Étude de l'imagerie amyloïde cérébrale et de l'élargissement des endosomes dans les cellules sanguines au cours de la maladie d'Alzheimer

Fabian Corlier

▶ **To cite this version:**

Fabian Corlier. Étude de l'imagerie amyloïde cérébrale et de l'élargissement des endosomes dans les cellules sanguines au cours de la maladie d'Alzheimer. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066687 . tel-01200763

HAL Id: tel-01200763

https://theses.hal.science/tel-01200763

Submitted on 17 Sep 2015

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.

THÉSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

École Doctorale 3 C – Cerveau, Cognition et Comportement

Présentée par

M. Fabian Wolfram Corlier

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Étude de l'imagerie amyloïde cérébrale et de l'élargissement des endosomes dans les cellules sanguines au cours de la maladie d'Alzheimer

Présentée et soutenue publiquement le 24 septembre 2014

Devant le jury composé de :

Mme Dr. Marie-Claude Potier	Directrice de thèse
Mme Pr. Marie Sarazin	Co-directrice de thèse
M. Pr. Pierre Aucouturier	Président du jury
Mme Dr. Claire Desnos	Rapporteur
M. Dr. Vincent Deramecourt	Rapporteur
Mme Dr. Bernadette Allinquant	Examinateur
M. Dr. Christian Czech	Examinateu

Remerciements

J’aimerais remercier le Pr. Pierre Aucouturier d’avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie également le Dr Vincent Deramecourt et le Dr Claire Desnos, pour l’honneur qu’ils me font en acceptant le rôle de rapporteur de ce travail.

Je tiens à remercier vivement le Pr Bernadette Allinquant et le Dr Christian Czech, pour l’honneur qu’ils m’ont fait en acceptant de participer au jury de thèse en qualité d’examinateurs. En particulier je remercie M. Czech pour les échanges très enrichissants que nous avons eus durant les réunions de travail annuelles « JSC meetings » avec Roche ; je suis très fier de lui présenter ce travail qui synthétise quelques résultats discutés au cours de ces rencontres.

Je remercie la fondation Roche et l’APHP pour le soutien financier qu’ils ont accordé à ce projet, pour leur grande disponibilité quand nous avions des questions, ainsi que pour leur grande flexibilité concernant la publication des résultats ou leur communication en congrès. Merci à Dr Christian Czech et Tania Nikolcheva pour leur relecture du manuscrit de l’article en cours de préparation.

Je tiens à témoigner ma plus sincère gratitude au Pr. Marie Sarazin et Dr Marie-Claude Potier pour leur encadrement, pour la confiance qu'elles ont eu en moi et pour les nombreux enseignements que j'ai tirés de nos échanges.

Elles incarnent à mon sens, deux approches différentes et complémentaires de la maladie d'Alzheimer, l’une mécanistique, l’autre clinique ; l'une spécifique et technique l'autre holistique et pratique. Je suis conscient d’avoir vraiment beaucoup de chance d’apprendre de deux chercheurs que j’admire et respecte énormément, et j’espère qu’il me restera ne serait-ce qu’un peu de leur grande expérience et de leur profonde connaissance de la maladie.

Je leur suis extrêmement reconnaissant pour le temps qu'elles ont passé à (tenter de) me pousser dans la direction de l’excellence, pour leur indulgence et leur conseil. Je suis très reconnaissant aussi, pour les nombreuses opportunités qu’elles m’ont donné de participer à des conférences, et de prendre part à des échanges passionnants.

En particulier j’aimerais exprimer ma profonde gratitude à Marie pour m’avoir soutenu dans ma démarche de poursuivre mon éducation avec ce projet doctoral alors que j’étais en poste dans son équipe en tant qu’attaché de recherche clinique.

Les équipes cliniques

Je n'aurai jamais imaginé en passant cet entretien d'embauche, il y a bientôt six ans, avec Marie et Isabelle Leber dans le couloir souterrain qu'était alors le centre de neuropsychologie du bâtiment Castaigne, qu'il allait m'amener aussi loin. Ni qu'il amorçait la période la plus lumineuse de ma vie. Je souhaite remercier infiniment Marie et Isabelle de m'avoir donné cette chance. Et je souhaite remercier toute l'équipe du centre de neuropsychologie du langage pour l'accueil qu'elle m'a réservé.

Je me sens extrêmement fier et reconnaissant d'avoir pu évoluer parmi eux et j'ai envie de dire grâce à eux. Quand a commencé l'étude BIOMAGE, chaque bilan neuropsychologique était réalisé en plus des bilans journaliers, pendant la pause de midi ou les trous du planning, et pourtant c'est toujours avec le même enthousiasme que Valérie, Élodie, Dalila, Richard, Christina, Aurélie, et Sophie ont donné de temps, de leur savoir, et de leur personne, je leur en suis extrêmement reconnaissant. Je salue également Thierry, Velina, Pierre, Marc, Lionel, Véronique, Monique, Francis. Je remercie Fanny et Marie-Christine, pour leur accueil chaleureux, personne ne connaît les catacombes à dossiers des sous-sols de la Pitié aussi bien qu'elles!

Je remercie également le Pr. Bruno Dubois pour m'avoir accueilli dans sa structure et pour le riche environnement scientifique et clinique auxquels j'ai eu accès dans l'Institut de la Mémoire et de la Maladie d'Alzheimer (IMMA).

Plus que tout, je suis reconnaissant d'avoir eu la chance de côtoyer les patients du service, de les accompagner dans leurs visites et d'apprendre à travers leurs yeux, ce que signifie d'avoir une maladie d'Alzheimer. Plusieurs de ces rencontres m'ont bouleversé, et c'est avec beaucoup d'émotion que je voudrais leur dire merci pour avoir accepté de subir tous ces examens avec la motivation sincère de vouloir rendre service à l'équipe de recherche, plus que par l'espoir que cela leur servirait.

Je souhaite exprimer ma reconnaissance, à Hélène Corne pour avoir repris le flambeau dans l'organisation des visites IMABIO3 et l'énorme travail que cela représente, à Leonardo Cruz de Souza qui est un clinicien et un chercheur exemplaire, à Maxime Louis-Bertoux, à Lorraine Hamelin, à Marcel Levy, ainsi qu'à Carole Jagot et Julien Lagarde. Chacun à son tour s'est montré indispensable dans le projet. Et je vois dans nos interactions réciproques un exemple de travail en équipe. Je suis très reconnaissant envers Leo et Maxime pour le plaisir que cela a été de travailler à leurs côtés, et aimerai leur témoigner ma profonde estime en tant de chercheurs et en tant qu'humains.

L'équipe maladie d'Alzheimer et Prions

Je remercie les membres et anciens membres pour leur accueil et les rapports amicaux que nous avons développés au fil du temps. Jérémie Lavaur, Catherine Marquer, Adina Lazar, Aurore Loistron, Camille Neuillet, Christelle Albac, Gaelle Fontaine et son inaltérable bonne humeur, Luce Dauphinot, Stéphane Epelbaum dont je loue le courage de faire une thèse en même temps qu'un clinicat, Kunie Roussel-Ando qui est un exemple d'efficacité et d'organisation (et une excellente pâtissière), je suis vraiment admiratif. Je remercie également Benoit Delatour pour ses nombreux conseils.

J'aimerai aussi exprimer ma gratitude envers le Professeur Charles Duyckaerts pour ses conseils éclairés tant en neuropathologie qu'en statistiques. Je lui suis reconnaissant pour ses remarques bienveillantes et les nombreux apports méthodologiques qui ont été permis grâce à lui.

Le Service Hospitalier Frederic Joliot

Je remercie Dr Michel Bottlaender du SHFJ pour m'avoir enseigné les secrets de l'analyse des TEP et pour son contact chaleureux et sa constante bonne humeur. J'admire énormément Michel pour son travail, et la simplicité avec laquelle il sait le partager. Je suis vraiment honoré d'avoir travaillé avec lui. Je voudrais aussi témoigner ma gratitude à Claire Leroy et à Renaud Maroy pour leur aide et leurs conseils.

La plateforme d'imagerie cellulaire Pitié-Salpêtrière

Je remercie les membres de la plateforme d'imagerie cellulaire (PICPS), Aurélien Dauphin pour son aide en développement java, Dominique Langui pour les discutions passionnantes que nous avons eues et ses conseils en immunocytochimie, ainsi qu'en stratégie ! Dominique est redoutable au jeu de GO ! J'aimerais également remercier la PICPS pour la grande qualité des formations en imagerie cellulaire qu'elle organise avec l'UFR83.

L'institut curie

Je remercie Isabelle Rivals pour son aide extrêmement précieuse tout le long du projet, en particulier pour m'avoir appris les rudiments du codage sur MATLAB ; d'avoir appris ce langage informatique a été pour moi comme d'apprendre à parler. Sans cet outil précieux, ce projet n'aurait pas été possible.

L'équipe maladies immunes et conformationnelles

J'adresse mes sincère remerciements à Guillaume Dorothée dont les conseils concernant les phénomènes immunitaires dans la MA se sont révélés extrêmement précieux. Je lui suis aussi reconnaissant sa grande disponibilité pour répondre à mes nombreuses questions.

L'ICM

Je souhaite exprimer ma gratitude envers l'institut du cerveau et de la moelle épinière pour la grande qualité des conférences qui y sont organisées chaque semaine et l'environnement scientifique particulièrement riche dans lequel on évolue à l'ICM.

Plus particulièrement je remercie le Pr. Bernard Zalc et Patricia Oliviero pour leur soutient actif lors de la création de l'association des étudiants et post-doctorants de l'ICM, et leur aide dans l'organisation des nombreux évènements scientifiques et extra scientifiques des « Ajités ». Ils ont notament initié le projet de partir annuellement pour une retraite des docs et post docs qui est devenu l'évènement important la rentrée. Je remercie également le Pr Alexis Brice et Mme Anne Bellod qui ont également beaucoup soutenu les Ajités et notamment accueillent notre réunion mensuelle « science et pizza – the SCI-PI meeting » et nous ont accordé une aide financière annuelle.

Et bien sûr je remercie tous les étudiants qui ont pris part ou prennent part à la vie scientifique de l'ICM et contribuent au climat de travail stimulant qui règne à l'institut.

Enfin, je souhaite remercier très sincèrement mes proches et ma famille pour leur soutient, malgré la distance, Jean-Pierre Corlier, mon père, qui est un exemple d'abnégation, de rigueur scientifique et d'honnêteté. Et ma mère Beatrix Ibing, qui incarne l'opiniâtreté et le courage, elle ne renoncera jamais à chérir la vie. Pascal, l'esprit le plus créatif que je connaisse, devenu très célèbre au labo pour son Pho.

Juliane Bagdasaryan qui a énormément contribué à ce travail de manières les plus diverses, mais avant tout je lui dois un soutien logistique et moral de chaque seconde, pendant le parcours ; elle est la compagnie la plus douce et le soutient le plus solide que l'on puisse rêver, je lui suis extrêmement reconnaissant pour son aide et continue d'admirer sa détermination et son optimisme dans toutes les situations. Du hast dir jeden Tag mein Herz verdient.

« Sa ki pou-w riviè-la pé ké chayé-y[1] » (ce qui est pour toi ne sera pas emporté par la rivière)

[1] Proverbe créole qui signifie que la reconnaissance que l'on mérite ne sera pas emportée par les tourbillons du temps symbolisés par la rivière ; une manière imagée de dire à tous ceux qui m'ont soutenu et apporté leur aide, que je n'oublierai jamais ma dete morale envers eux.

Table des matières

Remerciements ..... **i**

Table des matières **1**

Abbréviations **4**

Index des illustrations **6**

Index des tableaux **9**

Résumé **9**

Abstract **10**

I. **INTRODUCTION** **11**
1.1 La Maladie d'Alzheimer 12
1.1.1 Historique et définition 12
1.1.2 Maladie d'Alzheimer et société 14
1.2 Neuropathologie 17
1.2.1 Neuropathologie de la maladie d'Alzheimer 18
1.2.2 Les dégénérescences neurofibrillaires 18
1.2.3 La Plaque amyloïde ou plaque sénile 22
1.2.4 Inflammation 27
1.2.5 Génétique de la maladie d'Alzheimer 28
1.2.6 Paradigme physiopathologique 31
1.3 Le diagnostic de la maladie d'Alzheimer 33
1.3.1 Evolution des critères de diagnostic 33
1.3.2 Les formes atypiques de la maladie d'Alzheimer 34
1.3.3 Marqueurs de la maladie d'Alzheimer 36
1.3.4 Biomarqueurs sanguins 42
1.4 Le compartiment endosomal et le métabolisme de l'APP 48
1.4.1 Nature et fonctions du compartiment endo-lysosomal 49
1.4.2 Les endosomes précoces dans la maladie d'Alzheimer 55
1.4.3 Conclusion sur l'élargissement des endosomes 61

II. **OBJECTIFS DU TRAVAIL** **62**

1 Contexte général **63**

2 L'étude BIOMAGE **63**
2.1.1 Objectifs 64
2.1.2 Critères d'inclusion et schéma expérimental 64
2.1.3 Description des critères d'exclusion (sur décision de l'investigateur) 65

3 Etude IMABIO3 ..... **70**
3.1 Objectifs 70
3.2 Critères d'inclusion et schéma expérimental 71

4 Hypothèses de travail **73**

4.1 Première étude : Analyse d'un biomarqueur cérébral de la maladie d'Alzheimer dans l'atrophie corticale postérieure (ACP) ... 73
4.2 Deuxième étude : Analyse des endosomes dans les cellules périphériques dans la MA sporadique ... 74

III. **PREMIERE ETUDE : ... 75**

1 Analyse des marqueurs physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer dans l'atrophie corticale postérieure ... 76
1.1 Introduction à l'article de de Souza, Corlier *et al.,* 2011 ... 76
1.2 Population ... 77
1.3 Méthodes ... 77
1.3.1 Génération des images paramétriques ... 78
1.3.2 Segmentation des VOIs ... 78
1.4 Resultats : Article de Souza, Corlier *et al.,* 2011 (en anglais) ... 80
1.5 Supplementary data de Souza, Corlier *et al.,* 2011 ... 90
1.6 Conclusions ... 91

IV. DEUXIEME ETUDE **... 93**

1 Développement des Méthodes ... 95
1.1 Généralités sur la microscopie confocale appliquée à la détection de petits objets ... 95
1.2 Analyse des endosomes dans les PBMC ... 97
1.2.1 Isolement des Cellules ... 97
1.2.2 Marquage immuno-cytochimique des endosomes précoces ... 97
1.2.3 Acquisition des images au microscope confocal ... 98
1.3 Analyse des endosomes dans les fibroblastes ... 99
1.3.1 Marquage des endosomes dans les fibroblastes ... 99
1.3.2 Acquisition des images dans les fibroblastes ... 99
1.4 Développement des méthodes de détection des endosomes ... 100
1.4.1 Méthode classique pas seuillage ... 100
1.4.2 Nouvelle méthode de détection par ondelettes ... 101
1.4.3 Comparaison des méthodes par seuil et par ondelette ... 102
1.4.4 Conclusion sur la comparaison des méthodes de détection ... 104
1.4.5 Echantillonnage du volume entier des cellules ... 105
1.4.6 Calibration de la détection ... 106
1.5 Faut-il procéder à une correction des données ? ... 108
1.5.1 Marquage de la membrane plasmique avec des Wheat germ Aglutinins ... 108
1.5.2 Segmentation du volume cellulaire dans MATLAB ... 109
1.5.3 Effet de la correction ... 109
1.6 Variabilité inter-échantillon ... 110
1.7 Analyse de la distribution spatiale des endosomes ... 112

2 Population ... 115

3 Résultats ... 116
3.1 Endosomes dans les PBMC ... 116
3.1.1 Analyse des endosomes par cellule ... 117
3.1.2 Classification des volumes moyens des endosomes par cellule ... 118
3.1.3 Analyse de la corrélation aux données cliniques ... 120
3.1.4 Analyse spatiale des endosomes dans les PBMC ... 124
3.2 Analyse des endosomes dans des fibroblastes ... 127
3.2.1 Analyse du nombre et de la taille des endosomes dans les fibroblastes ... 128
3.3 Analyse spatiale de la répartition des endosomes dans les fibroblastes ... 132
3.3.1 Méthode des plus proches voisins ... 132
3.3.2 Méthode de Ripley – densité des voisins ... 133

3.4 Lignées d'indivdidus DS avec ou sans Alzheimer 135
3.4.1 Nombre et volumes des endosomes 137

4 Récapitulatif des résultats principaux 140

5 Discussion de la seconde étude 142
5.1 Pertinence de l'analyse et limitations 143
5.1.1 Avantages des marqueurs cellulaires sanguins 143
5.1.2 Limitations des marqueurs cellulaires sanguins 143
5.2 Variabilité inter-individuelle et expérimentale 144
5.3 Avantages de la méthode de quantification 144
5.4 Augmentation de la fréquence des cellules anormales dans la MA 145
5.5 Relation entre élargissement des endosomes précoces et pathologie amyloïde cérébrale 146
5.5.1 Implication de la barrière hémato-encéphalique 147
5.5.2 Le phénotype « endosomes élargis » est-il constitutif? 149
5.6 Spécificité cellulaire ? 150
5.7 Analyse spatiale 150

6 Perspectives 152
6.1 Analyse par cytométrie des endosomes dans les PBMC 152
6.2 Suivi longitudinal 153
6.3 Perspectives méthodologiques - traitement des données 153
6.3.1 Automatiser une segmentation par seuil 153
6.3.2 Approfondir l'analyse spatiale 153
6.3.3 Mise à disposition du traitement automatisé 154
6.4 Cartographie neuropathologique des endosomes élargis dans le cerveau 154

V. **CONCLUSIONS 155**

VI. **REFERENCES 158**

VII. **ANNEXES 187**

Annexe 1a : Tableau récapitulatif des données de chaque sujet, groupe témoin 188

Annexe 1b : Tableau récapitulatif des données de chaque sujet, groupe MA-MCI 189

Annexe 1c : Tableau récapitulatif des données de chaque sujet, groupe MA-D 190

Annexe 2a : Diagrammes descriptifs des algorithmes de traitement des données 191

Annexe 2b : Diagramme descriptif de l'analyse spatiale 192

Annexe 3a : Marquage de l'A-beta et de l'APP dans les PBMC 193

Annexe 3b : Marquage de l'A-beta et de l'APP dans les PBMC 194

Annexe 4 : Manuscipt Corlier *et al.,* 2014, version soumise à Translational Psychatry le 02/09/2014 . 195

Abréviations

[11C]-PIB	Pittsburgh Compound B [N-methyl-11C]-2- (4'-methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole (l'abréviation PiB est également utilisée)
ABCA7	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 7
ACP	Atrophie corticale postérieures
ADAM9 (/10/17/19)	A Disintegrin and Metalloprotease, member 9/10/17/19
ADDF	Alzheimer's drug discovery foundation
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNI	Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative
AGE	Advanced glycation end product
AIBL	Australian Imaging, Biomarkers and Lifestyle
ApoE	Apolipoprotéine-E
ApoE-e4	Variant 'epsilon-4' de l'ApoE
APP	Amyloid precursor protein
APP'	Aphasie Primaire Progressive
APPs-alpha	APP alpha secretase
ARN	Acide ribo-nucleo
Aβ	Peptide beta-amyloïde
BACE1 & 2	Beta-site APP-cleaving enzyme 1 & 2
CE	Esters de cholestérol
CNS	Central Nervous System
CPF	Cortex préfrontal
CR1	Complement receptor type 1
C-terminale	Carboxyle-terminale
DNF	dégénérescences neurofibrillaires
DS	Down syndrome
EEA1	Early Endosome associated Antigen 1
EGFR	Epidermal groth factor receptor
EOAD	Early Onset Alzheimer's Disease
EPHA1	Ephrin type-A receptor 1
FAD	Familial Alzheimer's disease
FC	Cholestérol libre
FDG	Fluoro-desoxyglucose
FEOAD	Familial Early Onset Alzheimer's Disease
FTD	Démence fronto-temporale
GDP	Guanosine-diphosphate
GSK3ß	Glycogen synthase kinase 3
GTP	Guanosine-triphosphate
GWAS	genome-wide association studies
HLD	Lipoprotéines de haute densité
IL-1ß	Interleukine-1ß
INSERM	Institut national de la santé et de la recherche médicale
IRM	Imagerie par résonnance magnétique
KeV	Kilo-electron Volt
LAMP1	Lysosomal-associated membrane protein 1

LCR	Liquide céphalo-rachidien
LDL	Low-density-liporoteins
LDL	Lipoprotéines de basse densité
LDLR	Récepteur des « low-density lipoproteins »
MA	Maladie d'Alzheimer
MAP	Microtubule associated proteins
MAS	Forme sporadique de Maladie d'Alzheimer
MCI	Mild cognitive impairement
MVB	Corps multi-vésiculaires
NINCDS-ADRDA	National Institute of Neurological and Communication Disorders and Stroke - Alzheimer Disease and Related Disorders Association
PBMC	Leucocyte mononucléaires isolés du sang
PHF	Paired helical filaments
PI3K	Phosphatidyinositol-3-kinase
PICALM	Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein
PS	Plaques séniles
PS1 & 2	Préséniline 1 & 2
RAB4 (/5/11/15/22)	Ras-like protein in brain, member 4/5/11/15/22
RL /RI 16	Test de rappel libre et indicé à 16 items
SNX	Sorting nexin
SPECT	Single-photon-emitting computed tomography
TEP	Tomographie par émission de positrons
TGN	Trans-golgi network
VBM	Voxel Based Morphometry
VLDL	Lipoprotéines de très basse densité
VPS34	Phosphatidylinositol 3-kinase

Index des illustrations

Figure 1. 1 : Isoformes cérébrales de la protéine tau, chez l'adulte 19

Figure 1. 2 : Séquence d'apparition des anomalies neurofibrillaires 21

Figure 1. 3 : Morphologie des dépôts amyloïdes. 22

Figure 1. 4 : Phases de progression de l'amyloïdose cérébrale dans la MA. 23

Figure 1. 5 : Voies protéolytiques de l'APP 24

Figure 1. 6 : Représentation schématique des aspects de la physiopathologie 27

Figure 1. 7 : Evolution temporelle des lésions neuropathologiques 34

Figure 1. 8 : Phases théoriques de progression des marquages PIB 41

Figure 1. 9 : Nature des biomarqueurs sanguins 44

Figure 1. 10 : Le système endo-lysosomal 49

Figure 1. 11 : Schéma représentant les principales voies d'endocytose connues. 51

Figure 1. 12 : L'endosome précoce 53

Figure 1. 13 : Micrographies représentant des neurones pyramidaux 56

Figure 1. 14 : Illustration de la structure de l'ApoE 58

Figure 1. 15 : Métabolisme du Cholestérol dans le cerveau 59

Figure 2. 1 : Schéma du plan expérimental simplifié de l'étude BIOMAGE. 69

Figure 2. 2 : Schéma du plan expérimental simplifié de l'étude IMABIO3. 72

Figure 3. 1 : Calcul de l'index de fixation du PIB par volume d'intérêt 79

Figure 4. 1 : Principe du microscope confocal. 96

Figure 4. 2 : Segmentation par seuillage. 101

Figure 4. 3 : Aspect de l'interface du logiciel ICY.. 102

Figure 4. 4 : Segmentation des endosomes sur Fiji (méthode par seuil) 103

Figure 4. 5 : Segmentation des endosomes sur ICY (méthode par ondelettes) 103

Figure 4. 6 : Comparaison des méthodes de segmentation. 104

Figure 4. 7 : Une cellule dans le volume 105

Figure 4. 8 *:* Billes fluorescentes 175nm et fibroblaste d'un individu sain agé. 107

Figure 4. 9 *:* Correction de la taille des endosomes par le volume cellulaire. 110

Figure 4. 10 *:* Variabilité des volumes cellulaires..... 110

Figure 4. 11 *:* Variablité du volume endosomal par sujet. 111

Figure 4. 12 : Definition de trois catégories de volume endosomal moyen..... 111

Figure 4. 13 : Distance auplus proche voisin. 112

Figure 4. 14 : Analyse de densité de voisins dans un fibroblaste de malade 114

Figure 4. 15 : Densité de voisins par classe de distance. 114

Figure 4. 16: Planche d'images représentatives de PBMC marquées sur les endosomes précoces. 116

Figure 4. 17: Nombre et taille moyenne des endosomes par cellule. 117

Figure 4. 18: Division de l'histogramme des valeurs des VEM par cellule en trois catégories. 118

Figure 4. 19 : Classification des cellules en fonction des VEM. 120

Figure 4. 20 : Matrice de dispersion des variables descriptives des sujets Alzheimer.. 122

Figure 4. 21*:* Corrélation entre volume moyen des endosomes et marquage amyloïde 123

Figure 4. 22: Courbe de la fréquence cumulée de la distance au plus proche voisin..... 124

Figure 4. 23: Densité moyenne de voisins par classe de distance..... 125

Figure 4. 24: Puissance de la significativité de la différence, par classe de distance 126

Figure 4. 25: Images représentatves de fibroblastes marqués sur la protéine EEA1 127

Figure 4. 26: Présentation du nombre et du volume endosomal moyen pour chaque individu dans les fibroblastes. 128

Figure 4. 27 *:* Moyenne par groupe du nombre moyen d'endosomes par cellule, et du volume endosomal moyen dans les fibroblastes. 129

Figure 4. 28 *:* Division de l'histogramme des valeurs des VEM par cellule en trois catégories. 130

Figure 4. 29 : Classement des cellules dans trois classes, en fonction de leur VEM.....131

Figure 4. 30 : Courbe de densité cumulée de la distance au plus proche voisin. 132

Figure 4. 31 : Desité moyenne d'endosomes par classe de distance pour chaque cellule. 133

Figure 4. 32 : Comparaison des densités de distribution des endosomes entre MA et témoins. 134

Figure 4. 33 : Images représentatives du marquage des endosomes précoces dans des lignées lymphoblastoïdes.....136

Figure 4. 34 : Nombre et taille moyenne des endosomes par cellule dans les LCL de patients trisomiques avec ou sans MA. 137

Figure 4. 35 : Distribution du volume endosomal moyen par cellule dans les LCL.....138

Figure 4. 36 : Classification des cellules en fonction du volume endosomal moyen 138

Figure 5. 1 : Rôle de l'ApoE à la barrière hémato encéphalique. 148

Index des tableaux

Tableau 2. 1 : Détails de la batterie de tests neuropsychologiques conduite avec tous les sujets..... 67

Tableau 2. 2 : Population de l'étude BIOMAGE. 69

Tableau 4. 1 : Comparaison des résultats de détection pour une cellule analysées en 3D ou par coupes indivuduelles dans le volume de cette cellule 106

Tableau 4. 2 Description détaillée de la population incluse dans l'analyse des endosomes dans les PBMC..... 115

Tableau 4. 3 : Nombre moyen d'endosomes par cellule et volume moyen des endosomes par cellule.117

Tableau 4. 4 : Définition des intervalles de valeurs de trois classes de volume endosomal moyen par cellule 119

Tableau 4. 5 : Effectifs par classe de taille..... 120

Tableau 4. 6 : Matrice de corrélation des variables, chez les sujets Alzheimer..... 122

Tableau 4. 7 : Tableau recapitulatif des valeurs moyennes 128

Tableau 4. 8 : Définition des intervalles de valeurs de trois classes de volume endosomal moyen par cellule 130

Tableau 4. 9 : Tableau d'effectifs après classification des cellules en fonction de leurs VEM, dans les fibroblastes. 131

Tableau 4. 10 : Récapitulatif du nombre de cellules par classe de volumes moyen et pourcentage correspondant 139

Résumé

Le diagnostic de la maladie d'Alzheimer (MA) s'appuie sur des critères clinico-biologiques combinant un déficit de la mémoire épisodique et un marqueur biologique (dosage dans le liquide céphalorachidien, imagerie isotopique) indicateur des changements tissulaires qui signent le début de la maladie. L'un des phénomènes biologiques les plus précoces de la maladie est la production de dépôts du peptide amyloïde dont le principal site de production à partir de son précurseur, l'APP, est le compartiment endosomal. L'apparition dans le cerveau d'endosomes élargis précède celle des dépôts amyloïdes.

Nous avons analysé deux marqueurs biologiques : la charge amyloïde cérébrale et le compartiment endosomal dans le contexte de la MA. Nous avons tout d'abord étudié le marquage des dépôts amyloïdes cérébraux par fixation du ligand [PiB] en tomographie d'émission de positrons (TEP) dans le cerveau des malades atteints d'une atrophie corticale postérieure (ACP). Puis nous avons étudié les endosomes dans les cellules périphériques (leucocytes mononucléaires et fibroblastes) de patients MA, et dans des lignées lymphoblastoïdes (LCL) d'individus porteurs d'une trisomie 21 (Down's syndrome, DS) dont 45% développent une MA à l'âge de 60 ans (contre 3 % dans la population générale), principalement en raison de la présence d'une troisième copie du gène codant l'APP, localisé sur le chromosome 21. Nos hypothèses étaient que 1) le profil de marquage du [PiB] permettrait de confirmer l'existence de la maladie dans les formes focales de MA qui échappent aux critères de diagnostic classiques et 2) des endosomes élargis pourraient être détectés en périphérie du système nerveux (cellules sanguines mononuclées) dans la MA tout comme dans la trisomie 21.

Nos travaux montrent des profils de marquage [PiB] similaires entre la MA et l'atrophie corticale postérieure (ACP) aussi bien en intensité qu'en topographie, indiquant que la présentation phénotypique n'est pas congruente avec la pathologie amyloïde cérébrale. L'étude des endosomes dans les cellules sanguines ne met pas en évidence de différence de volume endosomal moyen (VEM) par cellule entre malades et contrôles, en revanche la classification des cellules en fonction du VEM montre une fréquence significativement plus élevée des cellules avec des endosomes élargis chez les patients atteints de MA. Le VEM est par ailleurs significativement corrélé au marquage [PiB] chez les patients. L'augmentation de la fréquence des cellules avec un VEM élevé est également retrouvée dans des fibroblastes de patients MA et dans des LCL d'individus DS atteints de MA par rapport aux DS sans MA. Enfin une analyse spatiale de la distribution des endosomes dans chaque cellule met en évidence des différences de densité des endosomes entre les groupes étudiés.

Ces altérations du compartiment endosomal dans deux types cellulaires périphériques constitue le premier marqueur morphologique cellulaire corrélé à la pathologie amyloïde cérébrale dans la MA et pourrait constituer un outil diagnostique de la MA à partir de prélèvements sanguins.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) diagnostic is based on clinical and biological criteria, and is dependent on impairment of the episodic memory together with a marker of the underlying pathophysiologic process causing initiation of the clinical stage. One of the earliest events in AD pathology in the brain is formation of Amyloid deposits in the extracellular space. One of the main subcellular sites of amyloid-β (Aβ) production from amyloid precursor protein (APP) processing is the endosomal compartment. Appearance of endosomal abnormalities precede the formation of amyloid deposits, in the brain areas affected by disease progression in AD.

In the present work we analyzed two biomarkers: cortical amyloid deposits and the endosomal compartment in the context of AD. We first studied brain amyloid load in patients with posterior cortical atrophy using [11C]PiB ligand retention in positron emitting tomography (PET). In a second part we studied the endosomal compartment in peripheral cells (fibroblasts and mononuclear leucocytes, PBMC) from AD patients, and in lymphoblastoid cell lines (LCL) from Down's syndrome (DS) individuals where a third copy of amyloid-precursor-protein-coding gene located on chromosome 21 is known to initiate early Alzheimer's pathology in most DS individuals (over 45% after 60 years old). Our hypotheses were 1) that [PiB] retention pattern may confirm underlying AD pathology in atypical focal presentations of AD, and 2) that endosome enlargement may be detectable in the periphery of central nervous system in AD and DS.

Our work shows similar profiles in topography and intensity of [PiB] binding in AD and posterior cortical atrophy (PCA), stressing the absence of congruence between phenotypic presentation and brain amyloid pathology. Analysis of endosomes in PBMC yielded no significant difference between AD and control subjects in the comparison of mean endosome volume per cell (MEV) but when classifying MEV in three categories of increasing volume, we observed a significant increase in the frequency of cells with large MEV in demented AD patients (AD-D). Furthermore, the MEV of all patients (AD-MCI and AD-D) correlated with brain [PiB] binding. The increased frequency of cells containing large MEV is also found in AD fibroblasts and in LCL from DS individuals suffering from AD compared to DS without AD. Finally a spatial analysis of the distribution of endosomes within each cell reveals different distribution patterns in the studied groups. Endosomal alterations in two cell types in the periphery of central nervous system is the first morphologic cellular marker correlating to amyloid pathology and may be used as a diagnostic tool for AD from blood.

I.Introduction

1.1 La Maladie d'Alzheimer

1.1.1 Historique et définition

1.1.1.1 Définition

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative qui se manifeste au départ par un déficit de la mémoire épisodique indiquant une atteinte des structures temporales internes (Hodges *et al.*, 2006). L'évolution de la maladie voit le processus neurodégénératif s'étendre à d'autres aires corticales entrainant secondairement une atteinte du langage et des fonctions instrumentales, des fonctions exécutives et des fonctions visuospatiales, allant jusqu'à la perte d'autonomie qui signe le stade de la démence (Ballard *et al.*, 2011).

1.1.1.2 Bref historique

On associe le plus souvent la première description de cette maladie neurologique à la communication du psychiatre allemand Aloïs Alzheimer, lors d'une conférence médicale en décembre 1906. Alzheimer y décrit le cas de sa patiente Madame D. présentant des troubles de la mémoire et du comportement d'évolution progressive et rapide. L'examen du cerveau révèle une atrophie importante et diffuse et l'étude histologique mit en évidence la présence de deux types d'anomalies du parenchyme cérébral, connues aujourd'hui sous le nom de dégénérescences neurofibrillaires (DNF) et plaques amyloïdes.

Dans l'article qu'il écrit en 1907, reprenant cette communication, Alzheimer écrit que des cas similaires sont déjà connus, et que ce tableau clinico-pathologique correspond probablement à une entité nosologique spécifique (Cipriani *et al.*, 2011; Claudia H Kawas 2006). Les plaques décrites par Alzheimer sont en effet déjà connues dans deux cas de 'démence sénile' décrits par Emil Redlich (1898), et la même année Oskar Fisher décrit les deux lésions de la 'maladie d'Alzheimer' chez des patients âgés qu'il distingue des autres démences séniles par leur tableau clinique spécifique, nommé presbyophrénie, qui comprend entre autre une atteinte de la mémoire (Fisher, 1907). En 1911, Alzheimer décrit un nouveau cas, qui a la particularité de ne pas présenter de DNF ; un examen 'moderne' des lames originales d'Alzheimer confirmera l'absence des DNF (Graeber and Mehraein 1999; Möller and Graeber 1998). Il écrit par ailleurs : « Il ne fait vraiment aucun doute que les plaques observées dans ces cas particuliers correspondent, pour tous les points de vue essentiels, à celles que nous trouvons dans la démence sénile. » (citation reprise par Dérouesné ; (Derouesné 2008)).

Par ailleurs la série d'articles de Fischer (1907, 1910 et 1912) produit la démonstration que les Plaques et les DNF sont fréquentes dans la population âgée mais il note que seulement 22% des cas étudiés présentent des DNF. Il avance l'hypothèse que les plaques sont des sécrétions extra cellulaires de nature protéique et que ce sont elles qui initient l'apparition de la maladie (Goedert 2009; Derouesné 2008).

Malgré les travaux de Fischer, et la conclusion d'Alzheimer dans son travail de 1911, la maladie de madame D. et des autres patients Alzheimer décrits ultérieurement par ses collaborateurs sont classés dans une entité nosologique qui porte son nom et qui n'est pas reliée aux démences séniles respectant le tableau de la presbyophrénie. La maladie est longtemps considérée comme spécifique des sujets jeunes, et de prévalence extrêmement faible (Hodges 2006; Cipriani *et al.*, 2011).

Le rôle des DNF et des plaques amyloïdes dans les étapes initiales de la pathologie, ainsi que la meilleure manière de définir les contours de la maladie (même d'un point de vue neuropathologique), continuera de faire débat. Pourtant ces travaux sont remarquables, car ils définissent un processus pathologique distinct du vieillissement normal, reconnaissable à l'existence de lésions spécifiques dans le cerveau et à un tableau clinique dominé par une atteinte de la mémoire.

Plusieurs terminologies et classifications ont ensuite été proposées pour la MA et les atteintes cognitives chez les personnes âgées. Elles feront l'objet d'un chapitre spécifique dédié à l'évolution des critères de diagnostic.

1.1.2 Maladie d'Alzheimer et société

1.1.2.1 Données épidémiologiques

La Maladie d'Alzheimer représente plus de 50% des cas de démence avec une prévalence qui augmente avec l'âge, en particulier chez les personnes âgées de plus de 65 ans bien que des formes dites à début précoce puissent se déclarer dès 40 ans.

On dénombre aux États-Unis 5.2 millions de patients, dont 3.2 millions de femmes, soit près des deux tiers. Avec 500.000 décès par an, elle est la 6e cause de mortalité en Amérique du Nord (Alzheimer Association 2012).

Le principal facteur de risque de la maladie d'Alzheimer est l'âge. L'incidence spécifique à l'âge double tous les 6 ans environ, au-delà de 75 ans, l'affection touche environ 13,2 % des hommes et 20,5 % des femmes. Au-delà de 85 ans, la prévalence s'accroît encore jusqu'à une proportion de 25% de sujets atteints.

En France, l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM) estime que 860 000 personnes sont aujourd'hui atteintes de la maladie d'Alzheimer ou d'une maladie apparentée. L'incidence s'élève à 225 000 nouveaux cas par an en France et l'espérance de vie après le début des symptômes est en moyenne de 8,5 ans. Par ailleurs une méta-analyse de l'incidence de la maladie dans plusieurs pays montre qu'elle diffère peu entre études et n'est pas affectée par la zone géographique (Ziegler-Graham *et al.,* 2008). Les chiffres de prévalence devraient globalement doubler dans les 20 ans en raison du vieillissement de la population.

1.1.2.2 Prédictions de prévalence

Le rapport annuel 2013 du 'Global Observatory for Ageing and Dementia Care' (Alzheimer's Disease International, London, UK) estime que le nombre de malades souffrant d'une démence dans le monde va passer de 35 millions en 2010 à 115 millions en 2050 (Prince *et al.*, 2013). La maladie d'Alzheimer serait à l'origine de 60 à 70 % des cas. La plus forte augmentation de prévalence sera à prévoir dans les pays en développement, en phase de transition démographique. Une méta-analyse menée à partir des études épidémiologiques publiées entre 2001 et 2010 sur la population chinoise a montré que la prévalence réelle en 2010 dépassait de 20% les estimations antérieures faites sur de plus petits échantillons de population (Chan *et al.,* 2013). D'autres études ont également ré estimé la prévalence de la maladie à la hausse (Ferri *et al.,* 2005; Prince *et al.,* 2013).

Les divergences entre études s'expliquent en partie par des biais méthodologiques et des fluctuations régionales de facteurs environnementaux mais aussi par la redéfinition des critères de diagnostic de la MA (Reitz *et al.*, 2011).

Par ailleurs, même avec des critères de diagnostic similaires, la vigilance du corps médical à l'encontre de la MA est plus élevée qu'il y a 20 ans, et l'attention portée à des cas modérés ou atypiques, qui seraient longtemps passés inaperçus, a augmenté en comparaison des années 90 (Chan *et al.*, 2013). Il faut cependant noter que, malgré cela, le diagnostic reste souvent méconnu, puisque, d'après le rapport ministériel de JF Girard datant de 2000, seulement 50 % des cas seraient diagnostiqués et seulement 20 % des patients ayant une MA bénéficiaient d'un traitement spécifique.

1.1.2.3 Le coût de la maladie d'Alzheimer

La partie quantifiable du coût sociétal de la maladie d'Alzheimer comprend majoritairement les dépenses 'formelles' : incluant le coût du suivi médical, et le coût de l'aide sociale et institutionnelle. L'investissement informel (non rémunéré), de la famille et des proches est, lui, plus difficile à estimer, et sa part à l'effort de prise en charge globale est variable d'un pays à l'autre. Il dépend de plusieurs facteurs incluant notamment, la disponibilité des filières de soin 'formelles'. A ce titre plusieurs études relient directement la part de soins informels au produit intérieur brut des pays étudiés. Le coût mondial cumulé de la maladie d'Alzheimer engendré par les dépenses de soin formelles (traitement et soins) s'élève à $604 milliards (€436.109) soit près de 1% du produit intérieur brut mondial. 90% de ces dépenses concernent l'Europe et l'Amérique du Nord qui, ensemble, ne comptent que 45% des malades.

La majorité des malades se trouve donc dans des régions du monde en pleine transition démographique dans lesquelles le système de soins s'appuie encore largement sur la prise en charge informelle des malades, ce qui suggère que les dépenses de santé mondiales liées à la maladie d'Alzheimer sont encore sous-estimées et augmenteront de façon importante dans les prochaines décennies.

Il faut noter que 60 % des malades d'Alzheimer demeurent à leur domicile, avec le concours essentiel des aidants (en particulier de leurs familles), les autres sont en établissement. Cause principale de dépendance lourde des personnes âgées, c'est le motif premier de leur entrée en institution.

1.1.2.4 L'importance du diagnostic précoce

Dans leur rapport annuel Alzheimer's disease international 2011, Prince et collaborateurs (Prince *et al.*, 2011) soulignent l'importance d'un diagnostic précoce de la MA, et concluent que le coût sociétal de la maladie pourrait être réduit de façon significative avec une prise en charge précoce et adaptée des malades, indépendamment de l'évolution des possibilités thérapeutiques disponibles. Ils préconisent de favoriser le diagnostic des malades qui selon les auteurs, est encore trop souvent méconnu, et confondu avec le vieillissement normal.

De plus, le diagnostic est souvent posé tardivement, en raison de la difficulté à aborder le diagnostic ouvertement, de la croyance erronée que le déclin cognitif est un élément normal du vieillissement, et surtout, d'un esprit de fatalisme reposant sur la croyance que rien ne peut être fait pour pallier au déclin cognitif (Prince *et al.*, 2011). Le diagnostic précoce ainsi qu'une meilleure prise en charge pharmacologique et non pharmacologique pourraient retarder la progression du niveau de dépendance des malades, qui est la cause principale des coûts induits par la maladie (financier ou personnel) (Banerjee & Wittenberg 2009).

1.2 Neuropathologie

1.2.1 Neuropathologie de la maladie d'Alzheimer

La description neuropathologique des plaques amyloïdes et des dégénérescences neurofibrillaires dans les deux premiers cas de 'démence présénile' du Dr. Alois Alzheimer en a fait la pierre angulaire de la définition histologique. Parallèlement plusieurs travaux de corrélation anatomoclinique ont permis de définir un tableau syndromique associé à la progression des lésions corticales.

Ce chapitre tentera de résumer ce qui est connu des principales lésions de la maladie, ainsi que les autres altérations plus rarement décrites, et listera dans une section dédiée au diagnostic, les outils disponibles pour en démontrer l'existence et l'étendue *in vivo*.

Les principales lésions neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer peuvent être schématiquement rangées sous trois rubriques : 1) la pathologie neurofibrillaire qui est due à l'accumulation intracellulaire de protéine tau anormalement phosphorylée, 2) les dépôts extracellulaires de peptide Aβ (peptide *beta*-amyloïde) et 3) les pertes synaptiques ou neuronales. La plaque sénile, quant à elle, est une lésion composite, comprenant à la fois un dépôt de peptide Aβ (le cœur) et des lésions neurofibrillaires périphériques (la couronne). (Duyckaerts *et al.*, 2009; Hyman *et al.*, 2012).

Les cas dans lesquels une ou plusieurs causes de démence, fréquentes dans la population âgée, sont retrouvées concomitamment avec une MA, ne sont pas exceptionnels (Cipriani *et al.*, 2011; Hyman *et al.*, 2012; Claudia H Kawas 2006). Par ailleurs les plaques séniles (PS) et DNF sont observées chez les individus porteurs d'une trisomie 21, ou Down syndrome (DS) (Wisniewski *et al.*, 1985).

1.2.2 Les dégénérescences neurofibrillaires

1.2.2.1 Tau et les DNF

Les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) sont constituées de l'accumulation intraneuronale de neurofilaments anormaux.

Elles sont constituées de paires de filaments de protéine Tau, qui dans la maladie d'Alzheimer prennent une conformation particulière en forme d'hélice qui leur vaut leur dénomination anglo-saxonne de 'paired helical filaments' (PHF).

La protéine tau fait partie de la famille des protéines associées aux microtubules (microtubule associated proteins, MAP). Elle joue un rôle dans la formation et la stabilisation des microtubules (Buée *et al.*, 2000; E.-M. Mandelkow & E. Mandelkow 2012; Drubin & Kirschner 1986). Le lien entre les PS et les DNF n'est pas clairement établi. Les deux lésions se forment indépendamment dans des régions distinctes du cortex. En revanche, les anomalies neuritiques de la couronne des plaques séniles matures sont parfois immunoréactives aux anticorps anti-tau (Derouesné 2008; Duyckaerts *et al.*, 2009). Le lien entre les anomalies neuritiques PHF positives, et les DNF n'est cependant pas connu, même si les neurites dystrophiques sont plus fréquemment tau-positives dans les régions riches en DNF. La DNF n'est pas spécifique de la MA et se rencontre dans plusieurs autres maladies neurodégénératives, mais la stœchiométrie des isoformes présentes dans les PHF ainsi que leurs niveaux de phosphorylation permet dans une certaine mesure de les distinguer (Goedert & Spillantini 2006; Buée *et al.*, 2000; Derouesné 2008).

1.2.2.2 Physiologie de la protéine tau

Le gène codant la protéine tau comporte 16 exons dont l'épissage alternatif produit 6 isoformes, dont la longueur varie entre 352 et 441 acides aminés, en fonction du nombre d'exons dont ils sont composés (Figure 1.1). Dans la partie carboxy-terminale de la protéine se trouvent 3 ou 4 répétitions des domaines de liaison aux microtubules qui jouent sur la stabilité des assemblages de tubulines (E. M. Mandelkow *et al.*, 1995; E.-M. Mandelkow & E. Mandelkow 2012).

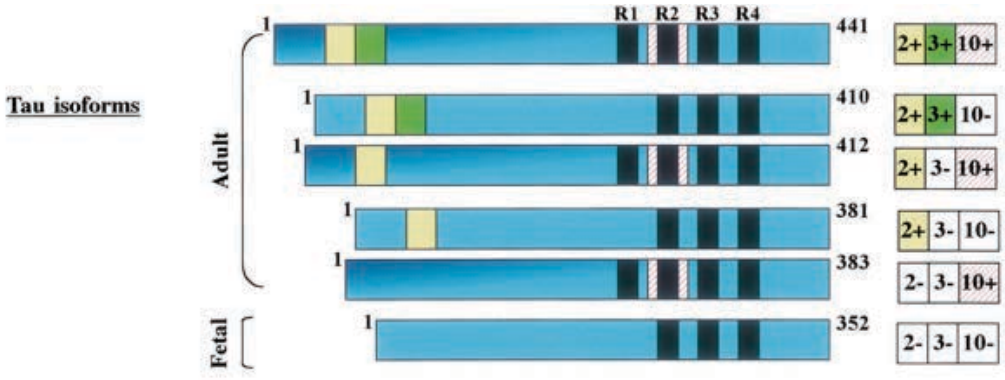


Figure 1. 1 : Isoformes cérébrales de la protéine tau, chez l'adulte. Elles diffèrent par la présence ou l'absence dans la région N-terminale d'insertions de 29a.a codées par les exons 2 (jaune) ou 3 (vert), en même temps que 3 ou 4 répétitions des domaines d'interaction aux microtubules (cubes noirs) en région C-terminale. L'isoforme qui ne contient ni les insertions codées par les exons 2 et 3, ni la répétition codée par l'exon 10, est surtout fœtale (d'après Buee et al, 2000).

L'interaction avec les microtubules se fait par des liaisons ioniques faibles, les charges positives de la protéine tau formant des liaisons ioniques avec les charges négatives de la tubuline. La phosphorylation des nombreux résidus sérine et thréonine, présents dans les domaines d'interaction aux microtubules pourrait entraîner la dissociation des liens ioniques par la modification de la balance des charges qui résulte des charges négatives supplémentaires (Butner 1991). Même si le mécanisme précis entraînant la déstabilisation des microtubules est mal connu, il a été montré que la phosphorylation de certains résidus de tau était critique dans l'interaction avec les microtubules (E. M. Mandelkow *et al.,* 1995; Biernat *et al.,* 1993; Brandt *et al.,* 1994). Des agrégats de protéines tau resolubilisés montrent des profils électrophorétiques différents avec un taux de phosphorylation plus important dans la MA que dans des cerveaux sains (Lee *et al.,* 1991).

Cependant, le rôle de la phosphorylation dans l'agrégation de la protéine tau sous la forme de PHF n'est pas clairement établi, et pourrait ne pas être le facteur principal de la formation des DNF (Mandelkow and Mandelkow 2012; Buée *et al.,* 2000).

D'autres modifications post-transcriptionnelles de la protéine tau sont de bons candidats pour expliquer son accumulation sous la forme de PHF insolubles, notamment la transglutamination qui crée des ponts entre les monomères de tau, les rendant plus stables, et plus résistants à la protéolyse calpaïne-dépendante (Tucholski *et al.,* 1999). La glycosylation de tau qui consiste en l'ajout de motifs glucidiques est augmentée dans la MA, et il a été montré qu'elle favorise sa phosphorylation anormale (Liu, Zaidi, Iqbal, Grundke-Iqbal, Merkle, *et al.,* 2002b; Liu, Zaidi, Iqbal, Grundke-Iqbal & Gong 2002a). Parmi les événements post-transcriptionnels tardifs on peut citer la glycation qui est un phénomène non-enzymatique. Elle entraine généralement l'oxydation, la condensation, et la formation de produits finaux nommés « advanced glycation end products » (AGE) et qui pourraient favoriser l'insolubilité des PHF (Gong *et al.,* 2005). Par ailleurs les protéines tau déclenchent après glycation un stress oxydant qui induit la production de cytokines et de peptides Aß (Yan *et al.,* 1995).

1.2.2.3 Progression des DNF

La formation des DNF dans la MA suit une séquence stéréotypée (H. Braak & E. Braak 1991; Delacourte *et al.,* 2002). Braak et Braak définissent ainsi 6 stades de progression regroupés en trois phases (Figure 1.2). Les premières DNF sont retrouvées dans le cortex entorhinal et l'hippocampe. Cette phase définit les states trans entorhinaux de Braak. Le caractère pathogène de cette phase est discuté car des individus sains de plus de 75 ans présentent couramment des DNF dans ces régions. Dans la phase suivante, dite

limbique, est touché le lobe temporal antérieur, ventral et médial. C'est cette phase qui est associée au début des plaintes cognitives. Dans la phase iso-corticale les anomalies s'étendent au reste du lobe temporal, au lobe pariétal et au lobe frontal. Au paroxysme de la progression des DNF, elles atteignent également les aires primaires sensori-motrices, et les aires primaires visuelles.

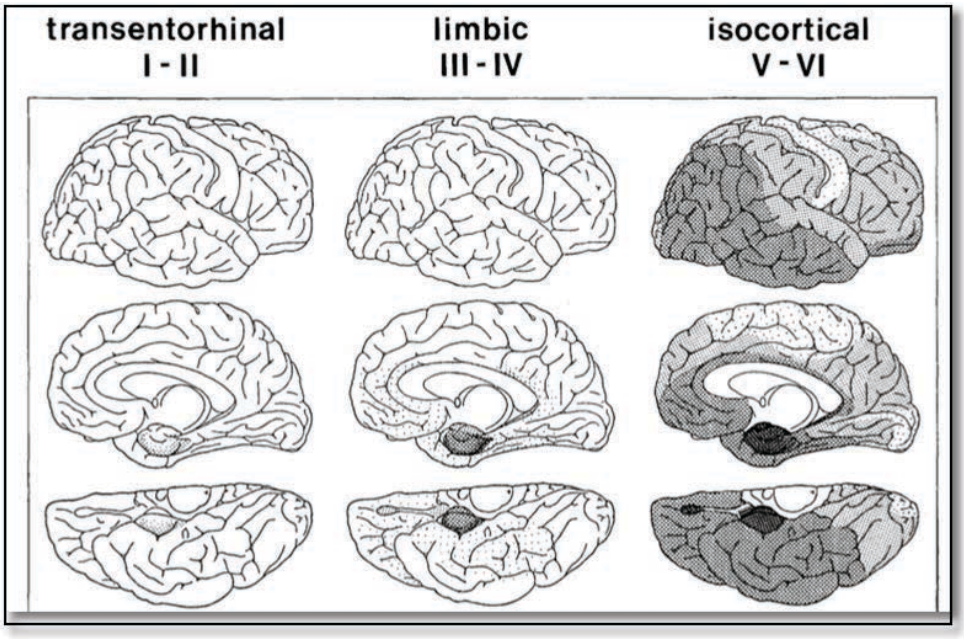


Figure 1. 2 : Séquence d'apparition des anomalies neurofibrillaires (DNF et fibrilles). VI stades sont distingués. Les stades I-II montrent des altérations virtuellement confinées à une seule couche de la région trans-entorhinale (transentorhinal I-II). La caractéristique principale des stades III-IV est l'implication sévère du cortex entorhinal et trans-entorhinal (limbic III-IV). Les stades V et VI sont marqués par une destruction isocorticale (isocortical V-VI). Les nuances de gris indiquent les niveaux de sévérités croissants. Traduit de Braak et al, 1991.

1.2.3 La Plaque amyloïde ou plaque sénile

1.2.3.1 Aspect et progression

Les dépôts de peptides amyloïdes sont des accumulations extracellulaires insolubles en solution aqueuse. On les classe dans plusieurs catégories qui se distinguent par des critères morphologiques : (1) les dépôts diffus, détectés par un immunomarquage anti-Aß et des techniques argentiques, d'aspect amorphe sans centre apparent de nature fibrillaire, et d'étendue importante (Figure 1.3a). Dans certaines régions cérébrales, les dépôts diffus sont si étendus qu'ils forment des zones jointives (ie. Lake-like, fleecy deposits) (Duyckaerts *et al.*, 2009). (2) les plaques séniles matures dites « classiques » prennent la forme d'un dépôt focal au cœur dense marqué à l'hématéine-éosine, certains anticorps spécifiques des formes fibrillaires et les colorants histologiques des composés amyloïdes (i.e. rouge Congo, thioflavines) (Figure 1.3b). Le cœur est parfois entouré d'un halo Aß positif plus faiblement marqué. Souvent les plaques classiques présentent également une couronne composée de neurites dystrophiques et de cellules microgliales qui entourent le cœur dense ; elles prennent alors le nom de « plaques neuritiques » (Figure 1.3c).

La formation des dépôts amyloïdes suit une topographie stéréotypée et hiérarchique, elle commence par des dépôts néocorticaux et apparaît, quand elle progresse, dans les régions qui reçoivent les projections des aires précédemment touchée (Thal *et al.*, 2002). On dit que la progression est centripète en raison d'une distribution d'abord pan-corticale (mais limitée au néocortex), avec une extension, dans les stades suivants, aux aires allo-corticales, puis au tronc et au cervelet (Figure 1.4).

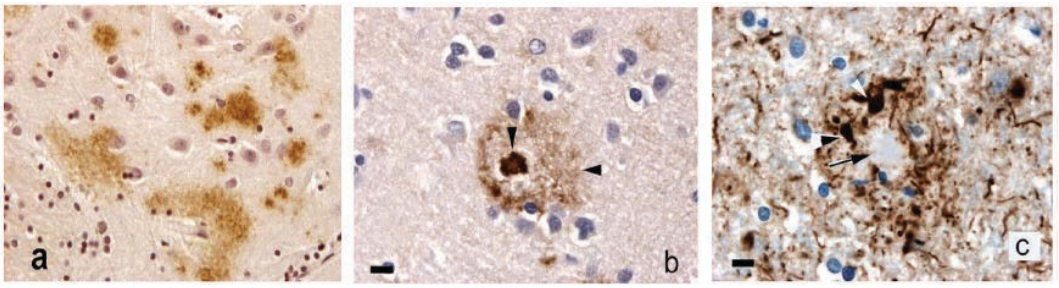


Figure 1. 3 : Morphologie des dépôts amyloïdes. (a) Dépôts diffus mis en évidence par un immunomarquage anti-Aß. (b) Dépôt focal entouré par une zone d'immunoréactive anti-Aß de plus faible intensité (têtes de flèches). (c) La couronne neuritique de la plaque classique contient des neurites tau-positives (têtes de flèches) contrairement au cœur (flèche entière) tel que révélé ici par un immunomarquage anti-tau (anticorps AT8, Innogenetics). Barre 10µm. Figure modifiée de Duyckaerts et al, 2009.

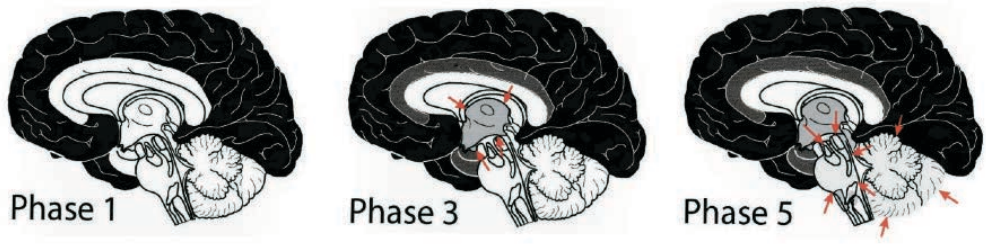


Figure 1. 4 : Phases de progression de l'amyloïdose cérébrale dans la MA. L'illustartion montre la progression depuis les aires néocorticales vers les régions allo-corticales. (Tiré de Thal et al, 2002).

Dans les aires qui au cours des premières phases de progression n'ont que peu ou pas du tout de plaques neuritiques ni de signes d'activation gliale (i.e. Thalamus, striatum, cerebellum), on ne trouve que des dépôts amyloïdes diffus, ce qui a permis de formuler l'hypothèse que les dépôts diffus sont un stade prématuré des plaques neuritiques, qui apparaissent dans une zone à dépôts diffus, par nucléation d'un cœur dense qui finit par induire la formation des neurites dystrophiques et l'activation gliale (Selkoe 2001). Enfin, les dépôts diffus ont été observés chez les personnes âgées sans plainte cognitive dans des aires qui chez les malades contiennent un mélange de plaques neuritiques et de dépôts diffus. Cela suggère que l'existence des dépôts diffus n'est peut-être pas un trait pathognomonique de la maladie.

Enfin, les dêpots amyloïdes sont fréquemment observés dans les démences à corps de Lewy et certaines démences vaculaires ce qui réduit la spécificité des biomarqueurs s'apuyant sur la détection des espèces amyloïdes.

1.2.3.2 Dépôts amyloïdes et APP

Les analyses de composition des lésions commencèrent dans les années 1980, à partir des DNF. L'identification du peptide Aß est due à Georges Glenner, à partir de purifications de dépôts purifiés de vaisseaux des méninges (Glenner and Wong 1984b). Il montra également que les dépôts méningo-vasculaires observé chez les individus DS contenaient le même peptide (Glenner and Wong 1984a). Plusieurs travaux ultérieurs démontrèrent que le composant principal des plaques séniles était similaire au peptide décrit par Glenner dans les dépôts extra-corticaux (Masters *et al.*, 1985; Roher *et al.*, 1986).

Très vite, on comprend que le peptide Aß dérive d'une glycoprotéine membranaire, produite par les neurones : le précurseur du peptide amyloïde (amyloid precursor protein, APP) (Kang *et al.*, 1987; Chartier-Harlin *et al.*, 1991).

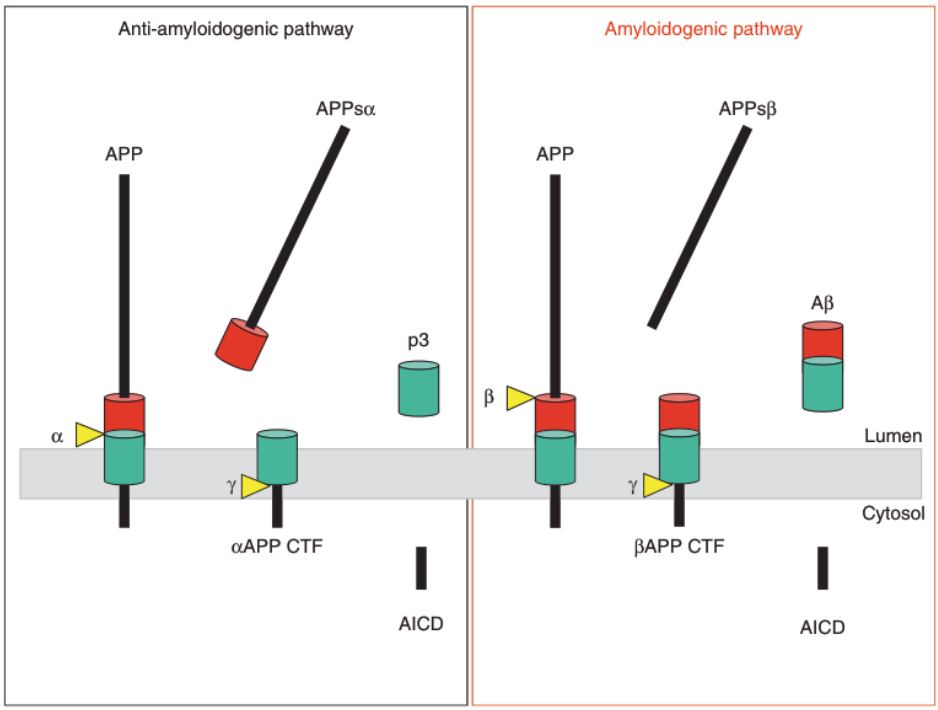


Figure 1. 5 : Voies protéolytiques de l'APP. Les séquences non-amyloïdogène (à gauche) et amyloïdogène (à droite) se distinguent par la libération de produits métaboliques différents. (Haass, 2012).

L'APP connaît des clivages successifs sous l'action d'enzymes appartement à la famille des sécrétases (Haass *et al.*, 2012) (Figure 1.5).

On distingue deux voies métaboliques de l'APP. La première dite amyloïdogène implique un clivage beta-sécrétase, par l'enzyme BACE1, et un clivage faisant intervenir le complexe de la gamma-sécrétase comprenant notamment les présenilines 1 et 2 (Masters & Selkoe 2012).

Dans la seconde voie, l'APP subit un premier clivage alpha-sécrétase juxta-membranaire, dans une portion de l'APP qui contient l'Aß, libérant un long fragment extracellulaire, APPs-alpha, aux propriétés neuroprotectrices et neurotrophiques (Stein *et al.*, 2004). Le clivage gamma-sécrétase intervient dans les deux voies.

