive nuclei were manually counted over the entire length of three retinal cross sections located close to the optic nerve position for each eye with the Cell counter plugin (ImageJ) and the length of the RGCs layer displayed on the transversal section was estimated to deduce the RGCs cell density expressed as cell number.mm⁻¹. As described in Froger et al. and Mead et al. (Froger et al., 2012; Mead et al., 2014), to ensure reliability of this quantification method, we counted for each retina three transversal sections in the vicinity of the optic nerve, a level at which the cutting plane is perpendicular to the retina. Colliculi were manually segmented using ImageJ and then a threshold was applied on each fluorescent channel before analysis of V5 and Estrogen-Related Receptor-β (ESRRβ) signals. NeuN positive nuclei were counted using the *analyze particle* plugin of ImageJ and the area of each colliculus was measured to deduce the neuronal cell density expressed as cell number.mm⁻².

For quantification of Iba1, GFAP, V5, HT7 and pSer422 immunostainings, three transversal sections of the retina and four transversal sections of the optic nerve were digitalized for each sample. The quantification was performed in each retinal section on 4 regions of interest covering the ganglion cell layer and the inner plexiform layer all along the retina and on the whole optic nerve sections, excluding the external sheath of this structure, often displaying a non-specific staining due the use of secondary antibodies against mouse IgG on mouse tissues. Then, a fixed threshold value was defined for each immunostaining to isolate the specific signal, corresponding to the sum of the grey value level of each pixel above the threshold.

2.6. Statistical analysis

Results are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism version 9.1 (GraphPad® software, San Diego, CA, USA). Data were assessed for normality and homogeneity of variance by Bartlett's test prior to analysis. According to the results of these tests, comparison between >2 groups were performed by one-way ANOVA or Kruskal-Wallis. ANOVA tests were followed by Sidak's post-hoc test for multiple comparisons between groups or Dunnett's (in case of ANOVA) post-hoc test. to compare injected groups vs non-injected groups. Multiple comparison by Dunn's post hoc test was performed after Kruskal-Wallis. With the same logic, for comparison between two groups, Unpaired t-test or Mann-Whitney test was used.

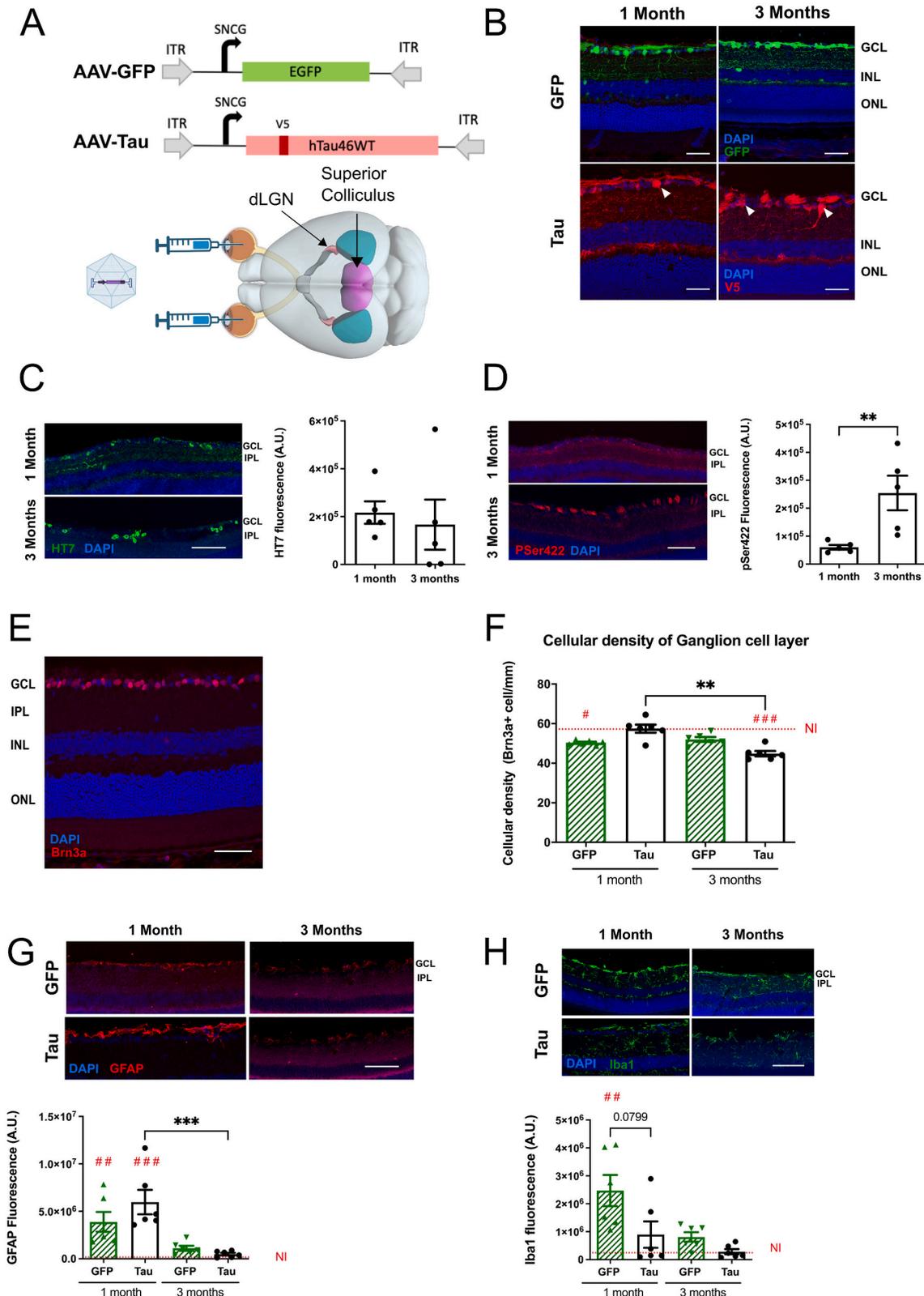
3. Results

3.1. Generation of a new model of focal tauopathy targeting retinal ganglion cells

We used rAAV mediated gene transfer to overexpress Tau in the mouse retina. To restrict expression to RGCs we combined AAV2-Y444F capsids with the SNCG promoter. The AAV-Tau was based on a Tau transgene derived from the 1N4R human cDNA in which a V5 tag was inserted between exons 3 and 4 (Dujardin et al., 2014a, 2014b). In the AAV-GFP control vector, the Tau-V5 cDNA was replaced by GFP. These rAAV vectors were injected bilaterally in the vitreous of 3-month-old C57Bl/6 J male mice (Fig. 1A). One- and three-months after injection, GFP and V5 immunofluorescence labelling demonstrated high levels of transgene expression specifically in RGCs (Fig. 1B). To quantify Tau expression in RGCs, we performed immunofluorescence labelling using the human specific anti-total Tau antibody HT7 and measured the fluorescence intensity across the whole ganglion cell layer (GCL) and inner plexiform layer (IPL) of a transverse section of the retina (Fig. 1C). The HT7 burden was the same at both time-points (Mann Whitney test,

$P = 0.3095$). Quantification of Tau expression based on V5 immunofluorescence led to the same conclusion (Fig. Supp1B), as did GFP expression in the control group (Fig. Supp1A). The ability of AAV-Tau to induce Tau hyperphosphorylation was then assessed by pSer422 antibody (Fig. 1D). This antibody is indeed specific for the human Tau

protein, whereas the more widely used AT8 antibody can also recognize murine forms. This is showed by numerous studies using AT8 immunoreactivity on wild-type mice subjected to traumatic brain injury (Kahriman et al., 2021). We observed an accumulation of hyperphosphorylated Tau at three-months post-injection compared to the one-



(caption on next page)

Fig. 1. Tauopathy can be induced in RGCs following intravitreal administration of AAV-Tau.

(A) Schematic representation of the experimental paradigm. rAAV vectors encoding V5-tagged wild-type 1N4R isoform of human Tau (AAV-Tau) or GFP (AAV-GFP) under the transcriptional control of the SNGC promoter were delivered bilaterally by intravitreal injection in old mice. (B) Representative images of Tau and GFP expression one- and three-months post-injection using GFP direct fluorescence and V5 immunolabelling. Arrowheads point to RGCs cell bodies. (C–D) Immunofluorescence labelling of the GCL using HT7 (C) and the human phospho-Tau specific epitope pSer422 (D) shows an accumulation of pSer422 labelling at three-months post-injection without concomitant increase of HT7 labelling. (E) Representative micrograph of Brn3a labelling used for assessing RGCs' survival. (F) Density of Brn3a-positive cells in AAV-GFP and AAV-Tau injected animals at one- and three-months post-injection. (G) Representative micrograph of GFAP labelling in GCL and IPL and quantification of the fluorescent signal in the different groups. (H) Representative micrograph of Iba1 labelling in GCL and IPL and quantification of Iba1 fluorescent signal in the different group. NI: non-injected, GCL: ganglion cell layer, INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer. $n = 3$ mice and 4 to 6 retinæ analyzed/group. Data represents mean \pm SEM. Scale bar: 50 μ m. Asterisks above each bar represent results of *Mann-Whitney test* between groups for C and D, results of *Dunn's* comparisons between groups for F, G and H * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$; # above each bar represents results of *Dunn's* comparison vs. non-injected animals.

month time-point, characterized by an increase of pSer422 signal (Mann-Whitney test, $P < 0.01$). This demonstrated that pathological phosphorylation of Tau can occur in RGCs.