Par ailleurs, le clivage gamma-secretase se produit à la membrane, et libère des fragments de longueurs variant de quelques acides aminés. Les deux espèces majoritairement produites sont l'Aß1-40 et l'Aß1-42.

Ce dernier comprend deux acides aminés hydrophobes de plus que l'Aß1-40 que qui explique peut-être sa plus forte tendance à l'auto-agrégation et à la précipitation (Duyckaerts *et al.*, 2009). C'est d'ailleurs le

peptide Aß1-42 qui est très majoritaire dans les dépôts diffus (les premiers à se former), alors que la forme courte de 40 aa est la plus produite. Les plaques de dépôts matures en revanche contiennent également l'Aß1-40 et ont des compositions de plus en plus hétérogènes quand évoluent les plaques (Delacourte *et al.*, 2002).

1.2.3.3 Clivage de l'APP et localisation subcellulaire de la production d'A-beta

Le peptide Aß des dépôts extracellulaires rencontrés dans la MA, est produit par clivage de son précurseur, l'APP, dans la membrane cellulaire des neurones. C'est une protéine transmembranaire comportant une longue queue amino-terminale extracellulaire, et une extrémité carboxy- terminale dans le cytosol (Figure 1.5). La portion de l'APP qui forme le peptide Aß débute dans la partie qui traverse la bicouche lipidique à une profondeur variable, et se termine dans la partie extracellulaire entre les acides aminés 670 et 671.

L'existence des deux voies de clivage amyloïdogène et non-amyloïdogène soulève une nouvelle question qui est celle de la régulation du clivage de l'APP par l'une ou l'autre de ces voies. En effet la compréhension des mécanismes qui influencent son métabolisme apporterait des connaissances précieuses dans la compréhension de la MA.

L'APP, bien qu'initialement adressé à la membrane par la voie sécrétoire, connaît en réalité un cheminement complexe entre sa production, et l'éventuelle production d'Aß. D'abord, on estime que seuls 10% de l'APP traduit parviennent à la membrane (Haass *et al.*, 2012).

Le clivage α-sécrétase, qui dans les neurones est assuré par ADAM10 (Kuhn *et al.*, 2010), se produit au niveau de la membrane plasmique. Il est ici important de noter que l'activité α-sécrétase est aussi exercée par plusieurs enzymes dans l'organisme, parmi lesquelles ADAM9, ADAM19 et ADAM17 (Hotoda *et al.*, 2002; Asai *et al.*, 2003). Ces trois séceretases sont expimées dans le cerveau adulte et furent proposée comme cible thérapeutique (Postina *et al.*, 2004).

L'APP porte dans sa partie C-terminale un motif 'YENPTY' qui signalise l'internalisation par endocytose. Si le clivage α-sécrétase n'intervient pas, l'APP membranaire est internalisé en quelques minutes (Lai *et al.*, 1995). De plus une partie au moins de l'APP internalisé est adressé aux endosomes tardif/Lysosomes (Haass *et al.*, 1992), la même étude met en évidence les produits de clivage de l'APP dans ces lysosomes.

La démonstration de l'origine endocytique de la production d'Aß a été apportée par le travail de Perez et al (1999) (Perez *et al.*, 1999).

La partie C-terminale de l'APP (région cytoplasmique) interagit avec plusieurs protéines cytosoliques adaptatrices telles que Mint1, Mint2, Mint3, et dont la surexpression reduit la production d'Aß suggérant le rôle potentiel de ces protéines dans la régulation des clivages pathogènes de l'APP (Miller *et al.*, 2006). En effet la souris déficiente pour Mint produit d'avantage d'Aß (Sano *et al.,* 2006). Un travail récent, a montré que la phospholrylation de Mint2 favorise l'internalisation de l'APP et l'accumulation d'Aß intracellulaire, alors que dans l'état non phosphorylé l'APP emprunte plutôt la voie endocytique avec recyclage et libération extracellulaire d'Aß42 (Chaufty *et al.,* 2012).

Le clivage ß-sécrétase est, lui, assuré par BACE1 (Vassar 1999). Un homologue de BACE1 a été identifié, BACE2 qui partage certaines propriétés de BACE1 notamment la capacité de cliver l'APP au niveau du site de la ß-secretase (Vassar 2004). Cependant BACE2 coupe l'APP avec d'avantage d'affinité dans un site de coupure proche de l'α-sécrétase (Farzan *et al.,* 2000). L'activité la plus efficace de BACE2 se fait à pH acide (pH 3.5). Un crible fonctionnel systématique en modèle in vitro, à la recherche d'enzymes capable de dégrader l'Aß a identifié BACE2 par sa forte capacité à couper l'Aß néo-synthétisé (Abdul-Hay *et al.,* 2012) un rôle opposé à son homologue BACE1. BACE1 est la seule enzyme à exercer l'activité ß-secretase dans les neurones, car les souris dans lesquelles le gène BACE1 est supprimé ne produisent plus du tout d'Aß, ce qui indique que la fonction ß-sécrétase de BACE2 n'est pas active en contexte physiologique (Luo *et al.,* 2003).

Les localisations subcellulaires dans lesquelles BACE1 a été mise en évidence sont assez nombreuses. Des études dans des cellules rénales (modèle de cellule polarisée) montrent un adressage à la membrane plasmique de BACE1, vers les deux faces, en revanche dans ce modèle, APP et ADAM10 sont adressées vers les membranes plasmiques baso-latérales (Haass *et al.,* 1994; Wild-Bode *et al.,* 2006; Haass *et al.,* 1995), il est donc possible qu'en conditions normales l'APP et BACE1 ne se rencontrent pas dans la membrane plasmique, dans les cellules polarisées.

En atteignant la membrane, BACE1 est enrichie dans les radeaux lipidiques, microdomaines membranaires dans lesquels se concentrent sphingolipides et cholestérol, et 'flottant' dans la membrane plasmique (Riddell *et al.,* 2001). L'activité ß-sécrétase a été associée aux rafts lipidiques (Ehehalt *et al.,* 2003), et les modèles in-vitro montrent une modulation de cette activité par l'environement lipidique de l'enzyme (Kalvodova *et al.,* 2005). L'APP possède un domaine de liaison au cholestérol (Beel *et al.,* 2008; 2010; Barrett *et al.,* 2012), ainsi l'enrichissement de BACE1 dans les rafts, pourrait favoriser la rencontre de l'enzyme avec son substrat.

Le pH optimal pour l'activité de BACE1 se situe aux alentours de 4.5 (Vassar 1999), ce qui démontre que la co-localisation d'APP et de BACE1 à la membrane n'est pas suffisante pour entrainer le clivage ß-secretase. On a d'ailleurs pu démontrer que le fragment ß-CTF de l'APP (résultant du clivage ß-

secretase) s'accumule dans les endosomes lorsque l'activité des enzymes catalytiques lysosomales est inhibée (Haass *et al.*, 1992). Il est donc très probable que le clivage ß-secretase ait lieu dans les endosomes, en revanche le rôle des voies endosomales dans la production des dépôts insolubles extra cellulaires est encore incertain.

D'autres travaux avaient démontré une activité ß-sécrétase dans les endosomes (Huse *et al.*, 2000). Il est par ailleurs possible que la localisation de BACE1 soit un phénomène régulé, comme le montre le travail de Walter (Walter *et al.*, 2001) qui rapporte une localisation aux endosomes précoces qui est perdue quand le résidu serine 498 est phosphorylé.

Les facteurs qui entrainent la rencontre de l'enzyme avec son substrat dans des conditions favorables au clivage, sont encore mal compris, mais on a pu montrer un effet de l'activité neuronale (Das *et al.*, 2013) et une influence du microenvironnement des cellules tel qu'un léger stress oxydant (Tan *et al.*, 2013) sur l'internalisation de l'APP dans des vésicules acides contenant BACE1.

1.2.4 Inflammation

D'autres effets toxiques indirects du métabolisme du précurseur amyloïde comprennent une activation microgliale, et une prolifération astrocytaire qui toutes deux, entrainent la libération de médiateurs circulants pro- ou anti-inflammatoires (Figure 1.6).

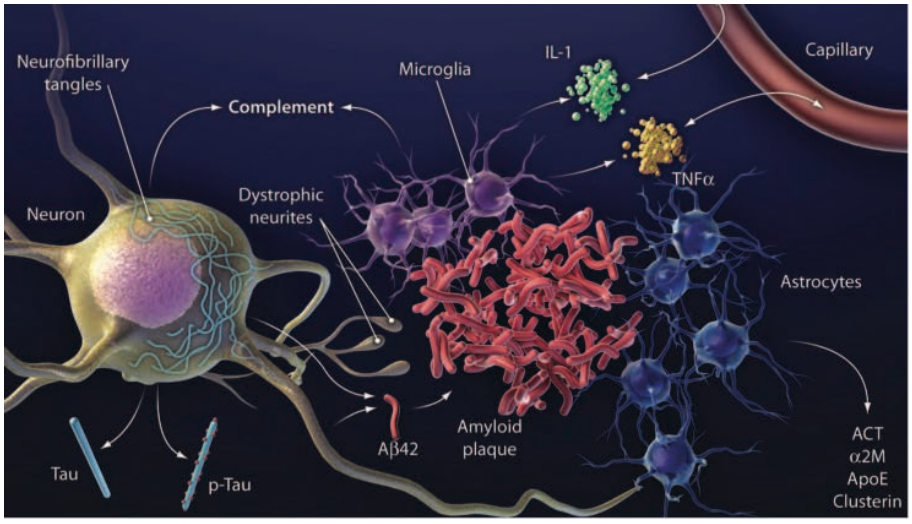


Figure 1. 6 : Représentation schématique des aspects de la physiopathologie, dans le microenvironnement des neurones, avec les possibles répercutions systémiques telles que la libération de médiateurs inflammatoires dans la circulation sanguine (d'après Holtzman *et al.*, , 2011).

La microglie, est en conditions normales, non activée. Dans un contexte activateur, elle connaît un stimulus primaire, qui entrainera une hyper sensibilité à d'éventuels stimuli secondaires. L'activation peut aussi avoir lieu dans le cadre de la perte de ligands neuronaux inhibiteurs de l'activation. L'accumulation de protéines de conformation anormale peut directement activer la microglie. Et l'exposition à certains médiateurs humoraux entraîne aussi sa prolifération (pour revue : (Perry and Holmes 2014)).

Dans la MA, l'activation microgliale est un phénomène connu (Heneka *et al.*, 2010; Heneka and O'Banion 2007). On a pu montrer que l'Aß fibrillaire peut activer la microglie (Jana *et al.*, 2008). Cette activation est modulée par l'ApoE (Barger and Harmon 1997).

Une fois activée la microglie produit plusieurs médiateurs pro-inflammatoires et des radicaux oxydants qui contribuent à la dérégulation neuronale. La glie activée recrute également les astrocytes qui accentuent le phénomène par la libération de médiateurs humoraux supplémentaires. Cette boucle pourrait jouer un rôle important dans l'évolution de la pathologie (Perry and Holmes 2014) .

Enfin le rôle de d'induction de la pathologie, ou de neuro-protection a été discuté; les deux états (pro-inflammatoire ou régulateur) étant rencontrés dans la MA (Nalivaeva *et al.*, 2012; Sudduth *et al.*, 2013).

1.2.5 Génétique de la maladie d'Alzheimer

Certains patients se distinguent par l'apparition d'une maladie à début précoce avec une héritabilité autosomique dominante. Ces formes familiales (familial Alzheimer's disease, FAD) peu fréquentes se distinguent des formes sporadiques et ont fait l'objet, dès les années 1980, de recherches de variants génétiques ségrégeant dans ces familles (Chartier-Harlin *et al.*, 1991) ; (Goate *et al.*, 1991) (Crawford *et al.*, 1991). Ces études ont montré de fortes liaisons génétiques dans plusieurs familles avec 3 gènes : le gène de l'APP sur le chromosome 21 (Goate *et al.*, 1991), le gène de la préséniline 1 (PS1) sur le chromosome 14 (Sherrington *et al.*, 1995), et le gène de la préséniline 2 (PS2) sur le chromosome 1 (Levy-Lahad *et al.*, 1995). Une étude génétique menée à partir des lames histologiques de Aloïs Alzheimer a d'ailleurs mis en évidence une mutation dans le gène de la PS1 chez la toute première patiente à début précoce décrite (Müller *et al.*, 2013).

L'étude fonctionnelle de ces trois gènes, pour lesquels on connaît au total plus de 200 mutations a mis en évidence leur rôle dans la surproduction d'Aß. Les mutations dans le gène de l'APP n'ont pas toutes le même effet, et l'augmentation des dépôts amyloïdes peut intervenir par plusieurs mécanismes tels qu'un

déséquilibre entre les voies amyloidogène et non-amyoidogène (par augmentation de l'activité ß-secretase) (Mullan *et al.,* 1992), la production de formes d'Aß plus hydrophobes ou plus prônes à l'agrégation (Suzuki *et al.,* 1994), ou encore par levée d'inhibition du clivage gamma-secretase (Tian *et al.,* 2010). Enfin, il existe aussi des duplications du locus du gène l'APP qui atteignent environ 10% des cas avec une maladie d'Alzheimer à transmission autosomique dominante (Rovelet-Lecrux *et al.,*2006 ; Wallon *et al.,* 2012).

La forme sporadique de MA (MAS), largement plus fréquente, présente les mêmes caractéristiques neuropathologiques, et cliniques que la MA Familiale, mais sans preuve manifeste de l'implication de l'un des gènes à transmission autosomique dominante décrits ci-dessus.

Le terme « early onset AD » (EOAD) désigne les cas de MA à début jeune génétique ou sporadique. Les EOAD représentent 7 à 8% des cas dont 13% seulement sont les formes familiales à transmission autosomique dominante (FEOAD pour « familial-EOAD») (Ertekin-Taner 2007).

D'autres gènes ont été associés à la MA. Un locus de risque a été identifié sur le chromosome 19, dans lequel est localisé le gène codant l'Apolipoprotéine-E. Le variant 'epsilon-4' de l'ApoE, (ApoE-e4) est associé à un risque accru d'avoir une MA. 10% des porteurs d'un allèle ApoE4 ayant atteint l'âge d 75 ans développeront une MA et 33% s'ils sont homozygotes ApoE4/E4 (Genin *et al.,* 2011) Dans la population générale caucasienne, la proportion de porteur hétérozygote ApoE4 est de 24 % et homozygote ApoE4/E4 de 2% (Bertram *et al.,* 2007; 2010)

L'ApoE a été détecté dans les plaques séniles (Namba *et al.,* 1991) est capable de se lier à l'Aß avec une forte affinité, et ses isoformes ont des effets contrastés sur la production et la clearance des dépôts amyloïdes, dans les modèles murins et cellulaires (Li *et al.,* 2012). Les variants de l'ApoE influencent également le risque d'hémorragie cérébrale (Biffi *et al.,* 2010). Les implications de l'ApoE dans la MA sont nombreuses y compris dans la maladie de Parkinson et le risque d'accidents vasculaires cérebraux (Kim *et al.,* 2009).

D'autres facteurs génétiques qui pourraient intervenir dans la MA. L'existence d'une cause génétique non encore identifiée, sous-tendant l'apparition des formes « non familiales » de la MA avait déjà été supposée par Selkoe et ses collaborateurs (Selkoe 2001). Et 5 ans plus tard, une étude scandinave sur des paires de jumeaux estime à 79% la part de facteurs génétiques dans l'apparition d'une MA sporadique (Gatz *et al.,* 2006).

Les données issues des dernières études génétiques d'association (genome-wide association studies, GWAS) ont permis d'identifier plusieurs gènes dans lesquels les variations sont associées à une MA sporadique à début tardif (Lambert *et al.,* 2013 ; 2009; Harold *et al.,* 2009). Toutes les GWAS ont

identifié l'ApoE, et confirment son rôle de facteur de risque principal (35%), et identifient d'autres gènes aux pénétrances variables d'une étude à l'autre. Parmi les gènes fréquemment associés à la MAS figurent PICALM (9%), CLU(9%), et CR1 (4%) (Ertekin-Taner 2010). Il est intéressant de noter que les gènes de l'APP et des préséniliines n'ont pas été associés à la maladie dans ces études.

PICALM (Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein) est impliquée dans l'endocytose clathrine-dépendante, dans tous les types cellulaires (Tebar *et al.,* 1999). PICALM et son homologue neuronal (AP180) jouent un rôle important à la synapse (Dittman and Ryan 2009). Elle est impliquée dans la toxicité cellulaire de l'Aß, chez la levure (D'Angelo *et al.,* 2013). AP180 est impliquée dans le maintien d'une taille homogène des vésicules d'endocytose (McMahon 1999).

CLU est un gène codant la clusterine, elle porte beaucoup d'autres noms, notamment ApoJ en raison de ses propriétés apolipoprotéine-like, ou CLI (Jones and Jomary 2002). Sa possible implication dans la MA a été proposée dès la fin des années 1990 (Choi-Miura and Oda 1996). Enfin CLU est aussi impliqué dans l'endocytose d'Aß par la microglie (Nuutinen *et al.,* 2009).

CR1 est un récepteur pour les protéines du complément, il lie C3b et C4b ; il est exprimé par la plupart des cellules sanguines et par la microglie. Il pourrait activer la phagocytose d'Aß par ces dernières (Perry and Holmes 2014).

Les gènes mis en évidence dans d'autres travaux (Hollingworth *et al.,* 2011) comprennent notamment CD33, le marqueur des cellules de la lignée myéloïde (monocytes, macrophages, microglie) ; MS4A6–MS4A4 homologue au cluster de différenciation CD20 des lymphocytes-B ; ABCA7 qui est impliqué dans la phagocytose par les macrophages ; CD2AP qui est impliqué dans la formation de la synapse immunologique et EPHA1 qui est exprimé par les lymphocytes-T CD4+ (Perry and Holmes 2014).

L'effet de ces facteurs de risque est individuellement, très modeste, et chacun n'a qu'une contribution limitée à la dérégulation observée chez le malade.

Il est d'ailleurs probable qu'à l'inverse des facteurs de risque, existent également des facteurs compensatoires et neuroprotecteurs, tels que le suggèrent des GWAS sur la population saine âgée (Deelen *et al.,* 2013).

Ensemble ces résultats montrent clairement l'origine multifactorielle de la MA, par l'influence de facteurs environnementaux et de gènes impliqués dans des voies physiologiques diverses, comprenant la synthèse de l'APP et ses mécanismes de transport intracellulaires, puis extracellulaires, par export vers le sang et le liquide céphalo-rachidien ou par ré-internalisation phagocytaire et dégradation. Ces voies étant elles-mêmes, influencées par l'homéostasie lipidique et le contexte inflammatoire.

1.2.6 Paradigme physiopathologique

La pathologie amyloïde et la pathologie tau suivent chacune une évolution spécifique, comme en témoignent les séquences de progression topographique des deux types de lésions (Braak and Braak 1991; Thal *et al.*, 2002) qui contrastent à la fois par leur région d'origine, leur étendue au départ, et probablement aussi par leur rythme d'évolution.

L'ordre d'apparition des lésions est encore débattu. On observe des DNF dans les stades précliniques de la MA ; à l'inverse les dépôts diffus sont aussi fréquemment rencontrés chez les individus sains rendant l'identification du primum movens et de l'évolution des lésions complexe sur la seule base des observations neuropathologiques.

L'identification de mutations responsables de la formation chez les FAD de dépôts amyloïdes plus abondants ou plus précoces a conduit à une meilleure compréhension de la physiopathologie de la maladie (Haass *et al.*, 2012) et a amené à la formulation de l'hypothèse de la cascade amyloïde (Selkoe 1991; Hardy and Allsop 1991).

L'origine de la pathologie observée se situant dans un déséquilibre du métabolisme de l'APP qui entraîne en cascade : l'augmentation du rapport Aß42/Aß40, la formation de dépôts insolubles d'Aß extracellulaires, et par effet toxique la dérégulation du fonctionnement neuronal conduisant à la phosphorylation excessive de tau qui se dissocie des microtubules entrainant la désorganisation du cytosquelette, aboutissant à la perte synaptique et à la mort neuronale dont découlent les signes cliniques.

En effet l'existence d'une mutation dans l'un des 3 gènes (APP, PS1, PS2) ou la triplication du gène de l'APP, provoquent une forme agressive de la maladie, avec un début parfois avant 40 ans (Selkoe 2011). Ces patients présentent à la fois des dépôts amyloïdes et des DNF. En revanche les mutations dans le gène de la protéine tau n'entrainent pas obligatoirement la formation de plaques, et sont d'avantage associées à la démence fronto-temporale (FTD) (Dumanchin *et al.*, 1998). De plus les modèles murins sur-exprimant le gène de la protéine tau ne produisent jamais de plaques (Duyckaerts *et al.*, 2007). Alors que les animaux sur-exprimant le gène de l'APP humain, ont des niveaux d'Aß augmentés, et montrent des troubles comportementaux associés à une possible perte de mémoire.

Plusieurs observations semblent en outre indiquer que la toxicité des espèces amyloïdes serait médiée par les formes semi-agrégées de peptides Aß. Ces formes, dites oligomériques, comprennent entre 2 et 16 monomères du peptide (Selkoe 2001; 2008). Chez le rat, l'injection intracérébrale d'oligomères solubilisés d'un cerveau Alzheimer, entrainent une toxicité synaptique ; en revanche les dépôts insolubles du même cerveau ne produisent pas d'effet (Masters and Selkoe 2012). Chez la souris exprimant l'APP humaine on observe une diminution de la densité synaptique avant la formation de dépôts focaux, mais en présence de concentrations élevées d'Aß42 (Lanz *et al.,* 2003). Cela semble indiquer un rôle délétère de l'Aß soluble même en l'absence de plaques. Un travail récent rapporte une augmentation de la densité synaptique dans la souris APP jeune, avant l'augmentation de la concentration d'Aß (Lee *et al.,* 2010) ce qui d'une part confirme le rôle délétère des peptides Aß et suggère un potentiel rôle trophique de l'APP.

Même si le lien entre l'existence d'une mutation dans le gène de l'APP et l'apparition de lésions et de déficits cognitifs est établi, la relation avec la pathologie tau n'est pas encore bien comprise.

Certains travaux rapportent une activation de certaines kinases sous l'effet d'une exposition à l'Aß, comme la GSK3ß qui est capable de phosphoryler tau et constituerait un lien potentiel entre la pathologie amyloïde et les DNF (Hooper *et al.*, 2008).

1.3 Le diagnostic de la maladie d'Alzheimer

1.3.1 Evolution des critères de diagnostic

Sans confirmation histologique de la présence des lésions spécifiques de la maladie, les critères de diagnostic, accessibles au clinicien, reposait principalement sur une description du syndrome clinique. Le NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communication Disorders and Stroke - Alzheimer Disease and Related Disorders Association) (McKhann *et al.,* 1984) définit la maladie par l'existence d'un syndrome démentiel caractérisé par un déficit mnésique obligatoirement associé à un autre trouble cognitif avec une répercussion sur les activités quotidiennes.

Plus récemment, en intégrant les nouveaux outils de diagnostic disponibles, ont été proposés de nouveaux critères de définition de la MA applicables à des stades moins avancés de la maladie, avec une atteinte cognitive légère n'affectant pas encore l'autonomie (Dubois *et al.,* 2007; McKhann *et al.,* 2011). L'évolution des critères de diagnostic clinique est également accompagnée d'une redéfinition des critères neuropathologiques de définition de la MA (Hyman *et al.,* 2012). Les révisions dans les deux domaines ont toutes deux pour but de prendre en compte les formes modérées de la pathologie et les stades dits précliniques, dans lesquels l'atteinte de la mémoire n'a pas encore de répercussion sur l'autonomie.

En effet les études neuropathologiques sur des populations âgées, ou les corrélations clinico-pathologiques sur des cohortes cliniques mentionnent fréquemment l'existence de personnes sans déficit objectif de la mémoire ou même indemne de trouble mnésique qui présentent à l'examen histopathologique des lésions qualitativement similaires à celles des personnes avec une MA modérée (Price *et al.,* 2009; Bennett *et al.,* 2009).

Les nouveaux critères diagnostiques introduisent la notion de trouble cognitif léger dû à une maladie d'Alzheimer (mild cognitive impairement, MCI) pour qualifier les patients chez lesquels un trouble débutant mais pas assez sévère pour établir un diagnostic certain, est associé à un marqueur biologique de maladie d'Alzheimer (Albert *et al.,* 2011), les lésions pathologiques affectant le parenchyme cérébral étant à ce stade déjà similaires bien que moins abondantes que celles d'une MA certaine (Vahram Haroutunian 2009).

Le MCI est d'abord un stade clinique et il peut être dû à plusieurs processus pathologiques différents, c'est uniquement la confirmation par un marqueur biologique qui permet de définir la probabilité qu'il soit dû à une MA.

L'enjeu principal du diagnostic de la MA se situe dans la recherche du changement pathologique le plus précoce qui permette de définir une MA avec une bonne spécificité et sensibilité. En effet, les essais thérapeutiques actuels (i.e. immunothérapie, inhibiteurs de sécrétases) ciblent des voies métaboliques caractéristiques de la maladie et nécessitent une définition sensible et spécifique des participants (Figure 1.7).

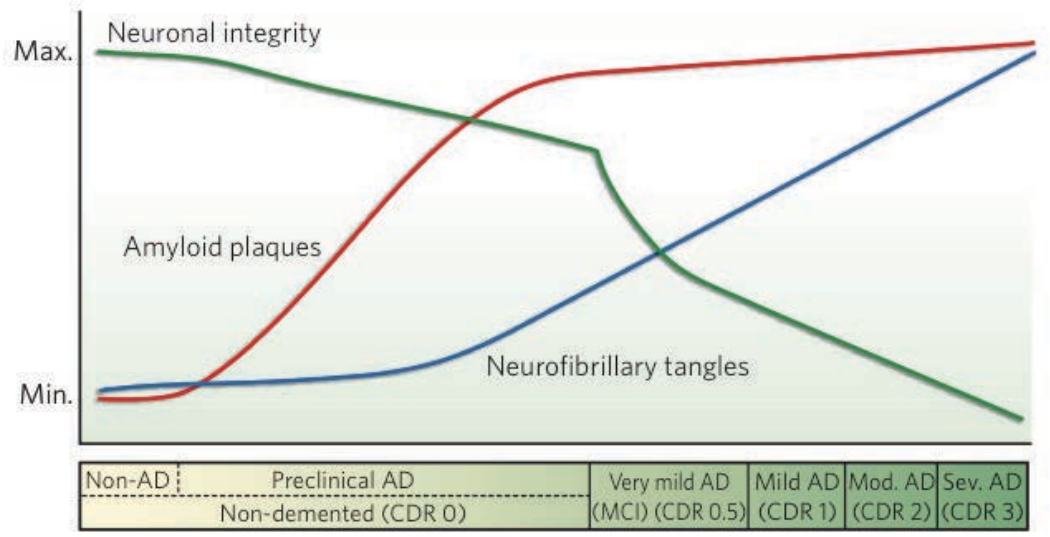


Figure 1. 7 : Evolution temporelle des lésions neuropathologiques et de la dégénérescence neuronale en association avec les phases cliniques de la MA. L'accumulation des lésions dans le parenchyme cérébral précède de plusieurs années l'apparition des troubles cliniques (Perrin *et al.*, 2009).

1.3.2 Les formes atypiques de la maladie d'Alzheimer

Il existe quelques formes atypiques de la maladie d'Alzheimer, qui d'un point de vue pathologique présentent les lésions évocatrices d'une MA, mais dont la distribution ne respecte pas la séquence stéréotypée de Braak et collaborateurs (1991), l'histoire clinique également, ne connaît pas l'évolution habituelle de la MA (Hyman *et al.*, 2012).

Ces formes se manifestent par une atteinte focale du cortex, et un respect relatif de la mémoire épisodique, qui lorsqu'elle est atteinte, ne l'est que secondairement. Ainsi selon les critères de diagnostic actuels, les formes sans atteinte de la mémoire n'entrent pas dans le cadre de la définition de la MA. Les formes atypiques de MA comprennent certaines formes d'aphasies primaires progressives (APP'), l'atrophie corticale postérieures (ACP), et les variantes frontales de la MA (Warren *et al.,* 2012).

L'ACP se caractérise par un syndrome clinique décrit par Benson et collaborateurs (1988) comportant des troubles visuo-spatiaux, une acalculie, mais une mémoire relativement préservée (Benson *et al.,* 1988; Alladi *et al.,* 2007). Dans 60 à 100% des cas, les études anatomopathologiques des patients concluent à une pathologie de type MA (Alladi *et al.,* 2007; Hof *et al.,* 1997; Tang-Wai *et al.,* 2004). L'imagerie structurelle (IRM) et fonctionnelle (SPECT ou TEP-FDG) montrent une atteinte des régions occipito-temporales.

L'APP' se caractérise par un trouble initial et progressif du langage. Plusieurs types cliniques d'APP sont connus. La forme la plus fréquemment due à une maladie d'Alzheimer confirmée par la neuropathologie est la forme dite logopénique. Le langage est essentiellement marqué par un manque de mot, des paraphasies et des troubles de la répétition. L'imagerie montre une atteinte prédominant dans les régions périsylviennes gauches ou temporo-pariétale gauche.

Les variantes frontales de MA se présentent par une syndrome dysexécutif majeur et des troubles comportementaux, alors que les troubles de la mémoire épisodiques peuvent être au second plan.

Les études neuropathologiques suggèrent que ces différentes formes cliniques de la MA sont associées à un motif de distribution corticale des DNF, différent de celui de la MA typique, avec une relative préservation des structures limbiques (Murray *et al.,* 2011; Whitwell *et al.,* 2012).

La suite de ce chapitre décrit les outils diagnostiques disponible aujourd'hui en les classant dans deux catégories telles que définies dans (Dubois *et al.,* 2010) : (1) les marqueurs topographiques, qui donnent des indications sur l'aire cérébrale affectée, et s'intéressent donc à la description clinique et (2) les marqueurs physiopathologiques qui rendent compte de l'existence des lésions cérébrales, et renseignent sur la dérégulation physiologique qui affecte les malades.

1.3.3 Marqueurs de la maladie d'Alzheimer

1.3.3.1 Marqueurs topographiques

1.3.3.1.1 Neuropsychologie – le syndrome amnésique de type hippocampique

Le symptôme majeur qui initie le début de la phase clinique, et les premières plaintes cognitives est le trouble de la mémoire épisodique antérograde, c'est à dire liée au souvenir des évènements récents. La mémoire épisodique est directement affectée par l'atteinte des structures temporales internes, qui sont impliquées dans la mémoire à long terme (Squire 1986).

Le processus de mémorisation peut être schématisé en trois étapes : la première constituant l'acquisition de l'information, c'est l'encodage. Il est dépendant de l'attention, et de l'accès au registre sémantique de l'individu, c'est à dire de sa capacité à reconnaître un terme, ou une forme et de lui associer une signification. La seconde étape est le stockage, ou consolidation mnésique, où se constitue la trace mnésique durable. La dernière étape est la récupération, qui constitue le rappel de l'information en vue de son utilisation. Cette étape met en jeu des stratégies de récupération impliquant les fonctions exécutives (frontales).

Un test neuropsychologique qui permet de distinguer les étapes de la mémorisation est le test de rappel libre et indicé à 16 items (RL / RI 16) (Van der Linden, 2004). Ce test permet d'identifier un syndrome amnésique de type hippocampique défini par un rappel spontané déficitaire et un rappel indicé déficitaire (efficacité de l'indicage sémantique < 71%). La valeur pronostique du test a été démontrée dans une étude multicentrique, avec un suivi longitudinal de 223 sujets avec un MCI suivis pendant 3 ans (Sarazin *et al.*, 2007). Dans ce travail, la sensibilité et la spécificité du test pour détecter une évolution vers une MA était d'environ 80%. Dans une population de malades MA, les scores aux tests étaient corrélés à la sévérité de l'atrophie des région temporale médiane gauche, de l'hippocampe gauche et des régions CA1 intra-hippocampique, dont on sait leur rôle dans les processus de consolidation mnésique (Sarazin *et al.*, 2010).

1.3.3.1.2 Evolution et troubles associés

Bien que la progression des lésions des tissus cérébraux soit stéréotypée, l'évolution de la MA est assez polymorphe dans le type d'atteinte cognitive dont souffre le patient et dans l'ordre et l'intensité avec laquelle elles se manifestent.

Les troubles du langage sont les plus fréquents après les troubles mnésiques. Ils se manifestent par un manque du mot, et une diminution de la fluence verbale (liste de mots énoncés en un temps limité), et s'accompagnent progressivement de difficultés de compréhension, jusqu'à une aphasie globale sévère. L'aphasie est le plus souvent associée à une apraxie gestuelle et à des troubles visuo-constructifs, signant une extension des lésions aux régions corticales pariétales. Fréquemment sont aussi observées des atteintes des fonctions exécutives avec une difficulté dans la pensée abstraite, le jugement et la planification, signant une extension des lésions aux lobes frontaux.

En plus des atteintes cognitives, les patients souffrent souvent d'une apathie, de dépression et d'anxiété (Hodges 2006). D'autres troubles tels que des hallucinations visuelles, des troubles du sommeil, ou une désinhibition, peuvent se manifester quand progresse la maladie (Hodges 2006).

1.3.3.1.3 IRM structurelle

L'imagerie par résonnance magnétique (IRM) revêt un double intérêt : celui d'écarter d'autres causes éventuelles d'atteinte cognitive pouvant interférer avec l'interprétation des données cliniques comme la présence d'un processus expansif, ou d'une atteinte vasculaire.

En plus du diagnostic différentiel, l'évolution des techniques de neuroimagerie a permis le développement et la généralisation de l'IRM en tant qu'outil indispensable de l'exploration diagnostique d'un patient.

Elle permet d'apprécier l'importance de l'atrophie cérébrale qui accompagne l'évolution des maladies neurodégénératives, et permet notamment une quantification du volume des hippocampes (Lehéricy *et al.*, 2006). En effet le volume des structures temporales internes est réduit en comparaison des témoins âgés. Jack et collaborateurs, montrent dans une étude comparant les stades de Braak au volume hippocampique avant le décès (Jack *et al.*, 2002), que l'atrophie de l'hippocampe suit la pathologie tau dans le cortex entorhinal et propose le volume de l'hippocampe comme l'un des marqueurs de neuro-dégénérescence. Dans une étude récente (Jack *et al.*, 2014), le même auteur montre que la diminution du volume de l'hippocampe sur un an n'est en revanche pas corrélée avec la charge amyloïde au départ.

D'autres méthodes permettent des mesures de l'atrophie corticale dans l'ensemble du cerveau, sans à priori régionale. Parmi ces méthodes, on trouve la Voxel Based Morphometry (VBM), la mesure de l'épaisseur du ruban cortical (Querbes, et al 2009) et l'étude de la morphologie des sillons corticaux. Cette dernière technique, associée à la mesure du volume hippocampique, permettrait d'améliorer la classification diagnostique des patients MA versus contrôles dès le stade de MCI (Communication personnelle, Hamelin et collègues, Abstract for Annual Meeting 2014 American Academy of Neurology, manuscrit en préparation)

1.3.3.1.4 Imagerie fonctionnelle – TEP-FDG et SPECT

Les deux modalités d'imagerie isotopique couramment utilisées dans la MA sont la scintigraphie de perfusion (single-photon-emitting computed tomography, SPECT), et la tomographie par émission de positrons (TEP).

Les deux méthodes reposent sur l'injection préalable d'un composé de synthèse couplé à un isotope radioactif. Dans la scintigraphie SPECT appliquée à la MA, on mesure l'afflux sanguin dans les différentes régions cérébrales dans le voisinage des neurones dont l'activité est élevée (Gsell *et al.,* 2000).

Dans la MA, l'hypoperfusion des régions temporo-pariétales et temporales médiales associée à une activité préservée dans le reste du cerveau est un bon critère de diagnostic. Une étude longitudinale sur 83 patients avec une légère plainte cognitive (Habert *et al.,* 2011) montre qu'une hypoperfusion pariétale droite, et hippocampique est associée à un risque de conversion vers un stade démentiel à 3ans.

La TEP au fluoro-desoxyglucose (FDG), mesure la consommation de glucose par les astrocytes et repose sur les besoins métaboliques des neurones dans les régions à activité plus importante. Dans le TEP, la caméra ne mesure pas un photon gamma issu de la désintégration de l'isotope radioactif, mais deux photons gamma diamétralement opposés et d'énergie équivalente (500 KeV) émis lors de la réaction d'annihilation qui résulte de la rencontre entre un positron, (émis par la désintégration du fluor-18) et un électron rencontré sur son chemin (1 à 3 mm). La connaissance de l'atténuation des tissus, mesurée préalablement, permet une reconstruction efficace de la localisation de la désintégration et autorise par ailleurs une approche quantitative qui n'est pas permise par le SPECT. La résolution dépend de la caméra utilisée et peut aller jusqu'à 2.5 mm.

L'hypométabolisme glucidique affecte les aires corticales associatives primaires (Chételat *et al.,* 2008) et permet la discrimination des patients MA relativement aux témoins, et distingue les MCI à risque de conversion vers une MA (Mosconi *et al.,* 2004).

En conclusion, l'utilisation des marqueurs topographiques permet une description précise des signes qui accompagnent la MA, l'imagerie fonctionnelle apporte également une indication sur les modifications métaboliques associées au déclin cognitif et pourraient donner des indices précoces de neuro-dégénérescence dans des régions encore épargnées par la mort neuronale (Noble and Scarmeas 2009).

1.3.3.2 Marqueurs Physiopathologiques

Les deux types de marqueurs physiopathologiques de la MA utilisés par le clinicien sont les dosages des peptides Aß, de la protéine tau, et de la protéine tau phosphorylée dans le liquide céphalo-rachidien (LCR), et l'imagerie isotopique par TEP des dépôts amyloïdes cérébraux.

1.3.3.2.1 Le LCR

En pratique clinique le recours au LCR a encore souvent lieu quand le tableau clinique présente des atypies (Troussière *et al.*, 2014).

Pourtant le diagnostic basé sur les seuls critères cliniques peut entraîner un taux important de faux-diagnostics, en particulier quand les signes sont encore discrets (Blennow *et al.*, 2014).

Les marqueurs du LCR couramment utilisés sont les peptides Aß42 ou Aß40, la protéine tau, et les formes phosphorylées de la protéine tau dont on a pu montrer que les résidus phosphorylables sont nombreux et les résidus, ou la combinaison de résidus phosphorylés est parfois spécifiques d'une pathologie (Buée *et al.*, 2000). Ainsi le dosage des protéines tau phosphorylées sur certains résidus, en particulier la thréonine 181 et 231, s'avère utile au diagnostic différentiel à partir du LCR (Hampel *et al.*, 2004).

Les travaux avec confirmation neuropathologique montrent une bonne corrélation entre les dosages de protéine tau et le compte des DNF d'une part, et une corrélation négative entre les dosages d'Aß42 avec la charge amyloïde d'autre part (Tapiola *et al.*, 2009).

Le meilleur prédicteur de MA débutante, ou de risque de conversion vers un MCI est une combinaison de plusieurs dosages (Fagan *et al.*, 2007; Stomrud *et al.*, 2010; Gasparini Berenguer *et al.*, 2014). La sensibilité/spécificité comprise entre 80 et 90 % pour les marqueurs isolés (Blennow *et al.*, 2010), est améliorée quand ils sont combinés (Hampel *et al.*, 2013; Blennow *et al.*, 2014; Lista *et al.*, 2014).

D'autres approches visent le dosage systématique des analytes du LCR pour tenter d'identifier une signature métabolique de la MA (Czech *et al.*, 2012; Wildsmith *et al.*, 2014; Britschgi *et al.*, 2011). Un travail notamment rapporte un dosage des protéines associées au système endo-lysosomal dans le LCR

(Armstrong *et al.*, 2014). Il est très probable que de nouveaux marqueurs soient petit à petit identifiés et viennent compléter les outils cliniques actuels de diagnostic, mais à ce jour, aucun marqueur autre que les protéines directement associées aux lésions pathologiques n'a été utilisé hors du contexte pré-clinique et exploratoire.

1.3.3.2.2 L'imagerie des dépôts amyloïdes cérébraux: Le PIB

Le développement des ligands compatibles avec une visualisation in vivo des dépôts amyloïdes du parenchyme cérébral a été une avancée majeure dans la compréhension de la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer.

Dérivé de la thioflavine-T, qui figure parmi les colorants histologiques fluorescents utilisés pour marquer les dépôts de peptide Aß cérébraux denses et insolubles accumulés en dépôts fibrillaires et les DNF, Le [N-methyl-11C]-2-(4'-methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole, plus connu sous le nom de Pittsburgh Compound B (PIB), marque uniquement les dépôts amyloïdes matures et ne marque pas les DNF.

La première utilisation du PIB chez l'humain, est le fait de Klunk et collaborateurs (Klunk *et al.*, 2004), sur un groupe de patients MA, et un groupe de témoins dont 3 jeunes. Il vérifie ainsi l'existence d'un marquage amyloïde dans la MA, et démontre qu'il n'existe pas de différence entre les témoins jeunes et âgés.

Les études neuropathologiques ont montré que la fixation du ligand est fortement corrélée à la quantité de plaques amyloïdes, mais aussi au dépôt amyloïdes fibrillaires diffus et à l'angiopathie cérébrale amyloïde, sans fixation des DNF. Une étude récente suggère que le ligand PIB marque plus les dépôts diffus d'Ab que les plaques neuritiques. La mesure de rétention du PIB est également corrélée avec le dosage du peptide amyloïde dans le LCR (Ikonomovic *et al.*, 2008; Sojkova *et al.*, 2011; Lockhart *et al.*, 2007). Une étude plus récente (Driscoll *et al.*, 2012) évalue la corrélation du marquage PIB in vivo avec une quantification régionale des dépôts d'Aß dense (6E10 positifs) et des DNF (Anticorps PHF1). La comparaison porte sur les régions les plus fréquemment mentionnées dans les études au [11C]-PIB (cortex cingulaire antérieur, médian et postérieur, et precuneus), validant la bonne congruence entre le PIB dans les régions d'intérêt et les marquages immuno-histochimiques post mortem. Les méthodes de quantification reposent sur le fait que la fixation dans les régions non impliquées dans les premières phases de la progression des plaques (i.e. pons, cerebellum, substance blanche), sont identiques entre les MA et les témoins, et comptent pour de la fixation non spécifique du ligand (Lopresti *et al.*, 2005). Le Marquage du [11C]-PIB cortical de chaque voxel est donc normalisé par la moyenne du marquage dans la substance grise du cervelet. Un marquage cortical supérieur à 1.4 fois la valeur du cervelet est considéré comme pathologique.

Le marquage [11C]-PIB est considéré comme stable au cours du temps, avec une charge amyloide corticale globale qui évolue très peu entre les stades précoces et les stades avancés atteignant une phase plateau avant les premiers signes cliniques tel que suggéré par la première étude longitudinale sur une cohorte clinique (Engler *et al.,* 2006) (en fait, les mêmes 16 patients de l'étude séminale de Klunk, 2004) discutée dans (Klunk *et al.,* 2006) qui propose que la progression des plaques dans la phase pré-symptomatique, puisse suivant les sujets être plus ou moins rapide et suggère qu'un suivi suffisamment long des témoins PIB-positifs verrait un taux de conversion vers une MA de 100% (Figure 1.8).

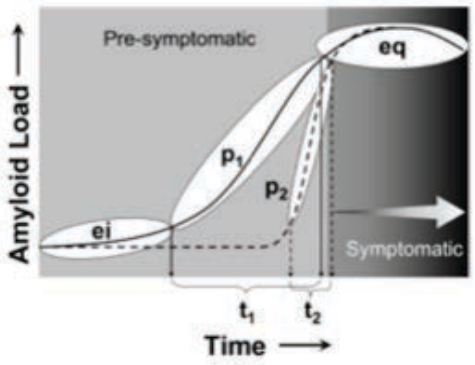


Figure 1. 8 : Phases théoriques de progression des marquages PIB proposée par Klunk (2006). ei : initiation p1 et P2 sont des progressions de vitesse différente s'étalant sur des périodes t1 ou t2, avant d'atteindre un équilibre (eq) dans la phase symptomatique de la MA.

Ainsi un marquage amyloïde positif permet d'identifier dès le stade de MCI les patients avec une MA débutante (Kemppainen *et al.,* 2007; Koivunen *et al.,* 2008) et les témoins à risque (Morris *et al.,* 2009). La question d'une évolution des marquages PIB au cours de la maladie est encore débattue, une étude récente et remarquable pour la durée de suivi (Kemppainen *et al.,* 2014) rapporte une augmentation significative sur 5ans chez 8 sujets MCI, y compris chez deux sujets PIB-négatifs au début du suivi ; malheureusement le petit nombre de sujets ne permet pas de conclusion définitive.

Dans les groupes contrôles, certains témoins âgés avec un marquage significativement pathologique sont systématiquement décrits dans les études de marquage amyloïde. Le pourcentage de témoins PIB positifs varie entre 21 et 30% (Aizenstein *et al.,* 2008; Jack *et al.,* 2008; Pike *et al.,* 2007). Dans une étude de suivi sur une population plus importante (32 MA, 49 MCI et 103 témoins) Villain et collaborateurs (2012), réalisent deux PET-PIB à 18 mois d'intervalle et implémentent une carte du « taux de changement » dans les valeurs observées, et met en évidence une augmentation du marquage PIB au cours du temps, même chez des individus qui demeurent en dessous du seuil de positivité après 18 mois

(Villain *et al.*, 2012). Il propose une distinction entre les individus non-accumulateurs et accumulateurs, ces derniers comptant pour 20% des cas dans la population PIB-négative.

Dans l'ensemble les données disponibles sur le marquage cérébral des dépôts amyloïdes par le [11C]-PIB indiquent une forte congruence avec les marquages immuno-histochimiques sur les cerveaux post-mortem, et les individus avec une MA au sens clinique sans marquage PIB pathologique sont peu fréquents et pourraient être en fait, affectés par une autre maladie neurodégénérative (i.e. sclérose hippocampique). Le PIB permet de distinguer chez le MCI les individus à risque de convertir à une MA avec 96% de spécificité. L'intensité du marquage augmente vite dans la phase préclinique puis lentement après l'apparition des premiers symptômes. Les individus sains PIB-positifs pourraient être des formes pré-symptomatiques voir asymptomatiques de MA, mais les données de suivi longitudinal de tels patients, sur des périodes suffisamment longues pour correspondre à la durée théorique de la phase préclinique (estimée en décennies), manquent encore pour répondre à cette question.

Ainsi l'imagerie isotopique des dépôts amyloïdes suggère une certaine colinéarité entre la rétention du ligand PIB et l'existence d'une accumulation de dépôts insolubles de peptides Aß qui signe l'initiation des processus physiopathologiques de la MA, débutant par un déséquilibre dans le métabolisme de l'APP, la formation des plaques amyloïdes et culminant dans l'extension corticale des DNF, et l'effondrement des fonctions cognitives.

Il est cependant interessant de noter l'absence de congrence entre l'apparition de dépôts amyloïdes reconnus par les ligands utilisés en imagerie isotopique (PiB, Florbetapir) avec les présentations cliniques des mêmes patients. A ce titre de nouveaux marqueurs capables de lier la protéine *Tau* dans ses conformations pathologiques pourraient apporter une contribution considérable dans la compréhension de la cascade pathologique de la MA (et des autres maladies implicant la protéine Tau). Plusieurs travaux proposent des ligands avec une bonne spécificité pour les DNF (Fodero-Tavoletti, 2011). En particulier, Okamura et collègues (2014), réalisent la première étude chez l'humain avec le [18F]-THK5105 qui s'avère très prometteur.

1.3.4 Biomarqueurs sanguins

1.3.4.1 Pourquoi un marqueur sanguin ?

Faire un diagnostic de MA dans les stades cliniques les plus précoces, quand les premiers symptômes sont encore légers, n'est pas aisé. Pourtant, afin de traiter la MA avant que la neuro-dégénérescence n'ait

progressé jusqu'à des stades irréversibles de progression de la maladie, il est nécessaire d'avoir recours à un biomarqueur ou à une combinaison de biomarqueurs permettant un diagnostic des stades pré-symptomatiques ou légers de la maladie.

Les marqueurs du liquide céphalorachidien (LCR) ont montré leur large contribution dans l'établissement d'un diagnostic précoce de la maladie (Blennow *et al.*, 2010) cependant la ponction lombaire est un examen invasif difficile à justifier chez les sujets sains.

En revanche le LCR est produit à raison de 500ml par jour et en relation avec le sang au niveau des villosités arachnoïdiennes et des capillaires par la barrière hémato encéphalique. Faisant du sang un tissu dans lequel on peut potentiellement détecter les modifications biochimiques qui accompagnent la MA (Schneider *et al.*, 2009).

L'identification d'un marqueur sanguin revêt par ailleurs beaucoup d'autres avantages, parmi lesquels figurent le faible coût, qui permettrait son utilisation en première ligne, la simplicité de réaliser un prélèvement qui réduit les réticences des patients ou des comités d'éthique, et rend possibles les mesures répétées à faible intervalle qui restent très rares avec le LCR (Henriksen *et al.*, 2013).

La conférence de la Alzheimer's drug discovery foundation (ADDF) en avril 2013, a fait ressortir la nécessité urgente de mettre au point un marqueur ou un panel de marqueurs sanguin permettant de définir une signature de la maladie, et propose un état des lieux des domaines dans lesquels l'amélioration des connaissance est la plus urgente (Snyder *et al.*, 2014).

Un des points qui ressort de cet état des lieux est la variabilité entre les études qui complique la reproduction des résultats, ou rend discutable leur interprétation.

En effet dès les années 1970, furent rapportés des travaux mentionnant la grande variabilité des dosages sanguins entre individus (Cotlove *et al.*, 1970). Ainsi que la variabilité intra-individuelle à quelques heures d'intervalle (Winkel *et al.*, 1974), et la difficulté d'établir des valeurs de référence (Harris 1974). Une possibilité pour améliorer la spécificité des marqueurs serait une stratification des patients sur la base des données d'imagerie amyloïde, ou des dosages du LCR en combinaison des performances cognitives (Blennow *et al.*, 2010).

La composante multifactorielle des maladies neurodégénératives est d'ailleurs en partie la cause de leur grande complexité, dans la MA en particulier, on a pu déterminer une cause purement génétique dans moins d'un individu sur 100 (Ertekin-Taner 2010), le reste des cas est expliqué par certains facteurs de risque ou provient de variants de séquences rares encore non identifiés (Bertram *et al.*, 2010), mais surtout les facteurs environnementaux pourraient expliquer 21% des cas (Gatz *et al.*, 2006).

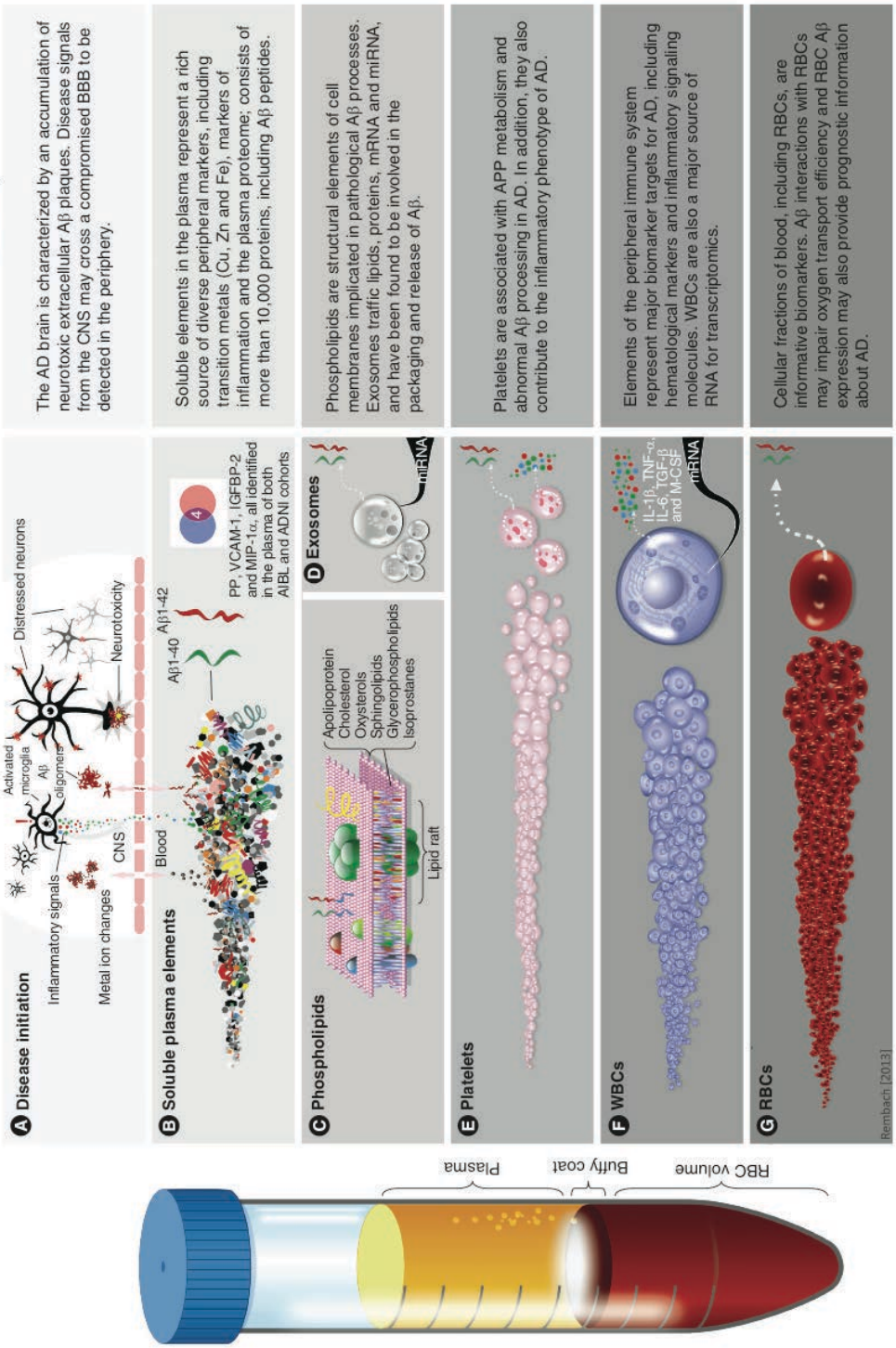


Figure 1. 9 : Nature des biomarqueurs sanguins actuellement explorés dans la maladie d'Alzheimer à partir des différentes fractions sanguines. Le plasma est obtenu par centrifugation du sang complet en présence d'un anti-coagulant. Il comprend 91% d'eau et 7% de protéines (fibrinogène, albumine, globulines) et 2% de nutriments (a.a, glucides, lipides, hormones, éléctrolytes) (Manzone *et al.*, 2007). Parmi les marqueurs sanguins plasmatiques on retrouve des médiateurs pro-inflammatoires libérés par la microglie activée (a) et un grand nombre d'éléments solubles (métaux, protéines) (b) ainsi que des phospholipides (c). Les éxosomes contiennent également des protéines et des ARN (d). La fraction composant l'hématocrite comprend des plaquettes (e) des leucocytes (f) et des hematies (g).

1.3.4.2 Les différents marqueurs sanguins de la maladie d'Alzheimer

On peut distinguer plusieurs types de marqueurs sanguins. Le sang est une source de protéines et de métabolites de signalisation et parfois d'ARN. A ces biomarqueurs plasmatiques s'ajoutent les marqueurs cellulaires (Figure 1.9).

Les études de biomarqueurs sanguins sont particulièrement nombreuses, et impossibles à lister dans le détail, mais des revues de la littérature sont disponibles sur le sujet (Schneider *et al.*, 2009; Blennow *et al.*, 2010; Thambisetty and Lovestone 2010; Henriksen *et al.*, 2013; Ghidoni *et al.*, 2013; Rembach *et al.*, 2013).

L'utilisation de l'ADN n'est pas un biomarqueur per se puisqu'il ne renseigne pas sur les phénomènes dynamiques qui accompagnent l'apparition de la maladie, mais l'identification des marqueurs de risque génétique tels que l'identification des isoformes de l'ApoE a montré une grande valeur prédictive du risque de développer une maladie d'Alzheimer et a ouvert la voie à la compréhension de l'homéostasie lipidique dans la maladie.

1.3.4.3 Les marqueurs du métabolisme amyloïde

Ces marqueurs sont pour l'instant considérés comme le meilleur marqueur de MA, cependant la source de l'Aß périphérique n'a pas été clairement identifiée. L'APP est en effet exprimé dans la plupart des types cellulaires, et l'Aß pourrait provenir de nombreuses sources (Masters and Selkoe 2012). Par ailleurs l'Aß est capable de se lier à un grand nombre de protéines plasmatiques ce qui complique les dosages.

Au total les études sur les dosages sériques d'Aß40, Aß42 ou du ratio Aß42 :Aß40 rapportent des résultats conflictuels y compris pour deux études longitudinales comprenant une évaluation de la charge amyloïde cérébrale en TEP au [11C]PIB associée aux dosages sériques de l'Aß dans un suivi longitudinal (Toledo *et al.*, 2011; Rembach *et al.*, 2014). La première étude basée sur la cohorte ADNI conclut que les mesures sont faiblement contributives à une classification des sujets, et la seconde, basée sur la cohorte australienne AIBL, rapporte une diminution des dosages chez les MCI et les sujets sains à risque.

Une méta-analyse sur l'utilisation de l'Aß plasmatique arrive à la même conclusion, l'Aß40 et l' Aß42 baissent dans le plasma avec la MA, mais les résultats sont hétérogènes (Koyama *et al.*, 2012).

Une meilleure compréhension de la dynamique de l'Aß plasmatique associée à des suivis individuels longitudinaux plus longs seront nécessaires pour réellement évaluer la contribution des dosages d'Aß sanguins (Toledo *et al.*, 2011).

1.3.4.4 Les lipides

Le lien entre les lipides et la maladie d'Alzheimer est fréquemment suggéré (Kosicek and Hecimovic 2013). Par ailleurs les molécules associées au métabolisme du cholestérol sont impliquées dans la régulation de la synthèse et dans la clairance du peptide Aß cérébral (Allinquant *et al.*, 2014). Mais la colinéarité entre le système nerveux central et la périphérie n'est pas bien comprise, et bien qu'un taux de cholesterol sanguin augmenté en milieu de vie (âge adulte) soit associé à un risque élevé de MA, aucun marqueur (oxystérols, ApoE, isoprostane) n'est prédictif de la présence d'une pathologie de type MA.

Un travail récent identifie un panel de phospholipides dont les dosages sont associés à un risque de déclin cognitif dans une cohorte de sujets sains (Mapstone *et al.*, 2014).

1.3.4.5 Marqueurs d'inflammation et immunité

Les phénomènes inflammatoires sont courants en périphérie des plaques dans le CNS, et on a pu montrer la libération de médiateurs pro ou anti-inflammatoires par la microglie et les astrocytes (Barger and Harmon 1997; Perry and Holmes 2014; Sudduth *et al.*, 2013) notamment l'interleukine-6 qui a été associée à un risque accru de développer une MA.

Deux populations de cellules monocytaires d'origine myéloïde jouent un rôle important dans les réponses immunitaires innées au cours de la MA : les cellules microgliales, qui sont les macrophages résidents du système nerveux central, et des monocytes infiltrants dérivés de la moelle osseuse. Après activation par le peptide Aß, ces cellules ont la capacité de phagocyter et dégrader le peptide amyloïde, mais aussi de produire un ensemble de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Il a été suggéré que les cellules microgliales résidentes tendent à promouvoir la neuroinflammation et le processus neurodégénératif, alors qu'à l'inverse les monocytes recrutés depuis la périphérie produiraient préférentiellement des facteurs neurotrophiques et des cytokines anti-inflammatoires, et favoriseraient la clairance du peptide Aß par phagocytose. Plusieurs études ont mis en évidence le développement spontané, chez les sujets âgés et les patients atteints de MA, de réponses lymphocytaires T et B spécifiques du peptide Aß. Des anticorps naturels dirigés contre les formes toxiques du peptide Aß ont été mis en évidence dans le plasma et le liquide céphalo-rachidien de patients MA et de sujets témoins (M Britschgi 2009). Le taux de ces anticorps diminue avec l'âge et la progression de la maladie , et le nombre de plaques amyloïdes chez les patients est inversement corrélé à la présence d'anticorps associés aux plaques (Kellner et al, 2009). Une fréquence accrue de cellules T anti-Aß est également observée dans le sang des patients atteints de MA (Monsonego *et al.*, , 2013). La nature exacte des populations de cellules T impliquées et leur rôle dans la physiopathologie de la maladie restent cependant encore à déterminer (Dorothée & Aucouturier 2011).

1.3.4.6 Etudes exploratoires de protéomique fonctionnelle

L'étude systémique du contexte physiologique dans lequel apparait la MA sporadique peut s'avérer très contributive dans l'identification des facteurs associés à l'apparition de la MA. A ce titre les approches pan-protéomiques récemment développées grâce aux progrès des techniques de détection, ont amorcé une transition du dosage unique vers la modélisation transversale de multiples voies physiologiques sans a priori (Pal *et al.*, 2013; Langley 2014). Quelques études protéomiques commencent à identifier des panels de protéines associés à l'existence d'une MA (Hye *et al.*, 2006; Sattlecker *et al.*, 2014).

1.3.4.7 Les marqueurs de la fraction cellulaire

Les marqueurs cellulaires sont basés sur des dosages protéiques (i .e. Aß des plaquettes) des études de transcriptomiques et des typages immunologiques.

Les travaux de dosages protéiques sur la fraction cellulaire se sont intéressés à la capacité des cellules sanguines de produire de l'Aß. On a par exemple pu montrer que les plaquettes produisent 90% de l'Aß plasmatique (Chen *et al.*, 1995). D'autres travaux montrent que la proportion d'Aß lié aux cellules, en particulier aux hématies, est plus élevée que l'Aß libre (Kiko *et al.*, 2012). La liaison aux membranes des cellules sanguines ou aux molécules chaperonnes pourrait expliquer les incohérences observées entre les différents dosages de l'Aß plasmatique, mais il n'y a, à ce stade, pas de méthode consensuelle de dosage de l'Aß sérique libre ou lié aux cellules, qui soit applicable dans un panel de biomarqueurs.

Les études de transcriptomique remarquables comptent deux applications commerciales : DiaGenic ASA (Norvège), et ExonHit (France) (Booij *et al.*, 2011; Fehlbaum-Beurdeley *et al.*, 2010) qui annoncent des sensibilités de 72 et 100% respectivement sur la comparaison de sujets sains avec des MA. Ces outils manquent cependant transparence pour une application au diagnostic précoce.

Aucun travail ne s'est intéressé à une caractérisation morphologique de cellules sanguines dans la MA Pourtant plusieurs éléments indiquent un lien entre le fonctionnement des endosomes dans les neurones et la production de peptide amyloïde. Le chapitre suivant propose une description simplifiée du compartiment endosomal, et souligne son lien avec la maladie d'Alzheimer. Il aboutit à l'hypotèse que les modifications cérébrales du fonctionnement endosomal sont détectables en périphérie du système nerveux et constituent une piste de biomarqueur sanguin pertinente.

1.4 Le compartiment endosomal et le métabolisme de l'APP

1.4.1 Nature et fonctions du compartiment endo-lysosomal

1.4.1.1 Généralités sur le transport vésiculaire

La notion de transport vésiculaire inclue les mouvements de vésicules et de composants solubles entre deux compartiment membranaires ; on distingue la fonction sécrétoire qui transporte les composants néo-synthétisés de l'appareil de golgi vers leur compartiment cible, des voies endo-lysosomales qui débutent par la réinternalisation de membranes par endocytose et dont le rôle est d'assurer l'internalisation le tri et/ou la dégradation de composants membranaires ou extracellulaires solubles ou liés à des récepteurs transmembranaires.

Ces fonctions sont assurées simultanément et de manière très dynamique puisqu'on estime que la proportion de la membrane plasmique qui est internalisée et recyclée chaque heure varie entre 0.5 et 1.8 fois la surface membranaire totale (Steinman *et al.*, 1983). Par ailleurs la séquestration de molécules, leur transport actif vers leur compartiment cible, et la fusion des vésicules cargo avec ces compartiments font intervenir de nombreux partenaires moléculaires qui seront l'objet de cette section.

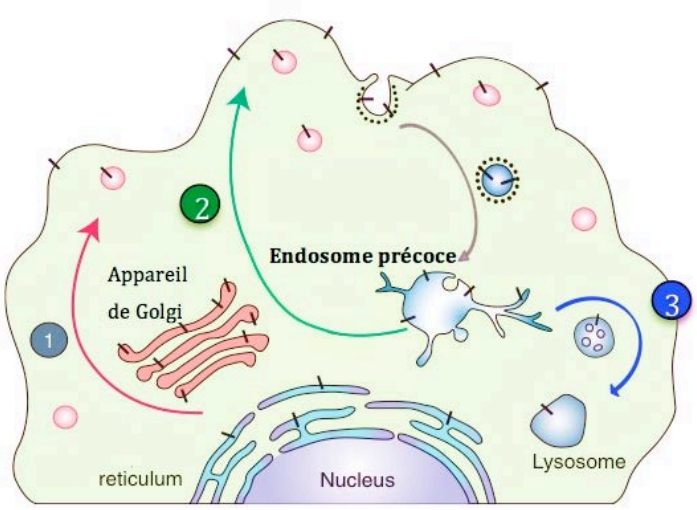


Figure 1. 10 : Les trois fonctions associées au transport vesiculaire. Représentation simplifiée représentant trois fonctions associées au transport vésiculaire ; (1) la sécrétion qui est un phénomène indépendant, et deux fonctions dépendantes de l'endocytose, et constituant les voies endo-lysosomales : le tri des composants cellulaires et leur recyclage à la membrane (2) ou leur dégradation (3). (Figure modifiée d'après Haass et al, 2012).

1.4.1.1.1 Sécretion :

La voie sécrétoire 'classique' (Figure 1.10, 1), fait intervenir des structures membranaires permanentes d'organisation cupulaire et de composition lipoprotéique, les porosomes (Jena 2009). Le porosome est impliqué dans le docking des vésicules sécrétoires, facilitant l'expulsion sous pression de leur contenu sans fusion totale de la vésicule avec la membrane réceptrice, ce qui permet de l'accélérer considérablement l'échange d'information. Le porosome est également présent dans les synaptosomes des neurones (Lee *et al.*, 2012).

Dans les cellules non polarisées la sécrétion a lieu par docking puis fusion des vésicules de transport avec la membrane plasmique, libérant leur contenu luminal dans l'espace extra cellulaire, et leurs constituants membranaires dans la membrane plasmique.

D'autres voies sécrétoires non-conventionnelles existent (Nickel and Seedorf 2008), notamment la sécrétion d'origine lysosomale qui est impliquée par exemple dans la toxicité des lymphocytes T, et la production de l'interleukine-1ß (IL-1ß). Une autre est la fusion des corps multi-vésiculaires (MVB) avec la membrane plasmique, libérant leurs vésicules intra-luminales dans l'espace extracellulaire (Stoorvogel *et al.*, 2002). Les vésicules ainsi libérées prennent le nom d'exosomes et sont impliquées dans plusieurs processus biologiques comme la communication intercellulaire et le développement tissulaire (Raposo and Stoorvogel 2013).

1.4.1.1.2 Voies endo-lysosomales :

Les deux autres phénomènes ont en commun l'étape d'endocytose de composés extracellulaires ou de composants membranaires qui sont ensuite (2) ré-adressés à la membrane ou au réseau trans-glogien (trans-golgi network, TGN) par l'une des voies du recyclage ou (3) dirigées vers des voies à fonction principalement catabolique, les endosomes tardifs qui de différencient en lysosomes au pH acide et au contenu riche en hydrolases.

Les voies endo-lysosomales dépendantes de l'endocytose (Figure 1.10, 2 & 3) dérivent d'une structure cellulaire hautement complexe : l'endosome précoce.

L'un des rôles principaux de l'endosome précoce est le recyclage de récepteurs membranaires après séparation d'avec leur ligand, qui est généralement dégradé, dans un cycle d'activation/internalisation/séparation du ligand et ré-adressage membranaire du récepteur (Dunn *et al.*, 1989). Dans d'autres cas, comme celui du « epidermal groth factor receptor» EGFR, le récepteur emprunte la voie catalytique avec son ligand (Herbst *et al.*, 1994) et sera remplacé par des récepteurs néo-synthétisés.

1.4.1.2 Formation et structure des endosomes précoces

Ce chapitre décrit quelques de voies d'entrée dans la cellule qui convergent dans l'endosome précoce (Figure 1.11). Ces voies comprennent l'endocytose clathrine-dépendente, la pinocytose, la macropinocytose ainsi que deux voies pinocytiques indépendantes de la clathrine et de la cavéoline.

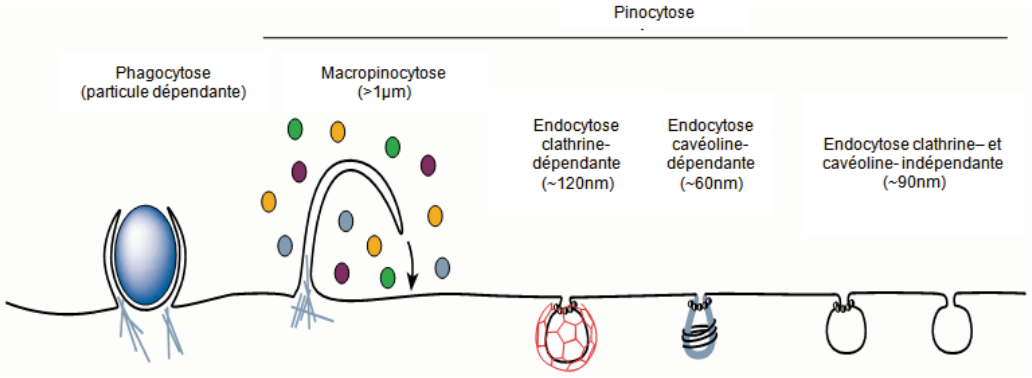


Figure 1. 11 : Schéma représentant les principales voies d'endocytose connues. Figure traduite de (Conner et al, 2003).

Les plus petites molécules (acides aminés, ions, oses) peuvent entre dans la cellule par le biais de transporteurs, ou par diffusion. Les molécules ou objets plus gros sont endocytés. Il existe beaucoup de formes d'endocytose, terme qui regroupe les processus d'entrée de matériel dans la cellule. La phagocytose n'existe que dans des cellules spécialisées, mais la pinocytose est rencontrée dans tous les types cellulaires.

La macropinocytose fait intervenir des protrusions membranaires soutenues par des filaments d'actine qui lorsqu'elles fusionnent avec la membrane donnent lieu à la formation de grandes vésicules, les macropinosomes. Les mécanismes moléculaires déclenchant la production des macropinosomes sont mal connus mais on sait qu'ils font intervenir la Phosphatidyinositol-3-kinase (PI3K) et la petite protéine-G, Rab5 impliquée dans la fusion des vésicules d'endocytose entre elles, et avec les endosomes précoces (Feliciano *et al.*, 2011). Des billes de Dextran utilisées pour activer la macropinocytose co-localisent après 10min, avec EEA1 (le marqueur des endosomes précoces) (Falcone *et al.*, 2006).

Les cavéoles sont des zones membranaires riches en cholestérol et en sphingolipides recouvertes sur leur face intracellulaire de cavéoline. L'endocytose cavéoline dépendante est lente (demie vie >20min) et contribue faiblement à l'internalisation de fluide en raison du faible volume des vésicules ; en revanche les caveoles représentent jusqu'à 20% de la surface cellulaire des endothéliums (Conner and Schmid 2003).

L'endocytose clathrine dépendante est majoritaire chez les mammifères et également la mieux connue. Elle intervient dans l'internalisation de nutriments essentiels tels que les Low-density-liporoteins (LDL) liées au cholestérol ou la transférine liée au fer (Schmid 1997). Cette forme d'endocytose fait intervenir la formation d'un manteau intracellulaire de clathrine et de ses protéines adaptatrices parmi lesquelles PICALM et son homologue neuronal AP180.

Les vésicules recouvertes de clathrine sont produites par plusieurs compartiments cellulaires, pas uniquement à la membrane plasmique (Schmid 1997), mais il semble que la complexité de machinerie intervenant à la membrane est plus importante (Conner and Schmid 2003).

Toutes les formes d'endocytose convergent vers l'endosome précoce (Klumperman and Raposo 2014). L'endosome précoce est une structure hautement pléomorphe, spécialisée dans le tri des lipides et des protéines (Marko Jovic 2010). Un point important est que l'on ne connaît pas de motif de tri dans les composants qui transitent par l'endosome précoce, qui semble réaliser la séparation différentielle de ses constituants par la différentiation de domaines tubulaires qui bourgeonnent depuis le soma (figure III.3) (Gruenberg 2001). L'endosome précoce comporte ainsi plusieurs domaines fonctionnellement différents. Par exemple, les protéines vouées au recyclage se concentrent dans les domaines tubulaires, celles adressées à la dégradation, plutôt dans les zones vacuolaires (Marko Jovic 2010).

Les endosomes précoces montrent une grande capacité à la fusion homotypique et contiennent parfois des vésicules intra-luminales dans le soma (Murk *et al.,* 2003). On estime également que la différenciation des micro-domaines tubulaires n'est pas uniquement destinée à augmenter le rapport membrane/volume, mais permet également d'y produire un microenvironnement spécifique. Ainsi le pH du lumen sensiblement acide 6.2 à ~5.5, favorise la séparation du ligand des récepteurs internalisés, alors que le pH des micro-domaines tubulaires est plus neutre (~6.5) (Mellman 1996) (Figure 1.12). L'activité des pompes à protons vacuolaires est, semble-t-il déterminante dans la différentiation des micro-domaines, en effet, leur inhibition par la bafilomycine-A entraine la formation d'endosomes précoces hautement tubulaires qui ne maturent pas en endosomes tardifs (voie de dégradation) (Clague *et al.,* 1994).

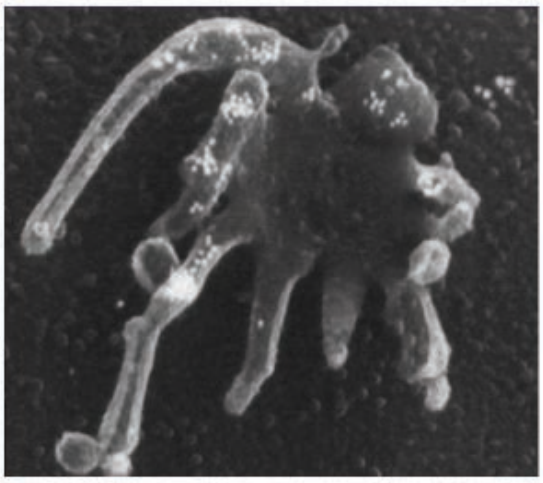


Figure 1. 12 : L'endosome précoce. Cette micrographie montre un endosome précoce contenant des 'low density lipoproteins' LDL couplée à des particules d'or endocytées durant 5 minutes. Le contraste est inversé faisant apparaître les particules d'or en blanc. (D'après Guerenberg et al, 2001) Cette micrographie montre la grande plasticité morphologique de l'endosome précoce, et la vitesse à laquelle il peut se différencier en structure de recyclage.

1.4.1.3 Marqueurs des endosomes

Les endosomes précoces résultent donc de la fusion les vésicules d'endocytose convergeant vers cette structure. Un autre point commun des vésicules d'endocytose est le recrutement à leur membrane de petites protéines-G de la famille des Rab-GTP-ases. Cette large famille de protéines joue un rôle essentiel dans la régulation du trafic vésiculaire. Elles fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires qui alternent entre un état activé lié au GTP et un état inactif lié au GDP (Stenmark 2009). Le marqueur associé aux vésicules d'endocytose est RAB5 qui dans l'état activé initie la fusion homo- et heterotypique des vésicules entre elles et avec l'endosome précoce, par le recrutement d'effecteurs, parmi lesquels EEA1 qui intervient dans la fusion deux membranes associées à RAB5 (i.e. la vésicule d'endocytose et la membrane de l'endosome précoce) (Rubino *et al.*, 2000). EEA1 est en particulier nécessaire à la l'accrochage de la vésicule à l'endosomes, préliminaire à sa fusion (Zerial *et al.*, 1999) (le 'docking'). Contrairement à RAB5, EEA1 se trouve uniquement sur la membrane receuveuse et est donc plus spécifique de l'endosome précoce que RAB5 dont les sites de recrutement sont plus nombreux (Rubino *et al.*, 2000).

D’autres effecteurs de RAB5 sont VPS34 (nommé aussi PtdInS(3)P-Kinase) dont le rôle est de produire le PtdIns(3)P, qui est le phosphoinositide le plus abondant dans la membrane de l’endosome précoce. Il agit dans le recrutement d’autres effecteurs de RAB5 comme EEA1, la Rabenosyn-5 (Lawe *et al.*, 2000) et des sorting nexins (SNXs) (Cozier *et al.*, 2002).

Le rôle de chaque effecteur de RAB5 ne sera pas détaillé ici, mais on retiendra que l’inhibition de la kinase VPS34 bloque le recrutement des effecteurs de RAB5 à l’endosome précoce et interrompt le recyclage rapide vers la membrane plasmique, médié par RAB4 mais pas le recyclage lent RAB11 dépendant (Hunyady *et al.*, 2002). Un autre phénomène intéressant observé dans les modèles cellulaires VPS34-déficients, est la production d’endosomes très élargis, et une augmentation de la production d’Aß dans le milieu de culture (Morel *et al.*, 2013).

Il existe beaucoup d’autres membres de la famille des petites protéines-G impliqués dans la régulation du trafic vésiculaire, et de l’identité des micro-domaines auxquels ils sont recrutés (pour revue : (Stenmark 2009)).

Le recrutement de Rab15 conduit également à une fusion avec les structures de recyclage tardif. La communication bidirectionnelle entre l’endosome précoce et le réseau trans-golgien est régulée par Rab22.

Le recrutement de Rab7, conduit à la maturation de l’endosome précoce en endosome tardif qui se manifeste par une acidification du lumen (~5), une apparence multivésiculaire, un détachement de Rab5, et le recrutement du marqueur lysosomal, LAMP1, ainsi qu’un enrichissement du contenu en hydrolases actives (Jatta Huotari 2011).

1.4.2 Les endosomes précoces dans la maladie d'Alzheimer

Comme cela a été exposé précédemment (chapitre 1.2.3.3), les clivages amyloïdogènes de l'APP font probablement intervenir la voie endosomale ; les modifications morphologiques des potentiels sites de clivage de l'APP représentent donc dans le cerveau un bon candidat pour expliquer les dérèglements métaboliques observés dans la MA.

1.4.2.1 Endosomes élargis dans maladie d'Alzeimer

A la fin des années 1990, un groupe s'est intéressé à la recherche des premières modifications histologiques décelables dans les neurones de patients atteints d'une MA, dans des aires cérébrales qui d'après les travaux de Braak et collègues, (Braak and Braak 1991) auraient développé à moyen terme les lésions caractéristiques de la MA. La première étude significative qui compare directement les éléments du système endo-lysosomal entre MA et sujets sains, porte sur 20 malades et 17 contrôles appariés en âge (62-78 ans) (Cataldo *et al.*, 1996). L'étude met en évidence une forte augmentation du contenu en hydrolases acides des endosomes tardifs et des lysosomes dans les couches III et V du cortex préfrontal (CPF), et les champs CA2 et CA3 de l'hippocampe, avec des nombres de vésicules hydrolases-positives augmentés de 1.75 à 8 fois, comparativement aux cellules des régions équivalentes dans les cerveaux sains. L'année suivante le groupe publie une comparaison de la taille des endosomes précoces, Rab5-positifs, dans les couches III et V du CPF (Cataldo *et al.*, 1997), et montre que dans ces régions spécifiquement, 48% des cellules ont un volume endosomal total augmenté par rapport aux contrôles (1 écart type au-dessus de la moyenne des contrôles).

Le Phénotype des endosomes précoces élargis est donc observable dans les régions exemptes de plaques ou de DNF des sujets avec une MA sporadique. Un détail important est que tous les neurones des couches concernées ne sont pas nécessairement touchés, puisque seuls 48% des neurones analysés présentent des anomalies du système endocytique dans les premières études (Cataldo, 1997) (Figure 1.13).

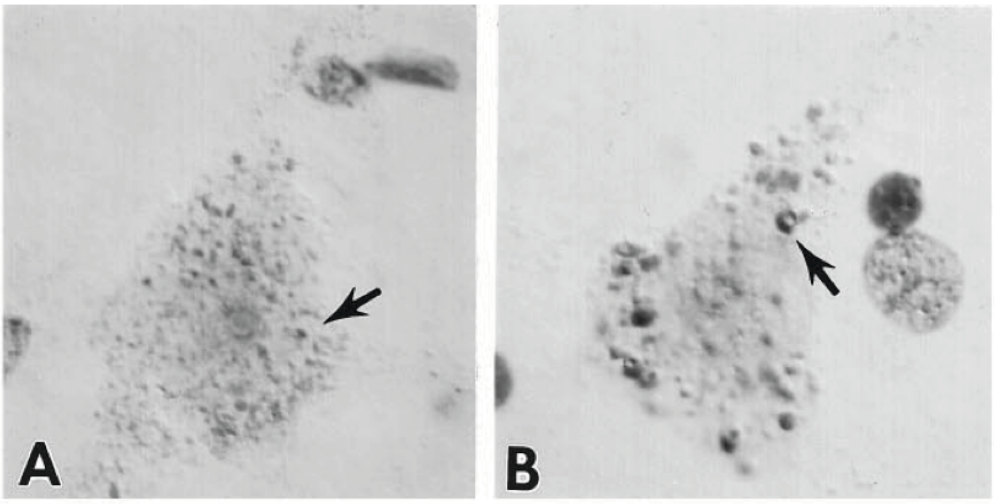


Figure 1. 13 : Elargissement des endosomes dans le cerveau. Micrographies représentant des neurones pyramidaux de la couche III du cortex pré-frontal, montrant les vésicules Rab5 positives dans un cerveau sain (A) et dans un cerveau Alzheimer (B). (Photos de cataldo et al, 1997).

1.4.2.2 Endosomes élargis dans la trisomie 21

Comme cela a été mentionné brièvement, les études neuropathologiques de patients avec une trisomie 21 mettent en évidence une pathologie de type Alzheimer dans la majorité des individus dès l'âge de 30 à 40 ans associée à une pathologie vasculaire dans 60% des cas et une angiopathie amyloïde dans 70% des cas (Wisniewski *et al.*, 1985). Une étude plus récente montre que 45% des individus DS ont une maladie d'Alzheimer à 65 ans (Coppus *et al.*, 2008). Les lésions observées sont composées du même peptide Aß que dans la MA (Glenner and Wong 1984a). Par ailleurs une micro-duplication du gène de l'APP est suffisante pour entrainer l'apparition d'une MA avec angiopathie amyloïde (Sleegers *et al.*, 2006; Rovelet-Lecrux *et al.*, 2005). Il fut donc proposé que la présence d'une troisième copie du gène de l'APP situé sur le chromosome 21 soit la cause des manifestations de type MA dans la trisomie 21 (Bird 2008; Margallo-Lana *et al.*, 2004).

Dans le cerveau d'individus avec une trisomie 21 mais trop jeunes pour avoir une maladie d'Alzheimer, on a pu mettre en évidence un élargissement des endosomes précoces (Rab5 positifs) dans les régions précédemment étudiées dans la MA (CPF, Hippocampe, cerebellum) (Cataldo *et al.*, 2000). Dans cette étude, Cataldo et ses collaborateurs, étudient l'élargissement des endosomes précoces dans la trisomie 21: du fœtus à 24 semaines de gestation jusqu'au jeune individu de 12 ans et notent une augmentation de la fréquence des neurones qui présentent cette anomalie, dépendante de l'âge avec 20% chez le fœtus

étudié, 40% chez l'adolescent. Dans les cellules concernées, l'agmentation du volume des endosomes précoces s'accompagne aussi d'une plus forte expression de la protéine RAB4 associée aux structures de recyclage précoce, indiquant que toutes les voies endosomales (endocytose et recyclage) sont probablement activées. Un autre groupe de malades inclus dans cette étude compte 12 individus avec une MA familiale causée par une mutation PS1 et 3 porteurs d'une mutation PS2. Aucun de ces 15 individus ne présentait à l'examen pathologique, d'altération du compartiment endo-lysosomal. Enfin, la stratification des patients en fonction de leurs isoforme d'ApoE montre dans 15 individus sains avec une pathologie conforme à des stades pré-cliniques de maladie d'Alzheimer que l'augmentation de la taille des endosomes est plus importante quand ils portent 1 ou 2 allèles e4, avec 4.68% du volume cellulaire occupé contre 3.18% avec les autres isoformes de l'ApoE (Cataldo *et al.*, 2000).

1.4.2.3 Endosomes élargis dans les modèles murins et cellulaires

La souris TS65Dn est un modèle de trisomie 21, la portion présente en 3 copies est synténique avec le chromosome 21 humain sur environ 15 Mb soit plus de 50% de gènes communs, notamment pour le gène de l'APP.

Dans son étude de 2003, Cataldo (Cataldo *et al.*, 2003) montre que la portion de Ts65Dn portant le gène de l'APP est responsable de l'élargissement endosomal ; en revanche la triplication du gène de l'APP humain chez la souris n'entraine pas d'augmentation de la taille des endosomes.

L'élargissement endosomal est également observé dans les fibroblastes d'individus DS (Cataldo *et al.*, 2008) et dans des lignées lymphoblastoïdes (Cossec *et al.*, 2012).

La simplicité de culture de ces cellules en fait des modèles utiles pour l'étude des altérations endosomales associées à la maladie d'Alzheimer.

1.4.2.4 Rôle du cholesterol dans l'elargissement des endosomes

Le cerveau compte pour environ 2% de la masse corporelle, mais il concentre 25% du cholestérol de l'organisme. Les analyses de composition chimique révèlent une teneur encore enrichie dans la maladie d'Alzheimer (Cutler, 2004 ; Xiong, 2008), et le rôle de l'ApoE, principal transporteur de cholestérol cérébral, a été remarqué avant la découverte de l'APP. En particulier, l'isoforme 'epsilon4' de l'ApoE est associée à un risque accru de développer une MA, et l'isoforme 'epsilon2' à un risque diminué (Bu 2009). L'ApoE comprend deux domaines fonctionnels : un domaine de liaison aux lipides et un domaine de liaison aux récepteurs chargés de son internalisation (Hatters, 2006) (Figure 1.14).

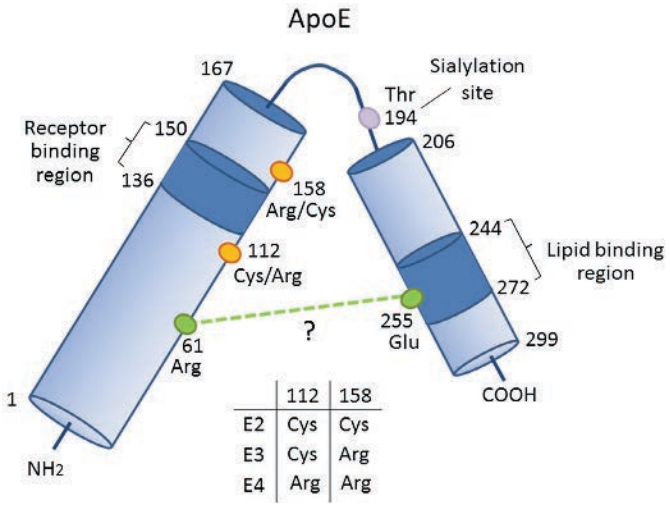


Figure 1. 14 : Illustration de la structure et des domaines fonctionnels de l'ApoE. Les 3 isoformes E2, E3 et E4 diffèrent par une variation dans les résidus 112 et 158. L'isoforme apoE2, possède une cystéine aux deux positions, apoE3 a une cys en position 112 et arg en position 158, et apoE4 a des arg aux deux positions. (Kanekiyo *et al.*, 2014).

Il existe plusieurs hypothèses pour expliquer des différences observées dans l'effet du génotype ApoE (*i.e.* clairance de l'Abeta, toxicité directe Une explication peut venir des affinités différentes des trois isoformes pour différents types de lipoprotéines. À l'inverse des isoformes apoE2, et apoE3, l'isoforme apoE4 est plus fréquemment associé aux lipoprotéines de très basse densité (VLDL), qu'aux lipoprotéines de basse (LDL) et haute densité (HLD) (Hatters, 2006).

En conditions normales, l'homéostasie du cholestérol cérébral est orchestrée par un ensemble d'acteurs qui comprennent plusieurs étapes limitant ou favorisant sa disponibilité telles que : sa diffusion à travers les cellules de la barrière hémato-encéphalique depuis le sang sous la forme oxydée (27-OH-cholestérol) semble jouer un rôle limité dans la régulation du taux de cholestérol cérébral. La liaison aux apolipoprotéines dans le cytoplasme des astrocytes, l'affinité des lipoprotéines pour les récepteurs membranaires des neurones et des astrocytes, la disponibilité des récepteurs et l'activité de la 24-hydrolase sont en revanche fortement impliqués dans le turnover du cholestérol entre les cellules cérébrales (Figure 1.15) (Allinquant *et al.*, 2014).

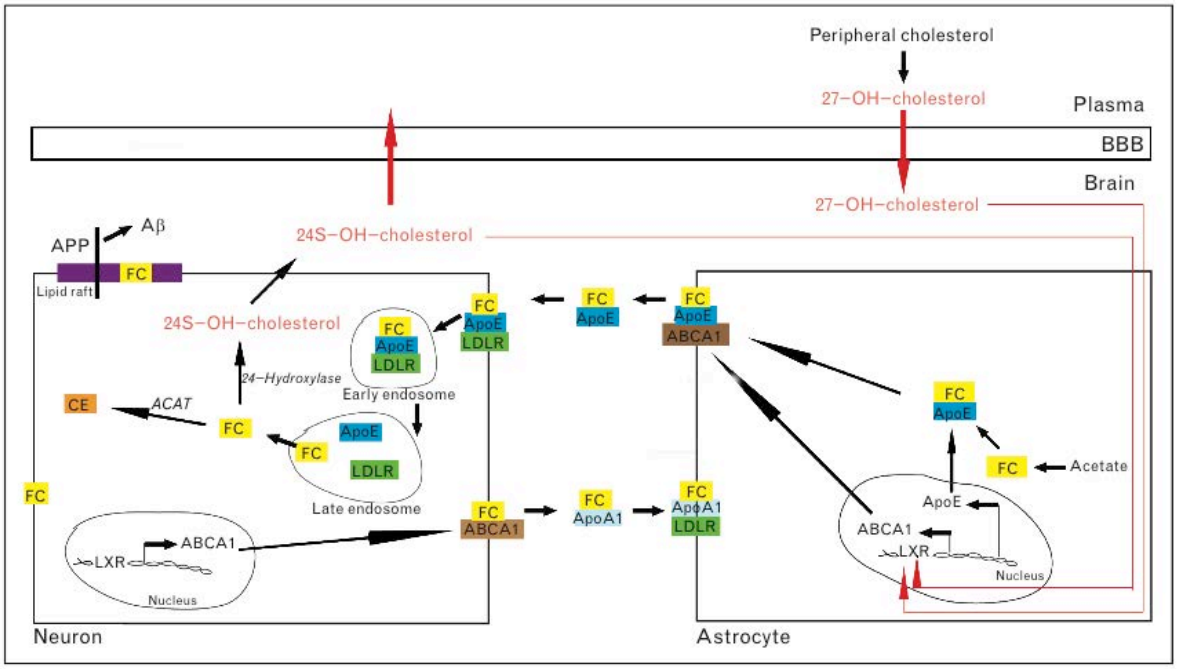


Figure 1. 15 : Métabolisme du Cholestérol dans le cerveau. Dans les astrocytes, le cholestérol libre (FC) est synthétisé à partir de l'acétate et s'associe à l'ApoE pour être exporté par l'ATP-binding cassette (ABCA1). Le complexe apoE-cholestérol est internalisé par les neurones après fixation au récepteur des « low-density lipoproteins » (LDLR). Dans les endosomes tardifs, le cholestérol libre est libéré et adressé à la membrane, où il participe à la formation des rafts lipidiques. Le cholestérol libre en excès est converti en 24S-hydroxy(OH)-cholestérol qui peut traverser la membrane et passer dans le sang, une autre partie est stockée sous forme d'esters de cholestérol (CE). Une dernière fraction du cholestérol libre est exportée par ABCA1 vers l'espace extracellulaire où il se lie à l'ApoA1 est peut être réinternatisé par les astrocytes. Les oxystérols (24 et 27) se lient au récepteur LXR, et entrainent la synthèse de ABCA1 (adapté de Allinquant *et al.*, , 2014).

Si la dérégulation de ces mécanismes est mal connue dans la MA, on a pu montrer en revanche qu'une augmentation de la teneur en cholestérol du milieu a un impact sur l'endocytose et la production d'Aß.

Sur cultures cellulaire de neurones, l'apport de cholestérol lié à l'apoB, entraine un élargissement des endosomes, une plus forte activité beta-sécrétase et une augmentation de la production d'Aß (Hui *et al.*, 2012). Inversement, l'administration de méthyl-beta-cyclodextrine, en réduisant le taux de cholestérol membranaire réduit la production d'Aß (Postina *et al.*, 2004; Simons *et al.*, 1998)

Le cholestérol est enrichi dans la membrane plasmique (30 à 40% des lipides, Yeagle 1985) où il interagit avec les autres lipides, en particulier les sphingolipides et les glycérophospholipides à chaine saturée (Brown, 1998 ; McConnell & Radhakrishnan, 2003) permettant l'organisation de domaines aux propriétés spécifiques très enrichis en certaines espèces chimiques comme les rafts ou les cavéoles. Par ailleurs la membrane des endosomes précoces est particulièrement enrichie en cholestérol comme en

témoigne sa résistance au détergents légers (i.e. Triton X100) (Hao *et al.*, 2004). De plus la composition lipidique joue un rôle dans la régulation du trafic vésiculaire. En effet une déplétion en cholestérol ou une augmentation de la teneur en lipides insaturés entraine une modification de l'équilibre entre recyclage et dégradation, en faveur d'un recyclage plus important (Hao *et al.*, 2004). La réduction de la teneur en cholestérol affecte également la production de vésicules sécrétoires dans l'appareil de golgi (Wang *et al.*, 2000).

Enfin, le rôle des domaines résistants aux détergents (rafts et autres micro domaines riches en cholestérol) dans les clivages beta- et gammasécrétase de l'APP, a été proposé après l'observation d'une association de BACE1 et de l'APP aux rafts lipidiques (Riddell *et al.*, 2001; Vetrivel & Thinakaran 2010). L'hypothèse du clivage amyloïde dans les domaines membranaires riche en cholestérol est également supportée par l'existence d'un domaine d'interaction avec le cholestérol sur l'APP (Beel *et al.*, 2010; Beel *et al.*, 2008).

Tous ces travaux suggèrent que le métabolisme du cholestérol est finement régulé dans le système nerveux central, et que sa dérégulation pourrait être impliquée dans la MA sporadique comme le suggère l'effet contrasté des trois isoformes de l'ApoE sur la prévalence de la pathologie, et l'augmentation dose dépendante de la gravité avec la présence des allèles ApoE4. L'effet du cholestérol sur le métabolisme amyloïde est par ailleurs supporté par des taux de synthèse d'Aß dépendants de la teneur de la membrane en cholestérol, et possiblement d'une différenciation latérale de la membrane en rafts lipidiques qui favoriseraient la rencontre de l'APP et des sécrétases.

1.4.3 Conclusion sur l'élargissement des endosomes

De tous ces travaux on retient que :

1. L'élargissement des endosomes concerne les régions à risque de développer des lésions caractéristiques de la MA.
2. Les modifications des endosomes interviennent avant l'apparition des dépôts amyloïdes.
3. préférentiellement dans les couches contenant les neurones pyramidaux,
4. qui ne présentent pas tous de modification des endosomes (pas même dans la trisomie 21).
5. La fréquence des neurones qui en présentent augmente avec l'âge, au moins dans la trisomie 21.
6. L'élargissement des endosomes est spécifique de la maladie d'Alzheimer sporadique et de la trisomie 21.
7. Les formes familiales de MA avec mutation des présenilines, et les modèles murins exprimant l'APP humain en trois copies ne présentent pas d'altération du système endocytique. Seules les mutations entrainant la surexpression de l'APP présentent ces altérations.
8. D'autres maladies neurodégénératives étudiées (i.e. la maladie de Huntington, la maladie de Pick, l'atteinte supranucléaire progressive, la sclérose latérale amyotrophique) ne présentent pas d'altération des voies endosomales.
9. Dans la trisomie 21, les endosomes précoces sont observables dans des fibroblastes et dans des lignées lymphoblastoïdes en culture, ainsi que dans des leucocyte mononucléaires isolés du sang (PBMC).
10. Les isoformes de l'ApoE ont un impact sur l'importance de l'élargissement (+ 50% avec un ou plusieurs allèles e4 chez les MA sporadiques_ la littérature n'indique pas si les endosomes sont élargis sans MA).
11. Une augmentation de la teneur en cholestérol membranaire mime, le phénotype d'endosomes élargis, et entraine une augmentation de la production d'Aß. (Cossec et al, 2010)

II. Objectifs du travail

1 Contexte général

Les travaux présentés ici sont le fruit d'un travail pluridisciplinaire autour de deux études de recherche clinique : Biomage (ANR 2007) et ImaBio3 (PHRC 2010 et roche), coordonnées par le Pr. Marie Sarazin, qui ont réuni des équipe cliniques, de neurologues, de neuroimageurs, de médecins nucléaires et de biologistes de plusieurs spécialités.

Mon implication dans ces projets sera ensuite brièvement expliquée avant que soient exposés les objectifs du présent travail. Par ailleurs, dans le contexte de l'étude Biomage, un travail collaboratif a abouti à trois études complémentaires : l'une s'intéréssant à la demence fronto-temporale (Bertoux *et al.*, , 2013), une deuxième au dosage des anticorps spécifiques du peptide-amyloïde dans le sang, dans l'ACP (Dorothée *et al.*, , 2012) et une troisème sur le dosage de la kinase Dyrk1a dans le sang comme biomarqueur de la MA (Delabar *et al.*, , in press). Ces travaux, dont je suis co-autheur, ne seront pas détaillés dans la suite.

2 L'étude BIOMAGE

- Investigateur principal : Pr Bruno Dubois, responsable scientifique Pr Marie Sarazin
- financement ANR 2007 et Fondation de gérontologie
- promotion INSERM (C08-30) (enregistrée sur https://clinicaltrials.gov, avec le numéro : NCT01095744)
- Accord du comité de protection des personnes (CPP) de la salpêtrière
- début du recrutement des patients en avril 2009
- dernier patient recruté en mai 2012.

2.1.1 Objectifs

Les objectifs principaux du projet étaient (a) étudier l'influence de l'âge sur la charge lésionnelle amyloïde mesurée en TEP au PIB, pour déterminer les facteurs spécifiques associés au vieillissement cérébral dans la MA, en comparant les données cliniques et de neuroimagerie, dans un groupe patients MA à début précoce (EOAD) (avant 65 ans) un groupe MA à début tardif (LOAD) ainsi qu'un groupe patient, (b) étudier la charge amyloïde dans les formes atypiques focales de MA (atrophie corticale postérieure, ACP et aphasie primaire progressive, APP) par comparaison aux formes typiques amnésiques.

2.1.2 Critères d'inclusion et schéma expérimental

Les participants étaient inclus dans plusieurs groupes distincts :

1. Patients :

a) Maladie d'Alzheimer typique au stade de MCI ou de démence légère à modéré, par, (a) un syndrome amnésique temporal interne prédominant et d'installation progressive avec un score de rappel libre total au RL-RI16 <19 ou un rappel total < 40/48, (b) Échelle clinical dementia rating (CDR) ≥ 0.5 et ≤2

b) Aphasie primaire progressive de type logopénique (Mesulam 2003) définie par :

- des troubles de la production du langage prédominant et initial d'évolution progressive ;
- l'aphasie est marquée essentiellement par un manque de mots, des troubles de la répétition et des paraphasies ;
- les activités de la vie quotidienne sont respectées ou perturbées uniquement en raison des troubles linguistiques.
    - pas d'atteinte linguistique pre-morbide ;
    - Pas de lésion spécifique focale à l'imagerie pouvant expliquer les troubles ;
- pas d'amnésie sévère précoce ;

c) ACP définie par des trouble visuo-spatiaux progressifs inauguraux répondant aux critères d'atrophie corticale postérieure :

- début insidieux et évolution progressive.

- déficit visuel ou visuospatial progressif, en absence de déficit ophtalmologique.
- Syndrome de Balint complet ou incomplet, pouvant être associé à un syndrome de Gertsmann complet ou incomplet, à une agnosie visuelle, à une apraxie d'habillage et à une désorientation dans l'environnement ;
- un respect relatif de la mémoire épisodique et du langage., (Benson, Davis, and Snyder 1988)).

2. Témoins : normalité du bilan neurologique et neuropsychologique pour l'âge et le niveau d'éducation; MMS > 27/30

2.1.3 Description des critères d'exclusion (sur décision de l'investigateur)

- Patient présentant une pathologie psychiatrique évolutive et/ou mal contrôlée.
- Patient présentant un syndrome démentiel potentiellement curable médicalement lié à une dysthyroïdie non corrigée, un déficit en vitamine B12 ou acide folique, une infection syphilitique ou HIV, une anémie, un trouble hydroélectrolytique.
- Patient présentant une pathologie grave, sévère ou instable dont la nature peut interférer avec les variables d'évaluation.
- Patient présentant une contre-indication à l'IRM : porteur d'un pacemaker, d'un défibrillateur cardiaque ou d'un neurostimulateur, d'un matériel implanté activé par un système électrique, magnétique ou mécanique, de clips hémostatiques des anévrysmes intracérébraux ou des artères carotides, d'implants cochléaires, d'un corps étranger métallique intra-oculaire, et les patients claustrophobes ou obèses majeurs.
- Patient présentant des antécédents connus ou supposés (≤5ans) d'alcoolisme ou d'usage abusif de drogues.
- Lésion vasculaire visible à l'IRM pouvant interférer avec les critères de diagnostic.
- Toute personne visée par la restriction des catégories (livre du code de la santé publique pour les recherches sans bénéfice individuel direct).
- non affiliation à un régime de sécurité sociale (bénéficiaire ou ayant droit)

Tous les participants ont eu, à l'inclusion :

- une évaluation neuropsychologique comprenant le MMSE, un test de la mémoire épisodique verbale (RL/RI 16) et visuelle (figure de Rey en différé), les empans verbaux et visuels (directs et indirects) pour évaluer les capacités attentionnelles et la mémoire de travail verbale, évaluation du langage par l'épreuve de dénomination à 80 items (Déno 80), évaluation des fonctions visuo-constructives par la copie de la figure de Rey, évaluation des praxies gestuelles par une batterie spécifique, et une évaluation des fonctions exécutives par la batterie rapide d'évaluation frontale (Dubois *et al.*, , 2000) et les fluences verbales (lexicale et catégorielle) (Tableau 2.1).

Les patients du groupe ACP ont également été évalués avec la « batterie neuropsychologique postérieure » incluant une évaluation du syndrome de Gerstman, du syndrome de Balin et des tests d'héminégligence (Kas et al, 2011).

- un examen neurologique

- un prélèvement sanguin en vue de la constitution d'un culot d'ADN qui sera subséquemment utilisé pour certains patients pour le génotypage de l'ApoE.

- Une IRM cérébrale (3T) :. Les examens par IRM ont tous été réalisés au Centre de NeuroImagerie de Recherche (CENIR), hôital Salpêtrière, sur la même IRM. Les acquisitions IRM ont été anonymisées. Les séquences d'acquisition comportaient une séquence anatomique 3DT1 à haute résolution, des séquences FLAIR et T2 pour évaluer l'importance des lésions vasculaires éventuellement associées, et une séquence optionnelle de tenseur pour permettre des études de recherche ultérieures (tracking de fibres; études des voies de connexions).

- Une TEP (réalisée dans les 2 mois) avec un examen au [11C]PIB, suivi d'un examen au [18F]FDG.

Fonctions cognitives	*Test Neuropsychologique*
Efficience cognitive globale	MMSE
Mémoire épisodique verbale	Free and Cued Selective Reminding Test (FCSRT)
Mémoire épisodique visuelle	Rey mémoire
Langage	Déno 100 + test d'appariement sémantique sur 12 images
Fonctions visuospatiales	Copie de la figure de Rey
Praxie gestuelle	Echelles d'apraxie gestuelle réflexive, symbolique et pantomime
Fonctions exécutives	BREF
	Trail Making test A et B
	Similitude de la Waiss III
Attention et mémoire de travail	Mémoire des chiffres de la MEM III endroit en envers
	Empan spatial immédiat et différé

Tableau 2. 1 : Détails de la batterie de tests neuropsychologiques conduite avec tous les sujets.

Les acquisitions des examens en TEP ont été faites dans le Service Hospitalier Frédéric Joliot (SHFJ, CEA) à Orsay. Cette visite était effectuée sur une durée de 1 journée dans les 3 mois suivant l'inclusion.

Ces examens ont été réalisés avec une caméra HRRT (High Resolution Research Tomograph, CPS Innovations). Installée au SHFJ en 2003, il s'agit de la caméra offrant la plus haute résolution spatiale actuellement disponible pour l'imagerie cérébrale. Sa résolution spatiale est en effet de 2,5 mm, comparée à 4,5 mm pour la caméra traditionnelle HR+. Sa sensibilité est, de même, supérieure de 30 % à celle d'une HR+, avec une sensibilité absolue de 6% en un point focal, au centre du champ de vue. Le Champ de vue axial est de 25 cm, le transaxial de 31.2 cm. Les sections sont de 1.1 mm (107 niveaux de coupes).

Acquisition des données TEP au [11C]-PIB: L'acquisition d'images TEP débutait dès l'injection IVD d'environ 370 MBq (10 mCi) de [11C]-PIB. L'examen dure environ 90 minutes. A la fin l'acquisition, le sujet était reconduit dans sa chambre où il pouvait se reposer pendant 1h30 heures minimum.

Acquisition des données TEP [18F]-FDG : Cet examen était réalisé avec la même caméra HRRT le jour même, au moins 3 heures après l'injection de PIB. L'acquisition des images était effectuée dès l'injection IVD de185 MBq (5mCi) de [18F]-FDG.

De manière optionnelle pour les malades, si une ponction lombaire (PL) a été proposée dans le cadre du soin, les dosages des biomarqueurs Aβ42, Tau et P-Tau dans le LCR ont été analysés. Pour des raison étiques, la PL n'a pas été pas proposée aux témoins.

L'évaluation clinique et neuropsychologique des participants a été faite à l'Institut de la Mémoire et de la Maladie d'Alzheimer de l'Hôpital de la Pitié-Salpêtrière. L'IRM cérébrale a été faite au CENIR (Centre de Neuroimagerie de Recherche - Hôpital de la Pitié-Salpêtrière) et les biomarqueurs du LCR ont été dosés au Service de Biochimie de cet hôpital (Dr. Foudil Lamari). L'acquisition des examens en TEP a été faite dans le SHFJ-CEA (Orsay) sous la coordination du Dr. Michel Bottlaender., déplacé en cours d'étude à l'institut de la mémoire et de la maladie d'Alzheimer, toujours à la Pitié-Salpêtrière.

Le groupe final de patients inclus comprend 60 participants parmi lesquels 9 ont été exclus de l'étude (7 pour critères d'inclusion non respectés, ou découverte de critères de non inclusion, un perdu de vue et un arrêt volontaire de participation) (Tableau 2.2).

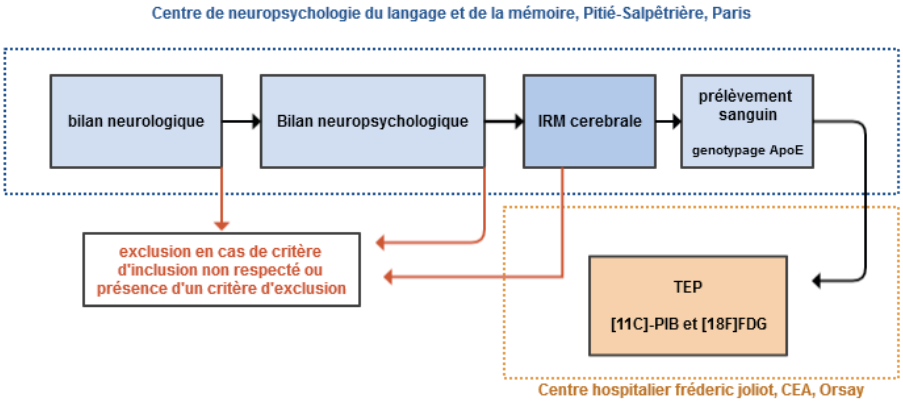


Figure 2. 1 : Schéma du plan expérimental simplifié de l'étude BIOMAGE. Tous les participants bénéficient des mêmes examens, mais pour les patients chez lesquels est suspecté un trouble visuo-spatial est proposé une batterie complémentaire spécifique.

		Témoins	MCI	AD	PCA
Nb sujets		13	14	11	9
Sexe (M/F)		10/3	7/7	7/4	2/7
Age		67.2 ± 7.5 (58.5 - 81.2)	67.3 ± 11.3 (52.9 - 88.5)	62.9 ± 6.3 (54 - 78.5)	62.7 ± 3.6 (58.8 - 69)
Education		13.1± 2.2 (9 15)	14 ± 2.9 (5 - 15)	13.0 ± 3.4 (5 - 15)	12.6 ± 2.6 (9 - 15)
Durée maladie		-	2.1 ± 0.9 (1 - 3)	3.5 ± 1,4 (2 - 6)	2.9 ± 1.5 (1 – 5)
MMSE		29 ± 1 (27 - 30)	23.9 ±3.1 (18 - 29)	16.5 ± 3 (10 - 21)	17.1 ± 5.9 (9 – 27)
CDR	≤ 0.5	-	14	0	3
	> 0.5		0	11	6
PIB	≤ 1.4	12	2	2	1
	> 1.4	1	12	9	8
ApoE		8/13	10/14	10/11	9/9
Ponction Lombaire		-	11/14	7/9	9/9

Tableau 2. 2 : Population de l'étude BIOMAGE.

3 Etude IMABIO3

- L'étude IMABIO3 a pour objectif principal d'étudier le rôle des réactions inflammatoires et immunitaires, centrale et périphérique dans la maladie d'Alzheimer.
- Coordinateur et investigateur principal : Pr marie Sarazin
- Financement PHRC 2010, et laboratoire Roche,
- PROMOTEUR : AP-HP, enregistrée sous le numéro NCT01775696.
- Accord du comité de protection des personnes (CPP) de la salpêtrière
- Début du recrutement des participants en décembre 2011,
- fin des inclusions : décembre 2014

3.1 Objectifs

L'étude est à la fois transversale et longitudinale avec un suivi annuel sur deux ans.

Les objectifs sont :

- Comprendre la rôle des réactions immunitaires et dans la MA définie par des critères clinico-biologiques au stade de MCI et de démence légère à modérée en couplant des techniques d'imagerie moléculaire en TEP (ligand [18F]DPA-714, marqueur de l'inflammation centrale, et ligand PIB, marqueur du dépôt amyloïde) et l'étude de marqueurs sanguins (panels de marqueurs inflammatoires et études réaction immuniatires spontanées anti Ab).
- Identifier des marqueurs sanguins de diagnostic et de pronostic de la MA. En ciblant des marqueurs inflammatoires et immunitaires et l'étude de la morphologie des endosomes sanguins.

3.2 Critères d'inclusion et schéma expérimental

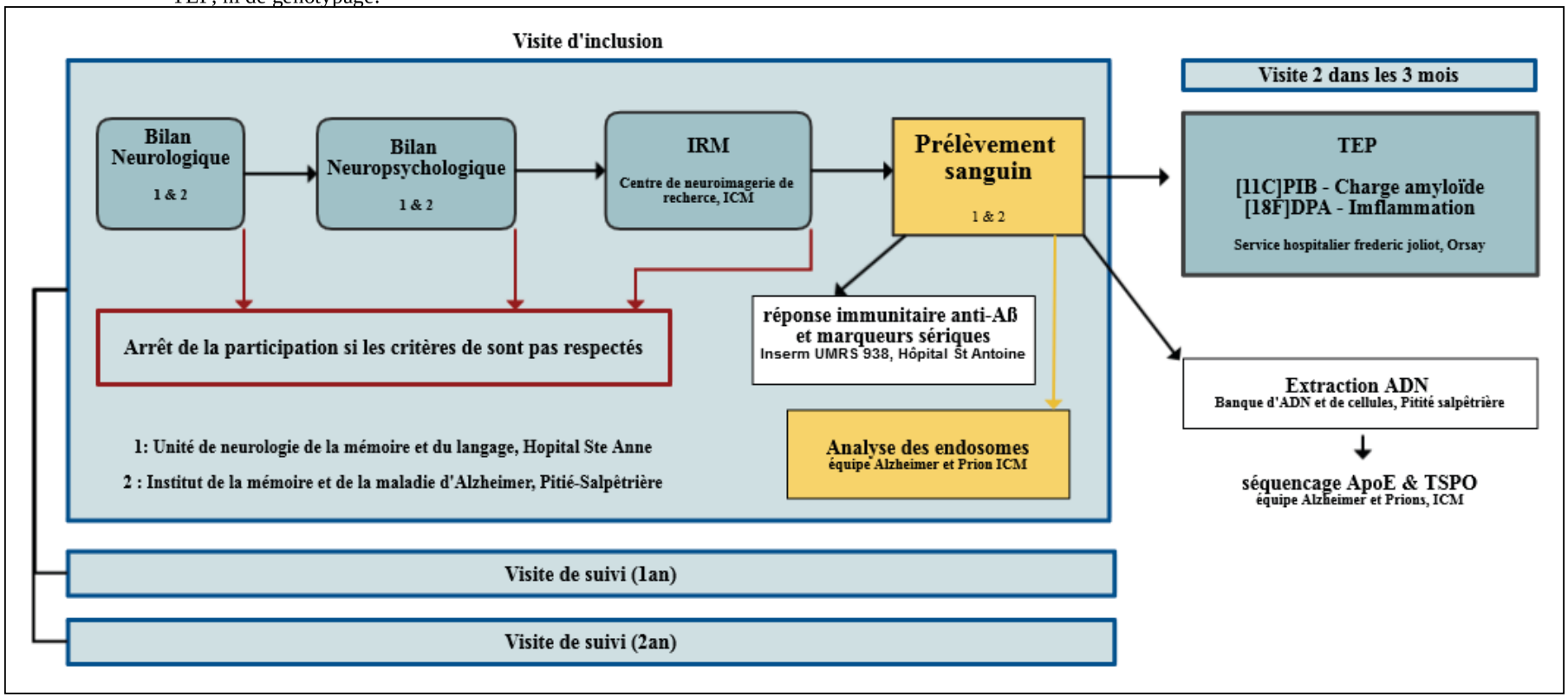
L'étude prévoit l'inclusion de 80 MA sporadiques dont 40 au stade de MCI (CDR=0,5) et 40 au stade de démence légère à modérée (CDR >0,5), qui seront comparés à 40 témoins âgés appariés en âge.

A l'inclusion (V1), après information et signature du consentement éclairé, chaque sujet a suivi le même protocole incluant :

- un bilan clinique complet ainsi qu'un bilan neuropsychologique visant à vérifier les critères d'inclusion et l'absence de critère d'exclusion (similaire à l'étude Biomage)
- Une IRM cérébrale avec séquence T1, T2 et T2* (détection des microsaignements) et des séquences de diffusion.
- Une TEP au [11C]PIB, et une TEP au [18F]DPA-714 un marqueur des TSPO (l'un des récepteurs aux benzodiazépine exprimé dans la microglie activée)
- Un prélèvement sanguin qui est réparti dans trois laboratoires (1) la banque d'ADN et de cellules de la Pitié-Salpêtrière (Prof. Brice) où est extrait l'ADN, (2) le laboratoire de neuro-immunologie et maladies conformationnelles UMRS 938, à l'hôpital St-Antoine (Prof. Aucouturier) où sont extraits et stockés les serums en vue du dosage des biomarqueurs sanguins, à la fin de la période d'inclusion. Parallèlement, cette équipe étudie la réponse immunitaire adaptative dirigée contre le peptide Aß. Enfin, (3) une partie du prélèvement arrive dans l'équipe de Marie-Claude Potier, où est étudié le compartiment endosomal.

Après cette première visite transversale, débute sur 2 ans un suivi annuel longitudinal des participants où sont proposés une évaluation clinique et neuropsychologique complète, des prélèvements sanguins adressés aux équipes (2) et (3), et une IRM cérébrale. (Figure 2.2).

Figure 2.2 : Schéma du plan expérimental simplifié de l'étude IMABIO3. En plus de la visite d'inclusion, qui comprend une évaluation clinique complète est prév
TEP au PIB et au DPA dans les 3 mois qui suivent. Deux visites de suivi sont organisées (après 1 ans et 2 ans post-inclusion). Ces visites de suivi ne comprennent
TEP, ni de génotypage.



4 Hypothèses de travail

4.1 Première étude : Analyse d'un biomarqueur cérébral de la maladie d'Alzheimer dans l'atrophie corticale postérieure (ACP)

Selon l'hypothèse amyloïde, la pathologie amyloïde joue un rôle clé et initial dans l'apparition de la MA. Un dérèglement de nature inconnue, entraîne une accumulation précoce de peptides Aß, sous l'effet d'une production plus abondante, ou d'un équilibre altéré entre les clivages alpha- ou beta-sécrétase du précurseur du peptide amyloïde, avec un effet additionnel d'une clairance diminuée (Hardy and Allsop 1991; Masters and Selkoe 2012). Lors de l'apparition des premiers signes cliniques, le marquage PIB, qui fixe les dépôts amyloïdes fibrillaires et les plaques amyloïdes, a déjà atteint une phase de plateau à laquelle sont intensité n'évolue plus beaucoup (Klunk *et al.,* 2006).

Dans les formes atypiques de MA, le diagnostic neuropathologique post-mortem est dans la grande majorité des cas celui d'une MA avec néanmoins une répartition inhabituelle des DNF (Alladi *et al.,* 2007 ; Murray et al 2011) les structures temporales internes sont épargnées ce qui soulève la question du lien entre la présentation phénotypique de la maladie et du mécanisme causal sous-jacent.

Notre objectif était d'étudier le profil des marqueurs physiopathologiques, (TEP au [11C]PIB, et biomarqueurs du LCR) dans l'ACP par comparaison aux formes typiques de MA..

En accord avec les données neuropathologique et l'hypothèse amyloïde, notre hypothèse était que l'imagerie TEP-PIB et les biomarqueurs du LCR seraient « positifs » dans l'ACP, et que la charge amyloide en TEP-PIB ne distinguerait pas les formes cliniques typiques et atypiques de MA.

4.2 Deuxième étude : Analyse des endosomes dans les cellules périphériques dans la MA sporadique

L'élargissement des endosomes est visible dans le cerveau d'individus Alzheimer, et dans le cerveau d'individus DS. Cette altération n'a pas été observée dans d'autres pathologies neurodégénératives et pourrait, dans le cerveau, être la première modification décelable avant l'apparition des dépôts amyloïdes (Cataldo *et al.*, 2000). Dans les individus DS, la fréquence des cellules présentant des endosomes élargis augmente avec l'âge.

Deux études ont rapporté l'existence d'endosomes élargis dans les modèles cellulaires de trisomie (Cataldo *et al.*, 2008; Cossec *et al.*, 2012), dans des cellules périphériques (fibroblastes et PBMC). Et un travail rapporte des endosomes élargis dans des neurones dérivés de cellules souches pluripotentes (IPS) de patients Alzheimer (Israel *et al.*, 2012).

Ces travaux suggèrent qu'aussi bien chez les individus DS que dans la MA, les cellules périphériques présentent les mêmes anomalies que celles observées dans le système nerveux central.

Notre objectif est de déterminer si les altérations du système endolysosomal cérébrales affectent également les cellules périphériques, dans la MA sporadique. Notre travail s'appuie très largement sur les caractérisations clinico-biologiques permises par l'étude IMABIO3, et compare un groupe de patients Alzheimer au stade léger du MCI (CDR=0.5) et au stade de démence (CDR>0.5) à un groupe de témoins (confirmés par un marquage PIB négatif).

Notre hypothèse est que dans la MA, les mécanismes physiopathologiques conduisant à l'apparition des lésions cérébrales s'accompagnent en périphérie, de modifications du système endolysosomal détectables par un examen cytologique.

Cette hypothèse sera vérifiée dans deux études annexes, l'une portant sur des fibroblastes cutanés de patients souffrant d'une MA et dans les lignées lymphoblastoïdes d'individus DS en comparant six individus sans MA avec six autres souffrant d'une MA.

III. Première étude :

Analyse des marqueurs physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer dans l'atrophie corticale postérieure

1 Analyse des marqueurs physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer dans l'atrophie corticale postérieure

1.1 Introduction à l'article de de Souza, Corlier *et al.,* 2011

L'atrophie corticale postérieure (ACP) se caractérise par une présentation clinique dominée par des troubles visuo-spatiaux constituant un syndrome de Bàlint (déficit neuro-visuel) souvent associé à un syndrôme de Gerstmann (indistinction droite/gauche, agraphie, acalculie, alexie), une apraxie contructive, une apraxie gestuelle reflexive et un déficit de la mémoire de travail (Mendez, Ghajarania, and Perryman 2002; McMonagle *et al.*, 2006). Les patients sont pas ou peu anosognosiques, et ont une mémoire épisodique et une capacité de jugement longtemps préservées. Lors de l'évolution de la maladie, les symptômes peuvent aussi s'accompagner d'un syndrome dysexecutif (Crutch *et al.*, 2012; McMonagle *et al.*, 2006).

Dans la MA classique, les études anatomopathologiques montrent que les DNF, la perte synaptique et la mort neuronale sont fortement corrélées à la nature et à la progression des signes cliniques (Braak et al, 1991; Delacourte et al, 2002; Jack and Holtzman 2013; Jack *et al.*, 2010; Hyman *et al.*, 2012; Querfurth and LaFerla 2010).

Dans les patients ACP, les études de corrélation clinicopathologique montrent une concentration en DNF plus importante dans les aires visuelles, et un respect relatif des aires limbiques (Alladi *et al.*, 2007; Galton *et al.*, 2000; Tang-Wai *et al.*, 2004, Murray *et al.*, 2011). Ces données suggérant que dans l'ACP aussi, la présentation phénotypique est bien corrélée avec la distribution des DNF mais qu'en revanche les dépôts amyloides [11C]PIB positifs devraient révéler un profil de distribution spatiale similaire à celui rencontré dans la MA typique.

L' objectif de notre travail était d'identifier le profil physiopathologique des patients ACP, en nous basant sur l'étude des marqueurs physiopathologiuqes : dosages des biomarqueurs du LCR (A-beta, tau, et tau

phosphorylée) et étude de la fixation du [11C]PIB cérébral, pour déterminer, si ces biomarqueurs permettent d'objectiver l'existence d'une physiopathologie compatible avec une maladie d'Alzheimer chez les individus avec un tableau clinique d'entrée dominé par une atteinte des fonctions visuo-spatiales.

Ce travail exploite les données collectées dans le cadre de l'étude clinique BIOMAGE.

1.2 Population

Neuf patients avec une Atrophie corticale postérieure (ACP), neuf patients avec une maladie d'Alzheimer appariés à l'âge et sévérité et dix témoins ont été inclus.

Les patients du groupe ACP (n = 9) répondaient aux critères d'inclusion suivants (Alladi *et al.*, , 2007; McMonagle *et al.*, , 2006) : Tous les malades avaient un tableau clinique dominé par la présence de troubles visuo-spatiaux pouvant constituer un syndrome de Bálint, et/ou de Gerstmann, avec une relative préservation de la mémoire épisodique. Tous les patients du groupe ACP avaient également une atrophie corticale mise en évidence par l'IRM et un hypométabolisme glucidique mis en évidence par la TEP au [18F]FDG, dans les deux cas prédominants dans les régions postérieures du cerveau.

Les patients du groupe MA ont été appariées au groupe ACP en fonction de l'âge, du niveau d'éducation, et de la durée de la maladie. Le diagnostic de MA a été établi selon les critères clinico-biologiques de diagnostic associant (a) un déficit mnésique défini au test de mémoire verbale, RL-RI 16 items, par un rappel libre ≤ 17/48 et un rappel total ≤ 40/48 , et (b) un profil MA des biomarqueurs du LCR défini par le ratio IATI (=Aß42/240 + 1.18 x tau) < 1 (Visser et collaborateurs 2009).