We next assessed the toxicity of Tau overexpression in RGCs, using Brn3a labelling as a surrogate marker of RGCs survival (Fig. 1E and F). Brn3a is a transcription factor specifically expressed in RGCs nuclei and whose expression declines when RGCs undergo apoptosis (Galindo-Romero et al., 2011). Counting of Brn3a positive cells in the AAV-GFP control group showed that either rAAV injection in itself or GFP expression induced a slight toxicity already visible one-month post-injection (Fig. 1F, Kruskal-Wallis test, $P < 0.01$ Dunn's test vs non-injected retinæ). Although our results do not allow us to definitively choose between toxicity linked to the injection procedure or to the AAV batch, the fact that this effect is observed in the group of animals injected with AAV-GFP only suggests a toxicity specific to the expression of the GFP reporter gene, as has already been described in the case of subretinal injections in mice (Khabou et al., 2018). However, in the AAV-Tau injected group, no toxicity was observed at one-month post-injection (Kruskal-Wallis test, $P > 0.9999$ Dunn's test vs non-injected), but this was followed by a significant degeneration of RGCs at three months, characterized by a 20% decrease of Brn3a positive cells (Kruskal-Wallis test, $P < 0.001$ Dunn's test vs non-injected). Importantly, similar to expression of the GFP or Tau transgenes, the degeneration was evenly distributed across the retina, with no preferential site of toxicity. This strongly suggests that in our model RGCs are sensitive to tauopathy.

To assess whether RGCs degeneration was associated with neuroinflammation, we next analyzed astrocytes and microglia reactivity in the retina. We first quantified GFAP immunofluorescence labelling in the GCL and IPL (Fig. 1G), which indicated a strong and equivalent astrocytic reactivity at one-month post-injection in the AAV-GFP (Kruskal-Wallis test, $P < 0.01$ Dunn's test vs non-injected) and AAV-Tau (Kruskal-Wallis test, $P < 0.001$ Dunn's test vs non-injected) groups. At three months post-injection, GFAP reactivity was resolved in all groups, suggesting that this transient astrocyte reactivity was mainly due to the injection procedure or the transient exposure to viral capsids. To assess microglial response, we used Iba1 immunolabelling in the GCL and IPL as an indicator of activation state (Fig. 1H). There was an activation of microglia only in the GFP group at one-month post-injection (Kruskal-Wallis test, $P < 0.01$ Dunn's test vs non-injected) which was still present, but significantly attenuated, at three-months post-injection. The situation was more complex in the AAV-Tau group for which a tendency of increase in Iba1 immunoreactivity was observed only transiently at one-month post-injection. However, this effect could be partly due to outliers resulting from traumatic injection (Fig. 1H).

Altogether, our results indicated that AAV-Tau injection in the vitreous of adult C57Bl6J mice resulted in overexpression of hyperphosphorylated Tau in RGCs, correlated to a progressive degeneration of these cells.

3.2. Tau expression follows RGCs axonal tracts up to the superior colliculi

RGCs' axons form the optic nerve and these cells project directly into the brain. The superior colliculus is the main relay for these cells in the

brain. Therefore, we assessed the distribution pattern of GFP and Tau further down the visual pathway.

First, we analyzed expression of Tau and GFP in the optic nerve (Fig. 2A). Following the same methodology than for the GCL and IPL, we assessed total Tau expression using HT7 immunofluorescence labelling. The Tau burden in optic nerve increased with time (Fig. 2B, Mann-Whitney, $P < 0.05$). This increase in total Tau was correlated with a slight although not statistically significant increase in hyperphosphorylated Tau, evidenced by the pSer422 marker (Fig. 2C, Mann-Whitney test, $P = 0.1320$). We next assessed astrocytes and microglia reactivity. Compared to non-injected animals, GFAP immunofluorescence quantification revealed a global astrocytic activation at both time-points in AAV-GFP injected mice, and only at one-month following AAV-Tau injection (Fig. 2D). Concerning microgliosis, quantification of Iba1 labelling showed a global microglia activation at one-month post-injection, which tended to resolve at the three-months' time-point only in the AAV-Tau injected group (Fig. 2E).

Finally, we characterized the tauopathy in the superior colliculi, one of the main projection areas of RGCs in the brain. Representative immunofluorescence labelling of V5 and GFP in this nucleus are shown in Fig. 3A. Quantification of the fluorescence signal showed that Tau significantly accumulated between the one-month and the three-months' time-points (Fig. 3C, unpaired *t*-test, $P < 0.05$). Although not statistically significant, the same tendency was observed in the AAV-GFP group (Fig. 3B). As shown in high magnification views of Fig. 3A, transgene expression displayed the typical appearance of fiber staining in both groups. Moreover, despite a thorough screening of the sections across the whole superior colliculi, we were not able to detect any cell soma expressing V5 or HT7, strongly suggesting that in our system Tau was not able to propagate from RGCs to their target neurons in the superior colliculi. To determine whether transduction of RGCs by AAV-Tau could lead to some toxicity in the superior colliculi we used immunolabelling of Estrogen-Related Receptor- β (ESRR β), a specific marker of the retinofugal projections (Real et al., 2008). A typical staining of ESRR β on naïve animals is shown on Fig. 3D. In the AAV-GFP control group ESRR β signal remained constant between one- and three-months post-injection. However, at one-month post-injection ESRR β was significantly higher in the AAV-Tau group (Fig. 3E), suggesting that an acute toxicity occurred in the AAV-GFP group following vector delivery. Interestingly, we detected a 40% decrease of ESRR β quantity between one- and three-months post-injection in the AAV-Tau group (Fig. 3E, One-way ANOVA, $P < 0,05$ Sidak's test). Overall, ESRR β data confirms the neurotoxic effect of Tau overexpression observed in the retina using Brn3a (Fig. 1F).

Taken together, these results demonstrate that injection of AAV-Tau in the retina induced a focal tauopathy characterized by the presence of hyperphosphorylated Tau in RGCs' soma. Moreover transgenic Tau was able to diffuse all along the axonal tract to reach a distal region in the brain.

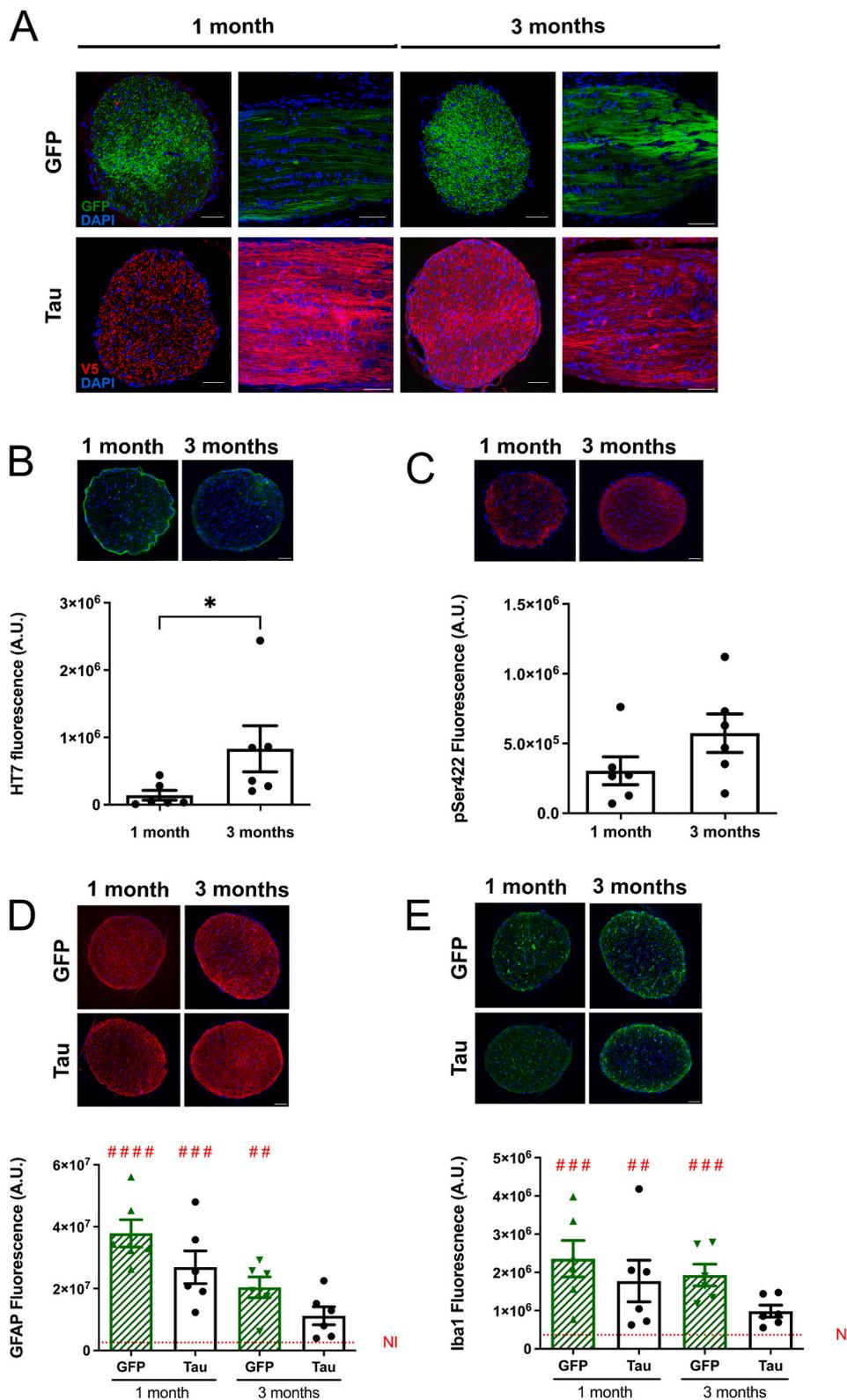


Fig. 2. Characterization of AAV-Tau induced tauopathy in the optic nerve.

(A) Representative images of transgene expression in transversal (left) and longitudinal (right) optic nerves' sections at one- and three-months post-injection in the AAV-GFP and AAV-Tau groups. (B–C) Representative micrographs and quantification of immunofluorescence signals of total human Tau using HT7 antibody (B) and Tau phospho-epitope pSer422 (C) in optic nerves at one- and three-months post-injection. (D) Quantification of GFAP labelling on transverse sections of the optic nerve in the different conditions. (E) Quantification of Iba1 immunofluorescence on transverse sections of the optic nerve in the different conditions. n = 3 mice and 4 to 6 retinae analyzed/group. After immunostaining, the sheath of the optic nerve being the source of a strong non-specific signal, the quantification of the fluorescence signal was carried out on a region of interest (ROI) excluding this part of the image. Data represents mean ± SEM. Scale bar: 50 µm. Asterisk in B represents result of *Mann-Whitney* test between groups (**P* < 0.05); # above each bar represents results of *Dunn's* comparison vs. non-injected animals (#*P* < 0.05 ##*P* < 0.01 and ###*P* < 0.001).

3.3. Reduction of microglial activation by *TREM2* deletion protects RGCs from AAV-Tau toxicity

To challenge the role of microglia in tauopathy progression and assess whether it has a role in Tau propagation in our model we applied our experimental paradigm into *Trem2*^{-/-} mice (Turnbull et al., 2006).

These mice present a default of microglia activation which remain in a homeostatic state in neurodegenerative conditions (Deczkowska et al., 2018; Keren-Shaul et al., 2017). We thus assessed the effect of *TREM2* deletion on RGCs neurodegeneration induced by AAV-Tau intravitreal injection in *Trem2* knockout, heterozygous and wild-type littermate mice at one-, three- and six-months post injection (Fig. 4A-C). Counting

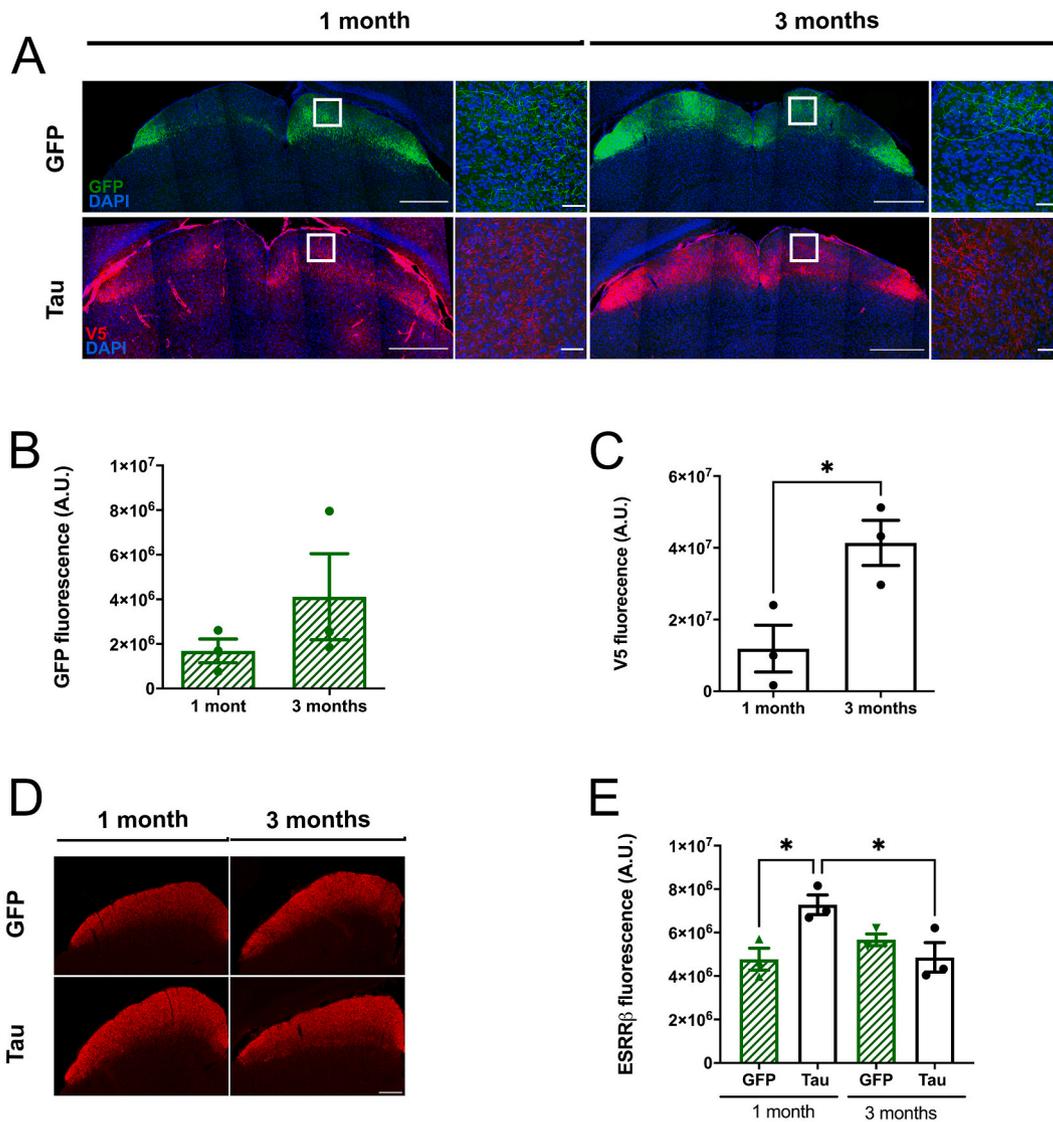


Fig. 3. Characterization of AAV-Tau induced tauopathy in the superior colliculi.

(A) Representative micrographs of transgenes expression in the superior colliculi of AAV-GFP- and AAV-Tau-injected animals. (B) Quantification of GFP direct fluorescence in the superior colliculi. (C) Quantification of Tau transgene expression based on V5 immunolabelling signal in the superior colliculi. (D) Micrographs showing representative ESRR β labelling in the superior colliculi of AAV-GFP- and AAV-Tau-injected animals. (E) Quantification of ESRR β fluorescent signal as a surrogate marker of integrity of RGCs terminal arborization in the superior colliculi. $n = 3$ mice for each group. Data represents mean \pm SEM. Scale bar: 500 μ m (large views in A) and 20 μ m (high magnification views in A). Asterisks above each bar represents results of *t*-test between time-points for C and between AAV-GFP and AAV-Tau injected groups in E, results of *Sidak's* comparisons between groups $^*P < 0.05$.

of Brn3a positive cells revealed that AAV-Tau injection induced a decrease of this marker in all groups at one-month post injection (Fig. 4A). However, at three- and six-months post-injection, RGCs survival in *Trem2*^{-/-} mice was not significantly different from non-injected animals (one-way ANOVA, $P = 0.6372$ Dunnett's comparison test *Trem2*^{-/-} vs non-injected), whereas RGCs survival in wild-type and heterozygous mice remained significantly different from non-injected animals (Fig. 4B and C, one-way ANOVA, $P < 0.01$ Dunnett's comparison test *Trem2*^{+/-} and *Trem2*^{+/+} vs non-injected for 3 months post-injection, and $P < 0.001$ for *Trem2*^{+/+} and $P < 0.0001$ for *Trem2*^{+/-} for 6 months post-injection). Moreover, at three-months, only *Trem2* knockout mice were statistically different from wild-type animals, whereas at six-months both *Trem2* wild-type and heterozygous mice were statistically different from knockout mice. To check whether RGCs' cell death led to degeneration of their target neurons, we quantified NeuN-positive cells in the superior colliculi. We did not detect any difference between AAV-Tau injected groups nor with non-injected wild-type

littermates (Fig. Supp2D and E) suggesting that Tau toxicity on RGCs does not impact survival of their target neurons in the superior colliculus. This shows that microglial activation through its TREM2 receptor is involved in the Tau-induced death of RGCs, and strongly suggests that lowering *Trem2* can reduce Tau toxicity.

Next, we analyzed Iba1 immunofluorescence signal in the GCL and IPL to check whether better RGCs survival in TREM2-deficient animals was associated to a decrease in microglia inflammation (Fig. 4D-F). As expected, microglia activation was markedly reduced at one-month post-injection in *Trem2*^{-/-} and *Trem2*^{+/-} mice (Fig. 4D, no difference vs. non-injected animals Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison). Analysis at three-months post-injection suggested a smaller microglia activation in *Trem2*^{-/-} animals compared to other genotypes, although this tendency did not reached statistical significance (Fig. 4E). Six months after the AAV exposure, we observed a resolution of inflammation in retinae of all groups (Fig. 4F). This delay of microglial inflammation in *Trem2*^{-/-} mice is in accordance with our