1.3 Méthodes

Les données de neuroimagerie des trois groupes de sujets ont été analysées par deux méthodes complémentaires en neuroimagerie pour la comparaison des examens TEP-PIB:

1. une analyse de groupe en utlisant le logiciel SPM5 permettant une comparaison voxel par voxel entre les groupes de sujets;

2. une analyse par volume d'intérêt (VOI) ajustée individuellement à l'atrophie corticale régionale. Cette analyse a été faite avec le logiciel Brainvisa (http://brainvisa.info) en appliquant l'atlas anatomique AAL (Automated Anatomic Labeling). La rétention du ligand est quantifiée par le potentiel de fixation du PIB (standardized uptake value ratio, SUVR) cortical global et régional.

Les analyses en neuroimagerie ont été faites en collaboration avec le Service de Médecine Nucléaire de la Salpêtrière (Dr. Marie-Odile Habert, pour l'analyse par SPM) et avec le SHFJ-CEA (Dr. Michel Bottlaender et Dr. Renaud Maroy, pour l'analyse par VOI).

Dans le cadre de ma thèse, j'ai participé aux recrutements et à l'inclusion des sujets, à l'organisation logistique de l'étude, et à la constitution de la base de données transversales. Plus spécifiquement, j'ai analysé, sous la direction du Dr Michel Bottlaender au SHFJ, l'ensemble des données en TEP-PIB par la méthode des VOIs. Cette analyse a été réalisée comme décrit ci-dessous :

Les données du TEP au [^{11}C]-PIB sont quantifiées en utilisant le cervelet comme structure cérébrale de référence. Cette methode, robuste permet de quantifier le potentiel de fixation du PIB (Standardised uptake value ratio, SUVR) du PIB (Lopresi 2005).

1.3.1 Génération des images paramétriques

Pour chaque examen une image de 20 minutes (obtenue entre 50 et 70 minutes après administration du [^{11}C]PIB) a été générée. Cette image a été normalisée, au niveau de chaque voxel, par la dose de radioactivité injectée, le poids du sujet ainsi que par la valeur moyenne de l'activité mesurée dans le cervelet. Ainsi, chaque voxel de l'image représente le SUVR du PIB.

1.3.2 Segmentation des VOIs

Les VOIs ont été délimité de manière semi-automatique sur l'image anatomique 3D de l'IRM T1 de chaque sujet, en utilisant le logiciel Brainvisa Les noyaux gris centraux ainsi que le cortex cérébral ont été segmentés. Puis les régions d'intérêts de l'atlas AAL ont été normalisées sur chaque IRM (par une transformation inverse). Pour augmenter la spécificité du signal obtenu, seule l'intersection entre la substance grise et l'atlas a été conservée. Cette méthode permet de tenir compte de l'atrophie corticale dans la création d'un masque de régions corticales indexées individuellement. Ces régions sont ensuite

rassemblées par volumes d'intérêt réunissant des grands ensembles topographiques ou fonctionnels (Figure 3.1).Les VOIs incluaient en particulier le cortex frontal, le gyrus cingulaire antérieur, moyen et postérieur, le précunéus, le cortex temporal, le cortex pariétal, le cortex occipital, le tronc cérébral et le cervelet. La région temporale inclut l'amygdale, l'hippocampe, le cortex entorhinal et les autres parties du gyrus parahippocampique.

Les images paramétriques TEP sont recalées sur les images anatomiques 3D IRM et la valeur moyenne du SUVR est déterminée pour chaque VOI.

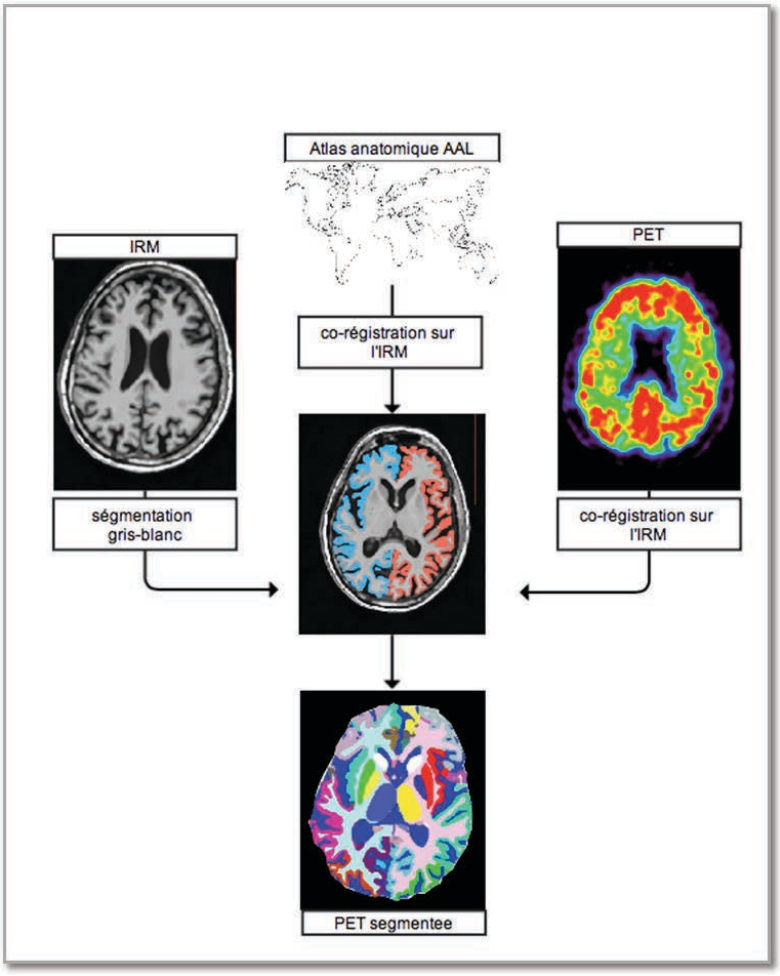


Figure 3. 1 : Calcul de l'index de fixation du PIB par volume d'intérêt (VOI). L'atlas anatomique AAL est co-régistré sur le masque de la substance grise obtenu de l'IRM. L'image paramétrique TEP est ensuite appliquée sur l'IRM et l'index du marquage PIB est déterminé par volume d'intérêt.

1.4 Resultats : Article de Souza, Corlier *et al.,* 2011 (en anglais)

doi:10.1093/brain/awr130 Brain 2011: 134; 2036–2043 | 2036

BRAIN
A JOURNAL OF NEUROLOGY

Similar amyloid-β burden in posterior cortical atrophy and Alzheimer's disease

Leonardo Cruz de Souza,[1,2,3,4,5,*] Fabian Corlier,[1,2,3,4,5,*] Marie-Odile Habert,[6,7] Olga Uspenskaya,[1,2,3,4,5] Renaud Maroy,[8] Foudil Lamari,[9] Marie Chupin,[1,2,3,4] Stéphane Lehéricy,[1,2,3,4,10] Olivier Colliot,[1,2,3,4] Valérie Hahn-Barma,[1,5] Dalila Samri,[1,5] Bruno Dubois,[1,2,3,4,5] Michel Bottlaender[8] and Marie Sarazin[1,2,3,4,5]

doi:10.1093/brain/awr130 Brain 2011: 134; 2036–2043 | 2036

BRAIN
A JOURNAL OF NEUROLOGY

Similar amyloid-β burden in posterior cortical atrophy and Alzheimer's disease

Leonardo Cruz de Souza,[1,2,3,4,5,*] Fabian Corlier,[1,2,3,4,5,*] Marie-Odile Habert,[6,7] Olga Uspenskaya,[1,2,3,4,5] Renaud Maroy,[8] Foudil Lamari,[9] Marie Chupin,[1,2,3,4] Stéphane Lehéricy,[1,2,3,4,10] Olivier Colliot,[1,2,3,4] Valérie Hahn-Barma,[1,5] Dalila Samri,[1,5] Bruno Dubois,[1,2,3,4,5] Michel Bottlaender[8] and Marie Sarazin[1,2,3,4,5]

1 Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle Épinière, UMR-S975, 47-83 bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France
2 Inserm, U975, 47-83 bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France
3 CNRS, UMR 7225, 47-83 bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France
4 Institut du Cerveau et de la Moelle Épinière, ICM, 47-83 bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France
5 Alzheimer Institute; Research and Resource Memory Centre; Centre de Référence de Démences Rares, Centre de référence maladie d'Alzheimer jeune, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, 47-83 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France
6 AP-HP, Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service de Médecine Nucléaire, 47-83 bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France
7 Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, INSERM, UMR-S 678, 47-83 bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France
8 CEA, DSV, I2BM, Service Hospitalier Frédéric Joliot, 4, place du Général Leclerc, 91401 Orsay, France
9 Department of Metabolic Biochemistry, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, 47-83 bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France
10 Centre de Neuroimagerie de Recherche – CENIR and Department of Neuroradiology, Pitié-Salpêtrière Hospital, 47-83 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

*These authors contributed equally to this work.

Correspondence to: Dr Marie Sarazin,
Fédération des maladies du Système Nerveux,
Research and Resource Memory Centre,
Pavillon Jean Lhermitte,
Hôpital de la Salpêtrière,
47 Boulevard de l'Hôpital,
75013 Paris,
France
E-mail: marie.sarazin@psl.aphp.fr

While the clinical presentation of posterior cortical atrophy is clearly distinct from typical Alzheimer's disease, neuropathological studies have suggested that most patients with posterior cortical atrophy have Alzheimer's disease with an atypical visual presentation. We analysed *in vivo* pathophysiological markers of Alzheimer's disease such as cerebrospinal fluid biomarkers and positron emission tomography imaging with ^{11}C-labelled Pittsburgh compound-B in posterior cortical atrophy to determine whether biochemical profile and fibrillar amyloid-β burden topography are associated with the clinical presentation. Nine patients with posterior cortical atrophy and nine with typical Alzheimer's disease individually matched for age, duration and severity of the disease and 10 cognitively normal age-matched controls were included. ^{11}C-labelled Pittsburgh compound-B images were analysed both using volumes of interest and on a voxel-wise basis using statistical parametric mapping, taking into account the individual regional cortical atrophy. Cerebrospinal fluid biomarkers did not differ between posterior cortical atrophy and patients with Alzheimer's disease. Compared with normal controls, both posterior cortical atrophy and Alzheimer's disease

Received February 16, 2011. Revised April 7, 2011. Accepted April 18, 2011
© The Author (2011). Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain. All rights reserved.
For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Downloaded from brain.oxfordjournals.org at BIUSJ (Paris 6) on August 1, 2011

groups showed increased ^{11}C-labelled Pittsburgh compound-B uptake. No significant difference was found in regional or global ^{11}C-labelled Pittsburgh compound-B binding between posterior cortical atrophy and Alzheimer's disease groups with both volumes of interest and voxel-wise basis using statistical parametric mapping methods. Our findings demonstrate that cerebrospinal fluid biomarkers and positron emission tomography imaging with ^{11}C-labelled Pittsburgh compound-B may be useful in identifying an atypical visual form of Alzheimer's disease. The similar topography of fibrillar amyloid-β deposition between typical Alzheimer's disease and posterior cortical atrophy groups suggests that, although amyloid-β accumulation plays a critical role in the pathogenesis of Alzheimer's disease, other factors such as neurofibrillary tangles may contribute to the different clinical features observed in posterior cortical atrophy.

Keywords: Alzheimer's disease; posterior cortical atrophy; Pittsburgh compound-B

Abbreviations: ^{11}C-PIB = ^{11}C-labelled Pittsburgh compound-B; PCA = posterior cortical atrophy

Introduction

Posterior cortical atrophy (PCA) can be defined as an atypical form of Alzheimer's disease, as shown by neuropathological studies (Renner *et al*., 2004; Tang-Wai *et al*., 2004; Alladi *et al*., 2007). However, the clinical presentation of PCA is clearly distinct from typical Alzheimer's disease (Dubois *et al*., 2010). In PCA, disease onset is characterized by visual disturbances, followed by an impairment of visuospatial skills, while episodic memory is relatively spared (McMonagle *et al*., 2006). Neuroimaging shows atrophy and hypoperfusion/hypometabolism that predominates in the parieto-occipital cortex regions (Lehmann *et al*., 2009), with a relative sparing of the temporal regions (Aharon-Peretz *et al*., 1999; Nestor *et al*., 2003). This clinical presentation contrasts with typical Alzheimer's disease, which is characterized by an early episodic memory deficit associated with prominent medial temporal lobe atrophy.

Pathophysiological markers can help identify the underlying aetiology of PCA (Dubois *et al*., 2010). CSF biomarker levels are considered to reflect Alzheimer pathology and can be useful in isolating patients with an atypical Alzheimer's disease phenotype (Baumann *et al*., 2010; de Souza *et al*., 2011). ^{11}C-labelled Pittsburgh compound-B (^{11}C-PIB)-PET scanning measures the fibrillar amyloid-β deposition (Ikonomovic *et al*., 2008). Only two cases of PCA have been published with details of ^{11}C-PIB binding showing a high amyloid-β burden in the occipital cortex (Ng *et al*., 2007; Migliaccio *et al*., 2009), which is not the most affected region in Alzheimer's disease (Kemppainen *et al*., 2006). Better characterization of CSF and PET amyloid deposition profiles in patients with PCA would improve diagnosis and facilitate inclusion in clinical trials of Alzheimer's disease-modifying drugs.

We aimed to analyse both CSF biomarkers and ^{11}C-PIB-PET profiles in subjects with PCA. Because PCA and Alzheimer's disease are likely to have the same underlying neuropathological process, we hypothesize that the two groups would present similar CSF and PIB binding patterns. Therefore, we studied the topography of amyloid deposition in PCA compared with Alzheimer's disease to examine whether the different clinical presentations of PCA and typical Alzheimer's disease were associated with a distinct distribution and burden of fibrillar amyloid-β deposition.

Materials and methods

Subjects

Nine patients with PCA were enrolled on the basis of following diagnostic criteria (McMonagle *et al*., 2006; Alladi *et al*., 2007): (i) insidious onset and gradual progression of cognitive impairment beginning with visual complaints; (ii) presentation with visuospatial deficits with intact primary visual function; (iii) features suggestive of Bálint's syndrome (optic ataxia, ocular apraxia and simultagnosia) associated or not with Gerstmann's (acalculia, agraphia, left–right disorientation and finger agnosia) syndrome; (iv) proportionally less episodic memory impairment; (v) relatively preserved insight; and (vi) glucose hypometabolism on ^{18}F-fluorodeoxyglucose-PET examination and prominent cortical atrophy in the posterior cortical region on MRI. A complete Bálint's syndrome was observed in seven of nine patients with PCA, while incomplete Bálint's syndrome was present in two of nine subjects (isolated simultagnosia for one patient, and simultagnosia with oculomotor apraxia for the other). In addition, complete Gerstmann's syndrome was observed in three of nine patients with PCA; incomplete Gerstmann's syndrome was present in six of nine patients. Ideomotor apraxia, acalculia, agraphia and environmental disorientation were observed for eight of nine patients, visual agnosia, hemineglect and finger agnosia were present in seven of nine patients and dressing apraxia in five of nine patients with PCA (refer to Supplementary Table 1 for details).

Nine typical patients with Alzheimer's disease were individually matched with subjects with PCA for age, duration of disease and disease severity assessed by the Clinical Dementia Rating scale score. Individual matching was used to avoid a selection bias caused by these parameters. All subjects with Alzheimer's disease were selected according to the New Research Criteria (Dubois *et al*., 2007, 2010), which include (i) progressive episodic memory impairment, characterized by a low free recall not normalized with cueing; (ii) CSF Alzheimer's disease profile, defined as score below 0.8 for the ratio of amyloid-β_{42}:tau, calculated with the formula amyloid-β_{42}/[240 + (1.18 × T-tau)] (Visser *et al*., 2009); and (iii) clinical dementia rating scale $\geqslant$0.5.

Ten healthy elderly controls were recruited for the study according to the following criteria: (i) Mini-Mental State Examination score $\geqslant$28/30 and clinical dementia rating scale = 0; (ii) no history of neurological or psychiatric disorders; and (iii) no memory complaint or cognitive deficit.

Subjects were not included in the study if they presented any of the following criteria: (i) systemic illnesses that could interfere with

Downloaded from brain.oxfordjournals.org at BIUSJ (Paris 6) on August 1, 2011

cognitive functioning; (ii) extrapyramidal signs or neurological history suggestive of Parkinson's disease with dementia, progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration or dementia with Lewy bodies; (iii) vascular lesions on MRI or neurological history suggestive of vascular dementia; or (iv) depression assessed with a score >20 on the Montgomery-Asberg Depression Rating Scale (MADRS; Montgomery and Asberg, 1979).

Blood samples were drawn to characterize APOE genotypes. The controls underwent the same procedures as did the patients with PCA and Alzheimer's disease, except for lumbar puncture, which was not proposed due to ethical reasons.

The study was conducted by the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM; ANR-07-LVIE-002-01) and was approved by the Ethics Committee of Pitié-Salpêtrière Hospital. All subjects provided written informed consent before participating.

Clinical, functional and cognitive assessment

All subjects (healthy controls, Alzheimer's disease and PCA) underwent a clinical and neuropsychological examination that included the Mini-Mental State Examination (Folstein *et al.*, 1975), the clinical dementia rating scale (Morris, 1993) and tests for assessing verbal episodic memory, executive functions, working memory, gesture praxis and visuoconstructive function. In addition, subjects with PCA underwent a specific 'posterior neuropsychological battery' assessing hemineglect, spatial disorientation, body schema distortion, Bálint's and Gerstmann's syndromes (Kas *et al.*, 2011).

Cerebrospinal fluid biomarker analysis

CSF samples obtained by lumbar puncture were processed with the same procedures described previously (de Souza *et al.*, 2011) to obtain CSF levels of total tau (T-tau), phosphorylated tau at threonine 181 (P-Tau) and amyloid-β peptide 1-42 (amyloid-β_{42}) by using enzyme-linked immunosorbent assay kits (Innogenetics), according to the manufacturer's instructions. All operators were blind to clinical information.

Magentic resonance imaging procedure

In each participant, the imaging data were collected using a 3 T Siemens 32-channel TRIO TIM system using 12-channel head coil for signal reception. The MRI examination included a 3D T_1-weighted volumetric magnetization-prepared rapid-gradient echo sequence with repetition time = 2300 ms, echo time = 3.43 ms, inversion time = 900, 256 × 256 matrix, axial field of view and slice thickness 1 mm. This sequence provided a high grey/white matter contrast-to-noise ratio and allowed for excellent segmentation and accurate coregistration with the PET images.

Positron emission tomography imaging procedure

Data acquisition

PET examinations were performed with a High Resolution Research Tomograph (HRRT, Siemens Medical Solution), the camera with the highest available spatial resolution for brain imaging. The spatial resolution for the HRRT scanner was 2.5 mm with an absolute sensitivity of 6% for a point source in the centre of the field of view. The HRRT had an axial field of view of 25 cm and a transaxial field of view of 31.2 cm. It allowed the reconstruction of 207 slices of 1.1 mm thickness. Subjects were positioned in the tomograph with the head maintained using an individually moulded head holder. A 6-min brain transmission scan was performed before injection of each radioligand using a ^{137}Cs point source to correct the emission scan for tissue attenuations. ^{11}C-PIB (mean 364 ± 47 MBq) was injected intravenously, and PET acquisitions lasted 90 min. Twenty-five images were reconstructed with a scan duration starting from 1 min and increasing up to 10 min during the experiment. All images were reconstructed with an accelerated list-mode, ordinary Poisson ordered-subset expectation maximization (OP-OSEM) algorithm, including an experimental stationary model of the scanner spatial resolution that allowed for a lowering or the statistical noise at the voxel level in the reconstructed images without degrading spatial resolution (Sureau *et al.*, 2008). This method improved quantitative accuracy by reducing the partial volume effects.

Volume of interest analysis

Parametric images were created using Brainvisa software (http://brainvisa.info). The cerebellum was used as a reference region in the analysis because this region has been found to be spared from amyloid plaque accumulation (Joachim *et al.*, 1989). Standard uptake value parametric images were constructed on late images over 50–70 min because this time schedule has been shown to be more accurate (Lopresti *et al.*, 2005). Standard uptake value-ratio parametric images were constructed by dividing each pixel by the corresponding value obtained in the cerebellum. The parametric images were coregistered individually with the corresponding 3D magnetic resonance T_1 images using the Brainvisa software.

All volumes of interests were delineated on the individual MRI scans for each subject as described below.

Segmentation: the T_1 weighted images were segmented with the Brainvisa software. The cortical and sub-cortical grey matter, white matter and cerebellum were delineated using histogram analysis, threshold methods and morphological operators. A parcellation of the cortex into 76 structures was then performed in three steps: (i) non-linear registration of the subject's segmented cortex on the Montreal Neurological Institute grey matter template and application of the inverse transformation to the Automated Anatomic Labeling atlas; (ii) masking of this resampled volume of labels by the segmented cortex structure and filling of the cortex mask using a Voronoi diagram; and (iii) minimization of the gyri interface distance to the nearest sulci bottoms extracted using a regional deformable model. The amygdala and hippocampi were automatically segmented in each individual using the T_1-weighted MRIs and the SACHA software (Chupin *et al.*, 2009).

Automated Anatomic Labeling segmentation provided values of ^{11}C-PIB fixation in 76 anatomical regions. The volumes of interest were defined separately for the left and right hemispheres and were pooled into greater anatomical regions based on anatomical relationships to obtain a mean ^{11}C-PIB-standard uptake value-ratio for each region, as described in the legend of Fig. 1. As a measure of global amyloid burden, we calculated a ^{11}C-PIB global index, representing the subject's mean standard uptake value-ratio in all the defined regions (Fig. 1).

Voxel-based analysis and preprocessing

MRI data were spatially normalized using SPM5 (Wellcome Trust Centre for Neuroimaging) and the Montreal Neurological Institute template, and then segmented to isolate the grey matter partition. In an effort to avoid a bias group effect resulting from spatial normalization, the procedure included the creation of a customized template

Downloaded from brain.oxfordjournals.org at BIUSJ (Paris 6) on August 1, 2011

Table 1 Demographic and clinical data of studied groups

	PCA	Alzheimer's disease	Controls
Number of subjects	9	9	10
Female/male	7/2*	6/3	2/8
Age (years)	62.9 ± 3.5 (59.5–69)	62.0 ± 2.7 (58–65.5)	65.8 ± 6.8 (59–75.5)
Education (years)	12.6 ± 2.6[§] (9–15)	14.7 ± 1.0 (12–15)	13.3 ± 2.35 (9–15)
Disease duration (years)	2.1 ± 1.8 (1–6)	2.6 ± 1.3 (1–5)	–
Mini-Mental State Examination	17.1 ± 5.9** (9–27)	19.4 ± 3.8** (15–25)	29.2 ± 1.0 (27–30)
Clinical dementia rating scale	0.5, $n = 3$	0.5, $n = 4$	0 for all subjects
	1, $n = 3$	1, $n = 3$	
	2, $n = 3$	2, $n = 2$	
Amyloid-β42 (pg/ml)	303 ± 73 (209–400)	236 ± 92 (125–386)	NA
T-tau (pg/ml)	511 ± 290 (319–1183)	540 ± 266 (175–1106)	NA
P-tau (pg/ml)	76 ± 34 (45–143)	86 ± 28 (29–123)	NA
Ratio of amyloid-β_{42}:Tau	0.4 ± 0.1 (0.2–0.6)	0.3 ± 0.1 (0.1–0.4)	NA

Data are presented as mean ± standard deviation (min–max).
[§]$P < 0.05$ versus Alzheimer's disease subjects; *$P < 0.05$ versus controls; **$P < 0.001$ versus controls. NA = not applicable.

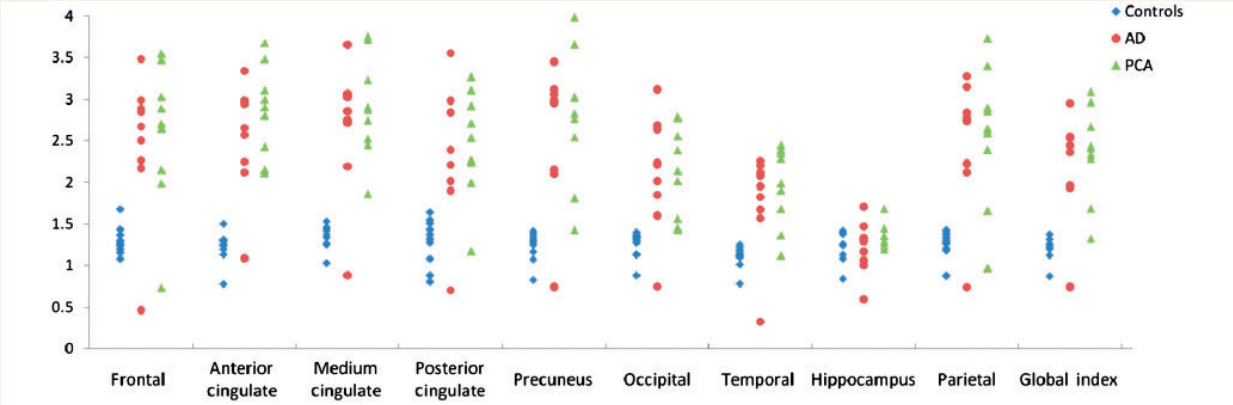


Figure 1 Scatter plots showing ^{11}C-PIB-standard uptake value-ratio in anatomical regions across groups [healthy controls (diamonds), Alzheimer's disease (circles), PCA (triangles)]. Anatomical regions were pooled from volumes of interests provided by Automated Anatomic Labeling segmentation and were defined as the following: (i) frontal cortex by grouping orbitofrontal, polar prefrontal and dorsolateral cortex; (ii) anterior cingulate; (iii) medium cingulated; (iv) posterior cingulate; (v) precuneus; (vi) occipital cortex by grouping calcarine cortex, occipital cortex and cuneus; (vii) temporal cortex by grouping anterior and lateral temporal cortex; (viii) hippocampus; and (ix) parietal cortex by grouping inferior and superior parietal cortex and the parietotemporal junction. The ^{11}C-PIB global index representing the subject's mean standard uptake value-ratio in the regions is described above. AD = Alzheimer's disease.

of the grey matter using the MRI data from the whole combined patient and control samples ($n = 28$). Grey matter data were then renormalized using this customized template. A whole grey matter mask was obtained by thresholding the grey matter density average image above a value of 0.2, corresponding to a 20% chance that the voxel belongs to the grey matter (Chetelat *et al.*, 2008).

Four ^{11}C-PIB PET frames of 5 min each from 50 to 70 min post-injection were realigned with SPM5, and a mean volume was calculated from these four frames for each subject. The mean ^{11}C-PIB-PET volumes were then coregistered to their corresponding MRI and spatially normalized, applying the transformation parameters obtained from MRI normalization. A partial volume effect was minimized by (i) the reconstruction algorithm described above (Sureau *et al.*, 2008); and (ii) by multiplying each normalized mean ^{11}C-PIB image by its corresponding whole grey matter mask. Each partial volume effect corrected ^{11}C-PIB image was then divided by its corresponding mean cerebellum PIB standard uptake value, resulting in parametric standard uptake value-ratio images. The mean cerebellum activity was obtained from a custom mask drawn on the Montreal Neurological Institute single subject MRI provided by SPM. The PIB-standard uptake value-ratio images were then smoothed (full width at half maximum = 10 mm).

Statistical analysis

The clinical data, CSF biomarker levels, mean ^{11}C-PIB-standard uptake value-ratio in each volume of interest and global PIB index group were compared between the PCA, Alzheimer's disease and healthy controls groups using a non-parametric Kruskal–Wallis one-way analysis of variance. The homogeneity of variances was assessed with the Levene and

Downloaded from brain.oxfordjournals.org at BIUSJ (Paris 6) on August 1, 2011

Brown-Forsythe tests. The Bonferroni correction for multiple comparisons was applied. The chi-square test was used to compare gender ratios. An alpha (significance) level of 0.05 was chosen. All statistical analyses were performed using PASW Statistics 18 (© SPSS Inc). For SPM analyses, the statistical threshold was set at $P < 0.001$, and false discovery rate corrected.

Results

Subjects characteristics

Clinical characteristics of subjects with PCA, Alzheimer's disease and healthy controls are presented in Table 1. The Mini-Mental State Examination score did not differ between the PCA and Alzheimer's disease groups, whereas both groups significantly differed from the healthy control group ($P < 0.001$).

Cerebrospinal fluid biomarker analysis

CSF biomarker levels in the PCA and Alzheimer's disease groups are presented in Table 1. No statistical differences were found between the PCA and Alzheimer's disease groups for amyloid-β_{42}, T-tau, P-tau levels or for the amyloid-β_{42}:Tau ratio. In accordance with the inclusion criteria, individual analysis showed that all patients with Alzheimer's disease had abnormal ratios of amyloid-β_{42}:Tau. All patients with PCA had a CSF Alzheimer's disease profile, and the highest amyloid-β_{42}:Tau ratio observed in this group was 0.6.

Pittsburgh compound-B: region of interest analysis

The Alzheimer's disease and PCA groups showed higher global ^{11}C-PIB index and higher ^{11}C-PIB uptake values in all regions of interest when compared with normal controls, except for the hippocampal region (Table 2). The mean PIB indices were identical in the PCA and Alzheimer's disease groups, and no significant differences in regional PIB uptake were detected between both groups in any region of interest.

Individual analysis showed that one patient with Alzheimer's disease had no significant ^{11}C-PIB uptake regardless of the region studied. This 65-year-old female had a typical clinical history of Alzheimer's disease, with onset of memory deficit 2 years before inclusion in the study. The Mini-Mental State Examination was 19/30, and the clinical dementia rating scale was 0.5. The CSF analysis revealed a biological profile of Alzheimer's disease with a low amyloid-β_{42} level (125 pg/ml) and an unusually high increase of T-tau (1016 pg/ml) and P-tau (123 pg/ml) levels. The EEG was normal. The clinical follow-up (18 months) was in agreement with the diagnosis. There was no argument for a frontotemporal dementia on clinical and neuroimaging investigations (MRI and fluorodeoxyglucose-PET). A 60-year-old female with PCA (Mini-Mental State Examination = 14; clinical dementia rating scale = 1) had a global ^{11}C-PIB index overlapping with the highest score measured in controls, although regional analysis showed a high ^{11}C-PIB uptake in the anterior and medium cingulate and occipital cortices. The CSF biomarkers showed a low amyloid-β_{42} level (246 pg/ml) with normal T-tau (336 pg/ml) and high P-tau levels (67 pg/ml) and an abnormal ratio of amyloid-β_{42}:Tau (0.38).

Pittsburgh compound-B: voxel-wise comparisons

Compared with normal controls, patients with Alzheimer's disease showed significant symmetrical ^{11}C-PIB binding throughout the frontal and parietal cortices, precuneus and cingulate regions (Fig. 2A), and patients with PCA showed diffuse and symmetric ^{11}C-PIB binding in the frontal, parietal, temporal cortices, cingulate and precuneus (Fig. 2B). Direct SPM comparison of the two patient groups showed no voxel in which PIB uptake was greater in one or another group, even at a lower threshold of $P < 0.001$ uncorrected for multiple comparisons.

Discussion

In our study, we used CSF biomarkers and ^{11}C-PIB-PET amyloid binding, which are markers of Alzheimer's disease lesions, to

Table 2 Neocortical mean (±SD) ^{11}C-PIB standard uptake value-ratio in anatomical regions

	Healthy controls ($n = 10$)	Alzheimer's disease ($n = 9$)	PCA ($n = 9$)
Frontal	1.30 (±0.17)	2.66 (±0.97)*	2.57 (±0.86)* NS
Anterior cingulate	1.23 (±0.19)	2.69 (±0.73)*	2.85 (±0.55)* NS
Medium cingulate	1.32 (±0.17)	2.79 (±0.86)*	2.89 (±0.61)* NS
Posterior cingulate	1.29 (±0.29)	2.53 (±0.84)*	2.47 (±0.64)* NS
Precuneus	1.24 (±0.18)	2.79 (±0.88)*	2.79 (±0.80)* NS
Occipital	1.26 (±0.16)	2.23 (±0.72)*	2.12 (±0.54)* NS
Temporal	1.11 (±0.13)	1.88 (±0.63)*	1.95 (±0.48)* NS
Hippocampus	1.24 (±0.20)	1.22 (±0.31)	1.36 (±0.16) NS
Parietal	1.26 (±0.15)	2.66 (±0.83)*	2.57 (±0.84)* NS
Global index	1.22 (±0.15)	2.37 (±0.71)*	2.35 (±0.57)* NS

*Significant ($P < 0.001$) when compared with healthy group; NS = non-significant ($P > 0.05$) when compared with Alzheimer's disease group.

Downloaded from brain.oxfordjournals.org at BIUSJ (Paris 6) on August 1, 2011

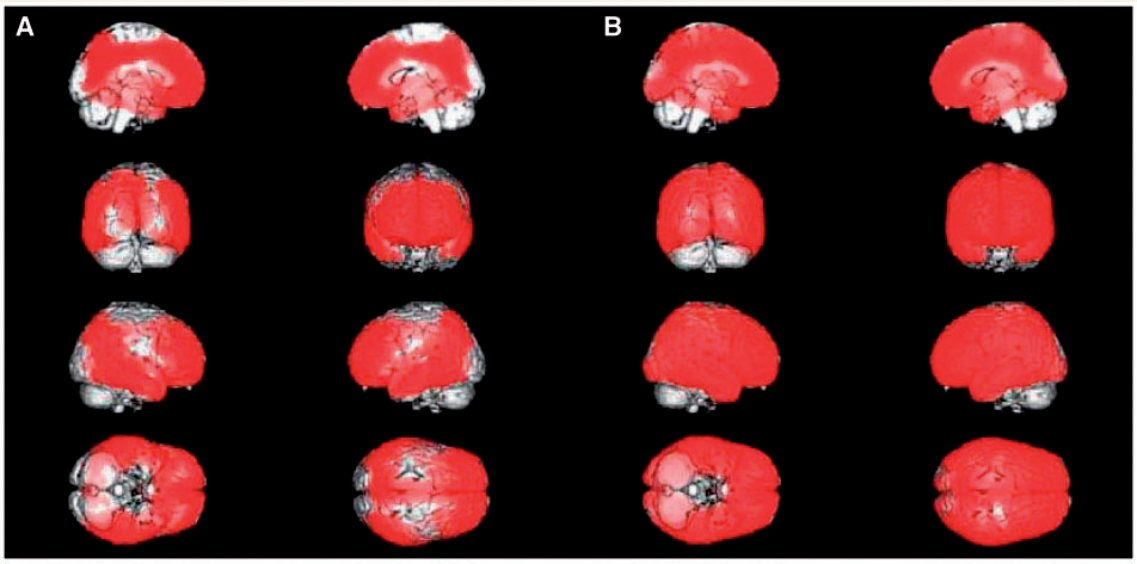


Figure 2 Topography of ^{11}C-PIB standard uptake value-ratio in the grey matter of nine patients with Alzheimer's disease (**A**) and in the grey matter of nine patients with PCA (**B**) compared with 10 normal healthy controls. In both the Alzheimer's disease and PCA group, increased ^{11}C-PIB standard uptake value-ratio involves widespread areas in the frontal, parietal, temporal and posterior cingulate cortices (significance threshold set at $P < 0.001$ corrected for false discovery rate).

investigate *in vivo* the neuropathological process of patients with PCA. The positivity of both pathophysiological markers indicated the presence of Alzheimer pathology in favour of the diagnosis of atypical Alzheimer's disease. In addition, using two different methods of analysis, no difference in the load and topography of amyloid-β deposition assessed by ^{11}C-PIB-PET was observed between the PCA and Alzheimer's disease groups, suggesting that amyloidosis cannot explain the differences in the Alzheimer's disease/PCA clinical presentations.

PCA is a rare disease, and we included a small number of patients in our analysis. To avoid selection bias, we individually matched each patient with PCA with a patient with Alzheimer's disease for age, duration of disease and disease severity. Patients with PCA had a similar profile of CSF biomarkers as compared with patients with Alzheimer's disease. Neuropathological studies demonstrated that the combination of amyloid-β_{42}, T-tau and P-tau levels in ante-mortem CSF predicted the presence of Alzheimer's disease-associated pathological changes with high accuracy, supporting the idea that these CSF changes are a surrogate marker for the diagnosis of Alzheimer's disease (Bian *et al*., 2008; Tapiola *et al*., 2009). Previous studies have also suggested that CSF biomarkers may be useful to identify *in vivo* atypical focal forms of Alzheimer's disease such as PCA (Baumann *et al*., 2010; de Souza *et al*., 2011), although these observations were not supported by ^{11}C-PIB-PET or autopsy data. The present study extends these results by providing molecular imaging support.

PIB binding is highly selective for insoluble fibrillar amyloid-β deposits. Direct correlation of *in vivo* ^{11}C-PIB retention with quantitative analyses of amyloid-β plaques was demonstrated in a post-mortem study (Ikonomovic *et al*., 2008) and supports the validity of ^{11}C-PIB-PET imaging as a method for the *in vivo* evaluation of amyloid-β plaque burden. High PIB uptake was observed in 80–100% of patients with Alzheimer's disease (Rowe *et al*., 2007; Rabinovici *et al*., 2010). In the current study, the CSF diagnosis of Alzheimer's disease in the PCA group was in accordance with the ^{11}C-PIB-PET imaging showing higher ^{11}C-PIB binding in subjects with PCA as compared with controls, and similar PIB binding as compared with patients with Alzheimer's disease. One subject with PCA had a PIB index that overlapped with the control values, although the subject had a biological CSF diagnosis of Alzheimer's disease. Interestingly, regional analysis showed high PIB binding in the anterior and median cingulate regions and a milder increase in the occipital cortex. One patient with Alzheimer's disease did not show evidence of elevated ^{11}C-PIB binding, despite having the typical Alzheimer's disease clinical presentation and CSF biomarkers profile. Failure of ^{11}C-PIB to detect amyloid-β pathology in Alzheimer's disease has already been reported (Rabinovici *et al.*, 2010.), even in one patient with a pathological confirmation of Alzheimer's disease (Cairns *et al*., 2009).

Taken together, CSF biomarkers and ^{11}C-PIB-PET provided arguments to establish *in vivo* the diagnosis of atypical Alzheimer's disease in patients with PCA. Clinicopathological investigations have demonstrated that Alzheimer's pathology is the most frequent cause of PCA, accounting for 80–100% of all cases (Renner *et al*., 2004; Tang-Wai *et al*., 2004; Alladi *et al*., 2007). Other diagnoses such as Lewy-body dementia, corticobasal degeneration and Creutzfeldt–Jakob (Renner *et al*., 2004) are rare. The fact that all patients with PCA in our study had no parkinsonism and had a disease onset characterized by visual disturbance could explain the homogeneity of our data. Future

Downloaded from brain.oxfordjournals.org at BIUSJ (Paris 6) on August 1, 2011

studies including autopsy diagnoses are needed to confirm our findings.

An unresolved challenge remains how to explain the differences in clinical presentation between PCA and Alzheimer's disease despite a similar burden of amyloidosis. PCA is characterized by early higher order visual deficits (Benson *et al.*, 1988). Patients develop features of Bálint's syndrome (ocular apraxia, optic ataxia and simultanagnosia), Gerstmann's syndrome (acalculia, agraphia, finger agnosia, and left–right disorientation), visual agnosia and transcortical sensory aphasia, whereas episodic memory is preserved or only mildly impaired. Structural and functional neuroimaging has also demonstrated parieto-occipital atrophy and hypoperfusion/hypometabolism in a focal pattern that is clearly different from Alzheimer's disease (Nestor *et al.*, 2003; Schmidtke *et al.*, 2005; Lehmann *et al.*, 2009; Kas *et al.*, 2011).

One way to understand this singular clinical presentation of PCA is to assess the amyloid topography between both diseases in order to evaluate whether amyloidosis is related to the atypical visual form of Alzheimer's disease. Descriptive data about ^{11}C-PIB binding in PCA are scarce. In two PCA cases, ^{11}C-PIB uptake was increased in the occipital (Ng *et al.*, 2007) and right calcarine cortices (Kambe *et al.*, 2010). We did not confirm higher ^{11}C-PIB uptake in the posterior cortical regions with our larger sample of nine patients with PCA who fulfilled strict inclusion criteria. No significant differences in ^{11}C-PIB burden and distribution between patients with PCA and Alzheimer's disease were observed either using a region of interest method or a voxel-based approach. The absence of a relationship between the clinical symptoms of Alzheimer's disease and amyloid deposition is supported by several arguments: (i) PIB binding in Alzheimer's disease was not correlated with the severity of dementia assessed by the Mini-Mental State Examination (Engler *et al.*, 2006) or the clinical dementia rating scale (Jack *et al.*, 2009); (ii) amyloid deposition remains stable during Alzheimer's disease follow-up (2 years) despite further decreases in cognitive function and cortical glucose metabolism (Engler *et al.*, 2006); (iii) the differences in clinical presentation between the early and late onset Alzheimer's disease groups was not related to amyloid burden (Rabinovici *et al.*, 2010); and (iv) the progression of the amyloid deposition in the human brain (from neocortical regions to cerebellum) does not correspond to the clinical progression of symptoms in Alzheimer's disease (Thal *et al.*, 2002).

The similar topography of fibrillar amyloid-β deposition between typical Alzheimer's disease and PCA groups provides support for the model in which amyloidosis plays a critical role in Alzheimer's disease pathogenesis. Other factors such as neurofibrillary tangles may contribute to the atypical visual clinical presentation (Jack *et al.*, 2002; Csernansky *et al.*, 2004). Indeed, autopsies have reported a greater density of neurofibrillary tangles in PCA than in Alzheimer's disease; these are most notable in the primary visual and visual associative cortex. Autopsies have also found a smaller density of tangles in the hippocampus and subiculum, with a similar density of senile plaques in cortical areas (Tang-Wai *et al.*, 2004).

To conclude, we hypothesize that amyloid-β pathology in PCA occurs at an early phase of the disease, similar to the timing seen in typical Alzheimer's disease, and that the clinical presentation of PCA may result from an interaction with tau-pathology. Because PCA is similar to Alzheimer's disease in terms of amyloid-β pathology but differs in its tau-pathology progression, PCA provides a model to study *in vivo* the interaction between amyloid and tau pathology, an interaction that is still poorly understood.

^{11}C-PIB-PET and CSF biomarkers have the potential to identify candidate patients with PCA who may benefit from specific therapeutic strategies targeting amyloid-β metabolism. The therapeutic windows during which treatment should be initiated should be discussed with regard to the present data, which provide support for early therapeutic interventions.

Acknowledgements

We are greatly indebted to the chemical/radiopharmaceutical and nursing staff of Service Hospitalier Frédéric Joliot for the synthesis of the ^{11}C-PIB and patient management, respectively.

Funding

French agence Nationale de la Recherche (ANR) under reference ANR-07-LVIE-002-01, French Fondation Nationale de Gerontologie and MEDIAPART; 'Fondation pour la Recherche Médicale' (to L.C.dS.). During the two last years, Dr L.C.dS. has collaborated with the pharmaceutical company Lundbeck; European Federation of Neurological Societies (EFNS to Dr O.U.). Mr F.C., Dr M.-O.H., Dr O.U., Dr R.M., Dr F.L., Dr O.C., Ms D.S. and Mrs V.H.-B. report no conflict of interest. During the two last years, Dr M.C. and Pr S.L. have collaborated with the pharmaceutical company EISAI. During the two last years, Pr B.D. has collaborated with the pharmaceutical companies EISAI, Novartis, Roche, Bristol-Mayer-Squib, Servier. During the two last years, Dr M.B. has collaborated with the pharmaceutical company IPSEN-BEAUFOUR. During the two last years, Dr M.S. has collaborated with the pharmaceutical companies EISAI, Novartis, Pfizer, Lundbeck.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain* online.

References

Aharon-Peretz J, Israel O, Goldsher D, Peretz A. Posterior cortical atrophy variants of Alzheimer's disease. Dement Geriatr Cogn Disord 1999; 10: 483–7.

Alladi S, Xuereb J, Bak T, Nestor P, Knibb J, Patterson K, et al. Focal cortical presentations of Alzheimer's disease. Brain 2007; 130: 2636–45.

Baumann TP, Duyar H, Sollberger M, Kuhle J, Regeniter A, Gomez-Mancilla B, et al. CSF-tau and CSF-Abeta(1-42) in posterior cortical atrophy. Dement Geriatr Cogn Disord 2010; 29: 530–3.

Benson DF, Davis RJ, Snyder BD. Posterior cortical atrophy. Arch Neurol 1988; 45: 789–93.

Downloaded from brain.oxfordjournals.org at BIUSJ (Paris 6) on August 1, 2011

Bian H, Van Swieten JC, Leight S, Massimo L, Wood E, Forman M, et al. CSF biomarkers in frontotemporal lobar degeneration with known pathology. Neurology 2008; 70: 1827–35.

Cairns NJ, Ikonomovic MD, Benzinger T, Storandt M, Fagan AM, Shah AR, et al. Absence of Pittsburgh compound B detection of cerebral amyloid beta in a patient with clinical, cognitive, and cerebrospinal fluid markers of Alzheimer disease: a case report. Arch Neurol 2009; 66: 1557–62.

Chetelat G, Desgranges B, Landeau B, Mezenge F, Poline JB, de la Sayette V, et al. Direct voxel-based comparison between grey matter hypometabolism and atrophy in Alzheimer's disease. Brain 2008; 131: 60–71.

Chupin M, Hammers A, Liu R, Colliot O, Burdett J, Bardinet E, et al. Automatic segmentation of the hippocampus and the amygdala driven by hybrid constraints: method and validation. Neuroimage 2009; 46: 749–61.

Csernansky JG, Hamstra J, Wang L, McKeel D, Price JL, Gado M, et al. Correlations between antemortem hippocampal volume and postmortem neuropathology in AD subjects. Alzheimer Dis Assoc Disord 2004; 18: 190–5.

de Souza LC, Lamari F, Belliard S, Jardel C, Houillier C, De Paz R, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in the differential diagnosis of Alzheimer's disease from other cortical dementias. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2011; 82: 240–6.

Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Cummings JL, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, et al. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. Lancet Neurol 2010; 9: 1118–27.

Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, et al. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. Lancet Neurol 2007; 6: 734–46.

Engler H, Forsberg A, Almkvist O, Blomquist G, Larsson E, Savitcheva I, et al. Two-year follow-up of amyloid deposition in patients with Alzheimer's disease. Brain 2006; 129: 2856–66.

Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. 'Mini-mental state'. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. J Psychiatr Res 1975; 12: 189–98.

Ikonomovic MD, Klunk WE, Abrahamson EE, Mathis CA, Price JC, Tsopelas ND, et al. Post-mortem correlates of in vivo PiB-PET amyloid imaging in a typical case of Alzheimer's disease. Brain 2008; 131: 1630–45.

Jack CR Jr, Dickson DW, Parisi JE, Xu YC, Cha RH, O'Brien PC, et al. Antemortem MRI findings correlate with hippocampal neuropathology in typical aging and dementia. Neurology 2002; 58: 750–7.

Jack CR Jr, Lowe VJ, Weigand SD, Wiste HJ, Senjem ML, Knopman DS, et al. Serial PIB and MRI in normal, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: implications for sequence of pathological events in Alzheimer's disease. Brain 2009; 132: 1355–65.

Joachim CL, Morris JH, Selkoe DJ. Diffuse senile plaques occur commonly in the cerebellum in Alzheimer's disease. Am J Pathol 1989; 135: 309–19.

Kambe T, Motoi Y, Ishii K, Hattori N. Posterior cortical atrophy with ^{11}C Pittsburgh compound B accumulation in the primary visual cortex. J Neurol 2010; 257: 469–71.

Kas A, de Souza LC, Samri D, Bartolomeo P, Lacomblez L, Kalafat M, et al. Neural correlates of cognitive impairment in posterior cortical atrophy. Brain 2011; 134: 1464–78.

Kemppainen NM, Aalto S, Wilson IA, Nagren K, Helin S, Bruck A, et al. Voxel-based analysis of PET amyloid ligand ^{11}CPIB uptake in Alzheimer disease. Neurology 2006; 67: 1575–80.

Lehmann M, Crutch SJ, Ridgway GR, Ridha BH, Barnes J, Warrington EK, et al. Cortical thickness and voxel-based morphometry in posterior cortical atrophy and typical Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 2009; doi:10.1016/j.neurobiolaging.2009.08.017.

Lopresti BJ, Klunk WE, Mathis CA, Hoge JA, Ziolko SK, Lu X, et al. Simplified quantification of Pittsburgh Compound B amyloid imaging PET studies: a comparative analysis. J Nucl Med 2005; 46: 1959–72.

McMonagle P, Deering F, Berliner Y, Kertesz A. The cognitive profile of posterior cortical atrophy. Neurology 2006; 66: 331–8.

Migliaccio R, Agosta F, Rascovsky K, Karydas A, Bonasera S, Rabinovici GD, et al. Clinical syndromes associated with posterior atrophy: early age at onset AD spectrum. Neurology 2009; 73: 1571–8.

Montgomery SA, Asberg M. A new depression scale designed to be sensitive to change. Br J Psychiatry 1979; 134: 382–9.

Morris JC. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. Neurology 1993; 43: 2412–4.

Nestor PJ, Caine D, Fryer TD, Clarke J, Hodges JR. The topography of metabolic deficits in posterior cortical atrophy (the visual variant of Alzheimer's disease) with FDG-PET. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2003; 74: 1521–9.

Ng SY, Villemagne VL, Masters CL, Rowe CC. Evaluating atypical dementia syndromes using positron emission tomography with carbon ^{11} labelled Pittsburgh Compound B. Arch Neurol 2007; 64: 1140–4.

Rabinovici GD, Furst AJ, Alkalay A, Racine CA, O'Neil JP, Janabi M, et al. Increased metabolic vulnerability in early-onset Alzheimer's disease is not related to amyloid burden. Brain 2010; 133: 512–28.

Renner JA, Burns JM, Hou CE, McKeel DW Jr, Storandt M, Morris JC. Progressive posterior cortical dysfunction: a clinicopathologic series. Neurology 2004; 63: 1175–80.

Rowe CC, Ng S, Ackermann U, Gong SJ, Pike K, Savage G, et al. Imaging beta-amyloid burden in aging and dementia. Neurology 2007; 68: 1718–25.

Schmidtke K, Hull M, Talazko J. Posterior cortical atrophy: variant of Alzheimer's disease? A case series with PET findings. J Neurol 2005; 252: 27–35.

Sureau FC, Reader AJ, Comtat C, Leroy C, Ribeiro MJ, Buvat I, et al. Impact of image-space resolution modeling for studies with the high-resolution research tomograph. J Nucl Med 2008; 49: 1000–8.

Tang-Wai DF, Graff-Radford NR, Boeve BF, Dickson DW, Parisi JE, Crook R, et al. Clinical, genetic, and neuropathologic characteristics of posterior cortical atrophy. Neurology 2004; 63: 1168–74.

Tapiola T, Alafuzoff I, Herukka SK, Parkkinen L, Hartikainen P, Soininen H, et al. Cerebrospinal fluid {beta}-amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain. Arch Neurol 2009; 66: 382–9.

Thal DR, Rub U, Orantes M, Braak H. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. Neurology 2002; 58: 1791–800.

Visser PJ, Verhey F, Knol DL, Scheltens P, Wahlund LO, Freund-Levi Y, et al. Prevalence and prognostic value of CSF markers of Alzheimer's disease pathology in patients with subjective cognitive impairment or mild cognitive impairment in the DESCRIPA study: a prospective cohort study. Lancet Neurol 2009; 8: 619–27.

Downloaded from brain.oxfordjournals.org at BIUSJ (Paris 6) on August 1, 2011

Supplementary Table: Clinical data and presenting complaints and neuropsychological presentations in 9 PCA patients

Patient	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9
Gender	F	M	F	F	F	F	M	F	F
Age (years)	60	62	62	69	60	62	69	60	63
Disease duration (years)	1	1	3	1	1	1	6	1	4
CDR	0.5	0.5	1	2	2	1	2	1	0.5
MMSE	21	21	14	10	17	21	9	14	27
Bálint's syndrome	Complete	Complete	Complete	Incomplete [a]	Complete	Complete	Complete	Complete	Incomplete [b]
Visual agnosia	+	+	+	+/-	+	+	+	-	+
Environmental disorientation	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
Dressing apraxia	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Hemineglect	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Gerstmann's syndrome	Incomplete	Incomplete	Complete	Incomplete	Incomplete	Incomplete	Complete	Complete	Incomplete
Agraphia, alexia	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Acalculia	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Finger agnosia	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Ideomotor apraxia	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Right-left disorientation	+	-	+	-	-	+	+	+	-

[a] only simultagnosia
[b] simultagnosia and oculomotor apraxia

1.6 Conclusions

Le profil des dosages des protéines du LCR n'a pas montré de différence entre les groupes MA et ACP. Les patients atteints d'une ACP ont une réduction d'Aβ42, associée à une augmentation de Tau et P-Tau. Ces résultats concordent avec des études précédentes publiées au même moment que notre travail (de Souza *et al.*, 2011; Seguin *et al.*, 2011) et sont ont été confirmés par plusieurs études ultérieures (Krolak-Salmon and Vighetto 2012; Coppi *et al.*, 2014) qui soulignent la capacité des marqueurs du LCR à reconnaître les patients avec une pathologie compatible avec une MA.

Les analyses d'imagerie cérébrales réalisées aussi bien avec SPM qu'avec Brainvisa (méthode AAL) montrent que les deux groupes de patients ACP et MA ont un marquage des dépôts amyloïdes fibrillaires [11C]PIB positifs significativement augmenté en comparaison des témoins.

Dans les ACP, les régions qui présentent une fixation du ligand significativement augmentée par rapport aux contrôles sont le cortex frontal, pariétal, frontal, temporal, le precuneus et le cortex cingulaire. La comparaison entre les ACP et les MA ne montre pas de différence significative de distribution ni d'intensité du marquage, que se soit par la méthode de l'analyse quantitative individuelle de l'index de fixation corticale globale analyse ou par régions d'interet, ou par la méthode groupe à groupe par SPM.

Ces résultats diffèrent d'autres observations qui avaient monté une fixation du PIB prédominant dans les régions postérieures du cerveau. (Tenovuo *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2006).

En revanche, nos résultats sont en nette concordance avec l'étude de Rosenbloom et collaborateurs (2011). Cette étude a un design similaire à notre travail. L'étude compare trois groupes de sujets : un groupe ACP (n = 12 patients), un groupe MA (n = 14 patients) et un groupe contrôle (n = 30) (Rosenbloom *et al.*, 2011). Dans ce travail les auteurs mettent en évidence un marquage PIB diffus chez les ACP et les MA significativement augmenté en comparaison des contrôles, en particulier dans les régions temporales et pariéto-oxipitales, mais pas de différence régionale du marquage entre patients ACP et MA.

Dans une étude précédente portant sur l'aphasie primaire progressive une autre forme atypique de MA, (nous notons APP' pour ne pas entraîner de confusion avec le précurseur amyloïde), Rabinovici et collègues (2008), le profil des dépôts est également similaire à une MA typique (Rabinovici *et al.*, 2008). Une comparaison de la charge amyloïde mesurée en TEP-PiB entre des patients ayant une forme de MA à début jeune et des patients ayant une MA à début tardif n'a pas non plus montré de différences entre les groupes, en ce qui concerne la topographie et l'intensité de la rétention du ligand amyloïde (Rabinovici *et*

al., 2010). L'ensemble de ces résultats confirme l'absence de congruence entre les dépôts amyloïdes mesurés en TEP-PIB et la présentation phénotypique de la maladie et suggère que la différence de topographie lésionnelle qui distingue cliniquement la MA typique des formes focales de la maladie serait liée à d'autres mécanismes, tels que les dégénérescences neurofibrillaires. La présentation phénotypique de la MA pourrait aussi être expliquée par d'autres facteurs tels que les oligomères solubles d'Aβ, qui pourraient être les formes les plus toxiques parmis les produits de clivage de l'APP (Masters and Selkoe 2012; Small and Gandy, 2012) et qui ne sont pas marquées par le ligand PiB (Rabinovici et al, 2010, Driscoll, 2012).

IV. Deuxième étude

Analyse des endosomes dans les cellules périphériques dans la MA sporadique

Analyse des endosomes dans les cellules périphériques dans la MA sporadique

Les méthodes et résultats présentés dans cette section, comportent trois parties principales :

1. La première concerne le travail principal qui a porté sur l'analyse des endosomes dans les leucocytes mononucléaires du sang (PBMC), obtenus des patients de la cohorte IMABIO3. L'analyse des endosomes porte sur le nombre et la taille des endosomes, et sur une étude de la répartition spatiale des endosomes dans les cellules. Les descripteurs des endosomes sont également confrontés aux données cliniques et aux autres biomarqueurs disponibles. Ce travail fait l'objet d'un manuscrit en cours de préparation dont le texte est disponible en annexe 4 (Corlier *et al.*, 2014).

2. Dans la seconde partie, sont présentées les analyses des endosomes dans des fibroblastes de patients avec maladie d'Alzheimer et des témoins. Ces cellules ont été obtenues dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Jean-Luc Olivier et Catherine Malapate-Armand (URAFPA-BFLA, Université de Lorraine, Nancy, France).

3. Dans la troisième partie, le nombre et le volume moyen des endosomes sont comparés dans des lignées lymphoblastoïdes d'individus DS avec ou sans maladie d'Alzheimer afin de déterminer si la présence de la maladie est associée à des modifications des endosomes dans la trisomie 21, dans laquelle les travaux précédents de l'équipe ont montré une augmentation de la taille des endosomes. Les lignées ont été obtenues de l'équipe du Dr. Delabar (CNRS UMR 8251, Unité de biologie fonctionnelle et adaptative, Université Paris Diderot) dans le cadre d'une collaboration avec le groupe de Lott et Coskun (Coskun et al,2010).

1 Développement des Méthodes

1.1 Généralités sur la microscopie confocale appliquée à la détection de petits objets

Toutes les images de microscopie qui seront présentées, ont été acquises par microscopie confocale (Figure 4.1). Il paraît donc important de rappeler certaines propriétés du signal obtenu, car elles ont conditionné le choix des outils de détection et de quantification choisis.

Une des caractéristiques des images confocales est la très faible profondeur de champs des coupes optiques obtenues, qui permet d'augmenter considérablement la résolution des images (Shotton, 1989). Dans une image de microscopie dite 'de plein champs' la résolution de l'image est altérée par la lumière des zones qui sont hors focus produisant un halo autours des objets, et empêche la distinction d'objets se trouvant à des profondeurs différentes (Figure 4.1b). La contrepartie de l'exclusion du signal lumineux qui n'est pas produit directement au point de focus, est le très faible nombre de photons qui sont détectés pour chaque point d'excitation rendant le dispositif susceptible au bruit de fond. En fonction des paramètres d'acquisition il peut être courant de faire des images avec moins de 20 photons par pixel, si un ou plusieurs photons projetés depuis les environs du point scanné parvient à passer le 'pinhole', il en résultera un signal non spécifique qui sera amplifié dans le photomultiplicateur, pour le pixel en cours. Il existe beaucoup d'autres sources de bruit comme la température, mais elles ne seront pas détaillées ici, on retient seulement que le traitement des images devra être capable d'opérer s'il y a du bruit de fond.

Les caractéristiques incontournables des images confocales sont donc : la bonne résolution liée à la petite profondeur de champs associée à une excitation ciblée dans l'espace, mais aussi une faible valeur du rapport signal sur bruit-de-fond (signal to noise ratio, SNR) (Conchello and Lichtman 2005).

Lorsque la microscopie confocale est appliquée à la quantification d'objets sub-résolutifs (c'est à dire se trouvant à la limite de la résolution du système d'acquisition) la présence de bruit de fond peut être critique, et l'algorithme de détection doit être capable de tenir compte du bruit dans produire de détections aberrantes, ni de lissages excessifs qui dégradent la résolution. Il existe beaucoup d'algorithmes capables de réaliser des détections d'objets dans des images de microscopie par fluorescence. Un travail a récemment proposé une comparaison quantitative de certaines d'entre-elles (Ruusuvuori *et al.*, 2010).

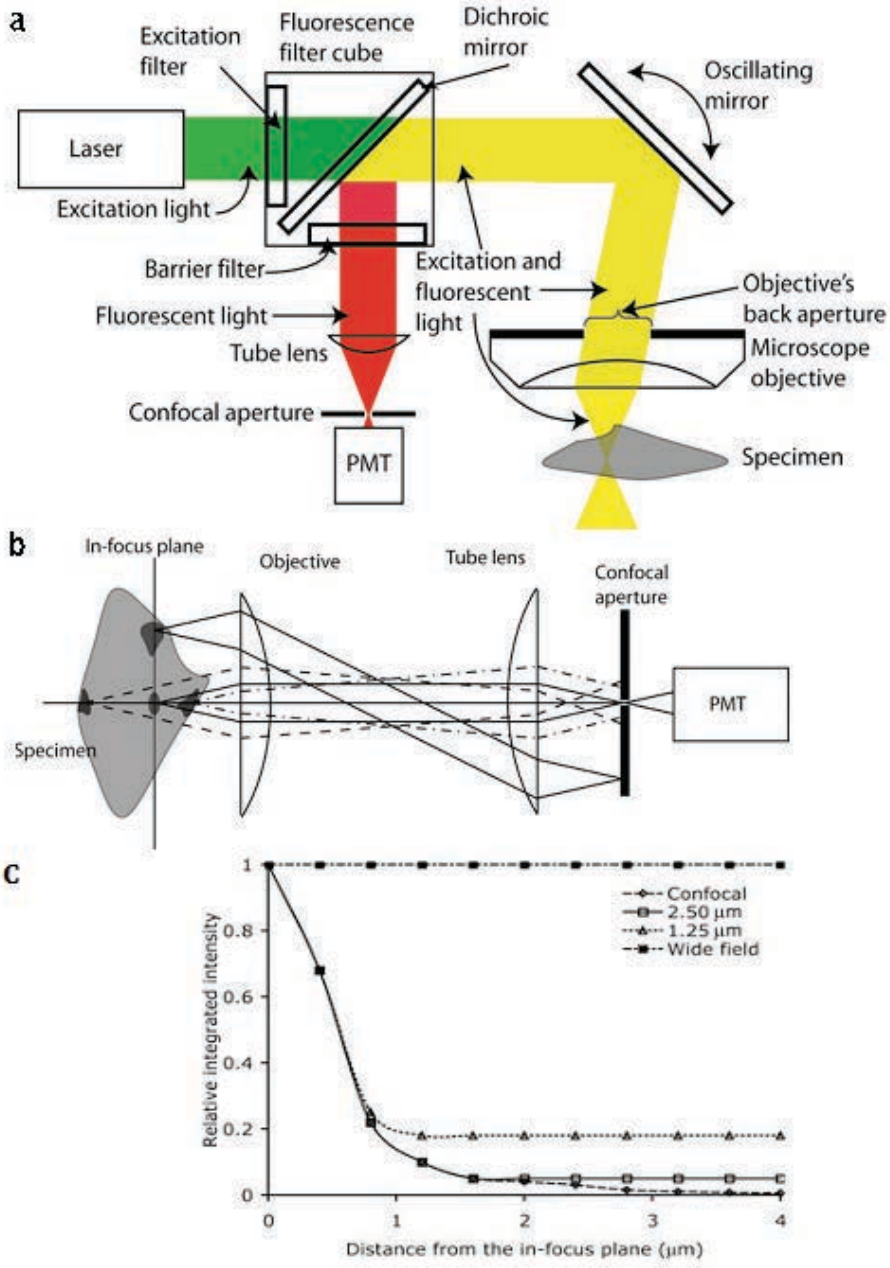


Figure 4. 1 : Principe du microscope confocal. (a) un laser émet une lumière d'excitation qui passe à travers le système optique et est déviée par un miroir oscillant dont le rôle est d'orienter le faisceau lumineux successivement vers toutes les positions de l'échantillon auxquelles correspondront les pixels de l'image. Les fluorophores contenus dans l'échantillon émettent sous l'effet de l'excitation une lumière dans une autre longueur d'onde qui est envoyée jusqu'au photomultiplicateur (PMT). (b) La lumière émise par les objets qui ne sont pas dans l'axe de l'excitation ou en dehors du plan focal ne sera pas focalisée vers le point d'ouverture confocale (nommé 'pinhole') et est bloquée. (c) Proportion du signal mesuré attribuable au bruit de fond (valeur relative au signal spécifique du plan focal) en fonction de l'éloignement au plan focal (en profondeur), pour un système plein champs (cubes noirs), un microscope confocal (diamants blancs), et pour un système en spinning disck* avec deux types de disques (cubes et triangles vides). Schéma de Conchello et al, (Nature methods, 2005).