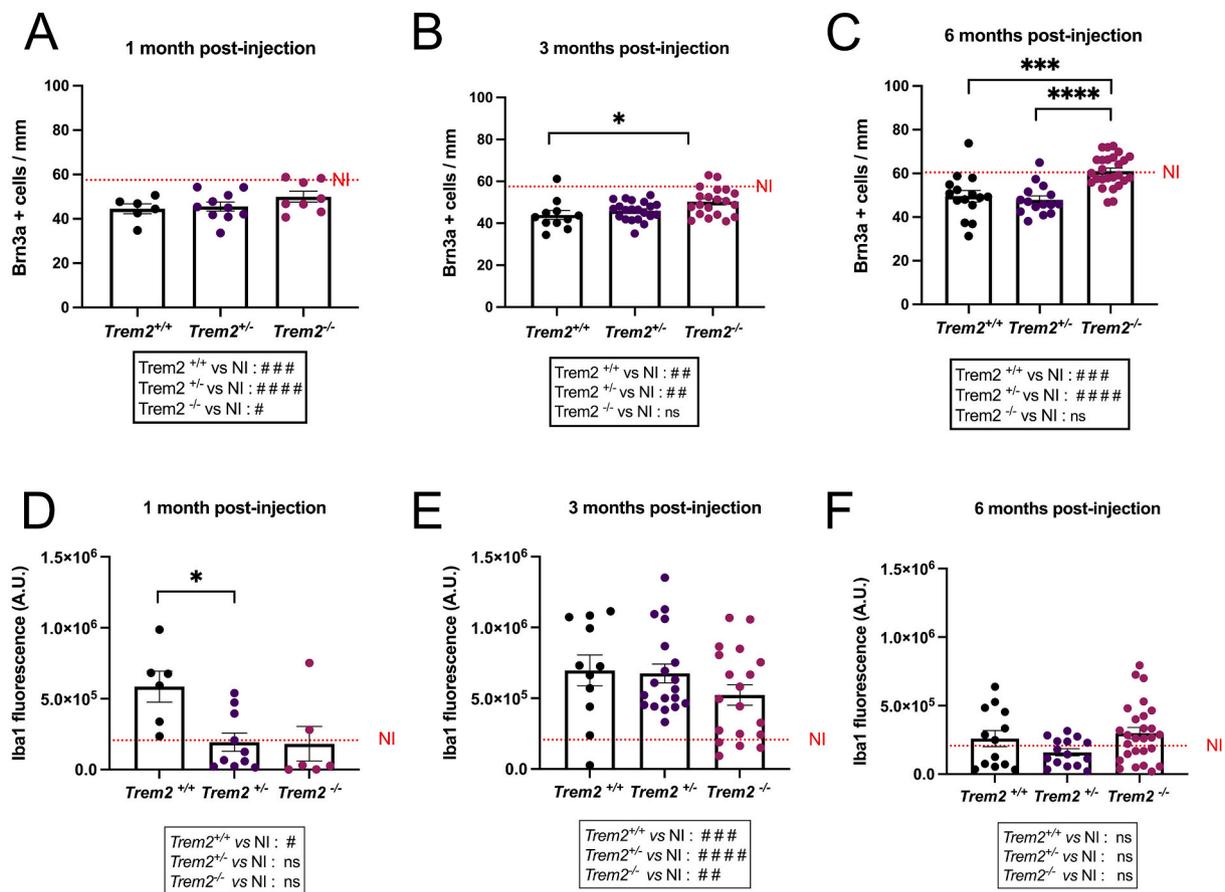


Fig. 4. TREM2 deletion protects RGCs from Tau toxicity and reduces microglial reactivity.

(A–C) Quantification of Tau toxicity in the retina based on counting of Brn3a-positive cells at 1- (A), 3- (B) and 6-months (C) post-injection in Trem2^{-/-}, Trem2^{+/-} and wild-type littermates. (D–F) Quantification of Iba1 immunofluorescence in GCL and IPL at 1- (D), 3- (E) and 6-months (F) post-injection in Trem2^{-/-}, Trem2^{+/-} and wild-type littermates. $n = 3$ to 5 mice and 6 to 10 retinæ analyzed/group at 1 month post injections; $n = 6$ to 11 mice and 11 to 21 retinæ analyzed/group at 3 months post injections; $n = 8$ to 13 mice and 15 to 26 retinæ analyzed/group at 6 months post injections. Data represents mean \pm SEM. Asterisks above each bar represents result of one-way ANOVA between genotypes for B and C, and Kruskal–Wallis test for D–F (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$); # in boxes represents results of Dunnett’s (A–C) or Dunn’s (D–F) comparison for each genotype vs. non-injected animals, ns not significant, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, and ### $P < 0.001$.

previous results obtained in THY-Tau22 mice, a transgenic model of tauopathy, that we crossed with Trem2^{-/-} knockout mice (Vautheny et al., 2021).

Recent evidences suggest that activated microglia can regulate astrocytic reactivity (Liddelow et al., 2017). Hence, we tested the hypothesis that reduced microglial activation in TREM2-deficient mice could impact astrogliosis. We quantified the expression level of GFAP in the GCL (Fig. Supp2A–C). AAV-Tau injection induced a strong astrogliosis in all groups at one-month post-injection (Fig. Supp2A) with no effect of TREM2 deficiency. Nonetheless, at three-months post-injection astrogliosis resolved in Trem2^{-/-} and Trem2^{+/-} animals but not in wild-type (Fig. Supp2B, Kruskal–Wallis test with Dunn’s multiple comparison, $P = 0.0660$). This suggests that following the acute phase of injection-induced neuroinflammation there is a temporal window during which astrogliosis could be driven by microglia subsequently to its activation by neuronal tauopathy through its TREM2 receptor. Finally, similarly to what we observed for microglia, astrogliosis was abolished at six-months post-injection (Fig. Supp2C). As for wild-type animals, we did not detect any propagation between afferent and efferent neurons in the superior colliculi of TREM2-deficient animals.

Overall, these results suggest that TREM2 deficiency delays microglial activation in our model of AAV-Tau-induced RGCs tauopathy and that this reduction of microglia diminishes astrogliosis and protects RGCs from Tau toxicity.

3.4. Aging exacerbates Tau pathology in our model

Microglial homeostasis is impaired during aging and acquire a priming state together with less phagocytosis capacity (Perry and Holmes, 2014; Pluvinage et al., 2019). We thus explored the effect of age in our model. To do this, we performed intravitreal injection of AAV-Tau in 15-months old wild-type mice and analyzed RGCs survival and retinal neuroinflammation one-month post-injection. First, we compared tauopathy induced by AAV-Tau into young (3 months) and old mice (15 months) by analyzing total human Tau protein with HT7 labelling (Fig. 5A) and hyperphosphorylated Tau with pSer422 epitope (Fig. 5B) in the retina. After quantification of Tau in the GCL and IPL we did not detect any difference in HT7 or pSer422 burden between young and aged animals (Mann–Whitney test, $P = 0.1823$ for HT7 and $P = 0.9682$ for pSer422). These analyses were consistent with quantification of V5 signal (Fig. Supp3A). Then, we quantified RGCs neurodegeneration induced by Tau expression in the retina (Fig. 5C). Comparison of RGCs density based on Brn3a-positive nuclei revealed that neurotoxicity was significantly exacerbated in aged animals with 40% more RGCs loss compared to non-injected animals (Fig. 5C, data normalized to age-matched non-treated animals, Mann–Whitney test $P < 0.001$). Absolute values of Brn3a-cell density are shown on Fig. Supp3B. Next, we compared the neuroinflammatory state of the retina in young and old animals with GFAP and Iba1 labelling of the GCL and IPL. In young

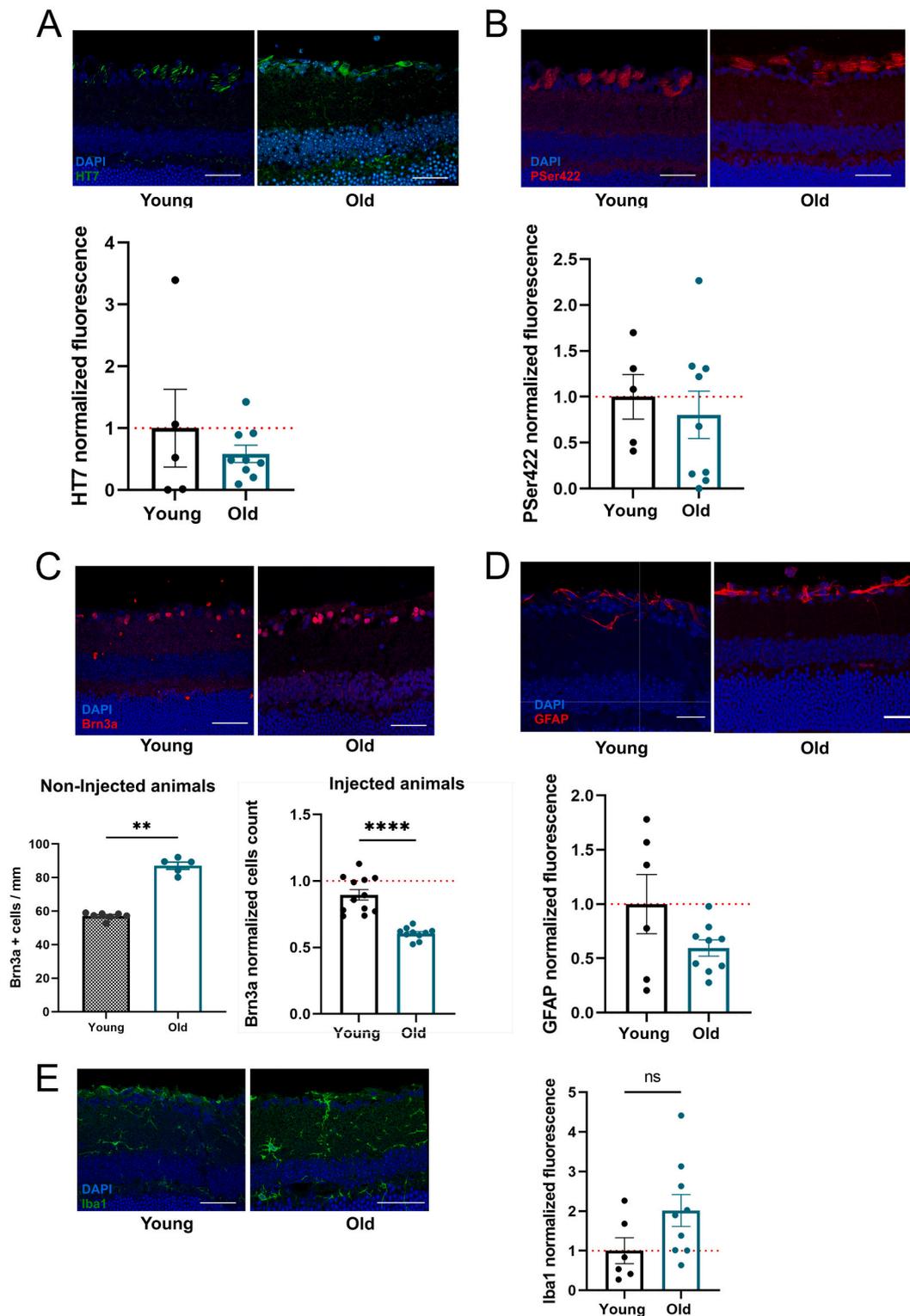


Fig. 5. Aging increased the susceptibility of RGCs to Tau neurotoxicity.

(A-B) Representative micrographs and quantification of HT7 (A) and pSer422 (B) immunolabellings in the GCL and IPL one month following injection of 3-month-old (Young) or 15-month-old (Old) animals. (C) Representative micrographs and cell-counting of Brn3a-positive RGCs in young and old animals. RGCs' density is expressed as number of Brn3a-positive RGC per mm of retina. (D-E) Representative micrographs and quantification of GFAP (D) and Iba1 (E) immunofluorescence in the retina of young and old animals. $n = 3$ mice and 6 retinae analyzed for young animals and $n = 5$ mice and 10 retinae analyzed for old animals. Data represents mean \pm SEM, normalized against young-animals group for A and B and against non-injected animals in C, D and E. The micrographs presented here correspond to the raw images obtained after acquisition with fixed parameters for each immunostaining. A thresholding was then applied to eliminate non-specific background noise prior to quantification of the signal. Asterisks above each bar represents results of Mann-Whitney test $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ and **** $P < 0.001$. Scale bar = 50 μ m.

animals, astrocytic reactivity was not different from non-injected animals. On the other hand, in old animals, a downward trend of GFAP expression was observed compared to young mice, which was however not statistically significant, probably due to the high variability observed in this latter group (Figs. 5D and Supp3C). In the same way, we did not detect statistically significant microglial activation with Iba1 quantification (Figs. 5E and Supp3D). Finally, we studied the propagation of the transgenic Tau protein in their target neurons of the RGCs by carrying out a V5/NeuN co-labelling at the level of the superior colliculi (Fig. 6). Interestingly, in animals injected at 3 months, we observed transgenic Tau protein only in the terminal arborization of RGCs, whereas in animals injected at 15 months, cell bodies co-labelled with NeuN and V5 could be clearly identified (Fig. 6A). To confirm this point, we performed a co-labelling with the Nissl body-specific NeuroTrace dye, which demonstrates the presence of the V5 tag in the cytoplasm of neurons of the superior colliculus (Fig. 6B). This suggests that in our experimental paradigm the spreading of the Tau protein from RGCs to their target neurons is age-dependent. In order to verify whether this spreading was accompanied by toxicity for the neurons of the superior colliculi, we quantified the neuronal density with NeuN and did not observe any differences between young and old animals (Fig. 6C).

These results show that aging aggravates toxicity of Tau protein on RGCs in our model and promotes the spreading of Tau to their target neurons in the superior colliculi. In addition, it suggests that the level of GFAP expression in astrocytes could be protective against Tau pathology. However, gene expression is highly modified in aged astrocytes and microglia (Pan et al., 2020) and the use of alternatives markers to GFAP and Iba1 would be necessary to precisely characterize their activation status.

4. Discussion

During AD, tauopathy follows a precise spatio-temporal progression pattern, defined by the Braak stages (Braak and Braak, 1991). Understanding the underlying mechanisms of the spreading of pathological Tau through the patients' brain could permit to find new therapeutic avenues. Here, we developed a new model of tauopathy by AAV-mediated overexpression of human Tau in RGCs of the mouse retina.

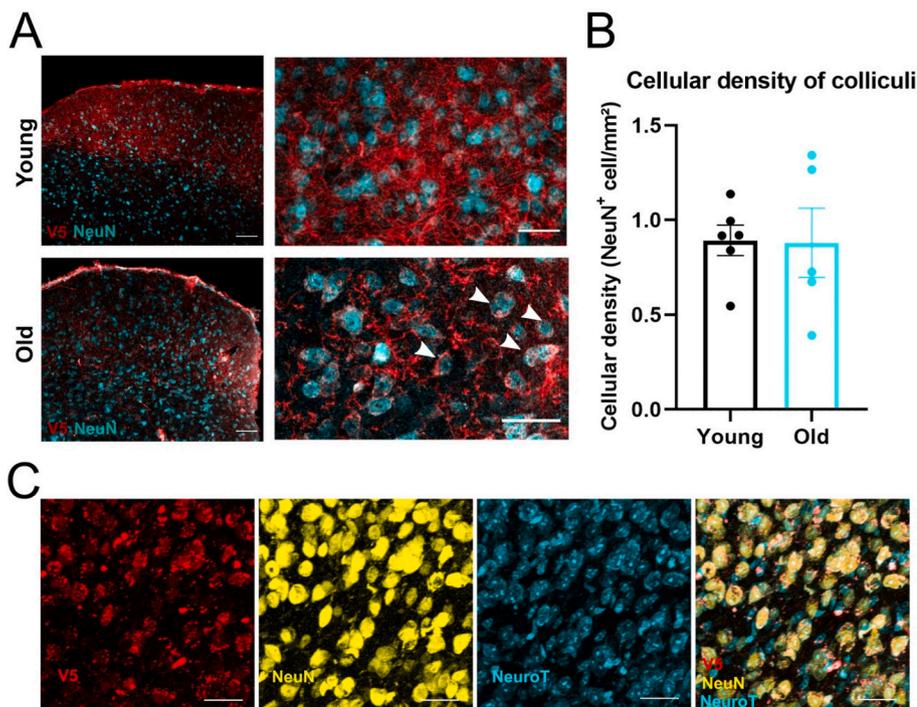


Fig. 6. Aging promoted the spreading of Tau from RGC's terminal arborization to neuronal cell soma in the superior colliculi.

(A) Confocal images of transgenic Tau expression in the superior colliculi one month following injection of AAV-Tau in three-month-old (young) or 15-month-old (old) animals. V5 signal (red) is visible in RGC's terminal arborization in both groups. However, V5 signal in neuronal cell soma clearly surrounding NeuN signal (blue) is identified only in old animals (white arrowheads). (B) Quantification of neuronal nuclei density in the superior colliculi based on NeuN staining. $n = 5$ mice for young animals and $n = 6$ for old animals.

(C) Confocal image of V5 (red), NeuN (yellow) and NeuroTrace (blue) labeling in old animals showing the colocalization of both markers within the cell soma of neurons in the superior colliculus. Upper panel: red channel only, lower panel: merge view of red and blue channels. Data represents mean \pm SEM. Scale bar: 100 μ m (large views in A), 20 μ m (high magnification views in A) and 50 μ m (in C). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

hyperphosphorylation of Tau (pSer422 labeling) appeared slower in the optic nerve, which is reflected by a tendency for the marker pSer422 to increase close to the threshold of statistical significance (Fig. 2C). Tau overexpression led to an accumulation of hyperphosphorylated form of the protein in the retina (Fig. 1C) causing neurodegeneration of RGCs (Fig. 1E). To assess for a possible role of neuroinflammation we quantified Iba1 and GFAP immunoreactivity in the retina. These markers were increased in both AAV-GFP and AAV-Tau injected animals, reflecting the acute toxicity observed at one-month post-injection in the AAV-GFP group, and precluding to conclude on the role of microgliosis by comparison of AAV-GFP and AAV-Tau injection in wild-type animals. AAV-Tau induced tauopathy was not restrained to the RGCs layer but followed the retinal projection up to the superior colliculi (Fig. 3A-C) which receives 85 to 90% of RGCs' axons (Ellis et al., 2016). As in the retina, Tau protein accumulated in the superior colliculi (Fig. 3C) and caused the degeneration of RGC's terminal arborization as shown by the decrease with time of ESRRB staining in the AAV-Tau injected animals (Fig. 3D-E). However, even if Tau protein was found all along RGCs' axons up to their terminal arborization in the superior colliculi, Tau spreading to their target neurons was observed only in aged animals (Fig. 6). This is in line with the recent study by de Fisenne et al. showing that following intra-ocular injection in Tau transgenic mice of sarkosyl-insoluble Tau aggregates extracted from human AD brain, although retinal ganglion cells are able to internalize Tau, there is no seeding activity inside these cells, and no transmission of the tauopathy to the brain (de Fisenne et al., 2022). On the one hand this means that our model must be implemented on old mice to test new therapeutic leads for example, and on the other hand it could help to identify the molecular and cellular mechanisms involved in Tau propagation by revealing the differences between young and old mice. The presence of propagation only in old mice could be due to the effect of aging on the neurons themselves (pre- and/or post-synaptic), the glial cells or the synaptic microenvironment, and will require further investigation.

Although we established that Tau spreading to RGCs target neurons occurs only in aged animals, we used our model of AAV-Tau intravitreal injection to challenge the role of TREM2 receptor in young adult mice (3-month-old). To that aim we used *Trem2*^{-/-} mice in which microglia are less prone to activation following inflammatory stimuli. As previously described in other neurodegenerative contexts (McQuade et al., 2020; Reifschneider et al., 2022; Sieber et al., 2013; Vautheny et al., 2021), TREM2 deficiency led to a decrease in microglial activation in our model (Fig. 4). This effect was however limited to the first time-point studied (i.e. 1-month post AAV-Tau injection), probably reflecting the fact that AAV-Tau transduction leads to an acute model of tauopathy, which evolves over several weeks only. This was associated with a neuroprotection of RGCs from Tau-induced degeneration. This result is in accordance with studies showing a reduced neuronal loss when TREM2 is deleted in PS19 mice. This protective effect can be linked to a decrease in microglial phagocytic activity (Gratuzé et al., 2020). The effect of TREM2 deficiency on tauopathy has indeed already been assessed in several transgenic models and led to contradictory results reporting deleterious or on the contrary protective effect (Bemiller et al., 2017; Gratuzé et al., 2020; Leyns et al., 2017). Our own experiment on THY-Tau22 mice showed that TREM2 deficiency led to larger accumulation of tangles in the CA1 layer of the hippocampus only at late stage of the disease (Vautheny et al., 2021). The results shown here reinforce the hypothesis that tauopathy drives a neuroinflammatory status of microglia which is deleterious for neuronal cells.