1.2 Analyse des endosomes dans les PBMC

1.2.1 Isolement des Cellules

Les endosomes précoces ont toujours été marqués de la manière suivante :

Les prélèvements de sang sont réalisés sur des tubes (Vacutainer®, Beckton-Dickinson) contenant de l'héparinate de lithium, et traités dans les 2 h qui suivent le prélèvement. Les leucocytes mononucléaires du sang sont isolés par centrifugation (16min, 1500 rpm, température ambiante) sur gradient de ficoll à 1,077g/mL (15mL prefilled filtered Leucosep PANCOLL tubes, PANTM biotech GmbH) après dillution du sang avec un volume équivalent de phosphate bufered saline solution (PBS), en concentration isotonique (1x).

La couche leucocytaire est récupérée et suspendue dans 10 volumes de PBS1x, et centrifugée (10min 800rpm).

Le culot de leucocytes est suspendu dans 200µL de milieu de culture sans sérum (GibcoTM OPTI-MEM®) et placé en incubateur pour 60 min (Co2 5%, 37°C). Après l'incubation d'une heure, les cellules sont rincées dans 10mL de PBS1x et centrifugées (10min, 800rpm). Le culot de cellules est laissé avec 100µL de PBS, et homogénéisé avec 100µL de paraformaldéhyde (PFA) froid à 4% dans du PBS1x (4°C), pour arriver à une concentration finale de PFA de 2%. Après 12 min de fixation, les cellules sont rincées dans 10mL de PBS1x et centrifugée (10min, 800rpm). Le surnageant est retiré à la pipette, ou renversé, et le culot de celllules est laissé avec 100 à 200µL de surnageant (0.04% PFA) et conservé à 4°C jusqu'à son utilisation (2-90 jours).

1.2.2 Marquage immuno-cytochimique des endosomes précoces

1. Les cellules sont rincées dans 10mL de PBS1x et centrifugées (10min, 800rpm)
2. Puis saturées dans une solution de normal goat serum (NGS) à 2% dans du PBS1x pendant 20 min.
3. La perméabilisation des membranes est réalisée en ajoutant un détergeant doux (tritonX100) pré dilué à 1% dans du PBS (QSP 0,1% triton).

4. Les cellules sont ensuite rincées et centrifugées comme à l'étape 1.

5. Le marquage des endosomes précoces est réalisé en utilisant un anticorps primaire anti EEA1(Cell signalling, Rabbit-anti-Human #2411), dilué à 1 :100 dans une solution de PBS1x avec 2% de NGS. Les cellules sont placées à 5°C à l'abri de la lumière pendant une nuit.

6. Les cellules sont ensuite rincées et centrifugées comme à l'étape 1.

7. Le marquage secondaire est réalisé en ressupendant les cellules dans une solution à 1 :500 de Goat-anti-Rabbit couplé Alexa-fluor-488® (Invitrogen) dans du NGS à 2% dans du PBS1x.

8. Les cellules sont ensuite rincées et centrifugées comme à l'étape 1.

9. Les préparations pour le microscope sont réalisées en resuspendant les cellules dans 40µL de PBS avec un cône coupé, puis en prélevant 10µL de la suspension de cellules qui seront mélangés à des gouttes de 10µL de milieu de montage (SouthernBiotech, fluoromount-G®) préalablement déposées sur des lames de microscope, le tout avec un cône coupé pour limiter la formation de bulles. La préparation est recouverte d'une lamelle ronde de 12*0.17mm et placée une nuit à température ambiante, à l'horizontale, et à l'abri de la lumière. Le lendemain, les lamelles sont scellées au vernis.

1.2.3 Acquisition des images au microscope confocal

L'acquisition d'images a été réalisée à la plateforme d'imagerie cellulaire de la Pitié-Salpêtrière (PICPS). Les lames ont été scannées sur un microscope Olympus FV1000 confocal à balayage laser, équipé d'un objectif 63x (NA1.4) apochromatique à immersion. Un zoom supplémentaire de 2.8x est systématiquement appliqué, la taille de l'image est définie à 1024x1024 pixels. L'interface logicielle permet de ne sélectionner, dans le champ, que la partie qui contient la zone que l'on souhaite scanner, sans modification des réglages (afin de réduire la durée d'acquisition et le temps d'exposition des fluorophores au laser). Toutes les images sont produites le même niveau de magnification (soit une taille de voxels affichée par le microscope de 0.073µm dans le plan horizontal (coordonnées XY) et 0.25µm dans l'axe vertical (Z).

Les cellules sont scannées individuellement afin d'avoir une seule cellule par image. Pour limiter les biais, aucune cellule n'est volontairement sélectionnée. L'utilisateur fait défiler le champs sous l'oculaire d'une diagonale à l'autre et scanne dans l'ordre les cellules qui se présentent en éliminant toutefois celles

qui paraissent endommagées ou agglomérées. 20 cellules par sujet sont ainsi scannées ; pour chaque cellule, un stack d'images est réalisé en fixant le plan de départ et d'arrivée avec un intervalle entre chaque coupe optique fixé à 250nm (la profondeur de champs de l'objectif).

1.3 Analyse des endosomes dans les fibroblastes

1.3.1 Marquage des endosomes dans les fibroblastes

Les fibroblastes sont cultivés dans des plaques 12 puits directement sur des lamelles de microscope (diamètre 12mm, épaisseur 0.17mm) dans du milieu OPTI-MEM (Gibco) enrichi avec 10% de sérum de veau fœtal dé-complémenté.

Une fois que les cultures sont suffisamment denses mais non confluentes, le milieu de culture est rincé. Le rinçage se fait par remplacement du milieu et ajout de 1mL de PBS1x par puits (3 fois 1min). A la fin des trois rinçages, les cellules sont fixées dans 400µL de PFA 4% froid (4°C) pour 12 minutes Puis rincées 1 fois au PBS1x et stockées à 4°C à l'abri de la lumière.

Le marquage des endosomes est réalisé de la même façon que les PBMC, à la différence que les étapes de rinçage et centrifugation sont remplacées par trois rinçages en PBS1x 1minute sur agitateur circulaire réglé à 40 tours par minute.

Le montage des lames se fait en retournant la lamelle sur laquelle se trouvent les cellules, contre une goutte de milieu de montage. Après une nuit à température ambiante, les lames sont scellées au vernis et gardées à 4°C jusqu'à l'acquisition d'images.

1.3.2 Acquisition des images dans les fibroblastes

Les fibroblastes sont des cellules de très grande taille, et les paramètres d'acquisition des images ont dû être sensiblement modifiés en comparaison des PBMC qui ont été scannées avec la résolution maximale permise par le microscope. Ici, les cellules sont scannées à la plus forte résolution permettant de visualiser les plus grandes cellules dans le champs de vue. Les paramètres retenus sont : des images de 1024x1024 pixels, un objectif 63x à immersion, et un zoom fixe de 2.2 produisant des voxels de 0.094x0.094x0.25 µm.

Les cellules sont scannées avec des vitesses élevées (8µs/px) pour limiter la dénaturation des fluorophores qui est ici un paramètre limitant, étant donné la durée des acquisitions (5 à 7 min par cellule). Un filtre de kalman est appliqué sur 3 images, pour compenser la vitesse de scan, qui impose une amplification importante du signal, et la génération d'un bruit plus important.

Le signal est échantillonné dans volume en fixant les points haut et bas du stack et en maintenant un espace entre deux coupes optiques de 250nm, pour scanner le volume entier.

1.4 Développement des méthodes de détection des endosomes

1.4.1 Méthode classique par seuillage

La méthode la plus fréquemment utilisée est basée sur un simple seuillage des valeurs de gris, avec des filtres préalables visant à réduire le bruit de fond. C'est la méthode la plus couramment appliquée aux images de microscopie, en particulier avec les logiciels ImageJ/Fiji (Schindelin *et al.*, 2012)

Sans rentrer dans le détail, le filtre repère les groupes de pixels isolés et les supprime ou les moyenne avec les pixels voisins. Si cette méthode fonctionne pour les objets de grande taille, elle n'est en revanche pas applicable pour la détection de petits objets dont la taille est potentiellement de quelques pixels, et qui seraient considérés comme du bruit de fond (Sahoo, Soltani, and Wong 1988).

Un autre défaut des méthodes de segmentation de spots par seuillage est la reproductibilité des résultats. En effet les étapes de supervision et d'ajustement sont souvent obligatoires, et donc utilisateur dépendantes comme illustré dans la figure suivante. La figure présente une image représentative d'une cellule marquée sur les endosomes précoces, et deux segmentations réalisées par la méthode par seuil d'abord en définissant manuellement le seuil de niveaux de gris correspondant au signal spécifique (Figure 4.2 C) en tentant d'obtenir une segmentation qui correspond aux objets visibles sur l'image, puis réalisant une segmentation automatique dans laquelle le programme définit "le meilleur" niveau de gris à appliquer à l'image (Figure 4.2 D). On se rend compte que la segmentation est meilleure manuellement. D'autre part si on applique un seuil définit manuellement pour une image, pour l'appliquer à d'autres images la segmentation ne fonctionne pas (i.e. échecs de détections, résultats aberrants) La méthode de segmentation classique des images (avec ImageJ ou Fiji) présente donc le désavantage (1) de produire un résultat qui est dépendant de l'utilisateur, et des conditions dans lesquelles a été réalisée la détection (i.e. nombre d'images à traiter manuellement, luminosité ambiante, sensibilité de l'œil aux niveaux de gris) et (2) non reproductibles, et non comparables. Le troisième défaut est (3) la difficulté de réaliser des traitements automatisés des images en raison des nombreux résultats aberrants de cellules dans lesquelles

il n'existe pas de détection, ou seule détection géante. Si ces deux cas sont évidents et peuvent être éliminés, il est plus difficile de déterminer quand éliminer des cas intermédiaires sans introduire de biais de sélection.

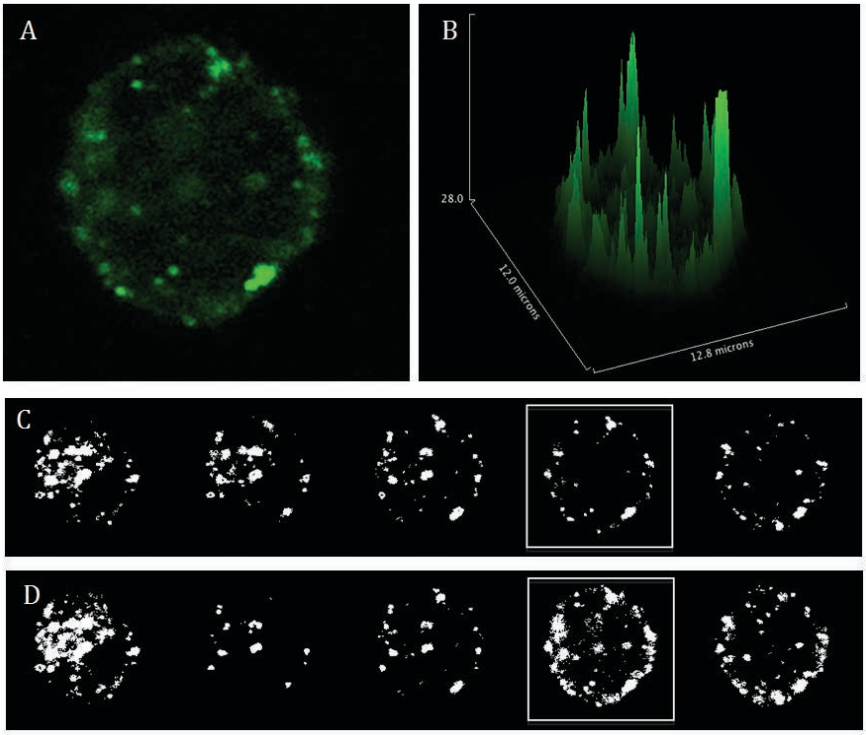


Figure 4. 2 : Segmentation par seuillage. (A) Exemple de marquage des endosomes précoces dans un leucocyte sanguin (anticorps anti-EEA1). (B) Le profil d'intensité de l'image montre des pics importants correspondant aux zones les plus intenses, et un ensemble de pics de faible intensité correspondant au bruit de fond et a de petits objets. Les planches C et D présentent le résultat de la segmentation de la même cellule pour 5 coupes optiques espacées de 500nm, (C) en travaillant manuellement, (D) en laissant le programme faire le calcul automatique du seuil pour chaque coupe, produisant un résultat différent. La coupe encadrée est celle qui correspond à la planche A.

1.4.2 Nouvelle méthode de détection par ondelettes

Une autre approche appliquée au traitement de signal est l'analyse fréquentielle qui consiste à rechercher des variations locales de fréquence dans l'image.

Un logiciel qui propose une telle détection est le logiciel ICY (http://www.bioimageanalysis.org/), sous la forme d'un plugin nommé 'spot detector'. Cet outil de détection a été développé par l'équipe de traitement quantitatif du signal, à l'institut Pasteur, et diffusé en version libre en 2012. L'utilisateur

choisit une taille d'objets à détecter ainsi qu'un niveau de stringence de la détection en testant un groupe d'images représentatives puis lance la détection sur l'ensemble de données (de Chaumont *et al.*, 2012).

C'est une méthode semi-supervisée, qui demande un réglage des paramètres de détection (Respectivement « scale » et « threshold » pour la taille des objets et la stringence, Figure 4.3) puis traite récursivement les images contenues dans le répertoire.

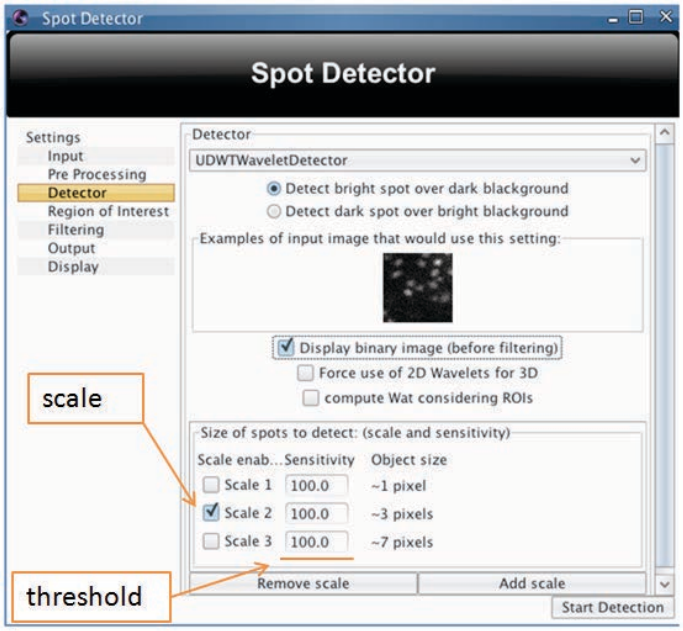


Figure 4. 3 : Aspect de l'interface du logiciel ICY. Les étiquettes indiquent les zones du réglage de l'échelle et du seuil de sensibilité.

1.4.3 Comparaison des méthodes par seuil et par ondelette

Pour détermier quelles méthode de détection est la plus adaptées à la quantification des endosomes, entre la méthode par seuil et par ondelettes, elles ont été comparées sur un échantillon de 30 images comportant chacune entre 20 et 40 coupes optiques (Figure 4.4, 4.5 et 4.6). Dans la suite, les piles d'images composées de coupes optiques successives seront nommées 'stacks d'images'.

Pour automatiser les détections, une macro compilant toutes les étapes du traitement par seuil, a été codée dans le logiciel de traitement d'images Fiji.

L’algorithme comprend :

1. un filtre median (taille du filtre x=2, y=2, z=1),
2. un filtre top-hat, c’est un filtre dont l’effet est équivalent à un filtre passe haut, et permet d’améliorer les contrastes locaux, après le passage du median, (Bright and Steel 2011).
3. Un seuil par la méthode d’Otsu et al (1975), sur l’image entière (Otsu 1975).
4. La détection des endosomes est réalisée en utilisant une détection 3D pour éviter une surreprésentation des objets les plus gros qui pourraient être comptés dans deux coupes consécutives.

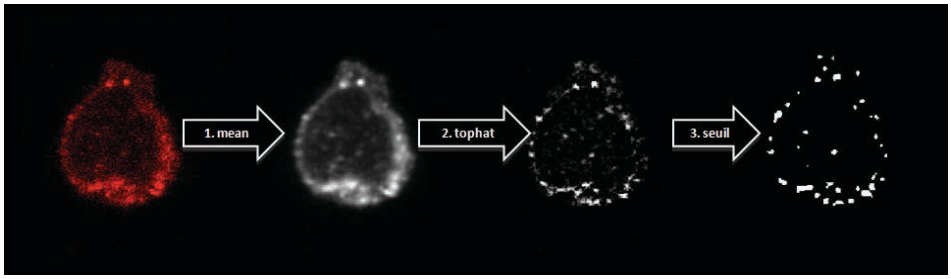


Figure 4. 4 : Segmentation des endosomes sur Fiji (méthode par seuil). Les étapes (1) de réduction du bruit de fond, (2) d’accentuation du contraste, et (3) le résultat de la segmentation sont présentés.

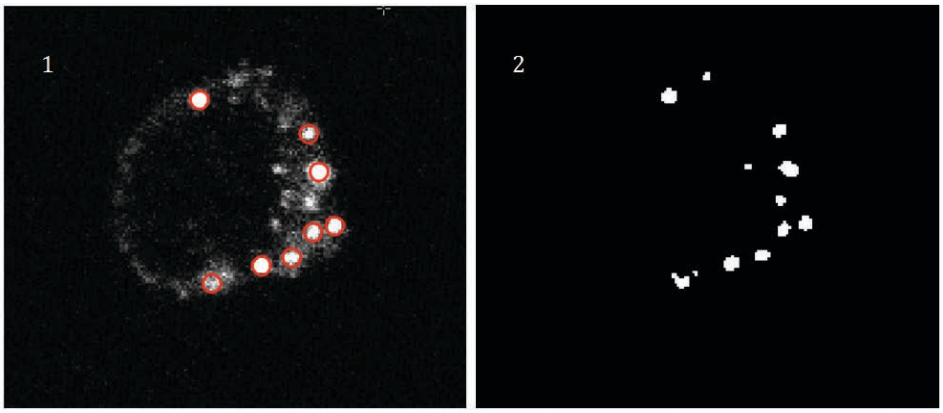


Figure 4. 5 : Segmentation des endosomes sur ICY (méthode par ondelettes). La détection a lieu sans prétraitement de l’image (1). Résultat de la segmentation (2), cette image fournit une représentation de la réponse obtenue pour un réglage donné, elle est indicative et ne sert qu’à la vérification des réglages de la détection.

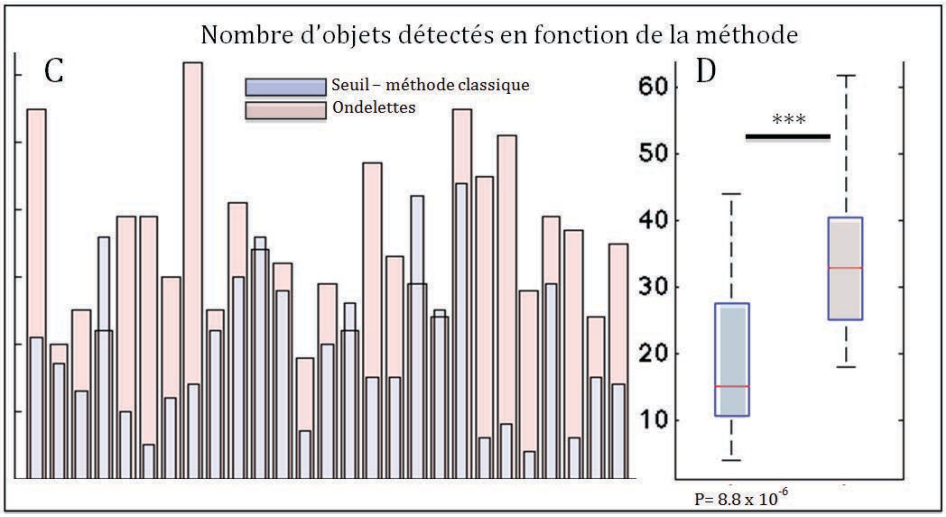


Figure 4. 6 : Comparaison des méthodes de segmentation. La comparaison des deux méthodes sur un échantillon de 27 cellules provenant d'un volontaire sain âgé. Le nombre d'objets détectés varie pour une cellule donnée (C), ou en moyenne sur toutes les cellules (D). Les nombre de détections par cellule diffèrent significativement ($P < 0.001$), en fonction de la méthode utilisée.

1.4.4 Conclusion sur la comparaison des méthodes de détection

La comparaison entre la méthode classique implémentée dans le logiciel Fiji, et la méthode par ondelettes implémentée dans ICY, pour la détection automatique des endosomes met en évidence une différence importante dans le nombre de détections. Le nombre d'objets reconnus par la méthode ondelettes est significativement plus important (moyennes : ICY=34.8 ±11.7 ; Fiji=19.25 ±11.47 ; Student p=8,84.10-6). On déduit de cette comparaison, que la détection par ondelettes est plus sensible, car elle détecte d'avantage d'endosomes. La méthode de détection des endosomes par ondelettes a été mise au point pour contourner les biais de quantification d'images au faible rapport signal sur bruit et de variation d'exposition. Dans notre jeu de données elle détecte d'avantage d'endosomes sans résultats aberrants. Une autre raison qui nous a amenés à favoriser l'utilisation de cette méthode est purement pratique : elle est plus facile à automatiser sur l'ensemble de la série de données, sans générer de fichiers intermédiaires, qui mobilisent de l'espace disque et du temps de calcul, et pourraient devenir source d'erreurs.

1.4.5 Echantillonnage du volume entier des cellules

Une question importante a été de définir le type d'échantillonnage à appliquer pour obtenir une mesure représentative de la taille et du nombre d'endosomes présents dans les PBMC.

Notre hypothèse au départ était que les endosomes sont distribués aléatoirement dans le cytoplasme et qu'une section optique à travers une zone où le diamètre est maximal (subéquatoriale) permet d'obtenir une mesure moyenne représentative de la cellule.

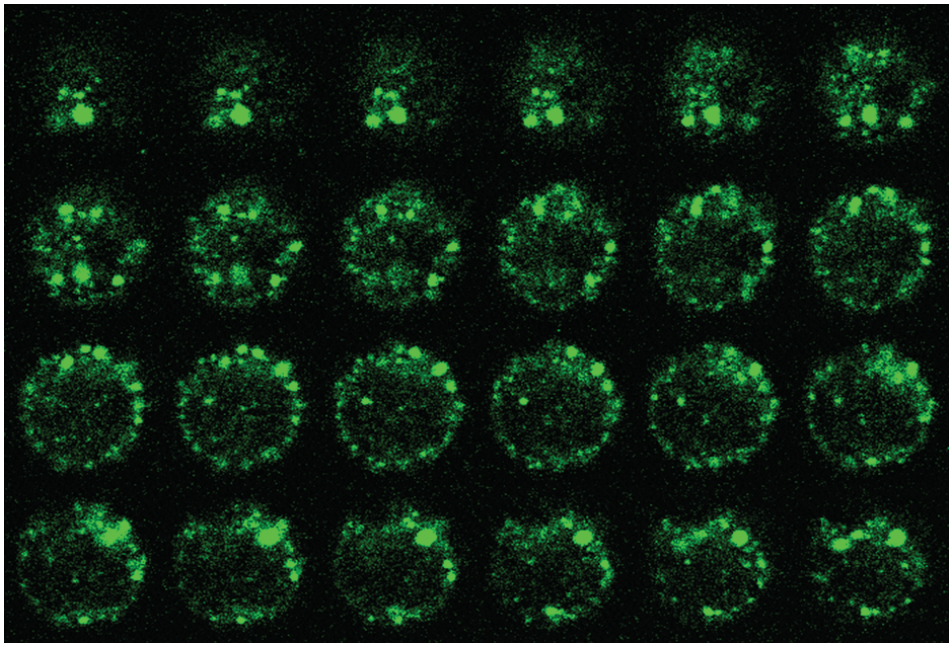


Figure 4. 7 : Une cellule dans le volume : Planche de coupes optiques successives montrant les endosomes EEA1 positifs dans le volume d'une PBMC d'un patient avec une maladie d'Alzheimer. Les coupes optiques sont réalisées dans le volume de la cellule, tous les 250nm.

Pour tester cette hypothèse, un stack d'images est pris et analysé dans le volume, puis décomposé en images indépendantes traitées comme des coupes équatoriales. Puis 12 coupes optiques sont sélectionnées tous les 500nm (1 coupe sur deux) et quantifiées indépendamment (Figure 4.7).

La comparaison des détections obtenues sur coupes équatoriales ou sur stack donne des résultats similaires pour les tailles, mais le nombre d'endosomes par plan de coupe est en revanche plus petit et plus variable ce qui risquait d'induire une évaluation erronée de la taille et du nombre des endosomes, dans les cas où les endosomes ne sont pas uniformément répartis dans le volume de la cellule (Tableau 4.1).

Nous décidons de travailler sur le volume entier de la cellule pour avoir un compte exhaustif du nombre d'objets EEA1 positifs détectés. Par ailleurs l'échantillonnage du volume entier de la cellule nous autorise également à réaliser une analyse de la distribution spatiale des endosomes dans la cellule.

	Nombre d'objets	Diamètre (µm)
Cellule entière 37 coupes (3D)	42	0.420
12 coupes (2D)	7.8 ±4	0.434 ± 0.055

Tableau 4. 1 : Comparaison des résultats de détection pour une cellule analysées en 3D ou par coupes indivuduelles dans le volume de cette cellule. On constate que la surface moyenne des détections obtenues à partir des coupes individuelles est équivalente au volume moyen obtenu par l'analyse de 3D et converti en surface.

1.4.6 Calibration de la détection

Nous avons donc vérifié la capacité de la méthode à détecter des billes fluorescentes d'une taille connue, et se trouvant à la limite de la résolution théorique (0.44λ/2*NA, (Pertsinidis, Zhang, and Chu 2010)) du système utilisé (rappel, objectif 63x, NA 1.4) et à réaliser une quantification fidèle à la réalité.

La méthode de marquage des endosomes est détaillée dans la section immunocytochimie pour ne pas alourdir l'explication de la méthode de calibration. Des fibroblastes ont été cultivés sur des lamelles de microscope Après le marquage des endosomes, les fibroblastes sont montés dans une goutte de milieu de montage dans laquelle ont été suspendues les billes fluorescentes (PS-Speck™ , Molecular probes, kit P7220) de couleur orange (longueur d'onde d'émission (λ) 560nm , diamètre 175 ± 5 nm).

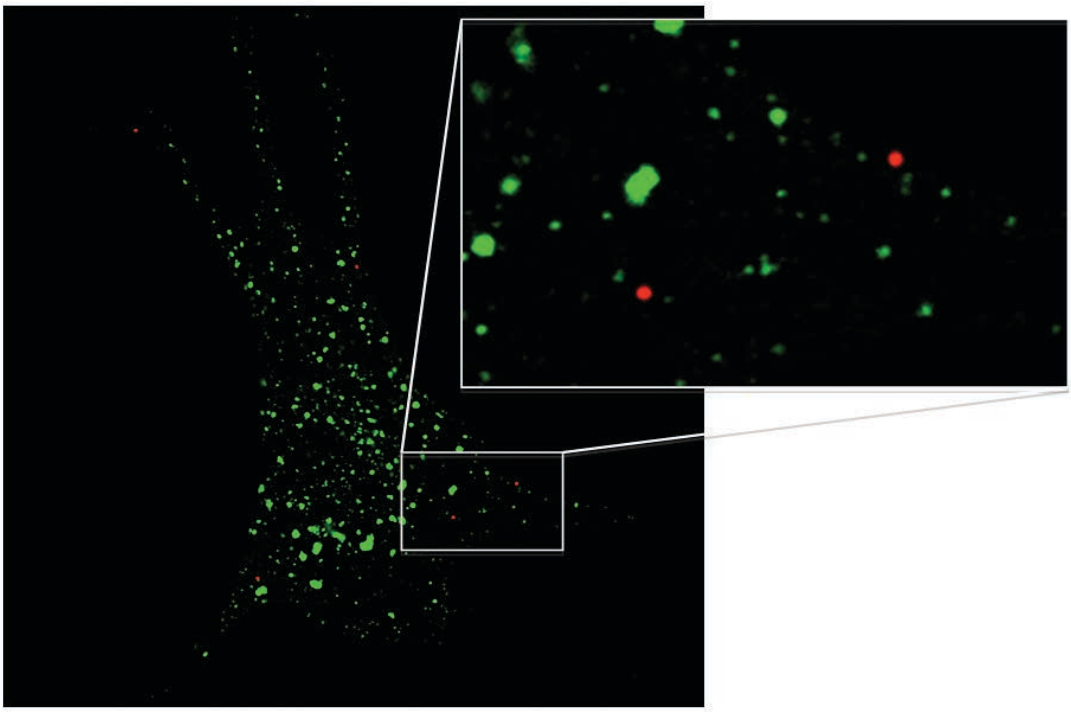


Figure 4. 8 *:* Billes fluorescentes 175nm et fibroblaste d'un individu sain agé. Les billes fluorescentes ont été ajoutées à a préparation de fibroblastes marqués sur les endosomes précoces (anticorps anti-EEA1) pour vérifier la calibration de la détection par ondelettes. Le détail de l'image montre un zoom sur une région de l'image où sont visibles les billes dont la taille est à la limite de la résolution du microscope.

L'utilisation de billes dont le diamètre est à la limite de la résolution théorique du microscope permet de connaître pour un réglage donné de la détection la plus petite surface de détection quantifiable sans biais d'interprétation (Figure 4.8). En effet les objets de très petites dimensions réelles produiront une image numérique au minimum de quelques pixels s'ils sont assez lumineux pour être détectés. On souhaite donc connaitre le plus petit volume détecté pour un objet de taille réelle se trouvant à la limite de la résolution théorique du microscope utilisé, pour déterminer à partir de quelque taille l'interprétation serait fausse en raison de l'incertitude sur la taille réelle des objets à quantifier.

La surface correspondant à un objet de 175nm de diamètre est 15px avec ICY (sc 1, th70). Dans les détections qui suivent, les tailles des objets seront donc systématiquement filtrées au dessus de 16px, pour que les analyses ne soient pas biaisées par la présence d'objets dont on ne peut pas connaître la taille, parce qu'elle est sous la limite de résolution.

1.5 Faut-il procéder à une correction des données ?

Comme nous l'avons vu les détections par ondelettes sont plus sensibles et détectent d'avantage de vésicules. Cependant quand nous avons observé la dispersion des données de chaque individu, nous observons qu'en fonction du donneur, le volume des endosomes est parfois différemment dispersé.

La Figure 4.9 montre des boites à moustache représentant la dispersion du volume endosomal moyen par cellule dans 30 cellules par sujet, pour un groupe de 9 témoins, et 15 patients Alzheimer.

Nous observons que les distributions inter-quartile (indiquées par le rectangle de chaque boite à moustache) sont très différentes entre les sujets d'un même groupe compliquant la réalisation de tout test paramétrique de comparaison des groupes. Nous avons donc observé en réalisant différentes corrections détaillées dans le chapitre suivant, si l'espace interquartile est régularisé entre les sujets par division des valeurs individuelles par le volume de la cellule.

La division de la taille moyenne des endosomes d'une cellule par son volume global est un moyen de corriger les variations de taille moyenne qui dépendent du volume de la cellule, et devait nous permettre de réduire la variance intra-groupe des mesures.

1.5.1 Marquage de la membrane plasmique avec des Wheat germ Aglutinins

Cette série de participants comporte 9 témoins, et 15 patients Alzheimer (dont 4 MA stade démentiel et 11 MA-MCI) comme il y a peu de MA au stade avancé les malades sont regroupés. (Nombre de cellules = ctrl : 268 ; Alz : 440)

Les cellules fixées et conservées à 4°C sont rincées dans 10mL de PBS1x et centrifugées (10min, 800rpm) puis incubées 10min dans une solution 1 : 500 dans du PBS1x de wheat germ aglutinins (WGA) couplées à un fluorophore (WGA-Alexa Fluro® 594, Invitrogen). Après incubation avec les WGA, les cellules sont rincées dans 10mL de PBS1x et centrifugées (10min, 800rpm), puis perméabilisées dans 200µL de triton x100 (0.1% en solution dans du PBS1x avec 2% de normal goat serum, NGS) pendant 20min, rincées dans 10mL de PBS 1x, et centrifugées (10min 800rpm).

La suite du protocole de marquage des endosomes est identique à la section immunocytochimie.

1.5.2 Segmentation du volume cellulaire dans MATLAB

Le volume des cellules est segmenté de manière automatique à l'aide d'un traitement implémenté dans le logiciel Matlab™. Le traitement est lancé sur le canal correspondant au signal rouge des WGA couplées à l'Alexa-594.

L'algorithme comprend (1) un lissage de suppression du bruit de fond, (2) une segmentation par seuil, (3) un remplissage des espaces vides délimités par du signal (comme uniquement la membrane est marquée), (4) une somme des zones positives coupe par coupe pour chaque cellule donnant une estimation du nombre de voxels composant la détection de la cellule.

Les volumes cellulaires obtenus par cette méthode sont présentés dans la Figure 4.10.

1.5.3 Effet de la correction

La Figure 4.9 A présente les mêmes patients que dans la Figure 4.9 B, mais après division des valeurs de volume endosomal moyen de chaque cellule par le volume cellulaire. On observe toujours des différences importantes entre les sujets ce qui signifie que les variations de volume endosomal moyen par cellule que nous observions avant correction entre les donneurs ne sont pas dépendantes du volume cellulaire. Elles pourraient représenter une variation inter donneur dépendante d'un autre paramètre biologique tel que l'âge le sexe ou la prise d'un traitement médicamenteux. Nous décidons donc de ne pas procéder à une correction des volumes endosomaux moyens par le volume cellulaire.

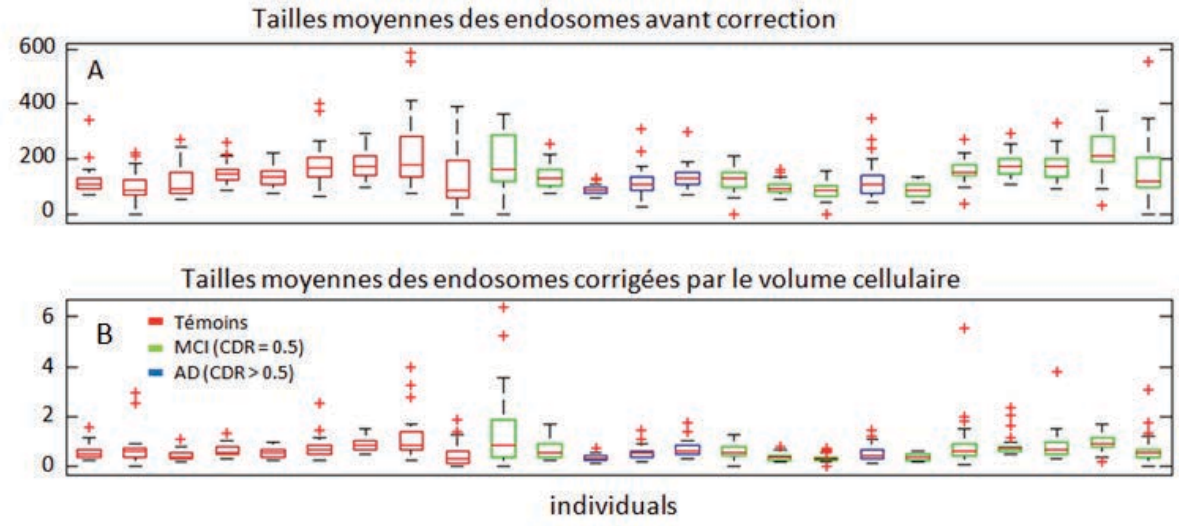


Figure 4. 9 *:* Correction de la taille des endosomes par le volume cellulaire. Chaque boite représente la taille moyenne des endosomes dans 30 cellules d'un sujet, avant correction (A), et après correction (B). Les témoins sont représentés en rouge, et les MA-D en vert pour les stades MA-MCI, et bleu pour les stades modérés.

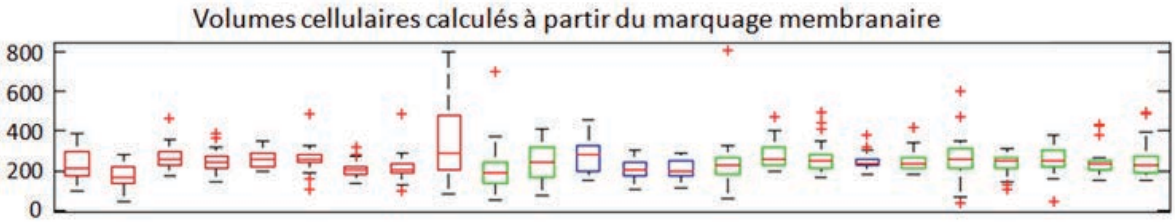


Figure 4. 10 *:* Variabilité des volumes cellulaires. Chaque boite représente la distribution du volume des 30 cellules de chaque sujet.

1.6 Variabilité inter-échantillon

La comparaison du groupe d'individus ci-dessus, avec les données acquises précédemment a mis en évidence un effet temporel peut-être lié au traitement des échantillons. En effet, les prélèvement sanguins sont traités à chaque nouvelle inclusion; il peut se dérouler plusieurs semaines entre deux prélèvements, induisant une separation dans le temps des étapes d'isolement, et de marquage des cellules, pour un échantillon donné, puis entre les groupes d'échantillons différents (Figure 4.11).

Nous constatons une différence affectant tous les échantillons qui lorsque l'ensemble des patients est aligné horizontalement. Les causes possible pour l'effet constaté sont: a) un effet lié au marquage supplémentaire par les WGA, b) autres différences dans la procédure expérimentale (i.e. lot d'anticorps

différents, utilisation DAPI, effet de la centrifugeuse), c) une maintenance du microscope, d) une variabilité biologique liée au donneur. Pour vérifier cet effet, nous avons réalisé plusieurs tests comparatifs dans le même prélèvement, en comparant les vitesses de contrifugation, la présence d'un marquage DAPI et des expositions différentes des images pour simuler l'effet de la maintenance sur le microscope. Aucun de ces paramètres n'a permis d'observer la variabilité constatée dans la Figure 4.11. Comme la variabilité biologique ne peut pas être exclue, dans la suite nous considérons tous les sujets comme un ensemble homogène.

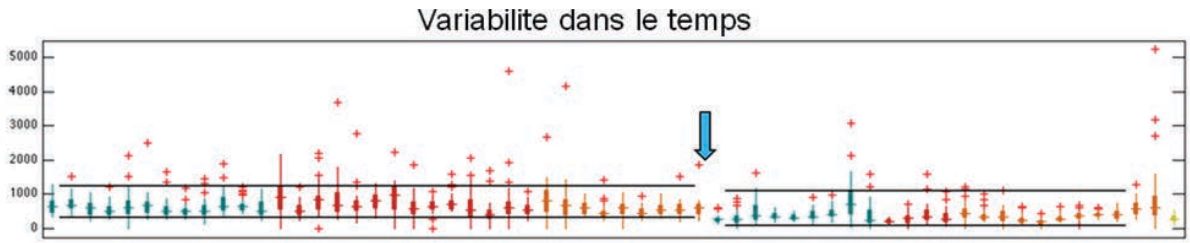


Figure 4. 11 *:* **Variablité du volume endosomal par sujet.** La flèche bleue marque le début de l'utilisation du marquage WGA.

1.7 Methode de classification des volumes endosomaux moyens

Dans les résultats nous avons procédé à une distribution des cellules dans trois catégories, en fonction du volume endosomal moyen obtenu. Ces catégories sont définie sur l'histogramme des valeurs des témoins qui représentent les données de référence auxquelle nous comparons les malades, par conséquent les bornes d'intervalle seront différentes d'un jeu de données à un autre (figure 4.12)

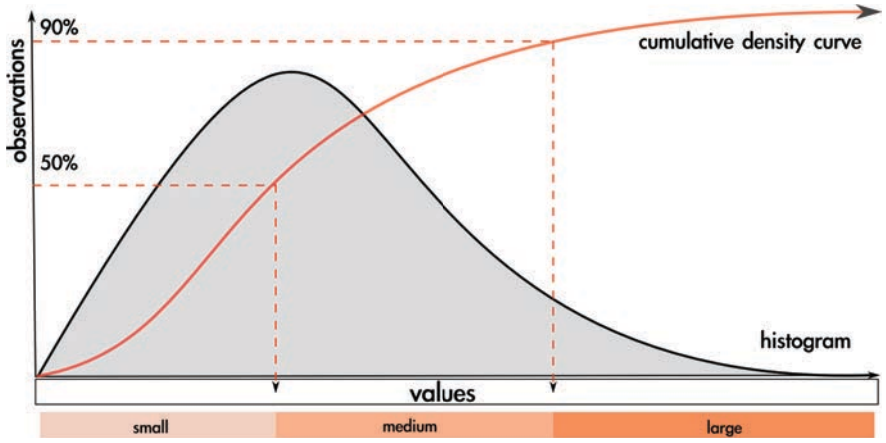


Figure 4. 12 : **Definition de trois catégories de volume endosomal moyen à partir des contrôles.**

1.8 Analyse de la distribution spatiale des endosomes

En plus de la taille et du nombre d'endosomes nous avons voulu savoir si leur répartition dans la cellule pouvait être différente entre les témoins et les malades.

Chaque détection est associée à un jeu de coordonnées en X, Y et Z, il est donc possible de calculer facilement leurs distances relatives les unes par rapport aux autres et d'automatiser une analyse spatiale (l'algorithme est expliqué en annexe 2a et 2b). Les données spatiales ont été analysées de deux manières différentes :

D'abord par la méthode des plus proches voisins, en calculant les distances euclidiennes (géométriques) entre chaque endosome et tous les autres endosomes de la même cellule. Puis en triant les distances obtenues dans l'ordre croissant, pour chaque endosome et en dessinant une courbe cumulative de la distance au plus proche voisin (nombre d'occurrences par distance croissante) comparée à une distribution théorique aléatoire (Andrey *et al.*, 2010, Figure 4.13). Dans notre cas la méthode a été détournée en remplaçant la distribution théorique par la distribution du groupe des témoins.

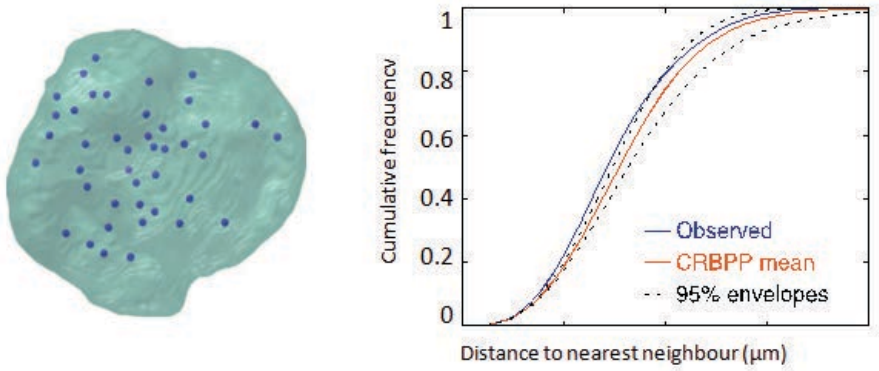


Figure 4. 13 : Distance auplus proche voisin. La méthode classigque de description de la distance au plus proche voisin compare la distribution des points du motif (bleu) à une distribution aléatoire (completely random binomial point pattern (CRBPP)) générée par une simulation de Monte-Carlo. Modifié de Andrey *et al.*, 2010.

Une autre méthode de description du motif de distribution spatiale des endosomes s'inspire de la fonction de Ripley (1977), qui réalise pour chaque point du motif, une recherche du nombre de voisins qui se trouvent dans une aire de recherche définie par l'utilisateur, et découpée en disques concentriques d'aire croissante autour du point central (Ripley 1977, Figure 4.14). La fonction renvoie la moyenne du nombre de points par classe de distance croissante autour des objets (Figure 4.15).

Lagache et collaborateurs, ont récemment proposé une méthode de correction de la fonction, et de définition d'un intervalle de confiance (Lagache *et al.*, 2013). Malheureusement, cette fonction qui est implémentée dans ICY, n'est pas applicable pour plusieurs cellules et ne permet pas d'extraire de données chiffrées.

Afin de pouvoir automatiser l'analyse spatiale de la distribution des endosomes dans la cellule, j'ai programmé un traitement qui s'inspire de la fonction de Ripley.

Cette version simplifiée ne réalise pas de correction par la surface cellulaire et les effets de bord de l'image, dans la mesure où les distances de recherche des voisins sont faibles, et que les images sont comparées entre elles, non à une distribution théorique aléatoire.

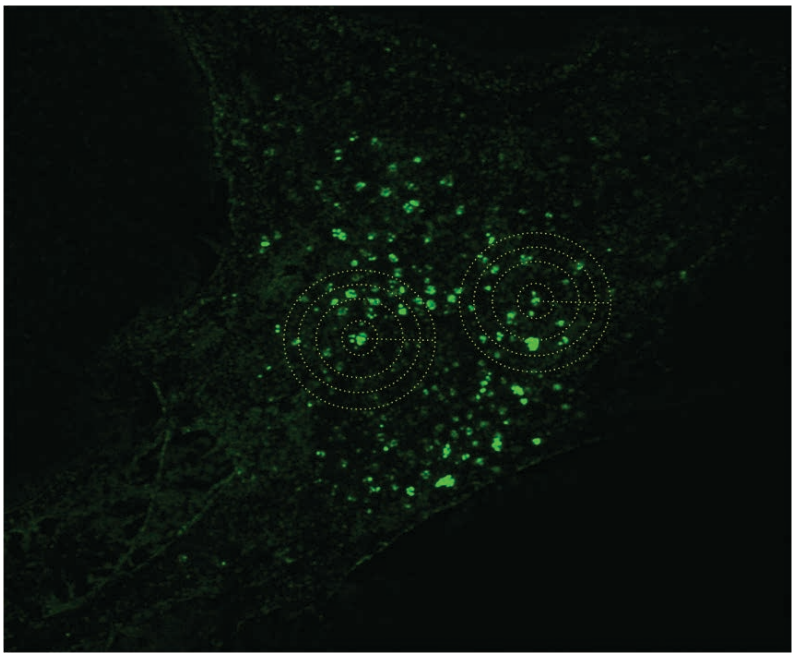


Figure 4. 14 : Image représentative d'un fibroblaste de malade Alzheimer marqué sur les endosomes précoces. Les cercles concentriques illustrent une zone de recherche des endosomes voisins dans un rayon d'environ 15µm. Le comptage du nombre de voisins par disque est répété pour chaque endosome de la cellule. La valeur de la densité moyenne de voisins par classe de distance (DMV) d'une cellule est la moyenne des nombres d'endosomes par cercle concentrique divise par la surface.

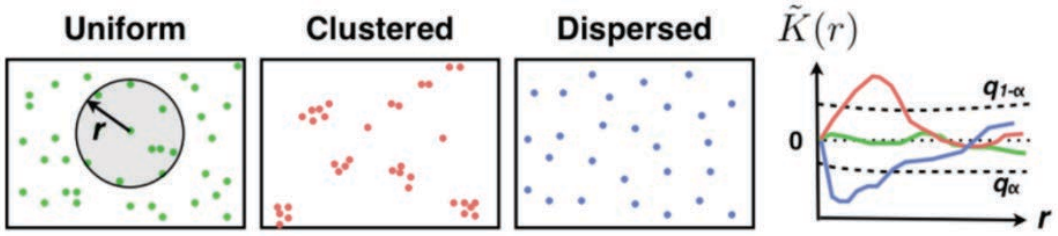


Figure 4. 15 : Densité de voisins par classe de distance. La fonction de Ripley permet de décrire les tendances à l'agrégation ou à la répulsion des points composant un motif de distribution spatiale. Adapté de Lagache et al, 2013.

2 Population

Le Tableau 4.2 présente le résumé de la population incluse.

Trois groupes sont comparés : 24 témoins et 48 patients Alzheimer dont 25 au stade léger (CDR=0.5) et 23 avec une démence modérée (CDR>0.5).

Tous les patients MA répondaient aux critères suivants : a) syndrome amnésique initial et prédominant le tableau clinique, avec des scores au RLRI définis par RL < 19 ou RT < 40 ; b) des marqueurs physiopathologiques de MA positifs définis par des biomarqueurs du LCR de type Alzheimer (ratio IATI < 0,8, Koric 2011) et une imagerie amyloïde positive définie par un index global cortical de fixation du ligand > 1,4.

Les patients ont été définis en deux sous groupes en fonction de la gravité globale de la maladie par l'échelle de CDR en stade de MCI (CDR = 0,5) et stade de démence légère à modéré (CDR= 1 ou 2). Ces groupes seront désignés par le terme MA-MCI et MA-D.

Les témoins ont été inclus sur les bases d'un bilan neuropsychologique normal, l'absence d'ATCD médicaux pouvant interférer avec les résultats, l'absence de lésion significative sur l'IRM cérébrale ET une imagerie amyloide négative (index de fixation cortical < 1,4).

Les trois groupes sont équilibrés en âge et sexe. Comme attendu, le MMSE est significativement diffèrent entre les trois groupes.

La fréquence des allèles epsilon4 de l'ApoE n'est pas significativement différente entre les patients MA-MCI et MA-D.

Les données individuelles des témoins, des MA-MCI et des MA-D sont disponibles en annexes 1a, 1b et 1c, respectivement.

	Témoins		MCI		MA	
	N=24		N=25		N=23	
sex ratio (F/H)	13/11		14/11		12/11	
age[a, NS]	67.04 ± 10.16	(51 - 86)	67.68 ± 9.7	(52 - 82)	69.43 ±11.6	(51 – 91)
MMSE[a]	29.9 ± 0.9	(27 - 30)	23.7 ±3.19[c,d]	(18 - 30)	15.43 ±4.9[c,d]	(4 – 22)
CDR = 0.5[b]	-		25		-	
CDR = 1[b]	-		-		23	
Genotype ApoE	22/24		22/25*		23/23*	
ApoE ε4/ -	2/22		9/25		7/23	
ε4/ε4	0/22		6/25		5/23	
[11]C-PIB PET scan	20/24		22/25		18/23	
Ponction lombaire (PL)	-		20/25		16/23	
PL et TEP au PIB	-		18		14	
Nb de cellules analysées	**454**		**460**		**427**	

3 Résultats

3.1 Endosomes dans les PBMC

Les données ont été analysées avec deux niveaux d'analyse différents, d'abord par cellule, en comparant entre les groupes le nombre et la taille moyenne des endosomes par cellule, puis par sujet en confrontant les données des endosomes aux données clinico-biologiques disponibles, puis par une analyse spatiale des endosomes dans la cellule.

Le Tableau 4.2 présente le résumé de la population incluse. Trois groupes sont comparés : 24 témoins et 48 patients Alzheimer dont 25 au stade léger (CDR=0.5) et 23 avec une démence modérée (CDR>0.5). Les trois groupes sont équilibrés en age et sexe. Le MMSE est significativement different entre les trois groupes. Enfin la frequence des alleles epsilon4 de l'ApoE n'est pas significativement differente entre les patients MCI et MA. La Figure 4.16 montre des exemples de cellules marquées sur les endosomes précoces dans les trois groupes.

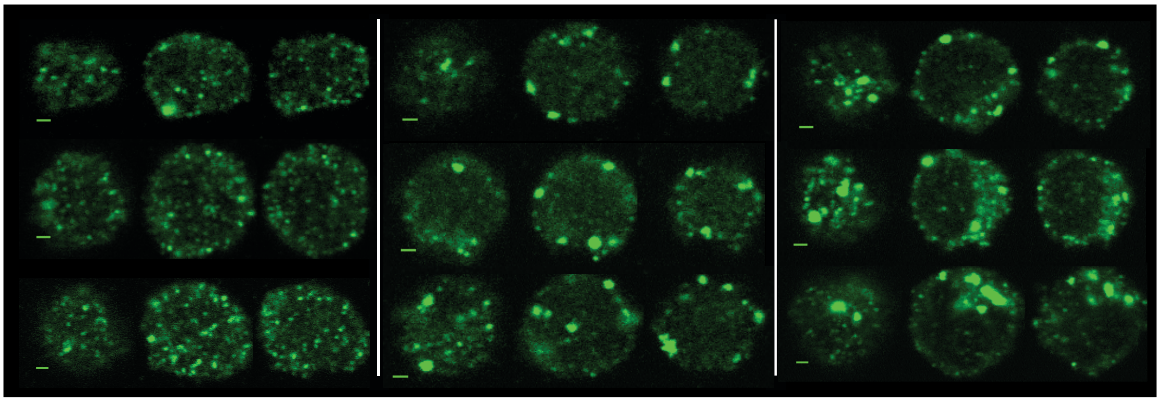


Figure 4. 16: Planche d'images représentatives de PBMC marquées sur les endosomes précoces avec des anticorps anti-EEA1, et un marquage secondaire couplé à un fluorophore vert (Goat-anti-rabbit-Alexa488®). Chaque panneau présente de haut en bas trois cellules représentatives des contrôles (A), des individus MCI (B), et desindividus MA (C). Pour chaque cellule est présenté horizontalement une série de trois coupe optiques espacées de 2µm à travers le volume de la cellule. Les barres d'échelle représentent une longueur de 1µm.

3.1.1 Analyse des endosomes par cellule

Les données cellulaires qui ont été étudiées sur la cohorte entière sont le nombre et le volume moyen par cellule. Le nombre d'endosomes par cellule et la taille moyenne des endosomes par cellule ont été comparés par une ANOVA hiérarchique à deux niveaux (sujet, groupe) et aucune différence significative n'a été mise en évidence (Figure 4.17). Le tableau 4.3 résume la moyenne± l'ecart type du nombre d'endosomes par cellule des sujets.

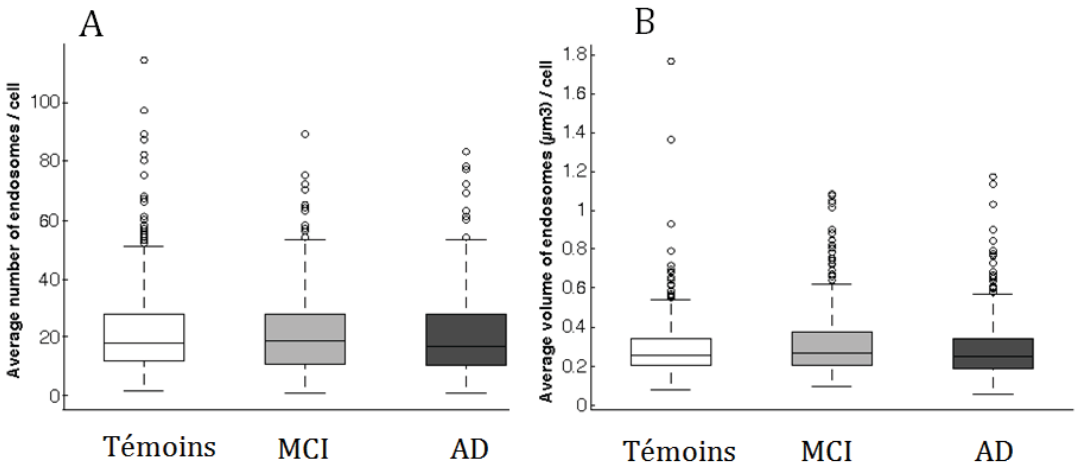


Figure 4. 17: Nombre et taille moyenne des endosomes par cellule. Ni le nombre (A), ni le volume moyen par cellule (B) ne sont significativement différents entre les Témoins et les patients.

	Témoins	MCI-MA	MA
Nb cellules	n=454	n=460	n=427
Nb endosomes / cellule	21.99 ±14.87	20.24 ±12.28	21.97 ±14.1
Vol. endosomes / cellule	216.19 ±105.6	214.62 ±106.4	234.03 119.5

Tableau 4. 3 *:* Nombre moyen d'endosomes par cellule et volume moyen des endosomes par cellule.

3.1.2 Classification des volumes moyens des endosomes par cellule

Dans un travail de 2008, Cataldo et collaborateurs procèdent à une classification des endosomes dans trois catégories de tailles pour souligner les différences qui concernaient une classe de taille particulière. En nous inspirant de cette méthode nous avons réalisé une classification des cellules en fonction de leur volume endosomal.

Trois intervalles de valeurs (petit – moyen – grand) sont définis dans les témoins en découpant l'histogramme des valeurs par déciles (voir méthodes, Figure 4.12) et en rassemblant dans la classe « petit » tous les VEM compris entre 15 voxels (la valeur d'exclusion des objets infra-résolutifs) et le 5e décile (195voxels), la classe « moyen » comprend toutes les valeurs comprises entre le 5e décile et le 9e décile (309vx), enfin la classe « grand » comprend toutes les valeurs supérieures à 309 voxels (Tableau 4.4 et Figure 4.18).

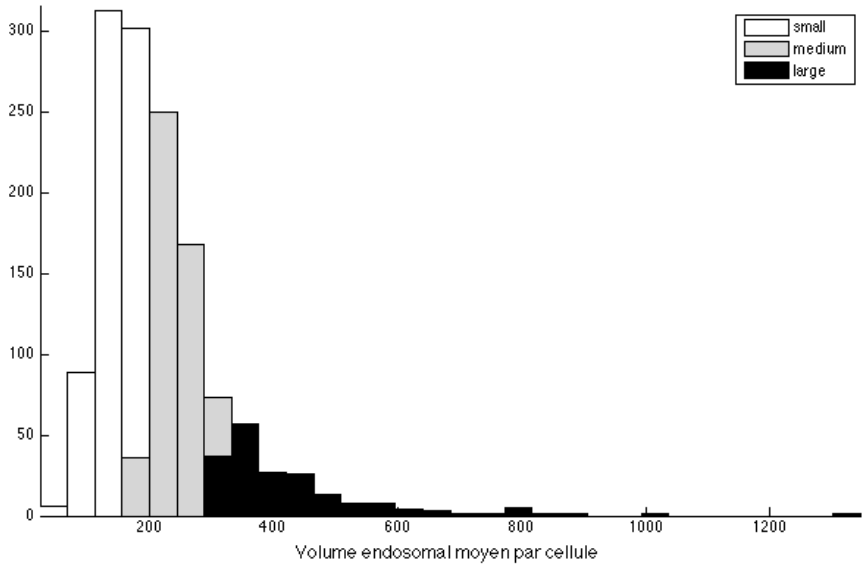


Figure 4. 18: Division de l'histogramme des valeurs des VEM par cellule en trois catégories. Les limites des intervales de valeurs sont définies à partir des témoins en prenant pour limites la médiane et le 9^{e} décile (voir figure 4.12). L'histogramme représenté ici présente les valeurs de toutes les cellules analysées (n=1431), tous groupes confondus.

Une analyse du volume endosomal moyen (VEM) par cellule en distribuant les cellules dans trois catégories de volume, montre des distributions significativement différentes pour les trois groupes (Figure 4.19 et Tableau 4.5 pour un résumé de la classification). Une comparaison post-hoc des effectifs par classe de taille des VEM révèle que seules les distributions des MA et des témoins sont différentes (p=0.014 après correction de Bonféroni pour tests multiples). Les Chi2 de comparaison des distributions des VEM dans le groupe des MCI avec des témoins, et avec les MA, renvoient un p non significatif.

	Intervalle (voxels)	correspondance (μm^3)	diamètres estimés (nm)
Petits VEM	[15 - 195]	[0.02 - 0.26]	[340 - 790]
moyens VEM	[195 - 309]	[0.26 - 0.41]	[790 - 920]
grands VEM	[309 - 1323]	[0.41 - 1.76]	[920 - 1500]

Tableau 4. 4 : Définition des intervalles de valeurs de trois classes de volume endosomal moyen par cellule (VEM). Ces classes de taille ont ensuite servi à classer toutes les cellules en fonction de leur VEM. Les diamètres estimés ont été calculés en considérant que les objets observés sont de forme sphérique

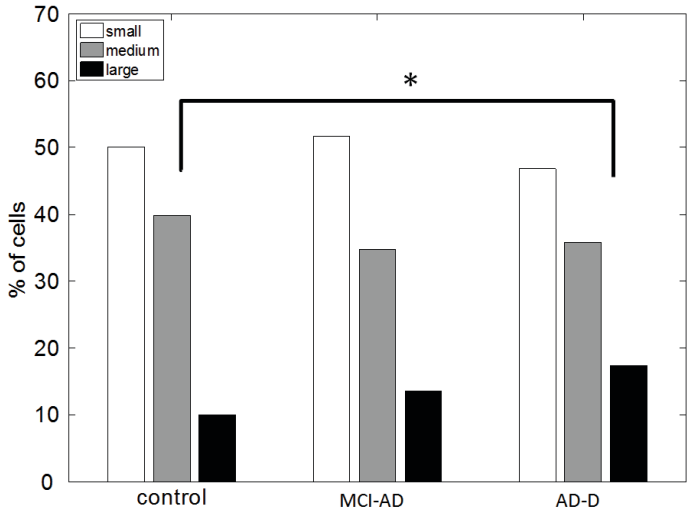


Figure 4. 19 : Classification des cellules en fonction des VEM. La comparaison des trois distribution obtenues pour les témoins, les MCI et les MA renvoie une p-valeur significative (CHI2, p=0.0021)

Effectifs (%)	Petits	Medium	Large
Témoins	240 (50.1%)	191 (39.9%)	48 (10%)
MCI	257 (51.7%)	173 (34.8%)	67 (13.5%)
MA	213 (46.8%)	163 (35.8%)	79 (17.4%)

Tableau 4. 5 : Effectifs par classe de taille. Résultat du classement des cellules en fonction de leur VEM, dans trois catégories de tailles. Entre parenthèses, les pourcentages correspondants.