Microglial phagocytic activity could also be disrupted by aging (Pluvinage et al., 2019). Thus, we evaluated the effect of aging in our model. Our results show that aging increases RGCs' susceptibility to Tau pathology leading to an important degeneration of these cells (Fig. 5). These results are in accordance with data reported recently in a comparable experimental paradigm, in which aged mice received an intra-hippocampal injection of AAV-Tau (Wegmann et al., 2019). We hypothesize that even if aged-microglia are less capable to phagocytose

tauopathic neurons, they can release high quantity of proinflammatory cytokines inducing neurodegeneration of neurons bearing Tau pathology. Notably this "primed" phenotype is described and characterized by an exaggerated and uncontrolled inflammatory response to an inflammatory stimulus (Niraula et al., 2017; Perry and Holmes, 2014).

Our model is based on the expression of the 1N4R form of Tau devoid of mutation. It is likely that the relatively rapid production of the hyperphosphorylated form stems from the fact that the expression level of AAV-Tau is higher than the endogenous Tau protein, as we have shown after AAV-Tau injection into the rat hippocampus (d'Orange et al., 2018). However, the use of a non-mutated form of Tau is particularly relevant in the case of AD in which to date no mutation in the MAPT gene has been identified. Previously, we overexpressed different forms of Tau by AAV and showed that the induced neurodegeneration was inversely correlated with the level of aggregation, thus confirming that the soluble pathological forms of the protein are more toxic than mature aggregates (d'Orange et al., 2018). In future studies, the model targeting RGCs described here could be extremely valuable to determine which forms of Tau, aggregated or not, are the most likely to propagate to post-synaptic neurons. In conclusion, we described here a new model of focal tauopathy obtained by targeted expression of Tau in RGCs. This model proved to be valuable to study the role of microglia in tauopathy. Further work will be needed to explore the mechanism allowing Tau spreading from RGCs to their target neurons in aged mice.

Authors contribution statement

Design of the study: CD, A-PB; acquisition of the data: CD, PL, AV, GA, CJ, M-CG, A-SH, CJ, PG, JM, SF, M-LN, A-PB; analysis of the data: CD, PL, KC, A-PB; contribution to funding: PH, EB, GB, KC, A-PB; writing of the manuscript: CD, PL, A-PB. All authors revised and approved the final version of the manuscript.

CRediT authorship contribution statement

Charlotte Duwat: Investigation, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Pauline Léal:** Investigation, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Audrey Vautheny:** Methodology. **Gwennaëlle Aurégan:** Investigation. **Charlène Joséphine:** Investigation. **Marie-Claude Gaillard:** Investigation. **Anne-Sophie Hérard:** Investigation. **Caroline Jan:** Investigation. **Pauline Gipchtein:** Investigation. **Julien Mitja:** Investigation. **Stéphane Fouquet:** Investigation. **Marie-Laure Niepon:** Investigation. **Philippe Hantraye:** Supervision. **Emmanuel Brouillet:** Supervision. **Gilles Bonvento:** Supervision. **Karine Cambon:** Conceptualization, Writing - review & editing, Supervision. **Alexis-Pierre Bemelmans:** Conceptualization, Investigation, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing, Supervision, Funding acquisition.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from Fondation Vaincre Alzheimer (grant LECMA-Vaincre Alzheimer #FR-15055), and by "NeurATRIS ANR-11-INBS-0011", of the French Programme Investissements d'Avenir (PIA) run by the Agence Nationale de la Recherche (ANR). CD is the recipient of a doctoral fellowship from the "IDI 2017" project funded by the IDEX Paris-Saclay, ANR-11-IDEX-0003-02 and PL received a doctoral fellowship from Université Paris-Saclay (Doctorate school 568 BIOSIGNE).

The graphical abstract was produced using Biorender™ software.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106116>.

References

- Aizenstein, H.J., Nebes, R.D., Saxton, J.A., Price, J.C., Mathis, C.A., Tsopelas, N.D., Ziolkowski, S.K., James, J.A., Snitz, B.E., Houck, P.R., Bi, W., Cohen, A.D., Lopresti, B.J., DeKosky, S.T., Halligan, E.M., Klunk, W.E., 2008. Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. *Archives of neurology* 65, 1509–1517. <https://doi.org/10.1001/archneur.65.11.1509>.
- Asai, H., Ikezu, S., Tsunoda, S., Medalla, M., Luebke, J., Haydar, T., Wolozin, B., Butovsky, O., Kugler, S., Ikezu, T., 2015. Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat. Neurosci.* 18, 1584–1593. <https://doi.org/10.1038/nn.4132>.
- Ashok, A., Singh, N., Chaudhary, S., Bellamkonda, V., Kritikos, A.E., Wise, A.S., Rana, N., McDonald, D., Ayyagari, R., 2020. Retinal degeneration and Alzheimer's disease: an evolving link. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 7290. <https://doi.org/10.3390/ijms21197290>.
- Aurnhammer, C., Haase, M., Muether, N., Hausl, M., Rauschhuber, C., Huber, I., Nitschko, H., Busch, U., Sing, A., Ehrhardt, A., Baiker, A., 2012. Universal real-time PCR for the detection and quantification of adeno-associated virus serotype 2-derived inverted terminal repeat sequences. *Hum. Gene Ther. Methods* 23, 18–28. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2011.034>.
- Bejanin, A., Schonhaut, D.R., La Joie, R., Kramer, J.H., Baker, S.L., Sosa, N., Ayakta, N., Cantwell, A., Janabi, M., Lauriola, M., O'Neil, J.P., Gorno-Tempini, M.L., Miller, Z. A., Rosen, H.J., Miller, B.L., Jagust, W.J., Rabinovici, G.D., 2017. Tau pathology and neurodegeneration contribute to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Brain J. Neurol.* 140, 3286–3300. <https://doi.org/10.1093/brain/awx243>.
- Bemiller, S.M., McCray, T.J., Allan, K., Formica, S.V., Xu, G., Wilson, G., Kokiko-Cochran, O.N., Crish, S.D., Lasagna-Reeves, C.A., Ransohoff, R.M., Landreth, G.E., Lamb, B.T., 2017. TREM2 deficiency exacerbates tau pathology through dysregulated kinase signaling in a mouse model of tauopathy. *Mol. Neurodegener.* 12, 74. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0216-6>.
- Berger, A., Lorain, S., Josephine, C., Desrosiers, M., Peccate, C., Voit, T., Garcia, L., Sahel, J.A., Bemelmans, A.P., 2015. Repair of rhodopsin mRNA by spliceosome-mediated RNA trans-splicing: a new approach for autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Mol. Ther.: J. Am. Soc. Gene Ther.* 23, 918–930. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.11>.
- Braak, H., Braak, E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82, 239–259.
- Braak, H., Alafuzoff, I., Arzberger, T., Kretschmar, H., Del Tredici, K., 2006. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol.* 112, 389–404. <https://doi.org/10.1007/s00401-006-0127-z>.
- Burger, C., Gorbatyuk, O.S., Velardo, M.J., Peden, C.S., Williams, P., Zolotukhin, S., Reier, P.J., Mandel, R.J., Muzyczka, N., 2004. Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol. Ther.: J. Am. Soc. Gene Ther.* 10, 302–317.
- Cearley, C.N., Vandenbergh, L.H., Parente, M.K., Carnish, E.R., Wilson, J.M., Wolfe, J. H., 2008. Expanded repertoire of AAV vector serotypes mediate unique patterns of transduction in mouse brain. *Mol. Ther.: J. Am. Soc. Gene Ther.* 16, 1710–1718. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.166>.
- Chaffiol, A., Caplette, R., Jaillard, C., Brazhnikova, E., Desrosiers, M., Dubus, E., Duhamel, L., Mace, E., Marre, O., Benoit, P., Hantraye, P., Bemelmans, A.P., Bamberg, E., Duebler, J., Sahel, J.A., Picaud, S., Dalkara, D., 2017. A new promoter allows optogenetic vision restoration with enhanced sensitivity in macaque retina. *Mol. Ther.: J. Am. Soc. Gene Ther.* 25, 2546–2560. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.07.011>.
- Chiassou, M., Cueva Vargas, J.L., Destroismaisons, L., Vande Velde, C., Leclerc, N., Di Polo, A., 2016. Tau accumulation, altered phosphorylation, and missorting promote neurodegeneration in Glaucoma. *J. Neurosci.* 36, 5785–5798. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3986-15.2016>.
- Chiassou, 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.* 12, 58. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0199-3>.
- Colin, M., Dujardin, S., Schraen-Maschke, S., Meno-Tetang, G., Duyckaerts, C., Courade, J.-P., Buée, L., 2020. From the prion-like propagation hypothesis to therapeutic strategies of anti-tau immunotherapy. *Acta Neuropathol.* 139, 3–25. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02087-9>.
- de Fisenne, M.A., Yilmaz, Z., De Decker, R., Suain, V., Buee, L., Ando, K., Brion, J.P., Leroy, K., 2022. 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.* 105875. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105875>.
- Deczkowska, A., Keren-Shaul, H., Weiner, A., Colonna, M., Schwartz, M., Amit, I., 2018. Disease-associated microglia: a universal immune sensor of neurodegeneration. *Cell* 173, 1073–1081. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.003>.
- Deczkowska, A., Weiner, A., Amit, I., 2020. The physiology, pathology, and potential therapeutic applications of the TREM2 signaling pathway. *Cell* 181, 1207–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.003>.
- Delaère, P., Duyckaerts, C., Masters, C., Beyreuther, K., Piette, F., Hauw, J.-J., 1990. Large amounts of neocortical β A4 deposits without neuritic plaques nor tangles in a psychometrically assessed, non-demented person. *Neuroscience Letters* 116, 87–93. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(90\)90391-L](https://doi.org/10.1016/0304-3940(90)90391-L).
- 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. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0650-x>.
- DeTure, M.A., Dickson, D.W., 2019. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* 14, 32. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0333-5>.
- d'Orange, M., Auregan, G., Cheramy, D., Gaudin-Guerif, M., Lieger, S., Guillermier, M., Stimmer, L., Josephine, C., Herard, A.S., Gaillard, M.C., Petit, F., Kiessling, M.C., Schmitz, C., Colin, M., Buee, L., Panayi, F., Diguet, E., Brouillet, E., Hantraye, P., Bemelmans, A.P., Cambon, K., 2018. Potentiating tangle formation reduces acute toxicity of soluble tau species in the rat. *Brain J. Neurol.* 141, 535–549. <https://doi.org/10.1093/brain/awx342>.
- Dujardin, S., Hyman, B.T., 2019. Tau prion-like propagation: state of the art and current challenges. In: Takashima, A., Wolozin, B., Buee, L. (Eds.), *Tau Biology, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, Singapore, pp. 305–325. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9358-8_23.
- Dujardin, S., Begard, S., Caillierez, R., Lachaud, C., Delattre, L., Carrier, S., Loyens, A., Galas, M.C., Bousset, L., Melki, R., Auregan, G., Hantraye, P., Brouillet, E., Buee, L., Colin, M., 2014a. Ectosomes: a new mechanism for non-exosomal secretion of tau protein. *PLoS One* 9, e100760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100760>.
- Dujardin, S., Lecolle, K., Caillierez, R., Begard, S., Zommer, N., Lachaud, C., Carrier, S., Dufour, N., Auregan, G., Winderickx, J., Hantraye, P., Deglon, N., Colin, M., Buee, L., 2014b. Neuron-to-neuron wild-type Tau protein transfer through a trans-synaptic mechanism: relevance to sporadic tauopathies. *Acta Neuropathol. Commun.* 2, 14. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-14>.
- Dujardin, S., Colin, M., Buée, L., 2015. Invited review: animal models of tauopathies and their implications for research/translation into the clinic. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 41, 59–80. <https://doi.org/10.1111/nan.12200>.
- Dujardin, S., Bégard, S., Caillierez, R., Lachaud, C., Carrier, S., Lieger, S., Gonzalez, J.A., Deramecourt, V., Déglon, N., Mauraige, C.-A., Froesch, M.P., Hyman, B.T., Colin, M., Buée, L., 2018. Different tau species lead to heterogeneous tau pathology propagation and misfolding. *Acta Neuropathol. Commun.* 6, 132. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0637-7>.
- Ellis, E.M., Gauvain, G., Sivy, B., Murphy, G.J., 2016. Shared and distinct retinal input to the mouse superior colliculus and dorsal lateral geniculate nucleus. *J. Neurophysiol.* 116, 602–610. <https://doi.org/10.1152/jn.00227.2016>.
- Froger, N., Cadetti, L., Lorach, H., Martins, J., Bemelmans, A.P., Dubus, E., Degardin, J., Pain, D., Forster, V., Chicaud, L., Ivkovic, I., Simonutti, M., Fouquet, S., Jammoul, F., Leveillard, T., Benosman, R., Sahel, J.A., Picaud, S., 2012. Tau protein provides neuroprotection against retinal ganglion cell degeneration. *PLoS One* 7, e42017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042017>.
- Galindo-Romero, C., Avilés-Trigueros, M., Jiménez-López, M., Valiente-Soriano, F.J., Salinas-Navarro, M., Nadal-Nicolás, F., Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., Agudo-Barriso, M., 2011. Axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult mice: quantitative and topographic time course analyses. *Exp. Eye Res.* 92, 377–387. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.02.008>.
- Gratze, M., Leyns, C.E., Sauerbeck, A.D., St-Pierre, M.K., Xiong, M., Kim, N., Serrano, J. R., Tremblay, M.E., Kummer, T.T., Colonna, M., Ulrich, J.D., Holtzman, D.M., 2020. Impact of TREM2R47H variant on tau pathology-induced gliosis and neurodegeneration. *J. Clin. Invest.* 130, 4954–4968. <https://doi.org/10.1172/JCI138179>.
- Haggerty, D.L., Grecco, G.G., Reeves, K.C., Atwood, B., 2020. Adeno-associated viral vectors in neuroscience research. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 17, 69–82. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.11.012>.
- Hart de Ruyter, F.J., Morrema, T.H.J., den Haan, J., Twisk, J.W.R., de Boer, J.F., Scheltens, P., Boon, B.D.C., Thal, D.R., Rozemuller, A.J., Verbraak, F.D., Bouwman, F.H., Hoozemans, J.J.M., Netherlands Brain Bank, 2023. Phosphorylated tau in the retina correlates with tau pathology in the brain in Alzheimer's disease and primary tauopathies. *Acta Neuropathol.* 145, 197–218. <https://doi.org/10.1007/s00401-022-02525-1>.
- Heppner, F.L., Ransohoff, R.M., Becher, B., 2015. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* 16, 358–372. <https://doi.org/10.1038/nrn3880>.
- Kahriman, A., Bouley, J., Smith, T.W., Bosco, D.A., Woerman, A.L., Henninger, N., 2021. Mouse closed head traumatic brain injury replicates the histological tau pathology pattern of human disease: characterization of a novel model and systematic review of the literature. *Acta Neuropathol. Commun.* 9, 118. <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01220-8>.
- Katzman, R., Terry, R., DeTeresa, R., Brown, T., Davies, P., Fuld, P., Renbing, X., Peck, A., 1988. Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: A subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Annals of Neurology* 23, 138–144. <https://doi.org/10.1002/ana.410230206>.
- Keren-Shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-Natan, O., Dvir-Szternfeld, R., Ulland, T.K., 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, 1276–1290 e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.018>.
- Khabou, H., Cordeau, C., Pacot, L., Fisson, S., Dalkara, D., 2018. Dosage thresholds and influence of transgene cassette in adeno-associated virus-related toxicity. *Hum. Gene Ther.* 29, 1235–1241. <https://doi.org/10.1089/hum.2018.144>.
- Klein, R.L., Dayton, R.D., Tatom, J.B., Diaczynsky, C.G., Salvatore, M.F., 2008a. Tau expression levels from various adeno-associated virus vector serotypes produce