3.1.3 Analyse de la corrélation aux données cliniques

Dans l'analyse par sujet, on ne tient plus compte des MEV par cellule, mais cette fois ci, tous les endosomes d'un sujet sont regroupés, et l'on ignore volontairement l'effet des cellules. Ces endosomes sont classifiés dans trois catégories à la manière des VEM par cellule, en définissant des bornes d'intervalle de valeurs chez les témoins.

Cette analyse a pour but d'étudier la liaison entre les données cliniques et démographiques des sujets, et les descripteurs morphologiques des endosomes.

Les variables qui ont été comparées sont les descripteurs des endosomes, descripteurs cliniques ainsi que les marqueurs physiopathologique et le facteur de risque ApoE. Dans une analyse préliminaire où nous observons la dispersion des valeurs, nous mettons en évidence une liaison de plusieurs variables entre elles (Figure 4.20 et Tableau 4.6).

Nous observons que les coeficients de corélation mesurés deux à deux pour chaque couple de variables, met en évidence une liaison entre l'index de fixation cortical du PiB et trois descripteurs des endosomes (listés ci-dessous). Cette methode est exploratoire et permet seulement de déterminer quel couple de variables sera étudié plus en détail.

Les descripteurs des endosomes comprennent:

- La moyenne des VEM de chaque sujet (**volmo**)
- Le nombre d'endosomes moyen par cellule de chaque sujet (**nbmoy**)
- Le % d'endosomes de grande taille de chaque sujet (>400vx) (**%larg**)

Les descripteurs cliniques comprennent:

- La gravité de la maladie (pour les patients uniquement) (CDR) (**gravi**)
- Le sexe
- L'âge des sujets
- Le score au mini mental state evaluation (**MMS**) / 30
- Le score de rappel total au test de mémoire verbale du RLRI16 (**RTT**)

Les marqueurs biologiques de la physiopathologie comprennent:

- Le génotype ApoE défini par trois catégories en fonction du nombre l'allèles epsilon 4. (catégories 1 = 0 allèles, 2 = 1 allèle, 3 = 2 allèles) (**ApoE**)
- Dosage du peptide Aß (si une ponction lombaire a été réalisée) (**Aß LC**)
- L'index de fixation corticale du [11C]PIB global (**PIB G**)
- Et l'index de fixation e du marquage [11C]PIB dans le precuneus (**precu**)

Les autres corrélations entre le marquage PIB et les données cliniques n'ont pas été étudiées. La correlation entre le volume endosomal et le PIB est calculée en tenant compte de l'âge, du sexe et de l'ApoE.

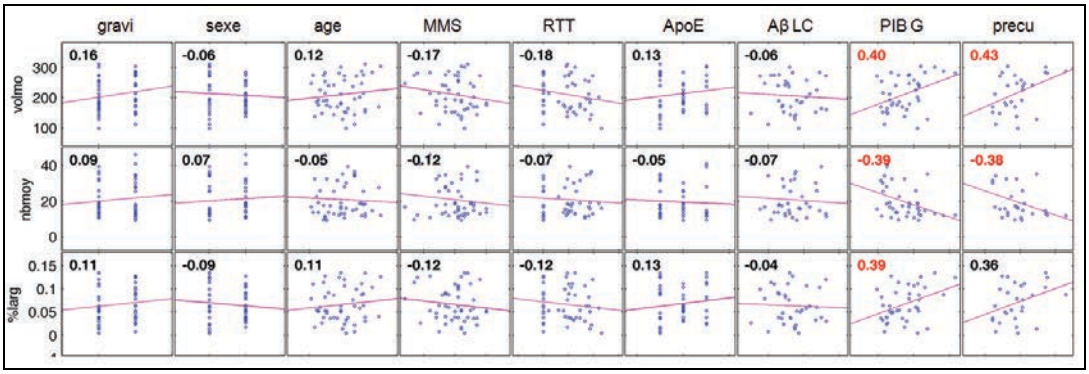


Figure 4. 20 : Matrice de dispersion des variables descriptives des sujets Alzheimer. Dans le titre de chaque graphique est indiqué le r de la corrélation qui apparaît en rouge si la corrélation est significative.

	gravi	sexe	age	MMS	RTT	ApoE	Aβ LC	PIB g	precu
volmo	0.16	-0.06	0.12	-0.17	-0.18	0.13	-0.06	0.40*	0.43*
Nbmoy	0.09	0.07	-0.05	-0.12	-0.07	-0.05	-0.07	-0.39*	-0.38*
%larg	0.11	-0.09	0.11	-0.12	-0.12	0.13	-0.04	0.39*	0.36

Tableau 4. 6 : Matrice de corrélation des variables, chez les sujets Alzheimer. Les coefficients de corrélation sont associés à une étoile quand la valeur du p est significative. La valeur du coefficient de correlation entre volume moyen des endosomes et PIBglobal (en rouge) a ensuite été corrigée pour tenir compte d'un éventuel effet de l'age et du sexe.

Pour vérifier la liaison observée entre le volume endosomal moyen des sujets et leur index de fixation cortical du PiB, nous calculons la corrélation partielle entre ces variables en corrigeant le coefficient de corrélation de pearson des deux variables étudiées par la covariance des autres variables (ici, l'age le sexe et le génotype *APOE*)

La valeur corrigée du coefficient de corrélation est toujours significative si on corrige par l'âge et le sexe (rho= 0.37 ; p=0.0187). Par ailleurs, en corrigeant aussi par l'ApoE, la corrélation entre volume endosomal moyen et PIB est plus forte (rho=0.39 ; p=0.0154).

Enfin, la corrélation entre les descripteurs des endosomes n'est pas significative pour les données neuropsychologiques et pour le dosage le l'A-beta dans le LCR.

Dans le cerveau, le phénotype d'endosomes élargis est influencé par le génotype ApoE (Cataldo, 1997). Pour vérifier si les isoformes de l'ApoE influencent l'interdépendance entre le volume endosomal moyen des sujets et le marquage cérebral des dépots amyloides, nous avons observé la corrélation entre VEM et marquage PIB en stratifiant les sujets par génotype ApoE (Figure 4.21). Nous réalisons 3 groupes : un groupe avec tous les témoins, un groupe avec tous les patients ApoE E4/x ou E4/E4, et un groupe de patients sans les porteurs d'allèles E4. Nous remarquons que la corrélation entre VEM et PIB est plus forte chez les sujets ApoE4 que sur l'ensemble des sujets. Par ailleurs nous n'observons plus de corrélation entre VEM et PIB chez les sujets sans allèles E4, mais le nombre d'individus étant plus faible que dans l'analyse précédente, nous ne pouvons pas conclure a une absence de corrélation chez les sujets sans allele E4.

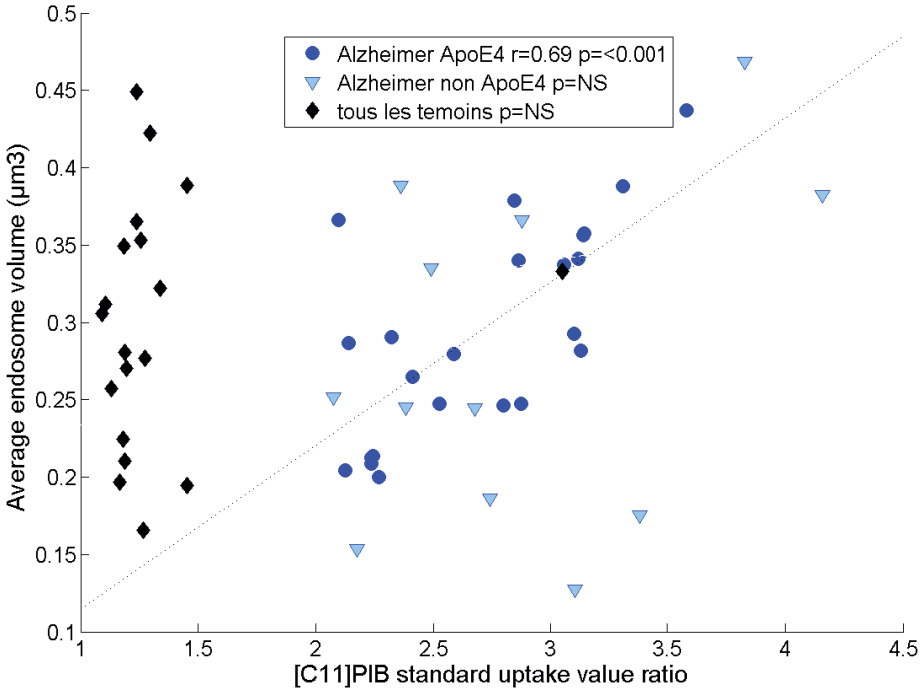


Figure 4. 21*: Corrélation entre volume moyen des endosomes* et marquage amyloïde cérébral. Contrôles: losanges noires, patients: triangulaires et cercles bleus. Les patients ont été stratifiés en fonction de leur génotype ApoE: patients sans allèle ApoE4 : triangles bleus claire/ patients avec 1 ou deux allèles E4 (cercles bleus foncé).

3.1.4 Analyse spatiale des endosomes dans les PBMC

2 types d'analyses spatiales ont été réalisées, une analyse de distance au plus proche voisin (cf Méthodes, Figure 4.14), et une analyse de densité des endosomes en fonction de la distance (cf Méthodes, Figure 4.15).

3.1.4.1 Méthode des plus proches voisins

La comparaison des fréquences cumulées de la distance au plus proche voisin dans les PBMC par la méthode des rangs de kruskal-Wallis ne montre pas de différence significative de la densité des endosomes. (Kolmogorov-smirnof, p = 0.39 pour control|MA ; et 0.81 pour control | MCI) (Figure 4.22).

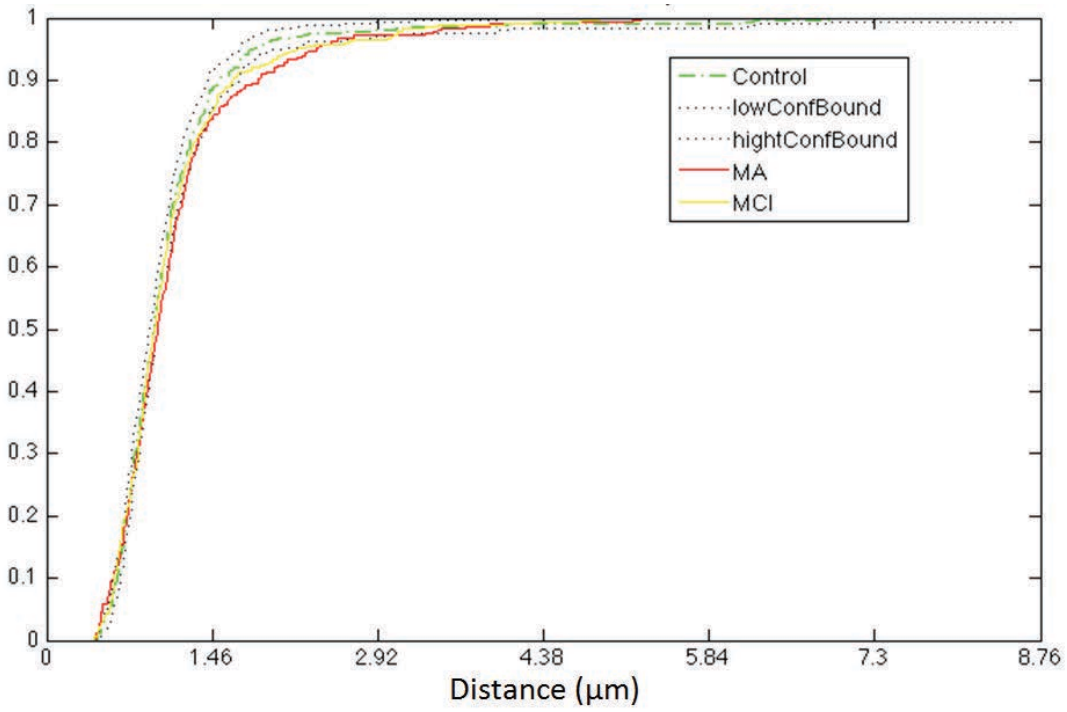


Figure 4. 22: Courbe de la fréquence cumulée de la distance au plus proche voisin dans les PBMC. Témoins (vert), patients au stade MCI (jaune), ou Alzheimer modéré (rouge). Les intervales de confiance (lignes en pointillés) indiquent une tendance vers une distribution moins clusterisées chez les MCI plus forte chez les MA.

Même si, dans les comparaisons réalisées sur les courbes cumulatives des MCI et des MA par rapport aux témoins, on observe une légère divergence d'avec les témoins entre 1 et 3 micromètres de distance. Nous en déduisons que l'analyse des plus proches voisins n'est pas

assez sensible pour mettre en évidence une différence de distribution spatiale. Une analyse qui permet de décrire la densité d'endosomes dans des intervalles de distance indépendants permet en revanche une meilleure discrimination des distributions spatiales.

3.1.4.2 Méthode de Ripley – densité des voisins

La deuxième méthode consiste en une analyse de densité de voisins par classe de distance est peut-être plus sensible pour détecter les différence parce qu'elle tient compte de tous les endosomes qui se trouvent dans le rayon de recherche, et pas uniquement du plus proche voisin (Figure 4.23 & Figure 4.24).

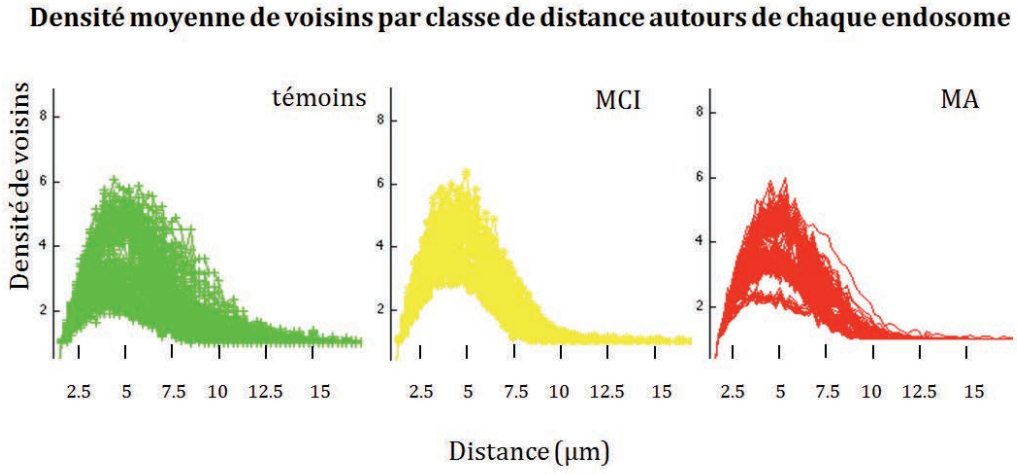


Figure 4. 23: Densité moyenne de voisins par classe de distance. Cette représentation présente, pour chaque cellule, le nombre d'endosomes par unité de surface.

On constate que la distribution des endosomes dans les PBMC des trois groupes est très différente d'une cellule a l'autre (Figure 3.7) mais en observant les moyennes des groupes (Figure 4.8) on met en évidence une différence significative de densité d'endosomes en fonction de la distance dans les trois groupes tel que révélé par l'ANOVA réalisée a chaque point de distance.

Les endosomes des patients MCI se comportent de manière opposée a ceux des patients MA avec des distributions significativement plus denses chez les MCI et significativement moins denses chez les MA, comparativement aux témoins.

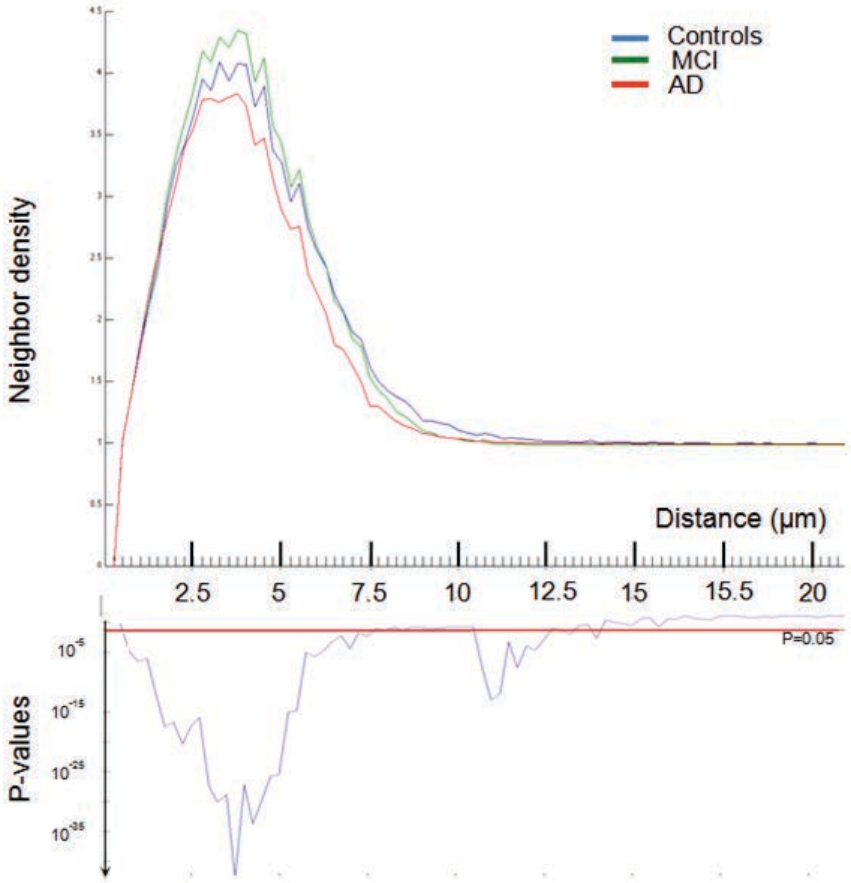


Figure 4. 24: Puissance de la significativité de la différence entre Témoins, MCI et MA, pour la densité d'endosomes par classe de distance, dans les PBMC. En haut, moyenne par groupe, pour chaque point de distance. En bas, p-valeur corrigée (Bonferoni) de l'ANOVA réalisée pour chaque distance sur les valeurs des cellules des témoins, des MCI et des MA. Echelle logarithmique. La barre horizontale indique le seuil de significativité de 0.05.

3.2 Analyse des endosomes dans des fibroblastes

Pour vérifier si d'autres types de cellules périphériques présentent également les modifications observées dans les PBMC, nous avons réalisé une caractérisation des endosomes précoces dans des fibroblastes prélevés dans un groupe de patients Alzheimer et un groupe témoin (Figure 4.25). Ces cellules nous ont été confiées dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de (*URAFPA-BFLA, Université de Lorraine, Nancy, France).*

Nous avons analysé la taille et le nombre des endosomes par cellule de la même manière que dans les PBMC, ainsi que la distribution spatiale des endosomes dans la cellule par la méthode des plus proches voisins, et la fonction de Ripley adaptée à un traitement automatique.

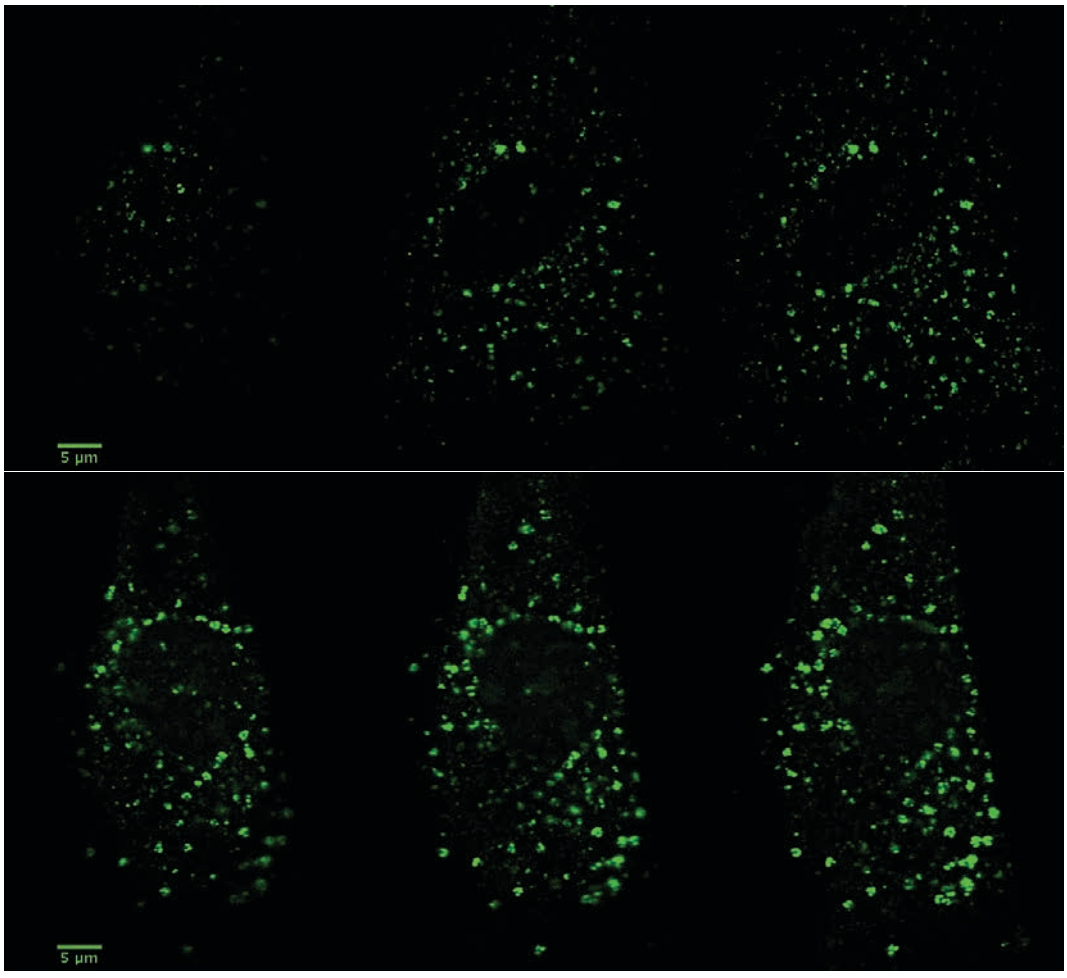


Figure 4. 25: Images représentatves de fibroblastes marqués sur la protéine EEA1 (haut) témoin, (bas) patient Alzheimer. Les trois images représentent des coupes optiques espacées de 500nm en profondeur dans la même cellule.

3.2.1 Analyse du nombre et de la taille des endosomes dans les fibroblastes

Les données présentées en Figure 4.26 portent sur les fibroblastes cutanés de 4 témoins et de 6 patients Alzheimer. Le nombre d'endosomes par cellule n'est par différent entre les témoins et les malades. En revanche le volume endosomal moyen (VEM) est significativement plus élevé chez les malades (Figure 4.27). Les valeurs moyennes sont présentées dans le tableau 4.7, ci-dessous.

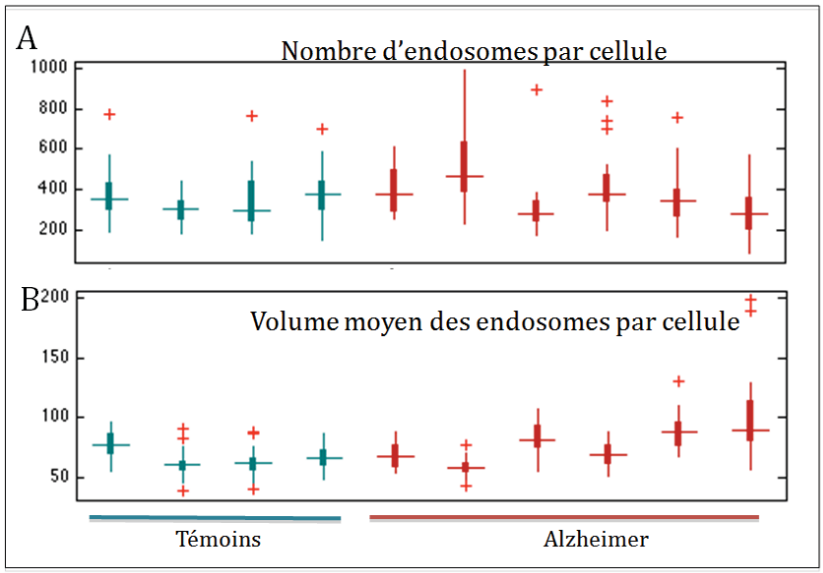


Figure 4. 26: Présentation du nombre (A) et du volume endosomal moyen (B) pour chaque individu dans les fibroblastes.

	Témoins	Alzheimer	P*
Nombre de sujets	4	6	
Nombre de cellules	116	127	
Volume endosomal moyen par cellule (vx)	69.8 ±12.9	77.7 ±17.6	0.0034
Nb endosomes par cellule	359.5±120.8	396.9±169.9	0.074

Tableau 4. 7 : Tableau recapitulatif des valeurs moyennes par groupe, pour le nombre d'endosomes par cellule et le volume endosomal moyen par cellule, dans les fibroblastes. (*) le p indique la p-valeur d'un test de Student comparant les moyennes du groupe MA au groupe témoin.

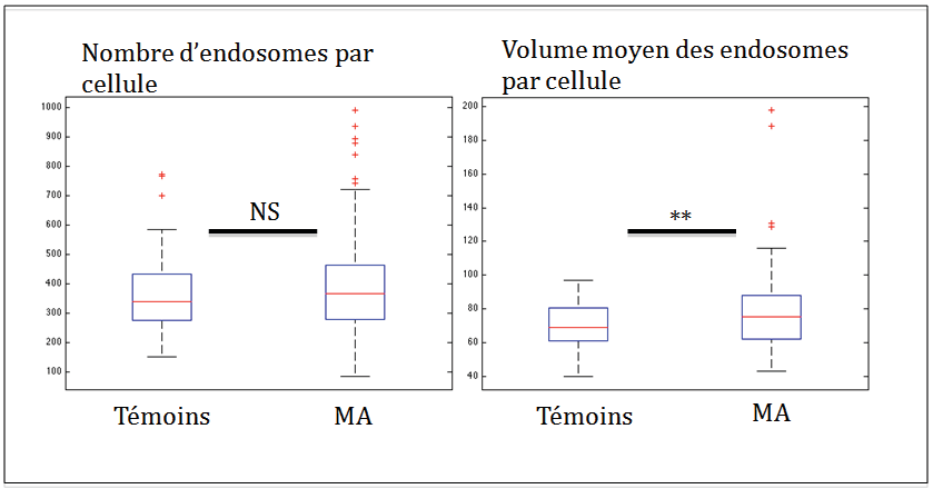


Figure 4. 27 *:* Moyenne par groupe du nombre moyen d'endosomes par cellule, et du volume endosomal moyen dans les fibroblastes.

Pour comparer les résultats obtenus dans les fibroblastes à ceux obtenus dans les PBMC, nous avons réalisé la même classification des cellules en fonction de leur volume endosomal moyen. Les bornes des intervalles de valeurs sont définies dans l'histogramme des valeurs du groupe témoin en prenant la médiane et le 9^{e} décile (Figure 4.28). Les intervalles obtenus sont indiqués dans le tableau 4.8.

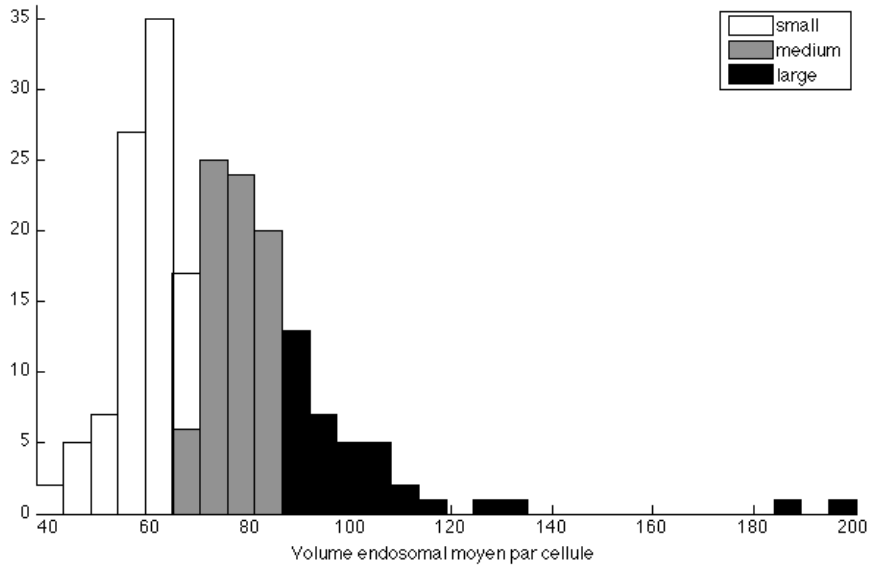


Figure 4. 28 *:* Division de l'histogramme des valeurs des VEM par cellule en trois catégories. Les limites des intervales de valeurs sont définies à partir des témoins en prenant pour limites la médiane et le 9^{e} décile (voir figure 4.12). L'histogramme représenté ici présente les valeurs de toutes les cellules analysées (n=217), tous groupes confondus.

La classification des cellules en fonction de leur volume endosomal moyen dans les trois classes de tailles ainsi définies, indique une augmentation de la fréquence des cellules présentant des endosomes élargis avec 25.2% de cellules avec des volumes endosomaux élevés (>0.2µm^3) contre 10% chez les témoins (Figure 4.29). Le tableau 4.9 indique le nombre de cellules dans chaque classe de volume et le pourcentage correspondant. La comparaison des deux distributions indique que les deux distributions sont significativement différentes (Chi^2, p=0.018).

	Petits VEM	Moyens VEM	Grands VEM
Intervalle de valeurs (voxels)	] 15 – 69]	] 69 – 89]	] 89 – 197]
Correspondance (µm^3)	] 0.03 – 0.15]	] 0.15 – 0.2]	] 0.2 – 0.43]

Tableau 4. 8 *:* Définition des intervalles de valeurs de trois classes de volume endosomal moyen par cellule (VEM). Ces classes de taille ont ensuite servi à classer toutes les cellules en fonction de leur VEM.

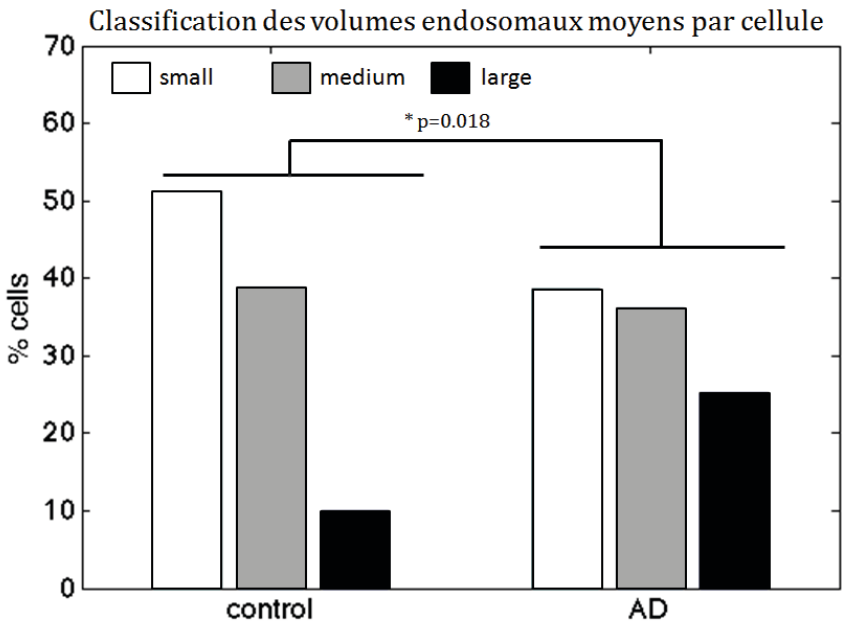


Figure 4. 29 : Classement des cellules dans trois classes, en fonction de leur VEM, dans les fibroblastes. Les deux distributions ont été comparées par un test Chi2, p = 0.018.

Effectifs (%)	Petits	Medium	Large
Contrôles	46 (51.1%)	35 (38.8%)	9 (10%)
Alzheimer	49 (38.6%)	46 (36.2%)	32 (25.2%)

Tableau 4. 9 *:* Tableau d'effectifs après classification des cellules en fonction de leurs VEM, dans les fibroblastes. Le tableau montre la différence de distribution des VEM dans les fibroblastes dans trois catégories de tailles définies à partir de la population témoin. Entre parenthèses le pourcentage correspondant.

3.2.2 Analyse spatiale de la répartition des endosomes dans les fibroblastes

Comme dans les PBMC, deux analyses de distribution spatiale ont été réalisées. L'analyse de distribution spatiale est plus pertinente dans les fibroblastes en raison du cytoplasme beaucoup plus étendu.

Les fibroblastes que nous avons observés nous ont semblé contenir des grappes d'endosomes rassemblées par petits groupes, et plus ou moins distribués dans le cytoplasme. Pour vérifier cette observation, nous avons réalisé une analyse de la répartition spatiale des endosomes par la méthode des plus proches voisins et la méthode de Ripley évaluant la densité de voisins de chaque endosome par classe de distance croissante.

3.2.2.1 Méthode des plus proches voisins

La Figure 4.30 présente l'analyse de la distance au plus proche voisin dans les fibroblastes. On met en évidence une accumulation significativement plus rapide (a des distances plus faibles) chez les patients MA qui sortent de l'intervalle de confiance entre 1 et 3um révélant une distribution plus dense chez les malades.

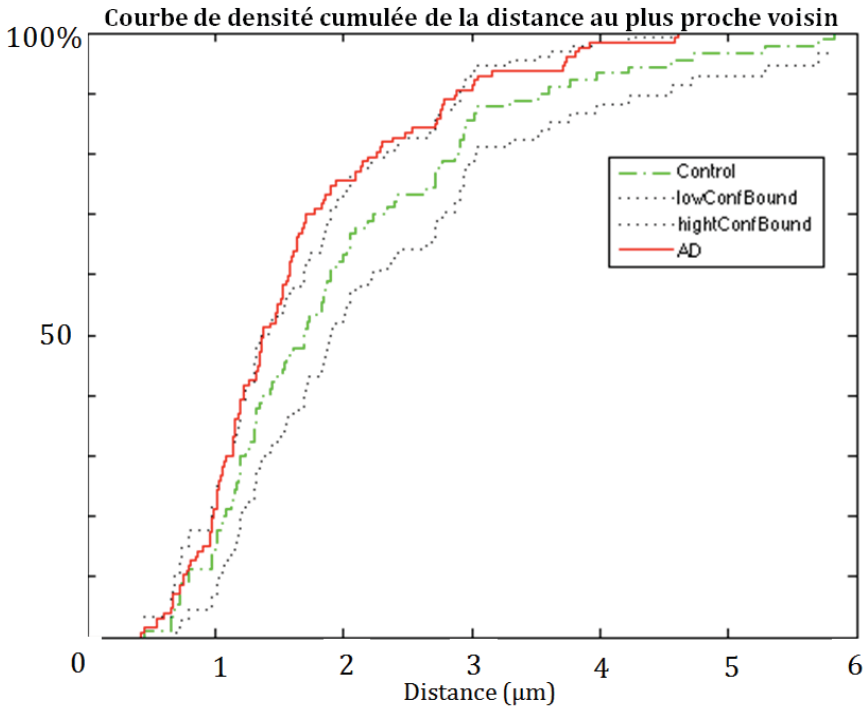


Figure 4. 30 : Courbe de densité cumulée de la distance au plus proche voisin. La courbe verte représente la fréquence cumulée des témoins, avec en noir l'intervalle de confiance. La courbe des MA (rouge) s'écarte significativement de l'intervalle de confiance entre 1 et 3 µm. (p= 0.038).

3.2.2.2 Méthode de Ripley – densité des voisins

Pour vérifier si le résultat de l'analyse spatiale par la méthode du plus proche voisin est confirmées par une analyse de densité de distribution, les cellules sont analysées par la méthode de Ripley. L'analyse de la densité d'endosomes en fonction de la distance pour chaque cellule (Figure 4.31) met en évidence une différence visible de densité de distribution des endosomes entres les témoins et les MA, en réalisant une ANOVA entre les valeurs des témoins et celles des MA, a chaque point de distance (Figure 4.32) observe que la différence est significative a toutes les classes de distance.

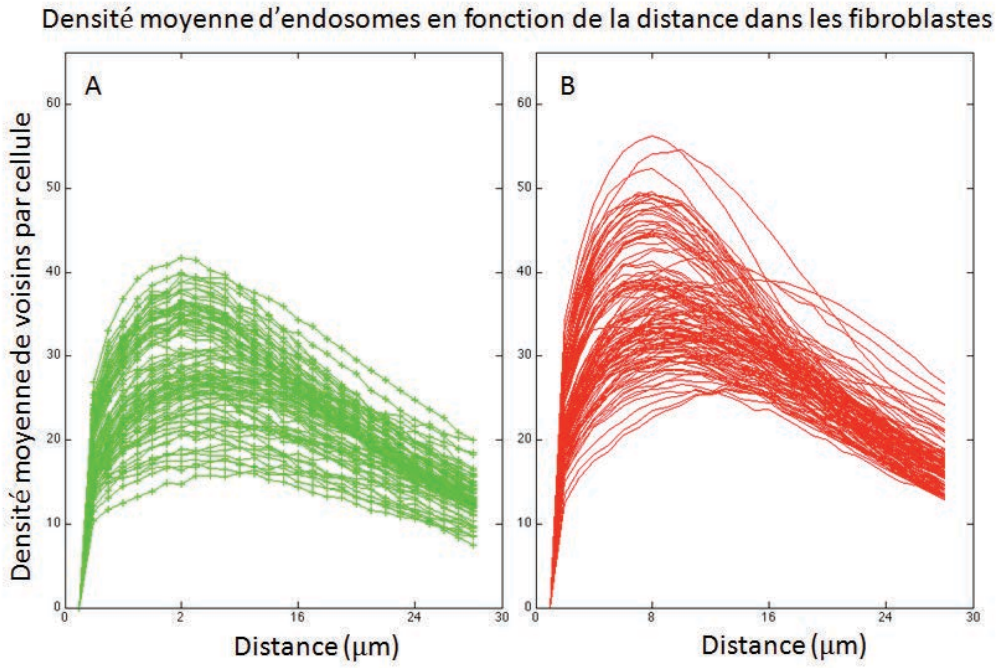


Figure 4. 31 : Desité moyenne d'endosomes par classe de distance pour chaque cellule. (A) cellules des témoins. (B) cellules des sujets Alzheimer.

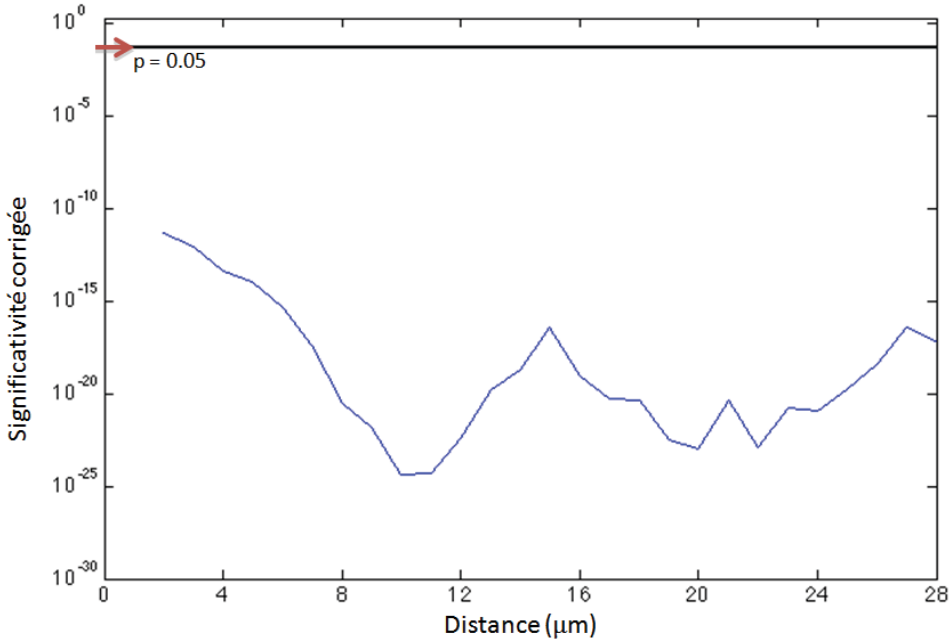


Figure 4. 32 : Comparaison des densités de distribution des endosomes entre MA et témoins. Le graphique présente la valeur du p d'une avona comparant les densités de voisins moyennes par classe de distance, pour chaque classe de distance. La valeur de p a été corrigée par la correction de Bonferoni pour les comparaisons multiples en multipliant chaque p par le nombre de comparaisons (ici 28). L'échelle est logarithmique en Y et arithmétique en X. La valeur du p est très inférieure au seuil de significativité de 0.05 (flèche rouge) pour toutes les classes de distance.

3.2.3 Conclusion sur l'analyse des endosomes dans les fibroblastes

L'analyse du nombre et de la taille des endosomes dans les fibroblastes révèle un nombre moyen d'endosomes par cellule équivalent entre les deux groupes (359.5±120.8 et 396.9±169.9 respectivement pour témoins et Alzheimer). La taille moyenne des endosomes par cellule est significativement différente entre les sujets MA (77.7±17.6) et les témoins (69.8±12.9). (Figure 4.27 et tableau 4.7)

La classification des cellules par catégorie de VEM (figure 4.28 et tableau 4.8) montre une fréquence accure des cellules avec des VEM > 0.2µm^3 (diamètre >730nm) chez les patients avec une MA (25.2% des cellules) comparativement aux témoins (10%) (Figure 4.29 et tablea 4.9).

L'analyse de distribution spatiale des endosomes dans la cellule met en évidence une distance au plus proche voisin plus petite chez les malades (Figure 4.30). Particulièrement, à des distances entre 1 et 3 micromètres autour des endosomes, où le nombre d'occurrences est significativement supérieur à celui des témoins, révélant un motif de distribution spatiale en petits amats d'un diamètre moyen de 3µm, bien visibles sur la figure 4.25.

L'analyse de densité de voisins (figure 4.31) rend quant à elle, compte d'une distribution globalement plus dense dans les cellules des malades. La comparaison, point par point entre les densités d'endosomes des malades et des témoins sur 80 intervales de distance espacés de 300nm autour de chaque endosome, renvoie un p très significatif à toutes les distances étudiées (Figure 4.32).

D'une manière générale ces résultats récapitulent ceux observés dans les PBMC. Les cellules portant des endosomes élargis sont plus fréquentes chez les malades, et les endosomes présentent une distribution plus dense.

3.3 Lignées d'individus DS avec ou sans Alzheimer

Un dernier travail a porté sur la comparaison de lignées lymphoblastoïdes d'individus trisomiques dont une moitié souffrait d'une maladie d'Alzheimer.

L'objectif était de déterminer si l'apparition de la démence s'accompagne dans les cellules périphériques d'une altération supplémentaire à celle déjà observée habituellement dans le Down syndrome.

12 lignées lymphoblastoïdes d'individus porteurs d'une trisomie 21 dont 6 souffraient d'une MAont été analysées. Ces lignées ont été obtenues de Jean Delabar (CNRS UMR 8251, Unité de biologie fonctionnelle et adaptative, Univ Paris Diderot) dans le cadre d'une collaboration.

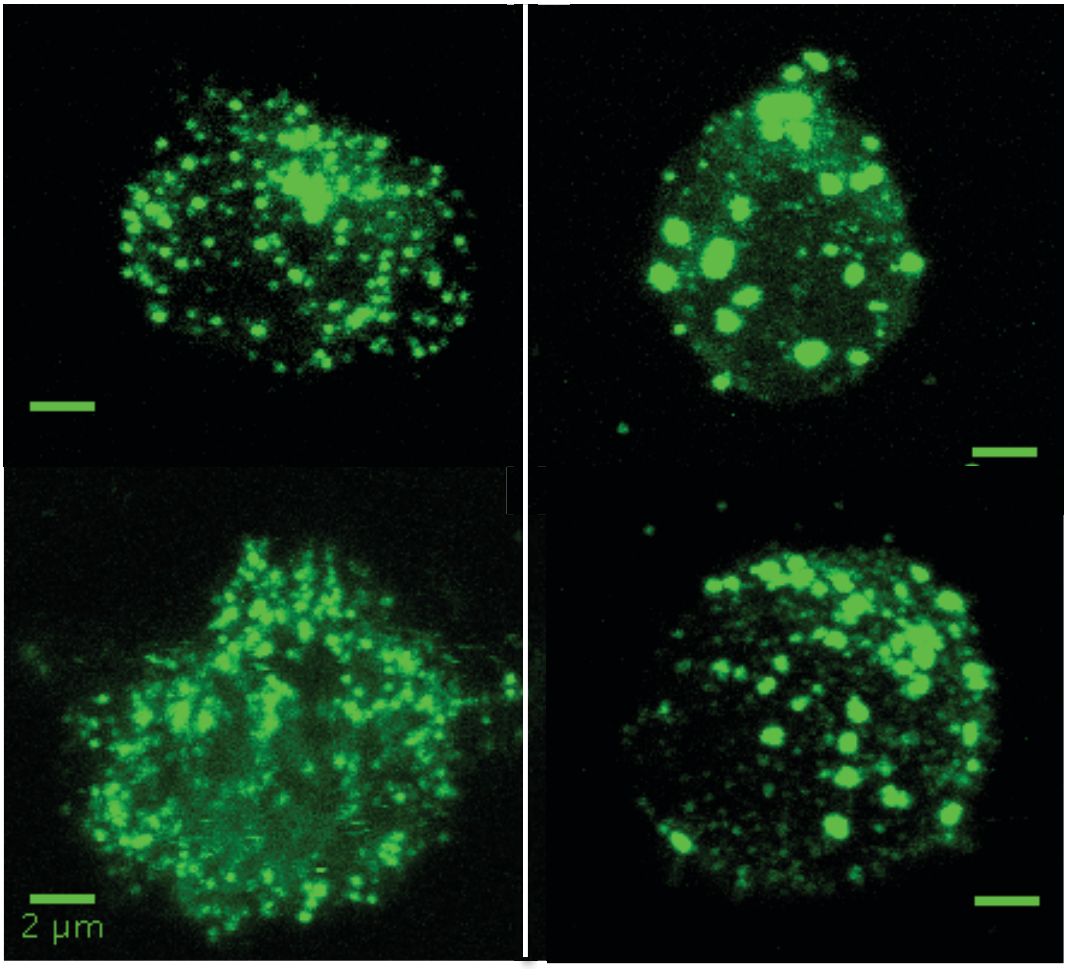


Figure 4. 33 : Images représentatives du marquage des endosomes précoces dans des lignées lymphoblastoïdes. Individus DS (gauche) et individus DS atteint par une MA (droite).

3.3.1 Nombre et volumes des endosomes

Le nombre d'endosomes par cellule est 41.9 ±28.5 chez les individus trisomiques sans MA, et 36.62±22.34 chez les individus trisomiques avec MA ; les valeurs ne diffèrent pas significativement (student, p=0.19).

Le volume moyen des endosomes par cellule est 192.4 ±60.4 chez les individus DS, et 221.5 ±81.6. Le test de Student met en évidence une différence significative entre les deux groupes (p=0.01) mais les boites à moustaches (Figure 4.34) montrent un recouvrement important des écarts types.

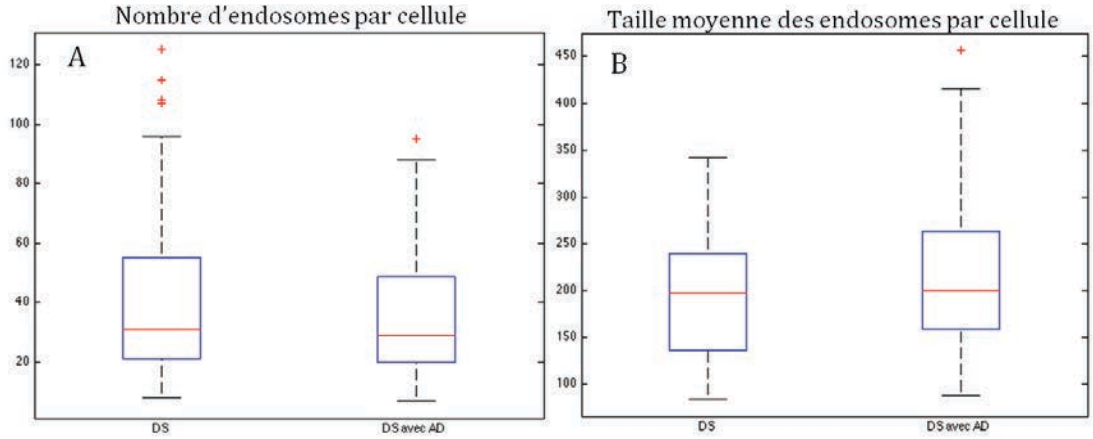


Figure 4. 34 : Nombre et taille moyenne des endosomes par cellule dans les LCL de patients trisomiques avec ou sans MA. Les nombres moyens (A) ne diffèrent pas significativement (p=0.19) et les volumes moyens par cellule (B) sont en revanche significativement différents (P=0.012) entre les individus trisomique souffrant une MA et ceux qui n'ont pas de MA.

Malgré la différence significative, entre les moyennes de groupe, nous constatons une variance importante dans la taille moyenne des endosomes, et en affichant les histogrammes des deux groupes (Figure 4.35), on constate une distribution multimodale qui témoigne d'une hétérogénéité au sein des groupes. A cause de l'hétérogénéité de la distribution du VEM par cellule, nous avons décidé de ne pas réaliser la répartition par classes de taille à partir des 5e et 9e déciles de la population de référence (ici, les DS sans MA), mais avons défini trois barycentres par la méthode des K-means, qui vise à rassembler les points d'un nuage de points dans un nombre k de classes défini par l'utilisateur, en minimisant la distance au centre de la classe. Les barycentres obtenus sont 145, 237, et 377 (correspondant à des volumes moyens de 0.19, 0.31, et 0.5 µm3 respectivement). La Figure 4.36 présente la classification obtenue. Les effectifs par classe sont présentés ci-dessous (Tableau 4.10).

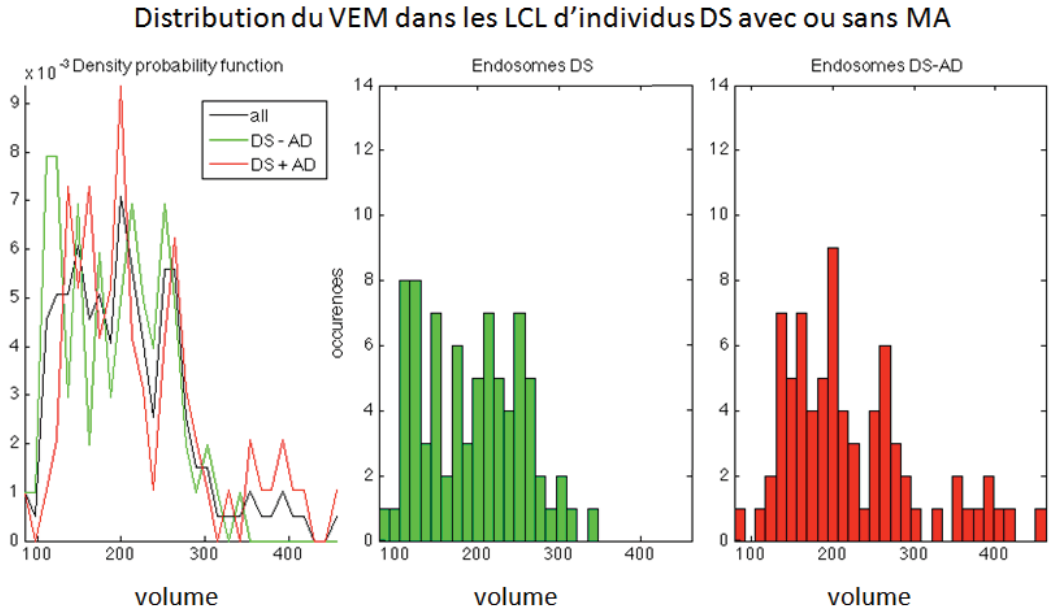


Figure 4. 35 : Distribution du volume endosomal moyen par cellule dans les LCL d'individus DS avec ou sans MA. On constate que les distributions sont hétérogènes.

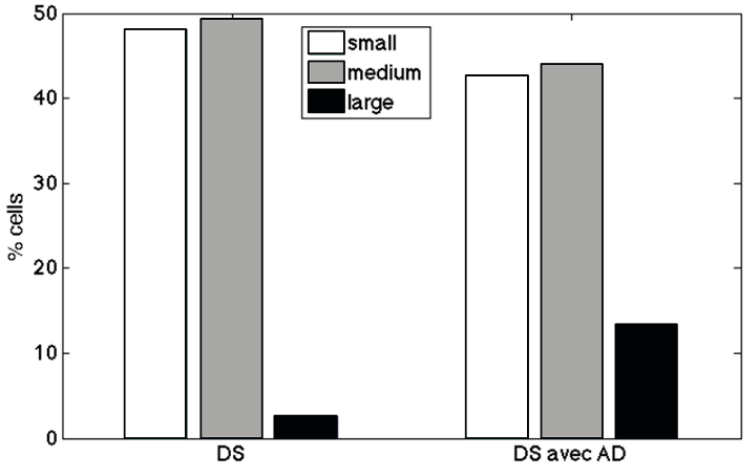


Figure 4. 36 : Classification des cellules en fonction du volume endosomal moyen définit par la méthode des K-means. Le Chi-2 de comparaison des distributions renvoie une valeur de p significative (p=0.044).

Effectifs (%)	DS	DS + AD
Classe 1 (centre = 145)	38 (48.1%)	32 (42.7%)
Classe 2 (centre = 237)	39 (49.4%)	33 (44%)
Classe 3 (centre = 377)	2 (2.5%)	10 (13.3%)

Tableau 4. 10 : Récapitulatif du nombre de cellules par classe de volumes moyen et pourcentage correspondant. Les classes des volumes moyen sont calculées par la méthode de K-means.

3.3.2 Conclusion dans les LCL d'individus DS

L'analyse des lignées lymphoblastoïdes d'individus DS a porté sur les cellules obtenues de 12 individus dont 6 avaient une maladie d'Alzheimer concomitante. 79 et 84 cellules ont été analysées chez les individus DS et chez les individus DS avec une maladie d'Alzheimer respectivement.

L'observation des histogrammes de distribution des valeurs du volume endosomal moyen par cellule (VEM) montre des distributions multimodales qui témoignent d'une hétérogénéité dans les cellules étudiées. Les cellules attypiques (avec un VEM particulièrement élevé) sont présentes dans plusieurs individus ce qui réduit les chances que cet effet provienne d'une variabilité expérimentale.

La classification des cellules dans trois classes de VEM, par l'algorytme des Kmeans, montre des distributions différentes. (chi^2 : p=0.044).

L'analyse spatiale a été réalisée (données non montrées) et ne révèle pas de différence de distribution des endosomes dans les cellules des deux groupes.

Récapitulatif des résultats principaux

Les endosomes ont été détectés par une nouvelle méthode qui semble plus sensible et moins dépendante de la présence de bruit de fond dans les images.

Nous avons réalisé les détections dans les reconstructions 3D des cellules pour tenir compte du volume entier de chaque cellule scannée.

Nous montrons dans deux types cellulaires périphériques de patients avec une MA sporadique (PBMCs et fibroblastes) que la fréquence des cellules présentant des volumes endosomaux moyens élevés est significativement plus importante que chez les contrôles.

Dans les PBMC, la population incluse comprend 24 témoins et 48 MA dont 25 au stade léger (MA-MCI, CDR =0.5) et 23 au stade démentiel modéré (MA-D, CDR>0.5), au moment de la prise de sang. Nous avons analysé 20 cellules par individu.

La comparaison des groupes ne montre pas de différence dans le nombre d'endosomes par cellule, ni dans leur taille moyenne. En revanche en classant les valeurs de volume endosomal moyen par cellule dans trois catégories de taille (petit/moyen/grand), nous constatons que les distributions sont différentes dans les trois groupes, avec notamment une augmentation de la fréquence des cellules avec des endosomes élargis (> 920nm de diamètre) chez les malades (contrôles : 10% des cellules, MA-MCI : 13.5 %, MA-D : 17.4%). L'augmentation de la fréquence des cellules qui contiennent des endosomes élargis suit un gradient proportionnel à la sévérité de la maladie.

L'étude de corrélation a été réalisée en regroupant tous les malades et en contrôlant l'effet de l'âge, du sexe et de la présence des allèles E4 de l'ApoE, et met en évidence une corrélation significative entre le volume endosomal moyen des patients avec l'index de marquage cérébral du PiB en TEP. Le volume endosomal moyen des sujets n'est en revanche pas corrélé aux données cliniques, ni aux dosages des biomarqueurs du LCR.

Enfin une analyse spatiale montre une tendance à l'agrégation des endosomes à l'intérieur des cellules dans les stades légers (MA-MCI) et des endosomes moins densément distribués dans les MA-D sans que nous n'ayons beaucoup d'éléments pour discuter ce résultat.

L'analyse des fibroblastes, confirme l'existence du même phénotype, dans un deuxième type cellulaire, en périphérie du système nerveux, avec 25,2% de cellules avec un volume endosomal moyen supérieur à 0.2μm^3 (diamètre >730nm) chez les individus MA contre 10% chez les contrôles.

Par ailleurs la grande taille des fibroblastes permet aussi une observation plus détaillée de la distribution des endosomes dans les cellules et révèle, chez les malades, une diminution de la distance au plus proche voisin qui difère significatiement des témoins aux distances comprises entre 1µm et 3µm autour de chaque endosome. Cette analyse révèle une distribution par paquets, à courte distance. Additionnellement, une analyse de densité de voisins par classe de distance montre aussi une distribution d'ensemble, plus dense chez les malades, à toutes les distances considérées.

L'analyse des lignées lymphoblastoïdes des individus DS montre une augmentation de la fréquence des cellules au volume endosomal moyen élevé ($0.56\mu m^3$; diamètre > 1.03µm) en présence d'une maladie d'Alzheimer est également observé dans les LCL d'individus DS chez lesquels une MA concomitante s'est déclarée.

4 Discussion de la seconde étude

4.1 Pertinence de l'analyse et limitations

4.1.1 Avantages des marqueurs cellulaires sanguins

Dans ce travail nous avons analysé les endosomes précoces dans les PBMC de patients et de volontaires sains recrutés dans le cadre d'un protocole de recherche clinique avec suivi longitudinal. Le choix des cellules sanguines présente plusieurs avantages parmi lesquels le premier est la simplicité d'obtention du prélèvement, et de ce fait le petit nombre de refus de la part des patients qui se prêtent par ailleurs à une série d'examens éprouvants le jour du prélèvement sanguin.

Ce facteur peut sembler un peu trop extra-scientifique, mais il joue un rôle évident dans la capacité de systématisation des procédures cliniques. Par ailleurs dans l'hypothèse où la caractérisation des endosomes précoces soit applicable à une utilisation plus large, elle le serait probablement à partir du sang plutôt qu'un autre type cellulaire. La nécessité de développer une méthode fiable de diagnostic de la MA, pour suivre la progression de la maladie dès les stades précoces, et faciliter le développement des approches thérapeutiques est devenue de plus en plus urgente (Synder, 2014). A ce titre les biomarqueurs sanguins sont la méthode la plus citée pour sa simplicité de mise en œuvre et de standardisation (Synder 2014, scheider 2011, blennow, 2010, rembach 2014).

Le désavantage du sang est la variabilité des mesures, parfois à l'échelle de quelques heures pour certains analytes sériques. Pour cette raison l'utilisation d'un marqueur sanguin cellulaire plutôt qu'un marqueur plasmatique/sérique pourrait représenter un avantage donnant accès à des mesures plus fiables de fonctions cellulaires telle que l'endocytose chez les patients.

4.1.2 Limitations des marqueurs cellulaires sanguins

Nous avons analysé les endosomes d'un grand nombre de sujets inclus à des temps parfois très espacés, en fonction du rythme des recrutements. L'analyse des endosomes se faisant sur le sang frais, l'ensemble des échantillons de notre analyse s'est répartis sur 26 mois, ce qui introduit des variabilités supplémentaires. Par ailleurs l'isolement des cellules sur ficoll impose plusieurs étapes de centrifugation qui ont pour effet la disparition des endosomes immédiatement après la centrifugation (donnée non présentée). Pour cette raison après

isolement les PBMCs sont incubées dans du milieu de culture cellulaire une heure à 37°C afin de reformer des endosomes. Si le phénotype « endosomes élargis » est conditionné par le microenvironnement des cellules (par exemple les taux de lipides ou d'autres molécules modifiant le compartiment endosomal) alors l'étape d'incubation peut lisser des différences qui seraient plus importantes *in-vivo*.

4.2 Variabilité inter-individuelle et expérimentale

La variabilité des mesures que nous avons observée entre les échantillons pour lesquels un marquage extracellulaire (wheat germ aglutinins) a été associé au marquage des endosomes et les échantillons sans ce marquage extracellulaire (Figure 4.11) avait été d'abord interprétée comme liée au marquage WGA. Cependant l'arrêt de ce marquage par la suite n'a pas modifié cette variabilité entre les sériesd'échantillons suivants. Nous avons alors cherché quels autres paramètres expérimentaux avaient changé mais n'avons pas pu le/les mettre en évidence. Par ailleurs, la différence inter-individuelle reste le facteur principal de variation, même si des effets expérimentaux ne sont pas exclus compte tenu du temps d'inclusion de tous les patients (26 mois).

4.3 Avantages de la méthode de quantification

La méthode mise au point dans ce travail est une approche nouvelle, dans le sens où elle permet la quantification automatique et reproductible d'un grand nombre d'images, associée à l'automatisation des traitements de données qui permet facilement l'ajout de nouveau sujets, ou la modification des paramètres de détection.

La détection des endosomes par la méthode des ondelettes produit un résultat moins dépendant de la qualité du rapport signal sur bruit qui, dans notre cas, subit inévitablement des variations à cause du temps d'inclusion de tous les patients.

Enfin, même si la méthode imageJ (par seuil) donne de bons résultats quand elle est appliquée manuellement, sur des images homogènes, elle est impossible à appliquer facilement dans un traitement automatisé à cause des variations d'intensité du signal. Par

ailleurs si l'on est obligé d'intervenir pour modifier les paramètres d'analyse entre deux images, alors la comparaison des résultats deviendrait discutable.

4.4 Augmentation de la fréquence des cellules anormales dans la MA

Nous montrons dans deux types cellulaires périphériques de patients avec une MA sporadique (PBMCs et fibroblastes) que la fréquence des cellules présentant des volumes endosomaux moyens élevés est significativement plus importante que chez les contrôles.

Dans le cerveau la fréquence des cellules avec des endosomes de taille plus importante est variable entre les régions mais nettement supérieure aux valeurs que nous observons en périphérie : les régions corticales pré-frontales présentent jusqu'à 93% de cellules avec des endosomes élargis (Cataldo, 1995, 1996, 1997) chez des individus sans troubles cognitifs, avec des lésions neuropathologiques compatibles avec une MA, mais encore cantonnées au cortex entorhinal, suggérant un rôle initiateur sinon précoce dans la physiopathologie. Les mêmes travaux rapportent une spécificité laminale du phénotype qui est plus fort dans certaines couches cellulaires (principalement les couche III et V).

Dans le cervelet, cependant, Cataldo (1996), note 5 à 10% de cellules de Purkinje avec une élévation du nombre de vésicules Cat-D postives (la cathépsine D est une hydrolase acide spécifique des lysosomes et des endosomes tardifs), et dans d'autres régions, des « élévations modérées » (la fréquence n'est pas indiquée) du nombre de vésicules Cat-D positives dans les cellules de la medulla, du striatum et des thalami.

Il semble donc que les anomalies du fonctionnement des endosomes dans le cerveau, apparaissent en proportion importante uniquement dans certaines régions

Dans la trisomie 21, Cataldo et collègues (2008) rapportent dans les fibroblastes, une augmentation de la fréquence des cellules présentant des endosomes élargis, 21% à 28 semaines de gestation et 41% à l'adolescence, (Cataldo et al 2008). Les auteurs précisent cependant que dans les cellules concernées, l'intensité de l'augmentation de volume des endosomes est indépendante de la fréquence des cellules. L'élargissement des endosomes apparaît donc sporadiquement dans certaines cellules avec une fréquence qui augmente avec l'âge des individus. Reste à savoir si le phénotype apparait dans un groupe de cellules de manière transitoire ou permanente, ce qui est impossible sur des tissus *post-mortem*.

Même si l'avancée en âge d'individus trisomiques n'est pas comparable, du point de vue physiopathologique, à la progression de la maladie dans la MA sporadique, il est intéressant de noter que le phénotype des endosomes élargis se manifeste dans notre travail et dans les fibroblastes de trisomiques, par une fréquence plus élevée des cellules anormales.

L'observation de la fréquence des cellules anormales pourrait représenter une nouvelle manière d'analyser les endosomes. En effet les différences de moyenne totale ne deviennent visibles que quand le % de cellules anormales devient important expliquant les moyennes de taille des endosomes significatives dans les fibroblastes mais pas dans les PBMC.

4.5 Relation entre élargissement des endosomes précoces et pathologie amyloïde cérébrale

Dans le cerveau les endosomes sont directement impliqués dans la production d'A-beta (Haass, 2010). De plus les endosomes montrent une forte immuno-réactivité contre les produits de clivage de l'APP (Cataldo, 2004). Dans les PBMC en revanche nous n'avons pas mis en évidence d'A-beta intracellulaire, malgré un marquage abondant de l'APP à la surface de toutes les cellules aussi bien chez les patients que chez les témoins (en utilisant deux anticorps planche d'images en annexe 3a et 3b).

Dans les PBMC, nos études de corrélation montrent que le volume moyen des endosomes par cellule d'un individu ou le pourcentage de cellules contenant des gros endosomes (>0,5µm^3) sont significativement corrélés avec le marquage cérébral des dépôts amyloïdes mesuré en TEP au [11C]PIB chez les MA et chez les MCI.

Il est établi que les dépôts amyloïdes PIB positifs débutent longtemps avant les phénomènes neurodégénératifs qui conduisent aux signes cliniques observés chez les malades atteints de MA (Ballard, 2011 ; Jack, 2011, 2014).

Dans notre groupe de malades, ni le volume moyen des endosomes par PBMC, ni le pourcentage de PBMC avec de gros endosomes n'est corrélé aux dosages des protéines tau et tau-phosphorylées du LCR. De plus, dans le cerveau, le phénotype « endosomes élargis » n'a pas pu être observé dans les prélèvements neuropathologiques de patients avec d'autres maladies neurodégénératives non associées à une MA, et incluant des taupathies (PSP, SLA, maladie de PICK, DCL) (Cataldo *et al*, 2000).

4.5.1 Implication de la barrière hémato-encéphalique

Un lien possible entre l'amyloïdose cérébrale et les cellules sanguines a été proposé par Fiala et collègues (Fiala, 1998) dans un modèle de barrière hémato-encéphalique dans lequel le peptide A-beta cérébral stimule la production de médiateurs pro-inflammatoires activant les monocytes sanguins, et leur transmigration à travers la barrière hémato-encéphalique du sang vers le cerveau, Par ailleurs il a été montré que les monocytes ainsi recrutés vers le cerveau jouent un rôle dans le transport de l'A-beta vers le sang, et contribueraient à l'angiopathie amyloïde et au contrôle des plaques amyloïdes (Zaghi et al, 2009, Simard et al 2004).

La clairance des espèces amyloïdes pourrait jouer un rôle important sur leur concentration cérébrale (Selkoe, 2001 ; Bell, 2006). Notamment, le rôle du récepteur aux lipoprotéines LRP1 (low-density-lipoprotein-receptor related-protein-1) qui est responsable de l'efflux du peptide A-beta depuis le cerveau a été mis en évidence par plusieurs travaux (sagare et al, 2006 ; Zlokovic et al, 2010) et constituerait dans sa forme soluble plasmatique, un 'puit' systémique séquestrant l'A-beta sous forme liée, incapable de repasser la barrière dans le sens du sang vers le cerveau, et facilitant son élimination par le foie (Deane, 2009, Sagare 2006).

Cet export d'A-beta depuis le cerveau est influencé par le genotype ApoE dans des modèles de barrière hématoencéphalique Il est moins efficace avec l'isoforme ApoE4 (Bachmeiner, 2012 ; castellano 2008). Et il a été montré que l'interaction entre ApoE et LRP1 était importante dans le maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique par l'inhibition d'une voie pro-inflammatoire conduisant à la dégradation enzymatique des jonctions serrées et de la membrane basale des capillaires cérébraux (Bell, 2010 ; Figure 5.1). Le rôle de l'apoE dans la BHE serait donc possible par deux voies : l' une dépendante de l'A-beta et l'autre indépendante de l'A-beta (Zlokovic, 2013).

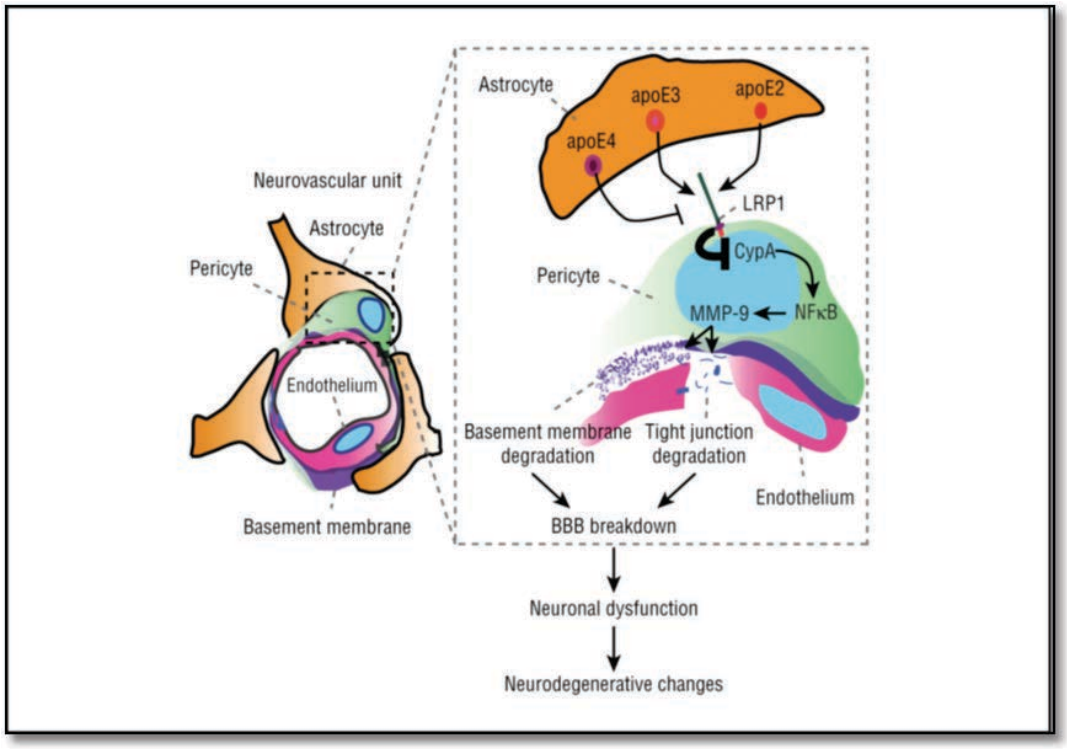


Figure 5. 1 : Rôle de l'ApoE à la barrière hémato encéphalique. L'Apolipoprotéine E2 (ApoE2) et l'ApoE3 mais pas l'ApoE4, sécrétées par les astrocytes interagissent avec LRP1, supprimant la voie pro-inflammatoire cyclophilin A (CypA)–nuclear factor κB (NFκB)–matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) dépendante qui mène à la dégradation de la membrane basale et des jonctions serrées par l'action enzymatique de MMP-9 (Bell, 2010).

Les effets contrastés des isoformes de l'ApoE dans l'export d'A-beta du cerveau et dans le maintien de l'intégrité de la BHE pourraient expliquer les différences que nous observons dans les corrélations entre le volume endosomal moyen des PBMC des sujets et leur charge amyloïde cérébrale en fonction de leur génotype ApoE.

4.5.2 Le phénotype « endosomes élargis » est-il constitutif?

Plusieurs éléments suggèrent que l'élargissement des endosomes en périphérie du SNC est un phénomène réactionnel consécutif à l'apparition des lésions neuropathologiques ou à l'environnement pro-inflammatoire de la MA.

Le gradient de fréquence des cellules avec des endosomes élargis dans les cellules des controles(10%) MA-MCI (13%) et des MA-D (17%) indiquant un phénomène progressif précoce.

Dans la trisomie 21 le phénotype cellulaire est hérité et constitutif, mais sa fréquence croit avec l'âge, et les lignées lymphoblastoïdes des individus avec une MA concomitante, présentent une élévation supplémentaire de la fréquence des cellules avec des endosomes élargis.

La transmissibilité du phénotype « endosomes élargis » a déjà été évoquée dans un travail caractérisant les endosomes dans des neurones dérivés d'iPSC de deux patients avec une MA sporadique. Les neurones dérivés de l'un des deux patients présentaient des endosomes élargis (Israel et al, 2012). Ce résultat n'a cependant pas encore été reproduit. Il serait intéressant de savoir si les fibroblastes d'origine avaient déjà des endosomes élargis.

Par ailleurs, les fibroblastes en cultures pendant plusieurs passages (dans notre cas 3 à 10 passages) ont réalisé plusieurs cycles de division cellulaire dans un milieu de culture standard, identique à celui des contrôles, suggérant (1) l'existence de facteurs épigénétiques permettant le maintien des endosomes élargis au cours des mitoses successives dans cellules filles. En effet des travaux sur la transmissibilité des facteurs épi-génétiques lors de la mitose et de la méiose existent, rendant le phénomène possible (margueron and Reinberg, 2010) (2) ou/et l'existence de facteurs génétiques favorisant de manière constitutive l'apparition de cellules avec des endosomes élargis en culture.

Dans la trisomie 21, l'étude de lignées lymphoblastoïdes d'individus avec des trisomies partielles, chez lesquelles seule une portion du chromosome 21 est tripliquée, a montré une implication de la portion contenant le gène codant la synaptojanine-1 (snyJ-1) une phosphatase impliquée dans la formation et la fusion des endosomes, (Cossec et al, 2012). Ce travail montre l'existence d'un lien entre la fonction de synJ-1 et la formation d'endosomes élargis, dans la trisomie 21 suggérant une cause génétique des endosomes élargis dans la

trisomie. Par ailleurs les études d'association génétique dans la MA sporadique ont mis en évidence plusieurs gènes dont le rôle est en lien avec le système endosomal tel que Clu, PICALM, BIN1 (Lambert, 2009 ; holligworth, 2011) ou encore SORL1 dont le rôle dans les neurones est d'orienter l'APP vers la voie de recyclage, et dont la sous expression conduit à l'augmentation de la production d'A-beta (Rogaeva, 2007). Il serait intéressant d'étudier les niveaux d'expression de ces gènes dans les PBMC.

4.6 Spécificité cellulaire ?

Les PBMC sont composées de plusieurs populations cellulaires aux rôles immunologiques différents. Plusieurs travaux rapportent des différences d'ordre immunologique dans la MA.

Pellicanò et collègues (2012) réalisent un immuno-typage des PBMC de (n=40) patients Alzheimer comparés à des contrôles (n=20) et mettent en évidence chez les individus MA une diminution de la proportion en lymphocytes T (LT) CD4+ naïfs en faveur de Lymphocytes T CD4+ différentiés (cellules mémoire) et une plus forte expression de marqueurs de sénescence sur tous les lmyphocytes T CD4+ qui selon les auteurs seraient associées à une stimulation chronique des lymphocytes T dans la maladie d'Alzheimer.

D'autre travaux rapportent une augmentation de la fréquence de cellules activées dans les PBMC (Pellicano, 2010 ; Monsonego, 2003). Des résultats plus récents rapportent une augmentation du rapport CD4+/CD8+ dans les LT et une augmentation du niveau d'activation des monocytes sanguins CD14+ qui présentent des niveaux anormaux d'expression de CD16 (zhang, 2013) et se distinguent par leur granularité plus élevée.

Ainsi l'augmentation du volume moyen des endosomes d'un pourcentage relativement faible des PBMC dans la MA (17.4% des cellules) pourrait être due à ces variations de proportions relatives des populations cellulaires.

4.7 Analyse spatiale

Dans les fibroblastes les endosomes ont une distribution plus dense chez les malades que chez les témoins, mise en évidence par les méthodes utilisées.

L’analyse spatiale des endosomes contenus dans les PBMCs de patients MA reste difficile à interpréter. Par la méthode des plus proches voisins, on note une tendance (non significative) vers une distribution dispersée des endosomes. Cette distribution dispersée est confirmée par l'analyse de densité des endosomes (methode de Ripley) uniquement chez les MA (CDR=1) et pas chez les MA-MCI, chez lesquels au contraire la densité d'endosomes par unité de surface est significativement plus élevée que dans les deux autres groupes.

Il pourrait s'agir d'une réaction compensatoire chez les MA-MCI mais en l'absence de connaissance du mécanisme impliqué il est difficile de conclure à un rôle délétère de l’agrégation des endosomes dans les cellules périphériques dans les PBMC.

Dans la trisomie 21, des observations en microscopie électronique à transmission dans des LCL et des fibroblastes de patients trisomiques montrent que les endosomes de grande taille visibles en microscopie à fluorescence sont peut-être des amas d'endosomes de taille normale, fortement agrégés, et que la fréquence de ces amas est plus élevée chez les sujets avec une MA (Potier et al, travail non publié).

Dans les PBMC les endosomes des patients les plus avancés (CDR>0.5) les plus faibles densités de distribution des endosomes par rapport aux contrôles sont contradictoires avec l'observation dans les MA-MCI et dans les fibroblastes ou la densité d'endosomes est plus importante. Ce pourrait-être le reflet d'un diamètre plus important des objets détectés indépendamment de leur nature (vésicule ou agrégat) car les coordonnées de chaque détection sont celles du centre de l'objet, ainsi plus le diamètre de deux objets sera élevé, et plus ils apparaitront éloignés l'un de l'autre. Enfin, si les endosomes sont très agrégés ils peuvent se trouver à une distance si proche qu'ils apparaissent comme un seul objet au microscope optique donnant virtuellement une distribution dispersée dans l'analyse spatiale.

La résolution du microscope confocal ne permet pas de trancher et d'autres analyses à plus haute résolution seraient nécessaires.

5 Perspectives

5.1 Analyse par cytométrie des endosomes dans les PBMC

Il paraît intéressant d'étudier les sous populations leucocytaires, en particulier les lymphocytes T et les cellules de la lignée myéloïde en réalisant une analyse du compartiment endosomal dans ces populations particulières.

Si une des populations cellulaires évoquées dans les travaux précédents est seule concernée par l'élargissement des endosomes, alors, l'analyse groupée des PBMC serait biaisée par deux paramètres:

Le premier est la fréquence de chaque sous-type cellulaire de leucocytes qui peut éventuellement changer entre deux individus et par conséquent changer les pourcentages correspondants de cellules avec des endosomes élargis

Le second est lié à la rareté des cellules d'un certain type chez un sujet donné; en effet dans mon travail les acquisitions au microscope confocal étaient limitées techniquement par le nombre de cellules qui peuvent être observée par sujet ; Si l'on s'intéresse aux monocytes (qui représentent 10 à 30% des PBMC) l'analyse de 20 PBMC permettra d'observer 2 à 6 monocytes par sujet, seulement et les varaitions seront donc importantes

Les types cellulaires peuvent être séparés en fonction de marqueurs spécifiques par FACS (fluorescence activated cell sorting).

L'avantage du FACS est le traitement statistiquement très robuste d'un très grand nombre de cellules, mais il présente l'inconvénient d'être bien moins résolutif qu'une analyse au microscope et fournit au mieux une mesure de fluorescence globale de la cellule. Nous avons fait un premier test en collaboration avec Christophe Parizot (équipe INSERM UMR-S 945) . Ce premier test montre que le signal spécifique de EEA1 est plus intense dans certaines populations cellulaires mais des expériences supplémentaires sont nécessaires pour valider cette méthode.

Une autre possibilité serait d'isoler sur trieur de cellules, les PBMC par sous-type cellulaire, puis de fixer les cellules de marquer leurs endosomes et de les observer au microscope

confocal pour déterminer leur nombre et leur volume moyen. Un premier essai a été conduit sur un échantillon test avec Guillaume Dorothée de l'équipe des maladies immunes et conformationnelles (U938, Hôpital St Antoine, Paris) et a montré la faisabilité du marquage en sortie du trieur sur un très faible nombre de cellules (<500).

5.2 Suivi longitudinal

Par ailleurs le suivi longitudinal des patients va permettre l'accès à de nouveaux échantillons après un an et deux ans de suivi, pour tous les patients inclus dans l'étude et permettra de mettre en relation l'évolution des tableaux cliniques avec celle des endosomes, pour chaque sujet.

5.3 Perspectives méthodologiques - traitement des données

5.3.1 Automatiser une segmentation par seuil

Il paraît envisageable à court terme de proposer une méthode de segmentation par seuil basée sur les contrastes locaux et permettant une automatisation, telle que celle proposée par l'équipe de thomas Boudier (CNRS UMR7196, INSERM U565) ; (Ollion et al, 2013). Une discussion a été entamée à ce sujet et devrait aboutir à une méthode par seuil moins dépendante de l'intervention de l'utilisateur qui permettra la validation croisée des résultats par deux méthodes indépendantes.

5.3.2 Approfondir l'analyse spatiale

Parallèlement les méthodes d'analyse spatiale peuvent aussi être adaptées au traitement automatisé de grands volumes de données et l'extraction de valeurs quantitatives exploitables statistiquement. Ces améliorations pourraient faire l'objet d'une collaboration avec l'équipe de JC Olivo-Marin (Unité d'Analyse d'Images Quantitative, Institut Pasteur, Paris) en adaptant les traitements de Lagache et collaborateurs, (Lagache et al, 2013).

Par ailleurs une caractérisation des endosomes en microscopie électronique, n'a jamais été réalisées dans la MA sporadique. Une telle analyse permettrait de confirmer ou d'infirmer l'existence dans la MA, d'agrégats d'endosomes similaires à ceux observés dans les

fibroblastes et les LCLs d'individus DS, qui en microscopie optique paraissaient être des endosomes élargis.

5.3.3 Mise à disposition du traitement automatisé

Enfin, le traitement automatique des résultats de détection des endosomes que j'ai écrit pour traiter les images d'endosomes précoces est généralisable à une utilisation en routine (à partir d'un set d'images de cellules en coupe ou en stack) et a déjà permis la réalisation ponctuelle de quelques analyses annexes. (Caractérisation des endosomes précoces chez un patient portant une mutation rare du gène de la synaptojanine) Il parait envisageable de le mettre à disposition sous la forme d'un plugin dans le logiciel ICY.

5.4 Cartographie neuropathologique des endosomes élargis dans le cerveau

Il existe, même dans le cortex, une relative spécificité topographique dans l'apparition des cellules présentant des altérations du système endo-lysosomal en fonction de la couche cellulaire et en fonction de la région, mais il manque encore un relevé topographique systématique de la fréquence et de l'importance de ces modifications dans l'ensemble des régions cérébrales.

Un tel travail permettrait de déterminer si la distribution des cellules présentant des anomalies endosomales dans le cerveau est associée à la séquence de progression des lésions neuropathologies de la MA, ou si l'ensemble des régions cérébrales présente des cellules anormales, avec une fréquence accrue dans les régions les plus vulnérables sans lien avec les dépôts amyloïdes ni les DNF.

V. Conclusions

Nos deux études se sont intéressées à deux marqueurs potentiels associés au métabolisme du précurseur du peptide amyloïde dans la maladie d'Alzheimer. Le premier : l'imagerie isotopique utilisant le [11C]PiB dont l'affinité pour les dépôts amyloïdes insolubles, a été confirmée dans plusieurs séries clinico-pathologiques (kemppainen, 2014 ; Driscoll, 2013) et représente un excellent indicateur de l'existence d'un processus pathologique de type MA. Le second est la modification du compartiment endosomal qui dans le cerveau est détectée dans les neurones avant l'apparition des dépôts amyloïdes, au stade préclinique de la MA. Le compartiment endosomal est aussi le site de production majoritaire des peptides amyloides, dont le pH acide est plus favorable à l'action des sécrétases. La première étude montre que le marquage amyloïde cérébral en TEP tout comme les biomarqueurs du LCR (dosage de l'A-beta, des protéines tau totales et phosphorylées) permet de détecter un processus physiopathologique de MA, chez des patients dont le tableau clinique ne correspond pas à celui de la MA typique.

D'une manière générale le profil de marquage PiB montre une intensité et une distribution identique entre les formes focales de MA et la forme classique soulevant la question du lien entre les dépôts amyloïdes et l'émergence des atteintes cognitives associées à différentes aires cérébrales. Il est possible que les différences de présentation phénotypique soient liées à l'implication d'espèces amyloïdes oligomériques solubles non détectables par le PiB (Rosenbloom, 2011). Dans la seconde étude nous montrons d'une part que la fréquence des modifications du compartiment endosomal augmente avec la progression de la maladie ; les patients les plus avancés ayant d'avantage de cellules anormales que les MA-MCI et les témoins. D'autre part le volume moyen des endosomes de tous les patients (CDR =0.5 ou plus), est corrélé à l'intensité de la fixation corticale globale du PiB , mais pas aux scores des tests de mémoire ni à l'échelle d'évaluation de la sévérité (CDR).Cela représente le premier biomarqueur morphologique cellulaire sanguin qui soit corrélé avec la charge amyloïde cérébrale. L'existence de modifications du compartiment endosomal en dehors du système nerveux central dans la MA sporadique est confirmée par l'analyse des endosomes dans les fibroblastes. Finalement nous montrons que la fréquence des modifications est également augmentée chez des individus porteurs d'une trisomie 21 chez lesquels s'est déclarée une MA. La valeur prédictive de l'analyse des endosomes dans les PBMC et les fibroblastes reste modeste en raison du faible nombre de cellules affectées.

La cause de l'élargissement des endosomes, ou de l'augmentation de la fréquence des cellules aux endosomes élargis n'est pas encore connue. On ne sait pas non plus si

l’élargissement des endosomes dans la majorité des neurones pyramidaux de certaines aires cérébrales, rapporté par d’autres travaux (Cataldo et al, 1997 ; 2000), est spécifique de la pathologie cérébrale, ou si la tendance à la formation d’endosomes anormaux affecte l’organisme dans sa globalité avec une fréquence accrue dans certains tissus ou réseaux neuronaux plus vulnérables.

Dans l’ensemble, les résultats sur les endosomes suggèrent une association entre le volume endosomal moyen par cellule et les dépôts amyloïdes cérébraux et indique que l’étude des endosomes dans la MA sporadique pourrait constituer une nouvelle piste de recherche dans la compréhension de la physiopathologie de la maladie.

Par ailleurs avec une meilleure compréhension des facteurs de variation inter individuels, la mesure du volume endosomal dans les cellules sanguines pourrait constituer un marqueur indicatif du risque de développer dans les neurones un environnement favorable à une production accrue de peptide amyloïde.

VI. Références

Abdul-Hay SO, Sahara T, McBride M, Kang D, Leissring MA. 2012. Identification of BACE2 as an avid β-amyloid-degrading protease. Molecular Neurodegeneration 7: 1–1.

Aizenstein HJ, Nebes RD, Saxton JA, Price JC, Mathis CA, Tsopelas ND, Ziolko SK, James JA, Snitz BE, Houck PR, *et al.*, 2008. Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. Arch Neurol 65: 1509–1517.

Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B. 2011. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimer's & Dementia.

Alladi S, Xuereb J, Bak T, Nestor P, Knibb J, Patterson K, Hodges JR. 2007. Focal cortical presentations of Alzheimer's disease. Brain 130: 2636–2645.

Allinquant, B., Clamagirand, C. & Potier, M.-C., 2014. Role of cholesterol metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Current opinion in clinical nutrition and metabolic care, 17(4), pp.319–323.

Andrey, Philippe, Kiên Kiêu, Clémence Kress, Gaëtan Lehmann, Leïla Tirichine, Zichuan Liu, Eric Biot, *et al.*, 2010. "Statistical Analysis of 3D Images Detects Regular Spatial Distributions of Centromeres and Chromocenters in Animal and Plant Nuclei." Edited by Christophe Zimmer. PLoS Computational Biology 6 (7): e1000853. doi:10.1371/journal.pcbi.1000853.t002.

Armstrong A, Mattsson N, Appelqvist H, Janefjord C, Sandin L, Agholme L, Olsson B, Svensson S, Blennow K, Zetterberg H, *et al.*, 2014. Lysosomal network proteins as potential novel CSF biomarkers for Alzheimer's disease. Neuromolecular Med 16: 150–160.

Asai M, Hattori C, Szabó B, Sasagawa N, Maruyama K, Tanuma S-I, Ishiura S. 2003. Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. Biochem Biophys Res Commun 301: 231–235.

Alzheimer's Association A. 2012. Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's & dementia: the journal of Alzheimer's association.

Bachmeier, C., Paris, D., Beaulieu-Abdelahad, D., Mouzon, B., Mullan, M., & Crawford, F. (2012). A multifaceted role for apoE in the clearance of beta-amyloid across the blood-brain barrier. *Neurodegenerative Diseases*, *11*(1), 13-21.

Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. 2011. Alzheimer's disease. Lancet 377: 1019–1031.

Banerjee, S. & Wittenberg, R., 2009. Clinical and cost effectiveness of services for early diagnosis and intervention in dementia. International Journal of Geriatric Psychiatry, 24(7), pp.748–754.

Barger SW, Harmon AD. 1997. Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. Nature 388: 878–881.

Barrett PJ, Song Y, Van Horn WD, Hustedt EJ, Schafer JM, Hadziselimovic A, Beel AJ, Sanders CR. 2012. The Amyloid Precursor Protein Has a Flexible Transmembrane Domain and Binds Cholesterol. Science 336: 1168–1171.

Beel AJ, Mobley CK, Kim HJ, Tian F, Hadziselimovic A, Jap B, Prestegard JH, Sanders CR. 2008. Structural studies of the transmembrane C-terminal domain of the amyloid precursor protein (APP): does APP function as a cholesterol sensor? Biochemistry 47: 9428–9446.

Beel AJ, Sakakura M, Barrett PJ, Sanders CR. 2010. Direct binding of cholesterol to the amyloid precursor protein: An important interaction in lipid-Alzheimer's disease relationships? Biochim Biophys Acta 1801: 975–982.

Bell, R. D., Sagare, A. P., Friedman, A. E., Bedi, G. S., Holtzman, D. M., Deane, R., & Zlokovic, B. V. (2006). Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid β-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *27*(5), 909-918.

Bell, R. D., Winkler, E. A., Singh, I., Sagare, A. P., Deane, R., Wu, Z., ... & Zlokovic, B. V. (2012). Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature*, *485*(7399), 512-516.

Bennett DA, De Jager PL, Leurgans SE, Schneider JA. 2009. Neuropathologic intermediate phenotypes enhance association to Alzheimer susceptibility alleles. Neurology 72: 1495–1503.

Benson DF, Davis RJ, Snyder BD. 1988. Posterior Cortical Atrophy. Arch Neurol 45: 789–793.

Bertoux, M., de Souza, L. C., Corlier, F., Lamari, F., Bottlaender, M., Dubois, B., & Sarazin, M. (2014). Two Distinct Amnesic Profiles in Behavioral Variant Frontotemporal Dementia. *Biological psychiatry*, *75*(7), 582-588.

Bertram, L., Lill, C. M., & Tanzi, R. E. (2010). The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron*, *68*(2), 270-281.

Bertram, L., McQueen, M. B., Mullin, K., Blacker, D., & Tanzi, R. E. (2007). Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nature genetics*, *39*(1), 17-23.

Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E., & Mandelkow, E. (1993). Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: Distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron*, *11*(1), 153-163.

Biffi A, Sonni A, Anderson CD, Kissela B, Jagiella JM, Schmidt H, Jimenez-Conde J, Hansen BM, Fernandez-Cadenas I, Cortellini L, *et al.*, 2010. Variants at APOE influence risk of deep and lobar intracerebral hemorrhage. Ann Neurol 68: 934–943.

Bird TD. 2008. Genetic aspects of Alzheimer disease. Genet Med 10: 231–239.

Blennow, K., Hampel, H., Weiner, M., & Zetterberg, H. (2010). Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*,*6*(3), 131-144.

Booij BB, Lindahl T, Wetterberg P, Skaane NV, Sæbø S, Feten G, Rye PD, Kristiansen LI, Hagen N, Jensen M, *et al.*, 2011. A gene expression pattern in blood for the early detection of Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis 23: 109–119.

Braak H, Braak E. 1991. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol 82: 239–259.

Brandt, R., Lee, G., Teplow, D. B., Shalloway, D., & Abdel-Ghany, M. (1994). Differential effect of phosphorylation and substrate modulation on tau's ability to promote microtubule growth and nucleation. *Journal of Biological Chemistry*,*269*(16), 11776-11782.

D. S. Bright and E. B. Steel "Two-dimensional top hat filter for extracting spots and spheres from digital images", *J. Microsc.*, vol. 146, no. 2, pp.191 -200 1987

Britschgi, M., Rufibach, K., Huang, S. L. B., Clark, C. M., Kaye, J. A., Li, G., ... & Wyss-Coray, T. (2011). Modeling of pathological traits in Alzheimer's disease based on systemic extracellular signaling proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*, *10*(10), M111-008862.

Britschgi, M. *et al.*, 2009. Neuroprotective natural antibodies to assemblies of amyloidogenic peptides decrease with normal aging and advancing Alzheimer's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(29), p.12145.

Bu, G., 2009. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. Nature Reviews Neuroscience, 10(5), pp.333–344.

Buée L, Bussière T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. 2000. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders11These authors contributed equally to this work. Brain Research Reviews 33: 95–130.

Butner, K.A., 1991. Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. The Journal of Cell Biology, 115(3), pp.717–730.

Castellano, J. M., Kim, J., Stewart, F. R., Jiang, H., DeMattos, R. B., Patterson, B. W., ... & Holtzman, D. M. (2011). Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid-β peptide clearance. *Science translational medicine*, *3*(89), 89ra57-89ra57.

Cataldo AM, Barnett JL, Pieroni C, Nixon RA. 1997. Increased neuronal endocytosis and protease delivery to early endosomes in sporadic Alzheimer's disease: neuropathologic evidence for a mechanism of increased β-amyloidogenesis. The Journal of neuroscience 17: 6142–6151.

Cataldo AM, Hamilton DJ, Barnett JL, Paskevich PA, Nixon RA. 1996. Properties of the endosomal-lysosomal system in the human central nervous system: disturbances mark most neurons in populations at risk to degenerate in Alzheimer's disease. The Journal of neuroscience 16: 186–199.

Cataldo AM, Mathews PM, Boiteau AB, Hassinger LC, Peterhoff CM, Jiang Y, Mullaney K, Neve RL, Gruenberg J, Nixon RA. 2008. Down Syndrome Fibroblast Model of Alzheimer-Related Endosome Pathology. The American Journal of Pathology 173: 370–384.

Cataldo AM, Petanceska S, Peterhoff CM, Terio NB, Epstein CJ, Villar A, Carlson EJ, Staufenbiel M, Nixon RA. 2003. App gene dosage modulates endosomal abnormalities of Alzheimer's disease in a segmental trisomy 16 mouse model of down syndrome. Journal of Neuroscience 23: 6788–6792.

Cataldo AM, Peterhoff CM, Troncoso JC, Gomez-Isla T, Hyman BT, Nixon RA. 2000. Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. The American Journal of Pathology 157: 277–286.

Chan KY, Wang W, Wu JJ, Liu L, Theodoratou E, Car J, Middleton L, Russ TC, Deary IJ, Campbell H, *et al.*, 2013. Epidemiology of Alzheimer's disease and other forms of dementia in China, 1990-2010: a systematic review and analysis. Lancet 381: 2016–2023.

Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, Goate A, Rossor M, Roques P, Hardy J. 1991. Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. Nature 353: 844–846.

Chaufty J, Sullivan SE, Ho A. 2012. Intracellular Amyloid Precursor Protein Sorting and Amyloid-Secretion Are Regulated by Src-Mediated Phosphorylation of Mint2. Journal of Neuroscience 32: 9613–9625.

Chen M, Inestrosa NC, Ross GS, Fernandez HL. 1995. Platelets are the primary source of amyloid beta-peptide in human blood. Biochem Biophys Res Commun 213: 96–103.

Chételat G, Desgranges B, Landeau B, Mézenge F, Poline JB, la Sayette de V, Viader F, Eustache F, Baron J-C. 2008. Direct voxel-based comparison between grey matter hypometabolism and atrophy in Alzheimer's disease. Brain 131: 60–71.

Choi-Miura, N. H., & Oda, T. (1996). Relationship between multifunctional protein “clusterin” and Alzheimer disease. *Neurobiology of aging*, *17*(5), 717-722.

Cipriani, G., Dolciotti, C., Picchi, L., & Bonuccelli, U. (2011). Alzheimer and his disease: a brief history. *Neurological Sciences*, *32*(2), 275-279.

Clague, M. J., Urbé, S., Aniento, F., & Gruenberg, J. (1994). Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(1), 21-24.

Claudia H Kawas, M.M.C., 2006. Alzheimer’s and Dementia in the Oldest-Old: A Century of Challenges. Current Alzheimer Research, 3(5), p.411.

Conchello, J. A., & Lichtman, J. W. (2005). Optical sectioning microscopy.*Nature methods*, *2*(12), 920-931.

Conner SD, Schmid SL. 2003. Regulated portals of entry into the cell. Nature 422: 37–44.

Coppi, E, L Ferrari, R Santangelo, F Caso, P Pinto, G Passerini, G Comi, and G Magnani. 2014. “Further Evidence About the Crucial Role of CSF Biomarkers in Diagnosis of Posterior Cortical Atrophy.” Neurological Sciences 35 (5). Springer Milan: 785–87. doi:10.1007/s10072-014-1644-5.

Coppus, A.M.W. *et al.*, , 2008. Survival in Elderly Persons with Down Syndrome. Journal of the American Geriatrics Society, 56(12), pp.2311–2316.

Coskun, P E, J Wyrembak, and O Derbereva. 2010. “Systemic Mitochondrial Dysfunction and the Etiology of Alzheimer‘S Disease and Down Syndrome Dementia - Journal of Alzheimer’S Disease - Volume 20, Supplement 2/ 2010 - IOS Press.” Journal of Alzheimer's Disease.

Cossec JC, Lavaur J, Berman DE, Rivals I, Hoischen A, Stora S, Ripoll C, Mircher C, Grattau Y, OlivoMarin JC, *et al.*, 2012. Trisomy for Synaptojanin1 in Down syndrome is functionally linked to the enlargement of early endosomes. Human Molecular Genetics 21: 3156–3172.

Cotlove E, Harris EK, Williams GZ. 1970. Biological and analytic components of variation in long-term studies of serum constituents in normal subjects. 3. Physiological and medical implications. Clin Chem 16: 1028–1032.

Cozier GE, Carlton J, McGregor AH, Gleeson PA, Teasdale RD, Mellor H, Cullen PJ. 2002. The phox homology (PX) domain-dependent, 3-phosphoinositide-mediated association of sorting nexin-1 with an early sorting endosomal compartment is required for its ability to regulate epidermal growth factor receptor degradation. Journal of Biological Chemistry 277: 48730–48736.

Crawford F, Hardy J, Mullan M, Goate A, Hughes D, Fidani L, Roques P, Rossor M, Chartier-Harlin MC. 1991. Sequencing of exons 16 and 17 of the beta-amyloid precursor protein gene in 14 families with early onset Alzheimer's disease fails to reveal mutations in the beta-amyloid sequence. Neurosci Lett 133: 1–2.

Crutch, S. J., Lehmann, M., Schott, J. M., Rabinovici, G. D., Rossor, M. N., & Fox, N. C. (2012). Posterior cortical atrophy. *The Lancet Neurology*, *11*(2), 170-178.

Czech C, Berndt P, Busch K, Schmitz O, Wiemer J, Most V, Hampel H, Kastler J, Senn H. 2012. Metabolite Profiling of Alzheimer's Disease Cerebrospinal Fluid. PLoS ONE 7: e31501.

D'Angelo F, Vignaud H, Di Martino J, Salin B, Devin A, Cullin C, Marchal C. 2013. A yeast model for amyloid-{beta} aggregation exemplifies the role of membrane trafficking and PICALM in cytotoxicity. Disease Models & Mechanisms 6: 206–216.

Das U, Scott DA, Ganguly A, Koo EH, Tang Y, Roy S. 2013. Activity-induced convergence of APP and BACE-1 in acidic microdomains via an endocytosis-dependent pathway. Neuron 79: 447–460.

de Chaumont, F., Dallongeville, S., Chenouard, N., Hervé, N., Pop, S., Provoost, T., ... & Olivo-Marin, J. C. (2012). Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nature methods*, *9*(7), 690-696.

Janel, N., Sarazin, M., Corlier, F., Corne, H., de Souza, L. C., Hamelin, L., ... & Delabar, J. M. (2014). Plasma DYRK1A as a novel risk factor for Alzheimer's disease. *Translational psychiatry*, *4*(8), e425.

de Souza, Leonardo Cruz, fabian corlier, Marie-Odile Habert, Olga Uspenskaya, Renaud Maroy, Foudil Lamari, Marie Chupin, *et al.*, 2011. "Similar Amyloid-B Burden in Posterior Cortical Atrophy and Alzheimer's Disease.." Brain : a Journal of Neurology 134 (Pt 7): 2036–43. doi:10.1093/brain/awr130.

Deelen J, Uh H-W, Monajemi R, van Heemst D, Thijssen PE, Böhringer S, van den Akker EB, de Craen AJM, Rivadeneira F, Uitterlinden AG, *et al.*, 2013. Gene set analysis of GWAS data for human longevity highlights the relevance of the insulin/IGF-1 signaling and telomere maintenance pathways. Age (Dordr) 35: 235–249.

Delacourte A, Sergeant N, Champain D, Wattez A, Maurage C-A, Lebert F, Pasquier F, David J-P. 2002. Nonoverlapping but synergetic tau and APP pathologies in sporadic Alzheimer's disease. Neurology 59: 398–407.

Derouesné, C., 2008. La maladie d'Alzheimer : regards sur le présent à la lumière du passé. Une approche historique. Psychologie & NeuroPsychiatrie du vieillissement, 6(2), pp.115–128.

Dittman, J., & Ryan, T. A. (2009). Molecular circuitry of endocytosis at nerve terminals. *Annual Review of Cell and Developmental*, *25*, 133-160.

Dorothée, G. & Aucouturier, P., 2011. Les réponses immunitaires adaptatives contre le peptide amyloïde Aβ dans la maladie d'Alzheimer. Médecine sciences : M/S, 27(11), pp.938–940.

Dorothée, G., Bottlaender, M., Moukari, E., De Souza, L. C., Maroy, R., Corlier, F., ... & Aucouturier, P. (2012). Distinct patterns of antiamyloid-β antibodies in typical and atypical Alzheimer disease. *Archives of neurology*, *69*(9), 1181-1185.

Driscoll I, Troncoso JC, Rudow G, Sojkova J, Pletnikova O, Zhou Y, Kraut MA, Ferrucci L, Mathis CA, Klunk WE, *et al.*, 2012. Correspondence between in vivo (11)C-PiB-PET amyloid imaging and postmortem, region-matched assessment of plaques. Acta Neuropathol 124: 823–831.

Drubin, D. G., & Kirschner, M. W. (1986). Tau protein function in living cells.*The Journal of cell biology*, *103*(6), 2739-2746.

Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Cummings JL, DeKosky ST, Barberger-Gateau P, Delacourte A, Frisoni G, Fox NC, Galasko D, *et al.*, 2010. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. 1–10.

Dubois B, Feldman HH, Jacova C, DeKosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, Delacourte A, Galasko D, Gauthier S, Jicha G. 2007. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS–ADRDA criteria. The Lancet Neurology 6: 734–746.

Dumanchin C, Camuzat A, Campion D, Verpillat P, Hannequin D, Dubois B, Saugier-Veber P, Martin C, Penet C, Charbonnier F, *et al.*, 1998. Segregation of a missense mutation in the microtubule-associated protein tau gene with familial frontotemporal dementia and parkinsonism. Human Molecular Genetics 7: 1825–1829.

Dunn KW, McGraw TE, Maxfield FR. 1989. Iterative fractionation of recycling receptors from lysosomally destined ligands in an early sorting endosome. The Journal of Cell Biology 109: 3303–3314.

Duyckaerts C, Delatour B, Potier M-C. 2009. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. Acta Neuropathol 118: 5–36.

Duyckaerts C, Potier M-C, Delatour B. 2007. Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. Acta Neuropathol 115: 5–38.

Ehehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., & Simons, K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer β-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *The Journal of cell biology*, *160*(1), 113-123.

Engler H, Forsberg A, Almkvist O, Blomquist G, Larsson E, Savitcheva I, Wall A, Ringheim A, Långström B, Nordberg A. 2006. Two-year follow-up of amyloid deposition in patients with Alzheimer's disease. Brain 129: 2856–2866.

Ertekin-Taner, N. (2007). Genetics of Alzheimer's disease: a centennial review.*Neurologic clinics*, *25*(3), 611-667.

Ertekin-Taner, N. (2010). Genetics of Alzheimer disease in the pre-and post-GWAS era. *Alzheimers Res Ther*, *2*(1), 3.

Fagan, A. M., Roe, C. M., Xiong, C., Mintun, M. A., Morris, J. C., & Holtzman, D. M. (2007). Cerebrospinal fluid tau/β-amyloid42 ratio as a prediction of cognitive decline in nondemented older adults. *Archives of neurology*, *64*(3), 343-349.

Falcone S, Cocucci E, Podini P, Kirchhausen T, Clementi E, Meldolesi J. 2006. Macropinocytosis: regulated coordination of endocytic and exocytic membrane traffic events. Journal of Cell Science 119: 4758–4769.

Farzan M, Schnitzler CE, Vasilieva N, Leung D, Choe H. 2000. BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. PNAS 97: 9712–9717.

Fehlbaum-Beurdeley P, Jarrige-Le Prado AC, Pallares D, Carrière J, Guihal C, Soucaille C, Rouet F, Drouin D, Sol O, Jordan H, *et al.*, 2010. Toward an Alzheimer's disease diagnosis via high-resolution blood gene expression. Alzheimers Dement 6: 25–38.

Feliciano WD, Yoshida S, Straight SW, Swanson JA. 2011. Coordination of the Rab5 Cycle on Macropinosomes. Traffic 12: 1911–1922.

Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, *et al.*, 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. Lancet 366: 2112–2117.

Galton, C. J., Patterson, K., Xuereb, J. H., & Hodges, J. R. (2000). Atypical and typical presentations of Alzheimer's disease: a clinical, neuropsychological, neuroimaging and pathological study of 13 cases. *Brain*, *123*(3), 484-498.

Berenguer, R. G., Argilés, J. A. M., Ruiz, C. M., Payá, J. S., Cantó, M. A. B., & Santana, C. L. (2014). Alzheimer Disease Cerebrospinal Fluid Biomarkers Predict Cognitive Decline In Healthy Elderly Over 2 Years. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*.

Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, Fiske A, Pedersen NL. 2006. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. Arch Gen Psychiatry 63: 168–174.

Genin, E. *et al.*, , 2011. APOE and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance. Molecular Psychiatry, 16(9), pp.903–907.

Ghidoni R, Paterlini A, Benussi L. 2013. Translational proteomics in Alzheimer's disease and related disorders. Clinical Biochemistry 46: 480–486.

Glenner GG, Wong CW. 1984a. Alzheimer“s disease and Down”s syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. Biochem Biophys Res Commun 122: 1131–1135.

Glenner GG, Wong CW. 1984b. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. Biochem Biophys Res Commun 120: 885–890.

Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L. 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. Nature 349: 704–706.

Goedert, M. (2004, February). Tau protein and neurodegeneration. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 15, No. 1, pp. 45-49). Academic Press.

Goedert, M. (2009). Oskar Fischer and the study of dementia. *Brain*, *132*(4), 1102-1111.

Goedert, M. & Spillantini, M.G., 2006. A Century of Alzheimer's Disease. Science, 314(5800), pp.777–781.

Gong, C. X., Liu, F., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2005). Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission*, *112*(6), 813-838.

Graeber, M. B., Kösel, S., Egensperger, R., Banati, R. B., Müller, U., Bise, K., ... & Mehraein, P. (1997). Rediscovery of the case described by Alois Alzheimer in 1911: historical, histological and molecular genetic analysis. *Neurogenetics*,*1*(1), 73-80.

Graeber MB, Mehraein P. 1999. Reanalysis of the first case of Alzheimer's disease. European Archives of Psychiatry and Clinical Neurosciences 249: S10–S13.

Gruenberg J. 2001. The endocytic pathway: a mosaic of domains. Nat Rev Mol Cell Biol 2: 721–730.

Gsell W, De Sadeleer C, Marchalant Y, MacKenzie ET, Schumann P, Dauphin F. 2000. The use of cerebral blood flow as an index of neuronal activity in functional neuroimaging: experimental and pathophysiological considerations. Journal of Chemical Neuroanatomy 20: 215–224.

Gunawardena S, Yang G, Goldstein LSB. 2013. Presenilin controls kinesin-1 and dynein function during APP-vesicle transport in vivo. Human Molecular Genetics 22: 3828–3843.

Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S. 2012. Trafficking and Proteolytic Processing of APP. Cold Spring Harb Perspect Med 2: a006270.

Haass C, Koo EH, Capell A, Teplow DB, Selkoe DJ. 1995. Polarized sorting of beta-amyloid precursor protein and its proteolytic products in MDCK cells is regulated by two independent signals. The Journal of Cell Biology 128: 537–547.

Haass C, Koo EH, Mellon A, Hung AY, Selkoe DJ. 1992. Targeting of cell-surface β-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. Nature 357: 500–503.

Haass, C., Koo, E. H., Teplow, D. B., & Selkoe, D. J. (1994). Polarized secretion of beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide in MDCK cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(4), 1564-1568.

Habert M-O, Horn J-F, Sarazin M, Lotterie J-A, Puel M, Onen F, Zanca M, Portet F, Touchon J, Verny M, *et al.,* 2011. Brain perfusion SPECT with an automated quantitative tool can identify prodromal Alzheimer's disease among patients with mild cognitive impairment. Neurobiology of Aging 32: 15–23.

Hampel H, Buerger K, Zinkowski R, Teipel SJ, Goernitz A, Andreasen N, Sjoegren M, DeBernardis J, Kerkman D, Ishiguro K, *et al.,* 2004. Measurement of Phosphorylated Tau Epitopes in the Differential Diagnosisof Alzheimer Disease: A Comparative Cerebrospinal Fluid Study. Arch Gen Psychiatry 61: 95–102.

Hampel, H., Lista, S., Teipel, S. J., Garaci, F., Nistico, R., Blennow, K., ... & Dubois, B. (2014). Perspective on future role of biological markers in clinical therapy trials of Alzheimer's disease: A long-range point of view beyond 2020.*Biochemical pharmacology*, *88*(4), 426-449.

Hao, M., Mukherjee, S., Sun, Y., & Maxfield, F. R. (2004). Effects of cholesterol depletion and increased lipid unsaturation on the properties of endocytic membranes. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(14), 14171-14178.

Hardy, J., & Allsop, D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in pharmacological sciences*, *12*, 383-388.

Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvina V, Dowzell K, Williams A, *et al.,* 2009. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. Nat Genet 41: 1088–1093.

Haroutunian, V., Hoffman, L. B., & Been, M. S. (2009). Is there a neuropathology difference between mild cognitive impairment and dementia?.*Dialogues in clinical neuroscience*, *11*(2), 171.

Harris, E. K. (1974). Effects of intra-and interindividual variation on the appropriate use of normal ranges. *Clinical Chemistry*, *20*(12), 1535-1542.

Heneka, M. T., O'Banion, M. K., Terwel, D., & Kummer, M. P. (2010). Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission*, *117*(8), 919-947.

Heneka, M. T., & O'Banion, M. K. (2007). Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Journal of neuroimmunology*, *184*(1), 69-91.

Henriksen, K., O'Bryant, S. E., Hampel, H., Trojanowski, J. Q., Montine, T. J., Jeromin, A., ... & Weiner, M. W. (2014). The future of blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, *10*(1), 115-131.

Herbst, J. J., Opresko, L. K., Walsh, B. J., Lauffenburger, D. A., & Wiley, H. S. (1994). Regulation of postendocytic trafficking of the epidermal growth factor receptor through endosomal retention. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(17), 12865-12873.

Hodges, J. R. (2006). Alzheimer's centennial legacy: origins, landmarks and the current status of knowledge concerning cognitive aspects. *Brain*, *129*(11), 2811-2822.

Hof PR, Vogt BA, Bouras C, Morrison JH. 1997. Atypical form of Alzheimer's disease with prominent posterior cortical atrophy: A review of lesion distribution and circuit disconnection in cortical visual pathways. Vision Research 37: 3609–3625.

Hollingworth P, Harold D, Sims R, Gerrish A, Lambert J-C, Carrasquillo MM, Abraham R, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvina V, *et al.*, 2011. Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. Nat Genet 43: 429–435.

Holtzman, D. M., Morris, J. C., & Goate, A. M. (2011). Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Science translational medicine*, *3*(77), 77 sr1-77 sr1.

Hooper, C., Killick, R., & Lovestone, S. (2008). The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, *104*(6), 1433-1439.

Hotoda N, Koike H, Sasagawa N, Ishiura S. 2002. A secreted form of human ADAM9 has an α-secretase activity for APP. Biochem Biophys Res Commun 293: 800–805.

Hui, L., Chen, X. & Geiger, J.D., 2012. Endolysosome involvement in LDL cholesterol-induced Alzheimer's disease-like pathology in primary cultured neurons. Life Sciences, pp.1–10.

Hunyady L, Baukal AJ, Gaborik Z, Olivares-Reyes JA, Bor M, Szaszak M, Lodge R, Catt KJ, Balla T. 2002. Differential PI 3-kinase dependence of early and late phases of recycling of the internalized AT1 angiotensin receptor. The Journal of Cell Biology 157: 1211–1222.

Huse, J. T., Pijak, D. S., Leslie, G. J., Lee, V. M. Y., & Doms, R. W. (2000). Maturation and endosomal targeting of β-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme The Alzheimer's disease β-secretase. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(43), 33729-33737.

Hye, A., Lynham, S., Thambisetty, M., Causevic, M., Campbell, J., Byers, H. L., ... & Lovestone, S. (2006). Proteome-based plasma biomarkers for Alzheimer's disease. *Brain*, *129*(11), 3042-3050.

Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, Dickson DW, Duyckaerts C, Frosch MP, Masliah E, *et al.*, 2012. National Institute on Aging-Alzheimer“s Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer”s disease. Alzheimers Dement 8: 1–13.

Ikonomovic MD, Klunk WE, Abrahamson EE, Mathis CA, Price JC, Tsopelas ND, Lopresti BJ, Ziolko S, Bi W, Paljug WR, *et al.*, 2008. Post-mortem correlates of in vivo PiB-PET amyloid imaging in a typical case of Alzheimer's disease. Brain 131: 1630–1645.

Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, Petersen RC, Trojanowski JQ. 2010. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. The Lancet Neurology 9: 119–128.

Jack CR, Dickson DW, Parisi JE, Xu YC, Cha RH, O'Brien PC, Edland SD, Smith GE, Boeve BF, Tangalos EG, *et al.*, 2002. Antemortem MRI findings correlate with hippocampal neuropathology in typical aging and dementia. Neurology 58: 750–757.

Jack CR, Lowe VJ, Senjem ML, Weigand SD, Kemp BJ, Shiung MM, Knopman DS, Boeve BF, Klunk WE, Mathis CA, *et al.*, 2008. 11C PiB and structural MRI provide complementary information in imaging of Alzheimer's disease and amnestic mild cognitive impairment. Brain 131: 665–680.

Jack CR, Wiste HJ, Knopman DS, Vemuri P, Mielke MM, Weigand SD, Senjem ML, Gunter JL, Lowe V, Gregg BE, *et al.*, 2014. Rates of β-amyloid accumulation are independent of hippocampal neurodegeneration. Neurology 82: 1605–1612.

Jana M, Palencia CA, Pahan K. 2008. Fibrillar amyloid-beta peptides activate microglia via TLR2: implications for Alzheimer's disease. J Immunol 181: 7254–7262.

Huotari, J., & Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *The EMBO journal*,*30*(17), 3481-3500.

Jena BP. 2009. Porosome: The Secretory Portal in Cells. Biochemistry 48: 4009–4018.

Jones SE, Jomary C. 2002. Clusterin. Int J Biochem Cell Biol 34: 427–431.

Kalvodova, L., Kahya, N., Schwille, P., Ehehalt, R., Verkade, P., Drechsel, D., & Simons, K. (2005). Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(44), 36815-36823.

Kanekiyo, T., Xu, H. & Bu, G., 2014. ApoE and Aβ in Alzheimer's disease: accidental encounters or partners? Neuron, 81(4), pp.740–754.

Kang J, Lemaire H-G, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik K-H, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B. 1987. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. Nature 325: 733–736.

Kemppainen NM, Aalto S, Wilson IA, Nagren K, Helin S, Brück A, Oikonen V, Kailajärvi M, Scheinin M, Viitanen M, *et al.*, 2007. PET amyloid ligand [11C]PIB uptake is increased in mild cognitive impairment. Neurology 68: 1603–1606.

Kemppainen NM, Scheinin NM, Koivunen J, Johansson J, Toivonen JT, Nagren K, Rokka J, Karrasch M, Parkkola R, Rinne JO. 2014. Five-year follow-up of 11C-PIB uptake in Alzheimer's disease and MCI. Eur J Nucl Med Mol Imaging 41: 283–289.

Kiko, T., Nakagawa, K., Satoh, A., Tsuduki, T., Furukawa, K., Arai, H., & Miyazawa, T. (2012). Amyloid β Levels in Human Red Blood Cells. *PloS one*,*7*(11), e49620.

Kim J, Basak JM, Holtzman DM. 2009. The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. Neuron 63: 287–303.

Klumperman, J., & Raposo, G. (2014). The Complex Ultrastructure of the Endolysosomal System. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, a016857.

Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, Bergström M, Savitcheva I, Huang G-F, Estrada S, *et al.*, 2004. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. Ann Neurol 55: 306–319.

Klunk, W. E., Mathis, C. A., Price, J. C., Lopresti, B. J., & DeKosky, S. T. (2006). Two-year follow-up of amyloid deposition in patients with Alzheimer's disease. *Brain*, *129*(11), 2805-2807.

Koivunen J, Pirttil auml T, Kemppainen N, Aalto S, Herukka SK, Jauhianen AM, H auml nninen T, Hallikainen M, N aring gren K, Rinne JO, *et al.*, 2008. PET Amyloid Ligand [^{11}C]PIB

Uptake and Cerebrospinal Fluid β-Amyloid in Mild Cognitive Impairment. Dement Geriatr Cogn Disord 26: 378–383.

Koric, L., Felician, O., & Ceccaldi, M. (2011). Utilisation des biomarqueurs du LCR dans le diagnostic de la maladie d'Alzheimer en pratique clinique. *Revue neurologique*, *167*(6), 474-484.

Kosicek M, Hecimovic S. 2013. Phospholipids and Alzheimer's Disease: Alterations, Mechanisms and Potential Biomarkers. IJMS 14: 1310–1322.

Koyama, A., Okereke, O. I., Yang, T., Blacker, D., Selkoe, D. J., & Grodstein, F. (2012). Plasma amyloid-β as a predictor of dementia and cognitive decline: a systematic review and meta-analysis. *Archives of neurology*, *69*(7), 824-831.

Krolak-Salmon, Pierre, and Alain Vighetto. 2012. "Cerebrospinal Fluid and PET Biomarkers for in Vivodiagnosis of Posterior Cortical Atrophy as the Early Onset and Focal Variant of Alzheimer'S Disease." Future Neurology 7 (4). Future Medicine Ltd London, UK : 403–7. doi:10.2217/fnl.12.39.

Kuhn P-H, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW, Kremmer E, Rossner S, Lichtenthaler SF. 2010. ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive α-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. The EMBO Journal 29: 3020–3032.

Lagache, Thibault, Gabriel Lang, Nathalie Sauvonnet, and Jean-Christophe Olivo-Marin. 2013. "Analysis of the Spatial Organization of Molecules with Robust Statistics." PLoS ONE 8 (12). Public Library of Science: e80914. doi:10.1371/journal.pone.0080914.

Lai A, Sisodia SS, Trowbridge IS. 1995. Characterization of sorting signals in the beta-amyloid precursor protein cytoplasmic domain. Journal of Biological Chemistry 270: 3565–3573.

Lambert J-C, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, Zelenika D, Bullido MJ, Tavernier B, *et al.*, 2009. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. Nat Genet 41: 1094–1099.

Lambert J-C, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, Jun G, DeStefano AL, Bis JC, Beecham GW, *et al.*, 2013. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. Nat Genet 45: 1452–1458.

Langley, G. R. (2014). Considering a new paradigm for Alzheimer's disease research. *Drug discovery today*.

Lanz TA, Carter DB, Merchant KM. 2003. Dendritic spine loss in the hippocampus of young PDAPP and Tg2576 mice and its prevention by the ApoE2 genotype. Neurobiol Dis 13: 246–253.

Lawe DC, Patki V, Heller-Harrison R, Lambright D, Corvera S. 2000. The FYVE domain of early endosome antigen 1 is required for both phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 binding. Critical role of this dual interaction for endosomal localization. Journal of Biological Chemistry 275: 3699–3705.

Lee J-S, Jeremic A, Shin L, Cho WJ, Chen X, Jena BP. 2012. Neuronal porosome proteome: Molecular dynamics and architecture. J Proteomics 75: 3952–3962.

Lee, K. J., Moussa, C. E. H., Lee, Y., Sung, Y., Howell, B. W., Turner, R. S., ... & Hoe, H. S. (2010). Beta amyloid-independent role of amyloid precursor protein in generation and maintenance of dendritic spines. *Neuroscience*,*169*(1), 344-356.

Lee, V. M., Balin, B. J., Otvos, L., & Trojanowski, J. Q. (1991). A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau.*Science*, *251*(4994), 675-678.

Lehéricy S, Marjanska M, Mesrob L, Sarazin M, Kinkingnehun S. 2006. Magnetic resonance imaging of Alzheimer's disease. Eur Radiol 17: 347–362.

Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, Anderson L, Goddard KA, Weber JL, Bird TD, Schellenberg GD. 1995. A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. Science 269: 970–973.

Li, J., Kanekiyo, T., Shinohara, M., Zhang, Y., LaDu, M. J., Xu, H., & Bu, G. (2012). Differential regulation of amyloid-β endocytic trafficking and lysosomal degradation by apolipoprotein E isoforms. *Journal of Biological Chemistry*,*287*(53), 44593-44601.

Lista, S., Zetterberg, H., Dubois, B., Blennow, K., & Hampel, H. (2014). Cerebrospinal fluid analysis in Alzheimer's disease: technical issues and future developments. *Journal of neurology*, 1-10.

Liu F, Zaidi T, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Merkle RK, Gong CX. 2002. Role of glycosylation in hyperphosphorylation of tau in Alzheimer's disease. FEBS Letters 512: 101–106.

Liu, F., Zaidi, T., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I. & Gong, C.X., 2002a. Aberrant glycosylation modulates phosphorylation of tau by protein kinase A and dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2A and 5. Neuroscience, 115(3), pp.829–837.

Lockhart, A. *et al.*, , 2007. PIB is a non-specific imaging marker of amyloid-beta (A) peptide-related cerebral amyloidosis. Brain : a journal of neurology, 130(10), pp.2607–2615.

Lammertsma AA, Hume SP. Simplified reference tissue model for PET receptor studies. *Neuroimage*. Dec 1996;4(3 Pt 1):153-158

Lopresti BJ, Klunk WE, Mathis CA, Hoge JA, Ziolko SK, Lu X, Meltzer CC, Schimmel K, Tsopelas ND, DeKosky ST, *et al.*, 2005. Simplified quantification of Pittsburgh Compound B amyloid imaging PET studies: a comparative analysis. J Nucl Med 46: 1959–1972.