- graded neurodegenerative disease states. *Eur. J. Neurosci.* 27, 1615–1625. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06161.x>.
- Klein, R.L., Dayton, R.D., Tatom, J.B., Henderson, K.M., Henning, P.P., 2008b. AAV8, 9, Rh10, Rh43 vector gene transfer in the rat brain: effects of serotype, promoter and purification method. *Mol. Ther.: J. Am. Soc. Gene Ther.* 16, 89–96. <https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300331>.
- Klein, R.L., Dayton, R.D., Diaczynsky, C.G., Wang, D.B., 2010. Pronounced microgliosis and neurodegeneration in aged rats after tau gene transfer. *Neurobiol. Aging* 31, 2091–2102. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.12.002>.
- Leyns, C.E.G., Ulrich, J.D., Finn, M.B., Stewart, F.R., Koscal, L.J., Remolina Serrano, J., Robinson, G.O., Anderson, E., Colonna, M., Holtzman, D.M., 2017. TREM2 deficiency attenuates neuroinflammation and protects against neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 11524–11529. <https://doi.org/10.1073/pnas.1710311114>.
- Liddelow, S.A., Guttenplan, K.A., Clarke, L.E., Bennett, F.C., Bohlen, C.J., Schirmer, L., Bennett, M.L., Munch, A.E., Chung, W.S., Peterson, T.C., Wilton, D.K., Frouin, A., Napier, B.A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M.S., Rowitch, D.H., Dawson, V. L., Dawson, T.M., Stevens, B., Barres, B.A., 2017. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541, 481–487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>.
- Martersteck, E.M., Hirokawa, K.E., Evarnts, M., Bernard, A., Duan, X., Li, Y., Ng, L., Oh, S. W., Ouellette, B., Royall, J.J., Stoecklin, M., Wang, Q., Zeng, H., Sanes, J.R., Harris, J.A., 2017. Diverse central projection patterns of retinal ganglion cells. *Cell Rep.* 18, 2058–2072. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.075>.
- Martin, K.R., Quigley, H.A., Zack, D.J., Levkovitch-Verbin, H., Kielczewski, J., Valenta, D., Baumrind, L., Pease, M.E., Klein, R.L., Hauswirth, W.W., 2003. Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection: retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 4357–4365.
- Mazzaro, N., Barini, E., Spillantini, M.G., Goedert, M., Medini, P., Gasparini, L., 2016. Tau-driven neuronal and neurotrophic dysfunction in a mouse model of early tauopathy. *J. Neurosci.* 36, 2086–2100. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0774-15.2016>.
- McQuade, A., Kang, Y.J., Hasselmann, J., Jairaman, A., Sotelo, A., Coburn, M., Shabestari, S.K., Chadarevian, J.P., Fote, G., Tu, C.H., Danhash, E., Silva, J., Martinez, E., Cotman, C., Prieto, G.A., Thompson, L.M., Steffan, J.S., Smith, I., Davtyan, H., Cahalan, M., Cho, H., Blurton-Jones, M., 2020. Gene expression and functional deficits underlie TREM2-knockout microglia responses in human models of Alzheimer's disease. *Nat. Commun.* 11, 5370. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19227-5>.
- Mead, B., Thompson, A., Scheven, B.A., Logan, A., Berry, M., Leadbeater, W., 2014. Comparative evaluation of methods for estimating retinal ganglion cell loss in retinal sections and wholemounts. *PLoS One* 9, e110612. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110612>.
- Niraula, A., Sheridan, J.F., Godbout, J.P., 2017. Microglia priming with aging and stress. *Neuropsychopharmacol.* 42, 318–333. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.185>.
- Oku, H., Kida, T., Horie, T., Taki, K., Mimura, M., Kojima, S., Ikeda, T., 2019. Tau is involved in death of retinal ganglion cells of rats from optic nerve crush. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 60, 2380–2387. <https://doi.org/10.1167/iovs.19-26683>.
- Pan, J., Ma, N., Yu, B., Zhang, W., Wan, J., 2020. Transcriptomic profiling of microglia and astrocytes throughout aging. *J. Neuroinflammation* 17, 97. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01774-9>.
- Perry, V.H., Holmes, C., 2014. Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurol.* 10, 217–224. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.38>.
- Petrs-Silva, H., Dinculescu, A., Li, Q., Min, S.H., Chiodo, V., Pang, J.J., Zhong, L., Zolotukhin, S., Srivastava, A., Lewin, A.S., Hauswirth, W.W., 2009. High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant AAV serotype vectors. *Mol. Ther.: J. Am. Soc. Gene Ther.* 17, 463–471.
- Pluvinaige, J.V., Haney, M.S., Smith, B.A.H., Sun, J., Iram, T., Bonanno, L., Li, L., Lee, D. P., Morgens, D.W., Yang, A.C., Shuken, S.R., Gate, D., Scott, M., Khatri, P., Luo, J., Bertozzi, C.R., Bassik, M.C., Wyss-Coray, T., 2019. CD22 blockade restores homeostatic microglial phagocytosis in ageing brains. *Nature* 568, 187–192. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1088-4>.
- Real, M.A., Heredia, R., Dávila, J.C., Guirado, S., 2008. Efferent retinal projections visualized by immunohistochemical detection of the estrogen-related receptor beta in the postnatal and adult mouse brain. *Neurosci. Lett.* 438, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.04.044>.
- Reifschneider, A., Robinson, S., van Lengerich, B., Gnörich, J., Logan, T., Heindl, S., Vogt, M.A., Weidinger, E., Riedl, L., Wind, K., Zatzepin, A., Pesámaa, I., Haberl, S., Nuscher, B., Kleinberger, G., Klimmt, J., Götzl, J.K., Liesz, A., Bürger, K., Brendel, M., Levin, J., Diehl-Schmid, J., Suh, J., Di Paolo, G., Lewcock, J.W., Monroe, K.M., Paquet, D., Capell, A., Haass, C., 2022. Loss of TREM2 rescues hyperactivation of microglia, but not lysosomal deficits and neurotoxicity in models of progranulin deficiency. *EMBO J.* 41, e109108 <https://doi.org/10.15252/emboj.2021109108>.
- Schultz, M.K., Gentzel, R., Usenovic, M., Gretzula, C., Ware, C., Parmentier-Batteur, S., Schachter, J.B., Zariwala, H.A., 2018. Pharmacogenetic neuronal stimulation increases human tau pathology and trans-synaptic spread of tau to distal brain regions in mice. *Neurobiol. Dis.* 118, 161–176. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.07.003>.
- Sieber, M.W., Jaenisch, N., Brehm, M., Guenther, M., Linnartz-Gerlach, B., Neumann, H., Witte, O.W., Frahm, C., 2013. Attenuated inflammatory response in triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) knock-out mice following stroke. *PLoS One* 8, e52982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052982>.
- Turnbull, I.R., Gilfillan, S., Cella, M., Aoshi, T., Miller, M., Piccio, L., Hernandez, M., Colonna, M., 2006. Cutting edge: TREM-2 attenuates macrophage activation. *J. Immunol.* 177, 3520–3524.
- Vautheny, A., Duwat, C., Auregan, G., Josephine, C., Herard, A.S., Jan, C., Mitja, J., Gipchtein, P., Gaillard, M.C., Buee, L., Blum, D., Hantraye, P., Bonvento, G., Brouillet, E., Cambon, K., Bemelmans, A.P., 2021. THY-Tau22 mouse model accumulates more tauopathy at late stage of the disease in response to microglia deactivation through TREM2 deficiency. *Neurobiol. Dis.* 155, 105398 <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105398>.
- Villemagne, V.L., Pike, K.E., Chételat, G., Ellis, K.A., Mulligan, R.S., Bourgeat, P., Ackermann, U., Jones, G., Szoek, C., Salvado, O., Martins, R., O'Keefe, G., Mathis, C.A., Klunk, W.E., Ames, D., Masters, C.L., Rowe, C.C., 2011. Longitudinal assessment of A β and cognition in aging and Alzheimer disease. *Annals of Neurology* 69, 181–192. <https://doi.org/10.1002/ana.22248>.
- Wegmann, S., Bennett, R.E., Delorme, L., Robbins, A.B., Hu, M., McKenzie, D., Kirk, M.J., Schiantarelli, J., Tunio, N., Amaral, A.C., Fan, Z., Nicholls, S., Hudry, E., Hyman, B. T., 2019. Experimental evidence for the age dependence of tau protein spread in the brain. *Sci. Adv.* 5 <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw6404> eaaw6404.
- Zhong, L., Li, B., Mah, C.S., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M., Cooper, M., Herzog, R.W., Zolotukhin, I., Warrington, K.H., Weigel-Van Aken, K.A., Hobbs, J.A., Zolotukhin, S., Muzyczka, N., Srivastava, A., 2008. Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 7827–7832.

Titre : Développement d'un nouveau modèle murin par transfert de gène pour étudier la propagation de la tauopathie : influence de l'agrégation de la protéine tau et de l'activation microgliale.

Mots clés : Tau, Propagation, Neuroinflammation, Microglie, TREM2, Espèces toxiques de tau

Résumé : Dans la maladie d'Alzheimer, la propagation de la tauopathie dans le cerveau des patients est fortement corrélée avec la progression des symptômes cognitifs. De ce fait, cibler les mécanismes favorisant la propagation de la protéine tau pathologique représente une stratégie thérapeutique intéressante. L'objectif de cette thèse a été de développer un nouveau modèle *in vivo* afin d'étudier la propagation de la protéine tau pathologique pour identifier quels en sont les acteurs cellulaires et moléculaires. Pour cela nous avons utilisé la technique de transfert de gènes par injection intracérébrale d'AAV à des souris. Nous avons développé un modèle d'injection qui cible le gyrus denté (GD), et plus particulièrement les cellules mossues de la couche polymorphique. Ces cellules ont en effet la particularité de projeter dans le GD contra-latéral, et plus particulièrement dans la couche polymorphique. Nous avons pu montrer que la protéine tau transgénique est capable de propager dans ces derniers, mimant ainsi un mécanisme de propagation de la tauopathie.

Une fois ce modèle mis au point, nous avons étudié l'impact de l'agrégation de la protéine tau sur sa propagation en surexprimant différentes versions de la protéine Tau humaine ayant des cinétiques d'agrégation et de neurotoxicité différents (D'Orange et al. 2018). Par ailleurs nous avons également étudié le rôle de la microglie et de son activation en appliquant le modèle de propagation à différents paradigmes expérimentaux : des souris transgéniques TREM2 KO dans lesquelles la microglie présente un défaut d'activation en cas de pathologies neurodégénératives, des souris transgéniques APP/PS1dE9 dans le cerveau desquelles des plaques amyloïdes apparaissent rapidement à l'âge adulte, et des souris sauvages âgées de 15 mois. Nous avons montré que l'amyloïdose, et l'agrégation de la protéine tau influencent la propagation de cette dernière, il serait maintenant intéressant de comprendre plus finement les mécanismes impliqués.

Title : Development of a new gene-transfer model in mice to study tauopathy spreading: influence of tau aggregation and microglia activation.

Keywords : Tau , Spreading, Neuroinflammation, Microglia, TREM2, Toxic species of tau

Abstract : In Alzheimer's disease, tauopathy spreading is highly correlated with the progression of cognitive symptoms in patient's brain. Thus, targeting the mechanisms implicated in the spreading of pathological tau would be a valuable therapeutic strategy. The aim of this project was to develop a new *in vivo* model to study the spreading of tau and identify the molecular and cellular actors involved, and particularly the role of microglia in this phenomenon. To do so, we used a gene transfer technique through intracerebral injection of AAV in mice. We developed an injection model that targets the dentate gyrus (DG), and more specifically the mossy cells of the polymorphic layer. In fact, those cells have axonal projection in the contralateral DG. We showed that transgenic tau protein is able to spread in these neurons, mimicking the mechanism of tauopathy spreading.

Then, when the model was validated to study propagation, we studied the influence of tau aggregation on its spreading by overexpressing different forms of human tau protein, with different aggregation and neurotoxicity profiles (D'Orange et al 2018). Furthermore, we studied the role of microglia and its activation using the model of spreading in mossy cells of the DG to different mouse models. We used TREM2 deficient mice that have a microglial activation deficiency in neurodegenerative diseases, APP/PS1De9 transgenic mice in whose brains amyloid plaques appear rapidly in adulthood, and wild-type mice aged of 15 months. We have therefore shown that amyloidosis and tau protein aggregation influence the spreading of tau, and it would now be interesting to study more deeply the mechanisms involved.