Luo Y, Bolon B, Damore MA, Fitzpatrick D, Liu H, Zhang J, Yan Q, Vassar R, Citron M. 2003. BACE1 (beta-secretase) knockout mice do not acquire compensatory gene expression changes or develop neural lesions over time. Neurobiol Dis 14: 81–88.

Mandelkow EM, Biernat J, Drewes G, Gustke N, Trinczek B, Mandelkow E. 1995. Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules. Neurobiology of Aging 16: 355–62– discussion 362–3.

Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. (2012). Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *2*(7), a006247.

Mandelkow, E. M., Thies, E., Trinczek, B., Biernat, J., & Mandelkow, E. (2004). MARK/PAR1 kinase is a regulator of microtubule-dependent transport in axons.*The Journal of cell biology*, *167*(1), 99-110.

Mandelkow, E.M. *et al.*, , 1995. Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules. Neurobiology of Aging, 16(3), pp.355–62,

Manzone, T. A., Dam, H. Q., Soltis, D., & Sagar, V. V. (2007). Blood volume analysis: a new technique and new clinical interest reinvigorate a classic study.*Journal of nuclear medicine technology*, *35*(2), 55-63.

Mapstone, M. *et al.*, , 2014. Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults. Nature medicine, 20(4), pp.415–418.

Margallo-Lana M, Morris CM, Gibson AM, Tan AL, Kay D, Tyrer SP, Moore BP, Ballard CG. 2004. Influence of the amyloid precursor protein locus on dementia in Down syndrome. Neurology 62: 1996–1998.

Marko Jovic MSJRSC. 2010. The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. Histology and histopathology 25: 99.

Masters CL, Selkoe DJ. 2012. Biochemistry of Amyloid β-Protein and Amyloid Deposits in Alzheimer Disease. Cold Spring Harb Perspect Med 2: a006262.

Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. 1985. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. Proceedings of the National Academy of Sciences 82: 4245–4249.

McGeer PL, McGeer EG. 2013. The amyloid cascade-inflammatory hypothesis of Alzheimer disease: implications for therapy. Acta Neuropathol 126: 479–497.

McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., & Stadlan, E. M. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease Report of the NINCDS-ADRDA Work Group* under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, *34*(7), 939-939.

McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR Jr, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, *et al.*, 2011. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer‘s Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer’s disease. Alzheimer's & Dementia 7: 263–269.

McMahon HT. 1999. Endocytosis: An assembly protein for clathrin cages. Current Biology.

McMonagle, P., Deering, F., Berliner, Y., & Kertesz, A. (2006). The cognitive profile of posterior cortical atrophy. *Neurology*, *66*(3), 331-338.

Mellman I. 1996. Endocytosis and molecular sorting. Annu Rev Cell Dev Biol 12: 575–625.

Charles, R. F., & Hillis, A. E. (2005). Posterior cortical atrophy: clinical presentation and cognitive deficits compared to Alzheimer's disease.*Behavioural neurology*, *16*(1), 15-23.

Mesulam, M. M. (2003). Primary progressive aphasia—a language-based dementia. *New England Journal of Medicine*, *349*(16), 1535-1542.

Miller, C. C., McLoughlin, D. M., Lau, K. F., Tennant, M. E., & Rogelj, B. (2006). The X11 proteins, Aβ production and Alzheimer's disease. *Trends in neurosciences*, *29*(5), 280-285.

Möller HJ, Graeber MB. 1998. The case described by Alois Alzheimer in 1911. European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience 248: 111–122.

Morel E, Chamoun Z, Lasiecka ZM, Chan RB, Williamson RL, Vetanovetz C, Dall'Armi C, Simoes S, Point Du Jour KS, McCabe BD, *et al.*, 2013. Phosphatidylinositol-3-phosphate regulates sorting and processing of amyloid precursor protein through the endosomal system. Nat Commun 4: 2250.

Morris JC, Roe CM, Grant EA, Head D, Storandt M, Goate AM, Fagan AM, Holtzman DM, Mintun MA. 2009. Pittsburgh Compound B Imaging and Prediction of Progression From Cognitive Normality to Symptomatic Alzheimer Disease. Arch Neurol 66: 1469–1475.

Mosconi L, Perani D, Sorbi S, Herholz K, Nacmias B, Holthoff V, Salmon E, Baron J-C, De Cristofaro MTR, Padovani A, *et al.*, 2004. MCI conversion to dementia and the APOE genotype: a prediction study with FDG-PET. Neurology 63: 2332–2340.

Mukherjee S, Maxfield FR. 2004a. Lipid and cholesterol trafficking in NPC. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids 1685: 28–37.

Mukherjee S, Maxfield FR. 2004b. Membrane domains. Annu Rev Cell Dev Biol 20: 839–866.

Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L. 1992. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N–terminus of β–amyloid. Nat Genet 1: 345–347.

Müller U, Winter P, Graeber MB. 2013. A presenilin 1 mutation in the first case of Alzheimer's disease. Lancet Neurol 12: 129–130.

Murk JLAN, Humbel BM, Ziese U, Griffith JM, Posthuma G, Slot JW, Koster AJ, Verkleij AJ, Geuze HJ, Kleijmeer MJ. 2003. Endosomal compartmentalization in three dimensions: implications for membrane fusion. Proceedings of the National Academy of Sciences 100: 13332–13337.

Murray, M.E. *et al.*, , 2011. Neuropathologically defined subtypes of Alzheimer's disease with distinct clinical characteristics: a retrospective study. The Lancet Neurology, 10(9), pp.785–796.

Nalivaeva NN, Belyaev ND, Zhuravin IA, Turner AJ. 2012. The Alzheimer's Amyloid-Degrading Peptidase, Neprilysin: Can We Control It? International Journal of Alzheimer's Disease 2012: 1–12.

Namba, Y., Tomonaga, M., Kawasaki, H., Otomo, E., & Ikeda, K. (1991). Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's

disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain research*, *541*(1), 163-166.

Neary, D., Snowden, J. S., Gustafson, L., Passant, U., Stuss, D., Black, S. A., ... & Benson, D. F. (1998). Frontotemporal lobar degeneration A consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology*, *51*(6), 1546-1554.

Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, Castellani RJ, Crain BJ, Davies P, Del Tredici K, *et al.*, 2012. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. J Neuropathol Exp Neurol 71: 362–381.

Ng, S. Y., Villemagne, V. L., Masters, C. L., & Rowe, C. C. (2007). Evaluating Atypical Dementia Syndromes Using Positron Emission Tomography With Carbon 11–Labeled Pittsburgh Compound B. *Archives of neurology*, *64*(8), 1140-1144.

Nickel W, Seedorf M. 2008. Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells. Annu Rev Cell Dev Biol 24: 287–308.

Noble, J. M., & Scarmeas, N. (2009). Application of Pet Imaging to Diagnosis of Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment< sup> 1</sup>.*International review of neurobiology*, *84*, 133-149.

Nuutinen T, Suuronen T, Kauppinen A, Salminen A. 2009. Clusterin: a forgotten player in Alzheimer's disease. Brain Research Reviews 61: 89–104.

Okamura, N., Furumoto, S., Fodero-Tavoletti, M. T., Mulligan, R. S., Harada, R., Yates, P., ... & Villemagne, V. L. (2014). Non-invasive assessment of Alzheimer's disease neurofibrillary pathology using 18F-THK5105 PET. *Brain*.

Ollion, J., Cochennec, J., Loll, F., Escudé, C., & Boudier, T. (2013). TANGO: a generic tool for high-throughput 3D image analysis for studying nuclear organization. *Bioinformatics*, btt276.

Otsu, N. (1975). A threshold selection method from gray-level histograms.*Automatica*, *11*(285-296), 23-27.

Pal R, Alves G, Larsen JP, Møller SG. 2013. New Insight into Neurodegeneration: the Role of Proteomics. Mol Neurobiol 49: 1181–1199.

Perez RG, Soriano S, Hayes JD, Ostaszewski B, Xia W, Selkoe DJ, Chen X, Stokin GB, Koo EH. 1999. Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis,

turnover, and the generation of secreted fragments, including Abeta42. Journal of Biological Chemistry 274: 18851–18856.

Perrin RJ, Fagan AM, Holtzman DM. 2009. Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease. Nature 461: 916–922.

Perry VH, Holmes C. 2014. Microglial priming in neurodegenerative disease. Nat Rev Neurol 10: 217–224.

Pike KE, Savage G, Villemagne VL, Ng S, Moss SA, Maruff P, Mathis CA, Klunk WE, Masters CL, Rowe CC. 2007. Beta-amyloid imaging and memory in non-demented individuals: evidence for preclinical Alzheimer's disease. Brain 130: 2837–2844.

Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, Prinzen C, Endres K, Hiemke C, Blessing M, *et al.*, 2004. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. J Clin Invest 113: 1456–1464.

Price, J. L., McKeel Jr, D. W., Buckles, V. D., Roe, C. M., Xiong, C., Grundman, M., ... & Morris, J. C. (2009). Neuropathology of nondemented aging: presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease. *Neurobiology of aging*,*30*(7), 1026-1036.

Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., & Ferri, C. P. (2013). The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis.*Alzheimer's & Dementia*, *9*(1), 63-75.

Prince, M., Prina, M. & Guerchet, M., 2013. World Alzheimer Report 2013 - Journey of caring Alzheimer's Disease International, ed. Alzheimer's Disease International - Worl reports, 2013, pp.1–92.

Prince, M., Bryce, R. & Ferri, C.P., 2011. The benefits of early diagnosis and intervention Alzheimer's Disease International, ed., (2011), pp.1–72.

Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). Mechanisms of disease. *N Engl J Med*, *362*(4), 329-344.

Raposo G, Stoorvogel W. 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. The Journal of Cell Biology 200: 373–383.

Reitz, C., Brayne, C. & Mayeux, R., 2011. Epidemiology of Alzheimer disease. Nature Reviews Neurology, 7(3), pp.137–152.

Rembach A, Faux NG, Watt AD, Pertile KK, Rumble RL, Trounson BO, Fowler CJ, Roberts BR, Perez KA, Li Q-X, *et al.*, 2014. Changes in plasma amyloid beta in a longitudinal study of aging and Alzheimer's disease. Alzheimers Dement 10: 53–61.

Rembach A, Ryan TM, Roberts BR, Doecke JD, Wilson WJ, Watt AD, Barnham KJ, Masters CL. 2013. Progress towards a consensus on biomarkers for Alzheimer's disease: a review of peripheral analytes. Biomark Med 7: 641–662.

Riddell DR, Christie G, Hussain I, Dingwall C. 2001. Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts. Curr Biol 11: 1288–1293.

Ripley, B. D. (1977). Modelling spatial patterns. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 172-212.

Roher A, Wolfe D, Palutke M, KuKuruga D. 1986. Purification, ultrastructure, and chemical analysis of Alzheimer disease amyloid plaque core protein. Proceedings of the National Academy of Sciences 83: 2662–2666.

Rosenbloom, M. H., Alkalay, A., Agarwal, N., Baker, S. L., O'Neil, J. P., Janabi, M., ... & Rabinovici, G. D. (2011). Distinct clinical and metabolic deficits in PCA and AD are not related to amyloid distribution. *Neurology*, *76*(21), 1789-1796.

Rovelet-Lecrux, A. *et al.*, , 2005. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. Nature Genetics, 38(1), pp.24–26.

Rubino, M., Miaczynska, M., Lippé, R., & Zerial, M. (2000). Selective membrane recruitment of EEA1 suggests a role in directional transport of clathrin-coated vesicles to early endosomes. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(6), 3745-3748.

Ruusuvuori, P., Äijö, T., Chowdhury, S., Garmendia-Torres, C., Selinummi, J., Birbaumer, M., ... & Yli-Harja, O. (2010). Evaluation of methods for detection of fluorescence labeled subcellular objects in microscope images. *BMC bioinformatics*, *11*(1), 248.

Sagare, A., Deane, R., Bell, R. D., Johnson, B., Hamm, K., Pendu, R., ... & Zlokovic, B. V. (2007). Clearance of amyloid-β by circulating lipoprotein receptors. *Nature medicine*, *13*(9), 1029-1031.

Sahoo, P. K., Soltani, S. A. K. C., & Wong, A. K. (1988). A survey of thresholding techniques. *Computer vision, graphics, and image processing*,*41*(2), 233-260.

Sano, Y., Syuzo-Takabatake, A., Nakaya, T., Saito, Y., Tomita, S., Itohara, S., & Suzuki, T. (2006). Enhanced amyloidogenic metabolism of the amyloid β-protein precursor in the X11L-deficient mouse brain. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(49), 37853-37860.

Sarazin M, Berr C, De Rotrou J, Fabrigoule C, Pasquier F, Legrain S, Michel B, Puel M, Volteau M, Touchon J, *et al.*, 2007. Amnestic syndrome of the medial temporal type identifies prodromal AD: A longitudinal study. Neurology 69: 1859–1867.

Sarazin, M., Chauviré, V., Gerardin, E., Colliot, O., Kinkingnéhun, S., De Souza, L. C., ... & Dubois, B. (2010). The amnestic syndrome of hippocampal type in Alzheimer's disease: an MRI study. *Journal of Alzheimer's Disease*, *22*(1), 285-294.

Sattlecker, M., Kiddle, S. J., Newhouse, S., Proitsi, P., Nelson, S., Williams, S., ... & Dobson, R. J. (2014). Alzheimer's disease biomarker discovery using SOMAscan multiplexed protein technology. *Alzheimer's & Dementia*.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, *9*(7), 676-682.

Schmid SL. 1997. Clathrin-coated vesiclle formation and protein sorting: An Integrated Process. Annu Rev Biochem 66: 511–548.

Schneider P, Hampel H, Buerger K. 2009. Biological Marker Candidates of Alzheimer's Disease in Blood, Plasma, and Serum. CNS Neuroscience & Therapeutics 15: 358–374.

Seguin, J., Formaglio, M., Perret-Liaudet, A., Quadrio, I., Tholance, Y., Rouaud, O., ... & Krolak-Salmon, P. (2011). CSF biomarkers in posterior cortical atrophy.*Neurology*, *76*(21), 1782-1788.

Selkoe DJ. 1991. The molecular pathology of Alzheimer's disease. Neuron 6: 487–498.

Selkoe DJ. 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. Physiological Reviews 81: 741–766.

Selkoe, D. J. (2008). Soluble oligomers of the amyloid β-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behavioural brain research*, *192*(1), 106-113.

Selkoe, D., Mandelkow, E., & Holtzman, D. (2012). Deciphering Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *2*(1), a011460.

Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, *et al.*, 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. Nature 375: 754–760.

Shotton, D. M. (1989). Confocal scanning optical microscopy and its applications for biological specimens. *Journal of Cell Science*, *94*(2), 175-206.

Simard, A. R., & Rivest, S. (2004). Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *The FASEB Journal*, *18*(9), 998-1000.

Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C. G., & Simons, K. (1998). Cholesterol depletion inhibits the generation of β-amyloid in hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,*95*(11), 6460-6464.

Sleegers K, Brouwers N, Gijselinck I, Theuns J, Goossens D, Wauters J, Del-Favero J, Cruts M, van Duijn CM, Van Broeckhoven C. 2006. APP duplication is sufficient to cause early onset Alzheimer's dementia with cerebral amyloid angiopathy. Brain 129: 2977–2983.

Small, S. A., & Gandy, S. (2006). Sorting through the cell biology of Alzheimer's disease: intracellular pathways to pathogenesis. *Neuron*, *52*(1), 15-31.

Snyder HM, Carrillo MC, Grodstein F, Henriksen K, Jeromin A, Lovestone S, Mielke MM, O'Bryant S, Sarasa M, Sjögren M, *et al.*, 2014. Developing novel blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement 10: 109–114.

Sojkova, J., Driscoll, I., Iacono, D., Zhou, Y., Codispoti, K. E., Kraut, M. A., ... & Resnick, S. M. (2011). In vivo fibrillar β-amyloid detected using [11C] PiB positron emission tomography and neuropathologic assessment in older adults.*Archives of neurology*, *68*(2), 232-240.

Squire, L. R. (1986). Mechanisms of memory. *Science*, *232*(4758), 1612-1619.

Stein TD, Anders NJ, DeCarli C, Chan SL, Mattson MP, Johnson JA. 2004. Neutralization of transthyretin reverses the neuroprotective effects of secreted amyloid precursor protein (APP) in APPSW mice resulting in tau phosphorylation and loss of hippocampal neurons: support for the amyloid hypothesis. Journal of Neuroscience 24: 7707–7717.

Steinman, R. M., Mellman, I. S., Muller, W. A., & Cohn, Z. A. (1983). Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *The Journal of cell biology*,*96*(1), 1-27.

Stenmark H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. Nat Rev Mol Cell Biol 10: 513–525.

Stomrud E, Hansson O, Zetterberg H, Blennow K, Minthon L, Londos E. 2010. Correlation of Longitudinal Cerebrospinal Fluid Biomarkers With Cognitive Decline in Healthy Older Adults. Arch Neurol 67: 217–223.

Stoorvogel, W., Kleijmeer, M. J., Geuze, H. J., & Raposo, G. (2002). The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic*, *3*(5), 321-330.

Sudduth TL, Schmitt FA, Nelson PT, Wilcock DM. 2013. Neuroinflammatory phenotype in early Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging 34: 1051–1059.

Suzuki, N., Cheung, T. T., Cai, X. D., Odaka, A., Otvos Jr, L., Eckman, C., ... & Younkin, S. G. (1994). An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants.*Science*, *264*(5163), 1336-1340.

Tan, J. L., Li, Q. X., Ciccotosto, G. D., Crouch, P. J., Culvenor, J. G., White, A. R., & Evin, G. (2013). Mild oxidative stress induces redistribution of BACE1 in non-apoptotic conditions and promotes the amyloidogenic processing of Alzheimer's disease amyloid precursor protein. *PloS one*, *8*(4), e61246.

Tang-Wai DF, Graff-Radford NR, Boeve BF, Dickson DW, Parisi JE, Crook R, Caselli RJ, Knopman DS, Petersen RC. 2004. Clinical, genetic, and neuropathologic characteristics of posterior cortical atrophy. Neurology 63: 1168–1174.

Tapiola T, Alafuzoff I, Herukka S-K, Parkkinen L, Hartikainen P, Soininen H, Pirttilä T. 2009. Cerebrospinal Fluid β-Amyloid 42 and Tau Proteins as Biomarkers of Alzheimer-Type Pathologic Changes in the Brain. Arch Neurol 66: 382–389.

Fodero-Tavoletti, M. T., Okamura, N., Furumoto, S., Mulligan, R. S., Connor, A. R., McLean, C. A., et al, V. L. 2011. 18F-THK523: a novel in vivo tau imaging ligand for Alzheimer's disease. *Brain*, *134*(4), 1089-1100.

Tebar F, Bohlander SK, Sorkin A. 1999. Clathrin Assembly Lymphoid Myeloid Leukemia (CALM) Protein: Localization in Endocytic-coated Pits, Interactions with Clathrin, and the Impact of Overexpression on Clathrin-mediated Traffic. Mol Biol Cell 10: 2687–2702.

Tenovuo, O., Kemppainen, N., Aalto, S., Någren, K., & Rinne, J. O. (2008). Posterior cortical atrophy: A rare form of dementia with in vivo evidence of amyloid-β accumulation. *Journal of Alzheimer's Disease*, *15*(3), 351-355.

Terry RD, Hansen LA, DeTeresa R, Davies P, Tobias H, Katzman R. 1987. Senile dementia of the Alzheimer type without neocortical neurofibrillary tangles. J Neuropathol Exp Neurol 46: 262–268.

Thal DR, Rub U, Orantes M, Braak H. 2002. Phases of A -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. Neurology 282: 1791–1800.

Thambisetty, M., & Lovestone, S. (2010). Blood-based biomarkers of Alzheimer's disease: challenging but feasible. *Biomarkers in medicine*, *4*(1), 65-79.

Tian Y, Bassit B, Chau D, Li Y-M. 2010. An APP inhibitory domain containing the Flemish mutation residue modulates γ-secretase activity for Aβ production. Nat Struct Mol Biol 17: 151–158.

Toledo JB, Vanderstichele H, Figurski M, Aisen PS, Petersen RC, Weiner MW, Jack CR, Jagust W, DeCarli C, Toga AW, *et al.*, 2011. Factors affecting Aβ plasma levels and their utility as biomarkers in ADNI. Acta Neuropathol 122: 401–413.

Troussière AC, Wallon D, Mouton-Liger F, Yatimi R, Robert P, Hugon J, Hannequin D, Pasquier F, Paquet C. 2014. Who needs cerebrospinal biomarkers? A national survey in clinical practice. J Alzheimers Dis 40: 857–861.

Tucholski, J., Kuret, J. & Johnson, G.V., 1999. Tau is modified by tissue transglutaminase in situ: possible functional and metabolic effects of polyamination. Journal of Neurochemistry, 73(5), pp.1871–1880.

Vassar R. 1999. Beta-Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE. Science 286: 735–741.

Vassar R. 2004. BACE1: The β-Secretase Enzyme in Alzheimer's Disease. JMN 23: 105–114.

Vetrivel, K. S., & Thinakaran, G. (2010). Membrane rafts in Alzheimer's disease beta-amyloid production. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1801*(8), 860-867.

Villain N, Chételat G, Grassiot B, Bourgeat P, Jones G, Ellis KA, Ames D, Martins RN, Eustache F, Salvado O, *et al.*, 2012. Regional dynamics of amyloid- deposition in healthy elderly, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a voxelwise PiB-PET longitudinal study. Brain 135: 2126–2139.

Visser, P. J., Verhey, F., Knol, D. L., Scheltens, P., Wahlund, L. O., Freund-Levi, Y., ... & Blennow, K. (2009). Prevalence and prognostic value of CSF markers of Alzheimer's disease pathology

in patients with subjective cognitive impairment or mild cognitive impairment in the DESCRIPA study: a prospective cohort study. *The Lancet Neurology*, *8*(7), 619-627.

Wallon, D., Rousseau, S., Rovelet-Lecrux, A., Quillard-Muraine, M., Guyant-Maréchal, L., Martinaud, O., ... & Campion, D. (2012). The French series of autosomal dominant early onset Alzheimer's disease cases: mutation spectrum and cerebrospinal fluid biomarkers. *Journal of Alzheimer's Disease*, *30*(4), 847-856.

Walter J, Fluhrer R, Hartung B, Willem M, Kaether C, Capell A, Lammich S, Multhaup G, Haass C. 2001. Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. Journal of Biological Chemistry 276: 14634–14641.

Wang, Y., Thiele, C. & Huttner, W.B., 2000. Cholesterol is required for the formation of regulated and constitutive secretory vesicles from the trans-Golgi network. Traffic (Copenhagen, Denmark), 1(12), pp.952–962.

Warren, J.D., Fletcher, P.D. & Golden, H.L., 2012. The paradox of syndromic diversity in Alzheimer disease. Nature Reviews Neurology, 8(8), pp.451–464.

Whitwell, J.L. *et al.*, , 2012. Neuroimaging correlates of pathologically defined subtypes of Alzheimer's disease: a case-control study. The Lancet Neurology, 11(10), pp.868–877.

Wild-Bode C, Fellerer K, Kugler J, Haass C, Capell A. 2006. A basolateral sorting signal directs ADAM10 to adherens junctions and is required for its function in cell migration. Journal of Biological Chemistry 281: 23824–23829.

Wildsmith, K. R., Schauer, S. P., Smith, A. M., Arnott, D., Zhu, Y., Haznedar, J., ... & Honigberg, L. A. (2014). Identification of longitudinally dynamic biomarkers in Alzheimer's disease cerebrospinal fluid by targeted proteomics. *Molecular Neurodegeneration*, *9*(1), 22.

Winkel, P., Statland, B. E., & Bokelund, H. (1974). Factors contributing to intra-individual variation of serum constituents: 5. Short-term day-to-day and within-hour variation of serum constituents in healthy subjects. *Clinical chemistry*,*20*(12), 1520-1527.

Wisniewski, K. E., Dalton, A. J., McLachlan, D. C., Wen, G. Y., & Wisniewski, H. M. (1985). Alzheimer's disease in Down's syndrome Clinicopathologic studies.*Neurology*, *35*(7), 957-957.

Yan SD, Yan SF, Chen X, Fu J, Chen M, Kuppusamy P, Smith MA, Perry G, Godman GC, Nawroth P, *et al.*, 1995. Non-enzymatically glycated tau in Alzheimer's disease induces neuronal

oxidant stress resulting in cytokine gene expression and release of amyloid β-peptide. Nat Med 1: 693–699.

Zaghi, J., Goldenson, B., Inayathullah, M., Lossinsky, A. S., Masoumi, A., Avagyan, H., ... & Fiala, M. (2009). Alzheimer disease macrophages shuttle amyloid-beta from neurons to vessels, contributing to amyloid angiopathy. *Acta neuropathologica*, *117*(2), 111-124.

Zerial M, Christoforidis S, McBride HM, Burgoyne RD. 1999. The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking : Abstract : Nature. Nature 397: 621–625.

Ziegler-Graham K, Brookmeyer R, Johnson E, Arrighi HM. 2008. Worldwide variation in the doubling time of Alzheimer's disease incidence rates. Alzheimer's & Dementia 4: 316–323.

Zlokovic, B. V. (2010). Neurodegeneration and the neurovascular unit. *Nature medicine*, *16*(12), 1370-1371.

Zlokovic, B. V. (2013). Cerebrovascular effects of apolipoprotein E: implications for Alzheimer disease. *JAMA neurology*, *70*(4), 440-444.

VII. Annexes

Annexe 1 (partie1) tableau récapitulatif des données de chaque sujet, groupe témoin

subject	nb cellules	% small	%medium	%large	volmo	sd	CDR	sex (2=f)	age	MMS	RTT	ApoE	Aß LCR	PIB global	précuneus
1	20	40	40	20	**225.8**	311,90	0	1	71	29	45	1	-	1,33	1,3
2	20	45	40	15	**220.8**	227,70	0	2	73	29	48	1	-	DM	DM
3	20	45	40	15	**199.02**	168,60	0	2	73	30	48	1	-	1,18	1,20
4	20	45	55	0	**184.05**	174,80	0	1	52	30	47	1	-	DM	DM
6	20	20	50	25	**278.3**	469,30	0	2	86	28	47	2	-	1,45	1,66
11	20	20	55	25	**274.3**	409,40	0	1	70	29	47	1	-	1,23	1,25
27	20	90	10	0	**154.9**	182,90	0	2	77	28	46	1	-	1,18	1,22
29	20	20	70	10	**253.5**	354,40	0	1	68	30	46	1	-	3,04	3,28
31	20	30	60	10	**211.8**	216,40	0	1	56	30	48	1	-	1,10	1,09
36	20	45	40	15	**217.8**	201,40	0	2	66	30	48	1	-	1,09	1,11
38	20	10	60	30	**290.5**	283,50	0	1	53	30	46	1	-	DM	1,28
39	20	10	80	10	**267.8**	224,20	0	1	54	27	48	2	-	1,23	1,29
42	20	35	45	20	**227.5**	202,80	0	2	53	28	47	1	-	1,18	1,24
46	20	80	10	10	**152.6**	208,90	0	2	78	29	48	1	-	1,17	1,18
55	20	85	15	0	**133.4**	253,80	0	1	66	30	47	1	-	1,26	1,34
58	20	20	60	20	**242.5**	260,20	0	2	63	30	48	1	-	1,25	1,27
59	20	90	10	0	**147.3**	132,80	0	2	76	29	48	1	-	1,16	1,26
62	20	55	40	5	**182.2**	184,10	0	2	62	30	48	1	-	1,13	1,18
65	20	95	5	0	**146.6**	138,80	0	2	73	30	48	1	-	1,45	1,53
66	20	80	15	5	**160.3**	152,10	0	2	70	30	48	1	-	1,18	DM
67	20	50	50	0	**192.08**	170,50	0	2	66	30	48	1	-	1,19	1,25
69	20	35	60	5	**203.5**	209,00	0	1	66	29	48	1	-	1,27	1,31
74	20	70	30	0	**183.8**	168,70	0	1	51	30	47	DM	-	DM	DM
80	20	85	15	0	**153.9**	146,90	0	1	86	28	44	DM	-	DM	DM

Tableau récapitulatif des données de chaque sujet pour le groupe des témoins. Les pourcentages indiqués dans les colonnes 3 à 5 sont ceux obtenus par la classification du volume endosomal moyen (VEM) par cellule, volmo est la moyenne des VEM. Tous les contrôles sont CDR=0. Les groupes ApoE sont notés 1 si le sujet ne porte aucun allèle E4, et 2 et 3 avec respectivement 1 et 2 allèles E4. Les deux dernières colonnes indiquent le valeur de l'index de fixation globale du PiB, et l'index dans le precuneus. DM = donnée manquante ou pas encore disponible.

Annexe 1 (partie2) tableau récapitulatif des données de chaque sujet, groupe MA-MCI

sujet	nb cellules	% small	%medium	%large	volmo	sd	CDR	sex (2=f)	age	MMS	RTT	ApoE	Aß LCR (pg/mL)	PIB global	precuneus	stade démentiel à un an
12	19	10,5	52,6	36,8	**322,6**	115,3	0,5	1	82	24	19	1	DM	DM	DM	0
13	20	20,0	40,0	40,0	**284,3**	91,1	0,5	2	52	20	20	3	232	2,85	2,90	1
25	20	10,0	75,0	15,0	**256,1**	91,1	0,5	2	80	25	23	2	310	3,12	3,39	0
26	20	70,0	25,0	5,0	**189,2**	107,2	0,5	2	66	27	29	1	326	2,08	2,47	0
30	20	40,0	50,0	10,0	**209,9**	76,7	0,5	2	54	22	12	2	388	2,59	2,95	1
33	20	15,0	60,0	25,0	**285,7**	110,0	0,5	2	70	21	33	1	414	3,00	3,10	0
35	20	60,0	35,0	5,0	**199,0**	66,2	0,5	1	68	30	37	2	378	2,41	2,71	0
37	20	10,0	75,0	15,0	**274,9**	126,5	0,5	2	59	21	36	3	296	2,10	2,32	0
40	20	35,0	30,0	35,0	**268,3**	130,4	0,5	1	75	26	19	3	315	3,14	3,23	0
41	20	10,0	40,0	50,0	**328,0**	153,7	0,5	1	68	23	25	3	319	3,58	3,95	0
44	17	76,5	11,8	11,8	**183,7**	69,0	0,5	2	62	26	22	1	276	2,68	3,07	1
45	20	95,0	5,0	0,0	**131,8**	27,0	0,5	1	69	22	37	1	349	3,38	3,87	1
51	20	95,0	5,0	0,0	**140,0**	25,8	0,5	2	53	22	19	1	347	2,74	2,90	1
52	20	50,0	20,0	30,0	**253,4**	146,6	0,5	1	56	18	0	2	471	3,05	3,39	1
54	20	35,0	65,0	0,0	**217,9**	41,7	0,5	2	68	21	36	2	433	2,32	2,38	1
57	20	100,0	0,0	0,0	**95,7**	28,0	0,5	1	71	23	46	1	370	3,10	3,83	1
60	20	85,0	15,0	0,0	**156,5**	42,1	0,5	2	82	20	19	2	DM	2,24	2,47	0
61	20	65,0	35,0	0,0	**185,6**	29,3	0,5	2	68	25	29	2	360	2,87	3,10	0
63	20	65,0	30,0	5,0	**185,6**	58,0	0,5	1	55	23	16	3	223	2,52	2,56	0
64	21	81,0	23,8	0,0	**160,3**	34,3	0,5	1	72	24	21	3	498	2,24	2,46	0
68	19	84,2	5,3	10,5	**184,9**	176,2	0,5	2	82	23	33	2	525	2,80	3,08	0
71	20	35,0	60,0	5,0	**219,5**	77,8	0,5	2	79	26	44	2	412	3,10	3,39	DM
73	20	45,0	50,0	5,0	**204,3**	46,8	0,5	2	55	20	37	DM	DM	2,33	2,53	DM
77	20	85,0	10,0	5,0	**157,9**	59,6	0,5	1	76	27	38	DM	353	DM	DM	DM
82	20	20,0	50,0	30,0	**274,8**	73,1	0,5	1	70	28	39	DM	524	DM	DM	DM

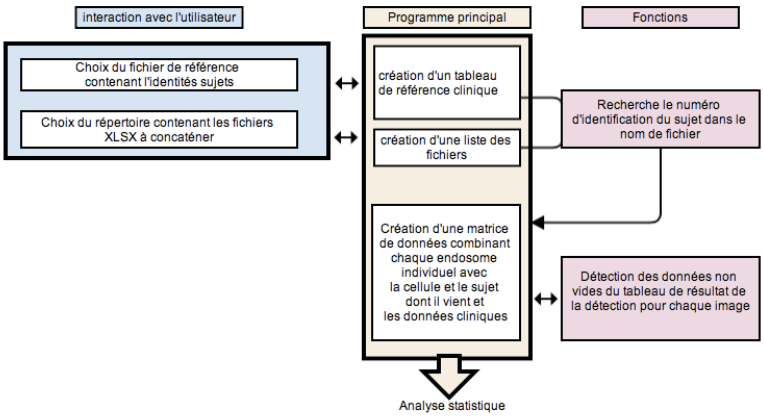
Tableau récapitulatif des données de chaque sujet pour le groupe des MA stade MCI. Les pourcentages indiqués dans les colonnes 3 à 5 sont ceux obtenus par la classification du volume endosomal moyen (VEM) par cellule, volmo est la moyenne des VEM. Les groupes ApoE sont notés 1 si le sujet ne porte aucun allèle E4, et 2 et 3 avec respectivement 1 et 2 allèles E4. La dernière colonne indique 1 quand l'atteinte cognitive s'est aggravée et affecte les activités de la vie quotidienne (sinon 0). DM = donnée manquante ou pas encore disponible.

Annexe 1(partie3) tableau récapitulatif des données de chaque sujet, groupe MA-D

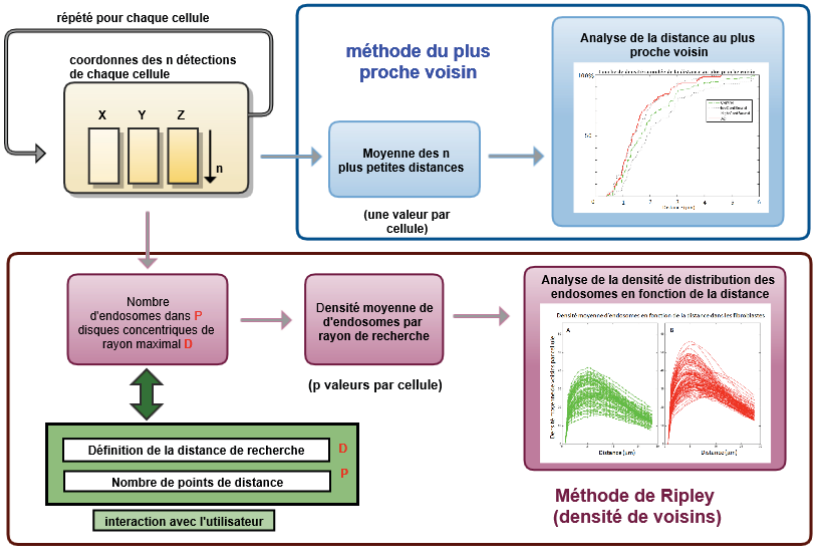
sujet	nb cell	% small	%medium	%large	volmo	sd	CDR	sex (2=f)	age	MMS	RTT	ApoE	Aß LCR	PIB global	precuneus	MMS à un an	CDR à 1 an
5	20	5,0	50,0	45,0	**383,2**	192,9	1	1	91	22	18	3	DM	3,2	DM	25	1
8	20	65,0	35,0	0,0	**184,1**	65,6	1	2	60	14	0	1	280	2,4	2,8	9	1
9	20	10,0	50,0	40,0	**325,5**	157,2	1	1	77	21	17	1	153	2,0	2,4	DM	1
10	20	25,0	55,0	20,0	**274,8**	138,6	1	2	81	17	20	1	260	2,9	3,5	15	1
14	20	15,0	60,0	25,0	**287,3**	110,6	1	1	67	8	0	1	DM	4,2	4,6	3	3
15	20	25,0	45,0	30,0	**291,6**	115,7	1	1	58	7	0	3	214	2,6	DM	3	3
16	19	21,1	36,8	42,1	**351,9**	192,8	1	1	80	18	0	1	DM	3,8	4,6	16	1
17	20	30,0	35,0	35,0	**267,5**	92,2	1	1	64	16	25	2	293	3,1	3,4	15	1
19	20	10,0	50,0	40,0	**291,4**	74,0	1	2	86	21	22	2	488	3,3	3,9	23	1
20	20	25,0	50,0	25,0	**255,3**	82,5	1	2	51	4	0	2	179	2,9	3,1	2	2
21	18	55,6	33,3	11,1	**211,4**	111,4	1	1	60	22	0	2	359	3,1	3,2	19	1
22	19	63,2	26,3	10,5	**189,1**	94,5	1	2	58	14	0	1	257	DM	DM	11	1
23	20	10,0	60,0	30,0	**291,6**	91,6	1	2	59	12	0	1	335	2,4	2,7	8	1
24	20	30,0	45,0	25,0	**251,5**	114,5	1	2	61	17	0	1	253	2,5	2,8	17	1
47	19	94,7	5,3	0,0	**115,5**	27,8	1	1	76	15	0	1	198	2,2	2,5	9	2
49	20	90,0	10,0	0,0	**150,3**	27,5	1	2	57	9	0	3	100	2,3	2,6	8	2
50	20	80,0	20,0	0,0	**153,6**	33,9	1	2	71	19	24	2	467	2,1	2,3	14	1
56	20	95,0	5,0	0,0	**159,5**	33,6	1	1	70	17	0	3	286	2,2	2,4	10	1
70	20	55,0	35,0	10,0	**215,0**	70,3	1	2	81	15	0	2	DM	2,1	2,3	DM	DM
72	20	90,0	10,0	0,0	**149,0**	28,4	1	1	64	21	26	1	323	DM	DM	DM	DM
78	20	80,0	20,0	0,0	**171,1**	27,9	1	2	90	17	17	1	DM	DM	DM	DM	DM
81	20	70,0	25,0	5,0	**186,3**	51,9	1	1	76	17	34	2	DM	DM	DM	DM	DM
83	20	35,0	60,0	5,0	**221,7**	54,7	1	2	59	12	4	3	558	DM	DM	DM	DM

Tableau récapitulatif des données de chaque sujet pour le groupe des MA stade démentiel. Les pourcentages indiqués dans les colonnes 3 à 5 sont ceux obtenus par la classification du volume endosomal moyen (VEM) par cellule, volmo est la moyenne des VEM. Les groupes ApoE sont notés 1 si le sujet ne porte aucun allèle E4, et 2 et 3 avec respectivement 1 et 2 allèles E4. La dernière colonne indique 2 ou 3 quand l'atteinte cognitive s'est aggravée depuis la première visite à laquelle tous les patients du groupe MA-D avaient ue CDR à 1. DM = donnée manquante ou pas encore disponible.

Annexe 2 : Diagrammes descriptifs des algorithmes de traitement des données.



Annexe 2a Création d'une matrice contenant toutes les données. Toutes les analyses réalisées subséquemment exploitent cette matrice de données.



Annexe 2b : Diagramme descriptif de l'analyse spatiale. Les coordonnées des endosomes de chaque cellule sont extraites de la matrice de données principale (Fig. annexe 2a). Ces coordonnées sont utilisées pour calculer la distance euclidienne entre chaque couple d'endosomes produisant une matrice de distances de n par n (n= nb d'endosomes de chaque cellule). L'analyse par la méthode des plus proches voisins (bleu) recherche pour les n endosomes la distance du plus proche voisin et renvoie pour chaque cellule la moyenne des n plus petites distances. La seconde méthode (rouge) recherche le nombre de voisins présents dans un rayon de recherche (D) contenant (P) intervalles définis par l'utilisateur (vert). Le résultat représente la densité d'endosomes dans chaque intervalle.

Annexe 3 (partie a) Marquage de l'A-beta et de l'APP dans les PBMC.

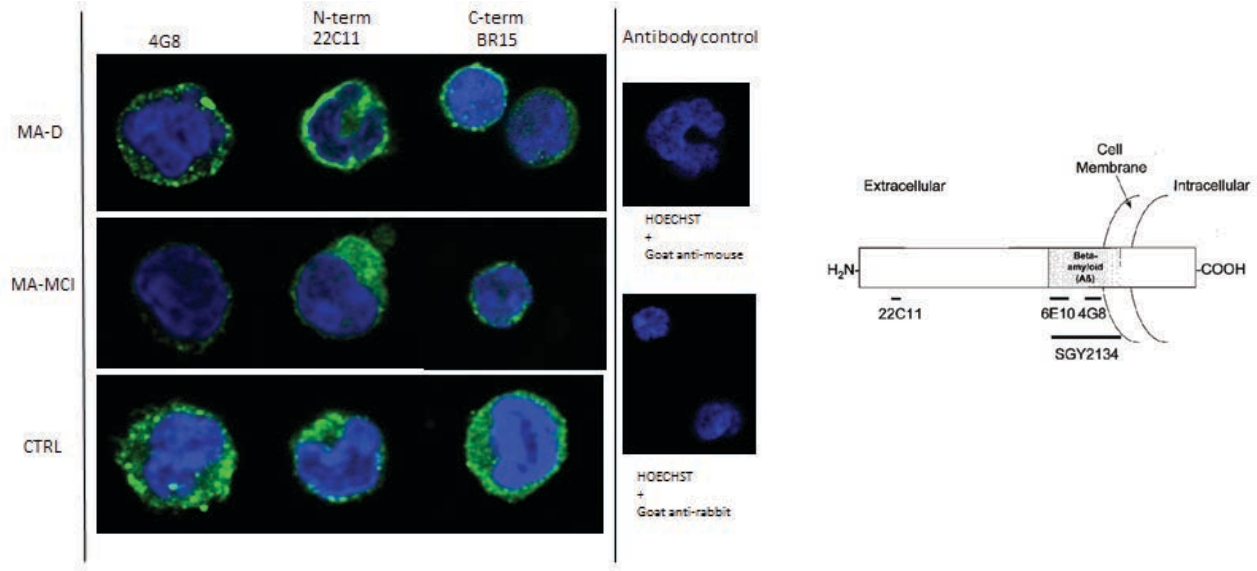


Figure annexe3a : Immuno marquage de l'APP et de l'Abeta dans les PBMC. La planche de gauche montre le résultat d'un immuno marquage de l'A-beta (anticorps 4G8), et du marquage de l'APP dans sa partie extracellulaire (anticorps 22C11), et dans la partie intracellulaire (anticorps BR15, non commercialisé, produit chez le lapin). Les trois anticorps ont été utilisés sur les cellules de trois sujets (un MA-D, un MA-MCI, et un témoin). La planche contrôle (au centre) indique que le marquage est spécifique. Le marquage par l'anticorp 4G8 n'est probablement pas spécifique de l'Abeta clivé, mais plutôt de la portion juxtamembranaire de l'APP contenant l'A-beta (sur le schéma de droite).

Annexe 3 (partie b) Marquage de l'A-beta et de l'APP dans les PBMC.

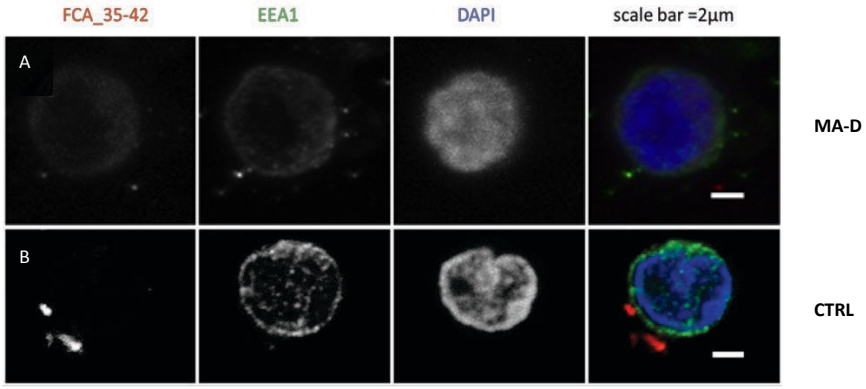


Figure annexe 3b : Marquage de l'A-béta, dans les PBMC. La planche d'images montre une cellule d'un patient MA-D (A) et d'un contrôle (B) marquées pour l'A-béta avec un anticorps spécifique des formes clivées (FCA_35-42), un anticorps polyclonal anti-EEA1 (endosomes) et un marqueur chimique du noyau (DAPI). L'image en couleur (à droite de chaque série) est la superposition des trois canaux. Le marquage A-beta montre quelques objets extra cellulaires qui sont peut-être des débris de plaquettes.

Modifications of the endosomal compartment in peripheral blood mononuclear cells from biologically defined Alzheimer's disease patients.

Fabian Corlier[1], Isabelle Rivals[2], Julien Lagarde[3] (MD), Lorraine Hamelin[3] (MD), Helene Corne[3], Luce Dauphinot[1], Kunie Ando[1], Gaëlle Fontaine[1], Guillaume Dorothée[4], Bruno Dubois[5] (MD, PhD), Michel Bottlaender[6] (MD, PhD), Charles Duyckaerts[1,7] (MD, PhD), Marie Sarazin[3*] (MD, PhD), Marie-Claude Potier[1*] and the clinical ImaBio3 team.

1 Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06 UMR S 1127, and Inserm, U 1127, and CNRS UMR 7225, and ICM, 75013 Paris, France
2 Équipe de Statistique Appliquée, ESPCI ParisTech, PSL Research University, INSERM UMRS 1158, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France
3 Neurologie de la Mémoire et du Langage, Service de Neurologie, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, INSERM UMR S894, Centre Hospitalier Sainte Anne, 75014 Paris, France.
4 Inserm UMRS938, Laboratoire Système Immunitaire et Maladies Conformationnelles, Hôpital Saint-Antoine, F-75012 Paris, France; and Université Pierre et Marie Curie, Université Paris 6, Centre de Recherche Saint-Antoine, Hôpital Saint-Antoine, 75012 Paris, France
5 Institut de la mémoire et de la maladie d'Alzheimer, IMMA, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, AP-HP, 75013 Paris, France
6 CEA (MB), DSV, Institut d'Imagerie Biomédicale, Service Hospitalier Frédéric Joliot, Orsay
7Laboratoire de Neuropathologie Escourolle, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, AP-HP, 75013 Paris, France

Clinical ImaBio3 team : Dr Amer Alnajjar-Carpentier, Consultation mémoire, Hôpital d'Orsay, Orsay ; Dr Michel Logak, service de Neurologie, Hôpital Saint Joseph, Paris ; Dr Sara Leder and Dr Dominique Marchal, Consultation mémoire, Institut des Invalides, Paris ; Dr Hélène Pitti-Ferandi, consultation mémoire, Clinique de la Porte Verte, Versailles ; Dr Hélene Brugeilles, service de neurologie, Hôpital Mignot, Versailles ; Dr Brigitte Roualdes, service de neurologie, Hopital Henri Mondor, Versailles ; Dr Agnes Michon, consultation mémoire, Hôpital de la Salpêtrière, Paris.

* Authors equally contributed

Abbreviated title: Enlarged endosomes in blood cells in Alzheimer's disease.

Send correspondence to :

Dr. Marie-Claude Potier

Group of Alzheimer's and Prion's diseases

ICM Research Centre

CNRS UMR7225, INSERM URM975, UPMC

Hôpital de la Pitié-Salpêtrière

47 Bd de l'Hôpital

75013 Paris

Tel: +33157274519

E-mail: marie-claude.potier@upmc.fr

Abstract : 181 words (max 200)

Identification of blood-based biomarkers of Alzheimer's disease (AD) remains a challenge. Neuropathological studies have identified enlarged endosomes in *post-mortem* brains as the earliest cellular change associated to AD. Here the presence of enlarged endosomes was investigated in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 48 AD patients (25 with Mild Cognitive Impairment (AD-MCI) and 23 with dementia (AD-D)), and 23 age-matched healthy controls using immunocytochemistry and confocal microscopy.

The volume and number of endosomes were not significantly different between AD and controls. However the percentage of cells containing enlarged endosomes was significantly higher in the AD-D group as compared to controls. Furthermore, endosomal volumes significantly correlated to [C^{11}]PiB cortical index measured by positron emission tomography (PET) in the AD group, independently of the *APOE* genotype, but not to the levels of amyloid-beta, tau and phosphorylated tau measured in the cerebrospinal fluid.

This study is the first to our knowledge to report morphological alterations of the endosomal compartment in PBMCs from AD patients reflecting possible changes in blood-based biomarkers that will need to be evaluated as prognostic or diagnostic biomarkers.

Introduction

An estimated 24 million people worldwide suffer from dementia, and this number, predicted to double every 20 years, will rise to more than 65 million in 2030 and more than 115 million in 2050 [1]. Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia. New proposals for the diagnosis of AD combine clinical tools and biological markers such as cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers and amyloid positron emission tomography (PET) imaging for identifying the underlying AD pathophysiological process. This approach allows establishing a clinical diagnosis of AD at the stage of Mild Cognitive Impairment (MCI), before dementia, but needs invasive and expansive tools [2].

Autopsy still remains the only fully reliable diagnosis. AD is neuropathologically characterized by extracellular amyloid plaques composed of β amyloid peptides (Aβ) and intracellular neurofibrillary tangles constituted of hyperphosphorylated tau protein [3]. Whereas the degree of tauopathy correlates strongly with cognitive decline in AD, the aggregation of Aβ plays a critical role as early trigger, and recent longitudinal PET imaging studies indicated that cerebral Aβ deposition precedes the clinical symptoms of AD by a decade or more [4,5].

One of the main challenges associated with the diagnosis of AD is the identification and validation of blood-based biomarkers. Among different tracks, neuropathological and clinical data suggested the presence of enlarged endosomes as a candidate cellular biomarker in the blood.

Indeed dysregulation of the endolysosomal compartment has been found in the brain of AD patients [6,7]. Neurons bearing enlarged endosomes were identified as the earliest morphological change observed in *post-mortem* brains from patients with sporadic AD before the onset of clinical symptoms [8,9]. While familial AD cases with mutations in the amyloid precursor protein (APP) gene harboured the same endosomal phenotype, cases with mutations in the presenilin genes did not [10]. Enlarged endosomes were also observed in individuals with Down syndrome (DS) who are at high risk for AD (45% of DS people have AD at 60 years against about 3% in the general population) [11]. In DS, enlarged endosomes have been identified not only in neuronal cells but also

in peripheral cells such as peripheral blood mononuclear cells (PBMC), lymphoblastoids and fibroblasts [12,13].

AD genome wide association studies suggest a crucial role of several proteins involved in membrane trafficking such as PICALM, SORL1, BIN1 [14]. In addition several endolysosomal proteins such as EEA1, Rab3, Rab7, LAMP1 and LAMP2 were found increased in the CSF of AD patients [15]. These data suggest that endosomal dysmorphologies could be associated with amyloid pathology in AD and could thus be detected in blood cells from AD patients at an early stage of the disease.

In this study, we analysed for the first time to our knowledge the endosomal compartment of PMBCs from 48 biologically confirmed AD patients (25 with Mild Cognitive Impairment, AD-MCI, and 23 at the dementia stage, AD-D), and 23 cognitively normal controls, with no evidence of preclinical AD (negative for the amyloid imaging). We hypothesised that the endosomes in cells from AD would be different from controls, even at the MCI stage.

Results

Population demographics

Morphometric analyses of early endosomes (number and volume) were obtained from 48 patients with AD (23 AD and 25 MCI-AD) and 23 healthy controls at inclusion (Table 1).

There were no significant differences in sex and age across the three AD-MCI, AD-D and control groups. As expected, there were significant differences across the diagnostic groups (MCI-AD and AD) for *APOE* ε4 status, amyloid burden and cognitive deficits (Mini Mental State Examination, MMSE and Cinical Dementia Rating, CDR) with AD and MCI-AD groups having more *APOE* ε4 carriers and poorer performance on cognitive assessments as compared to healthy controls. Individual data are presented as Supplemental Material (Supplementary Table).

Analysis of the mean endosome volume (MEV) and number (MEN) per cell:

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from all patients with AD-D, AD-MCI and healthy controls were purified from fresh blood, fixed and their early endosomes stained by immunocytochemistry using an antibody against early endosome antigen 1 (EEA1). Z-stack images of about 20 cells for each individual were obtained under the confocal microscope. Fig. 1 A-C show representative images obtained from PBMCs of control, AD-MCI and AD-D individuals. Videos of 3D reconstructed images are available as Supplemental Material (Supplementary videos 1-3).

Endosomes present in the whole cell volume were detected with the spot detector plugin of ICY software [16]. Volumes of individual endosomes were measured as voxels. A total of 459, 497 and 455 cells were analysed in the healthy control, AD-MCI and AD-D groups respectively. For each individual, mean endosome number (MEN) and mean endosome volume (MEV) per cell were calculated. Fig. 2 shows boxplots of individual values for the healthy controls, AD-MCI and AD-D cases. Individual data are presented as Supplemental Material (Supplementary Table).

According to ANOVA, MEN and MEV were not significantly different either between AD-MCI, AD-D and control groups (p_{group}=0.63 for MEN and 0.61 for

MEV), or between AD group (AD-MCI and AD-D) and controls. The MENs per cell were 22.47 for the controls, 20.12 for the AD-MCI and 21.92 for the AD-D. The MEVs per cell were 214.90, 214.81 and 233.83 voxels corresponding to 0.286 and 0.311 μm^3 in the control/AD-MCI and AD-D groups respectively.

Analysis of the endosome size distribution

We then categorized the 459, 497 and 455 cells from the healthy control, AD-MCI and AD-D groups respectively in three classes according to their mean endosomal volume. Small, medium and large were defined as classes containing endosomes with mean volume below the median (<0.256 μm^3; small), between the ninth decile and the median (0.256 to 0.412 μm^3; medium) and above the ninth decile (>0.412 μm^3; large) in the control group. Fig. 3A shows the percentage of cells with MEV of the three classes for the three groups. A significantly higher percentage of cells with larger MEV was found in the AD groups (MCI and D) as compared to controls (Bonferroni corrected $p=6.4\ 10^{-3}$ of χ^2 test). However the percentage of cells containing enlarged endosomes was significantly higher in the AD-D group as compared to controls. We confirmed the stability of these size distributions by drawing 1000 bootstrap samples at the individual level: the percentage of cells with large MEV was significantly higher in the AD groups as compared to control individuals (Bonferroni corrected $p < 0.05$) in 98% of the bootstrap samples. Means and standard deviations on the bootstrap samples are shown on Fig. 3B. These data suggest that the size distribution of endosome was distinct between healthy controls and AD groups.

Correlation between the mean endosomal volume per cell and the cortical amyloid burden assessed by [C^{11}]PiB **PET**

We then wondered what could cause the increase in the percentage of cells with bigger endosomes in the AD-MCI and AD-D cases. Since Aβ levels and *APOE* ε4 status have been shown to be associated with the increase in the size of early endosomes observed in neurons from AD patients [9], we analysed the potential correlation between amyloid burden and mean endosome volumes in the AD groups.

Pearson's correlations were used to test the level of overlap between endosomal volume and global amyloid burden measured by [C^{11}]PiB retention. We found a significant positive correlation between MEV and global amyloid burden in AD-MCI and AD-D patients ($p=0.014$ after adjustment for age and *APOE* ε4; Fig. 4). A similar correlation was found with amyloid load in the precuneus ($p=0.022$ after adjustment for age and *APOE* ε4).

However we could not find any correlation between the MEV and other parameters such as the levels of Aβ, tau or P-tau in the cerebrospinal fluid (CSF), or any indicators of cognitive deficit (data not shown).

Discussion

Previous studies which aimed at identifying blood-based biomarkers in AD were based on large longitudinal studies using top down approach [17]. Here we used a different approach based on a very well defined population of AD patients. We applied strict inclusion criteria based on both positive clinical/cognitive and pathophysiological markers (CSF biomarkers and [C^{11}]PiB -PET). More importantly, healthy controls had negative cortical [C^{11}]PiB retention, thus excluding presymptomatic AD. We focused our research on the analysis of the endosomal compartment, a putative cellular biomarker expected to be less sensitive to serum components.

Across the three very well-defined groups (AD-MCI, AD-D and controls), we found a significant increase in the percentage of cells containing enlarged endosomes in AD patients as compared to controls, even at an early stage of the disease (AD-MCI).

Enlarged endosomes have been previously identified in neuronal cells of AD-D, AD-MCI and DS patients as well as in peripheral cells from individuals with DS [9,12]. Changes of the endosomal compartment observed here in PBMCs were significantly correlated in the AD diagnostic groups with amyloid burden assessed by PET using [C^{11}]PiB retention. Notably this correlation was still valid after conditioning with age and *APOE* ε4 status. It thus appears that factors other than *APOE* ε4 allele and age likely contribute to the change observed in the morphology of early endosomes.

Aβ has been linked to endosomal dysfunctions in AD and DS. Indeed enlarged endosomes in *post-mortem* brains of AD and DS patients contain Aβ [9]. However enlarged endosomes are present in DS brains before Aβ can be detected and conversely enlarged endosomes are absent in familial AD brains with mutations in presenilin1 where Aβ is overproduced [9]. In DS fibroblasts APP C-terminal fragment rather than Aβ appeared to be related to endosomal dysfunction [18].

In PBMC from AD patients (MCI and D), we found that enlarged endosomes are more strongly correlated to amyloid burden when we stratified *APOE* ε4 carriers (data not shown). But since the correlation in AD-D and AD-MCI was still valid

after conditioning with *APOE* genotype, the *APOE* genotype could participate nonexclusively in the formation of enlarged endosomes in peripheral cells.
The levels of plasma *APOE* may be important for the endososomal function since *APOE* ε4 carriers have lower levels of plasma APOE4 protein that could predispose them to AD [19]. However *APOE* genotype does not influence the metabolism of plasma Aβ peptides in young persons without memory deficits. [20]. In addition, *APOE* ε4- but not ε4+ AD participants showed positive relationships between plasma Aβ1-40/Aβ1-42 and PiB uptake [21].

Macrophages are able to cross the blood brain barrier (BBB) and phagocytize cerebral Aβ while Aβ –engorged macrophages are adherent and cannot cross the BBB back into the blood [22]. We were unable to detect Aβ in PBMCs using immunocytochemistry (data not shown). Thus the role of peripheral Aβ in enlarged endosomes found in PBMC remains unclear.

PBMCs are blood cells with a round nucleus including 70-90% lymphocytes (T cells, B cells, and NK cells), 10-30% monocytes, and few percentage of macrophages and dendritic cells. The higher percentage of PBMCs containing enlarged endosomes observed in AD and MCI-AD compared to healthy controls could be the result of either a change of the endosomal compartment in a subpopulation of cells or a change in a small percentage of all cell types. Additional experiments of co-labelling of large endosome bearing cells with selective markers, or cell sorting using a panel of antibodies including anti-EEA1 will be necessary to confirm one of these hypotheses.

Inflammation could also be involved in endocytosis and the morphological changes of endosomes. Since inflammation is a hallmark of AD and the neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) was shown to be elevated in AD, it will be interesting to test the correlation between endosomal volume and the NLR [23].

We showed previously that higher cholesterol levels at the plasma membrane of cultured cells and neurons induced enlargement of early endosomes and subsequent increase of Aβ [24-26]. It is also well admitted that cholesterol levels

are increased in AD brains notably in membranes as well as in amyloid plaques [27-29]. Since neutral lipids have been found to be increased in a very high percentage of PBMC in AD (85% compared to 7% in controls), and cholesterol related genes are also differentially expressed in PBMC, it remains possible that cholesterol homeostasis could be involved in endosome changes observed in PBMC in AD patients [30,31].

Nevertheless it will be interesting to know whether some of the endo-lysosomal proteins that have been shown to be increased in the CSF of AD patients, including EEA1, are also changed in PBMC or plasma [15].

In conclusion, in this study we found morphological alterations of the endosomal compartment in blood cells (PBMCs) from sporadic biologically confirmed AD patients that may reflect amyloid pathology in the brain and could thus be a new blood-based biomarker. Future studies will determine whether changes in the endosomal compartment can be detected in peripheral cells other than PBMCs and if endosomal biomarkers, either cellular or plasmatic, can be identified.

Materials/Subjects and methods

Subjects

Seventy one subjects were enrolled in the ImaBio3 study (PHRC-0053-N 2010).

Forty eight AD patients with biologically confirmed AD were included according to the following criteria: (1) predominant and progressive episodic memory impairment, characterized by low free recall not normalized with cueing (free recall > 19/48 and total recall < 41/48 in the Free and Cued Selective Reminding Test, FCSRT), associated or not with other cognitive; (2) biological evidence of AD pathophysiological process as defined by cerebrospinal fluid (CSF)-AD biomarker profile and/or significant amyloid retention on positron emission tomography (PET) with [C11]- labeled Pittsburgh Compound B ([C11]PiB). A CSF AD" biomarker profile was defined as score below 0.8 for the ratio of Aβ 42/tau, calculated with the formula Aβ 42/[240 + (1.18 x T-tau)] [32] . Significant fixation of [C11]PiB on PET was defined by a global cortical index higher than 1.4 [33] . We excluded subjects who had clinical or neuroimaging evidence of focal lesions, severe cortical or subcortical vascular lesions on MRI, and severe depression.

We classed AD patients according to their CDR score in two groups: 25 patients had a score of 0.5 and constituted the AD-MCI group and 23 patients had a CDR score > 0.5 and constituted the AD-dementia group (AD-D).

Twenty-three healthy elderly control subjects were selected according to the following criteria: 1) MMSE ≥27 and normal neuropsychological testing; 2) no history of psychiatric or neurologic conditions, 3) no evidence of focal lesion or severe cortical or subcortical vascular lesions on MRI.

To improve diagnostic accuracy, all subjects had at least one 12 month follow-up to validate the AD diagnosis according to their clinical evolution, or the absence of cognitive decline for controls.

The study was approved by the Ethics Committee of Pitié-Salpêtrière Hospital. All the subjects provided written informed consent before participating.

Cerebrospinal fluid biomarker analysis

CSF samples obtained by lumbar puncture were processed with the same procedures described previously [34] to obtain CSF levels of total tau (T-tau), phosphorylated tau at threonine 181 (P-Tau) and amyloid-β peptide 1-42 (amyloid-β_{42}) by using enzyme-linked immunosorbent assay kits (Innogenetics), according to the manufacturer's instructions. All operators were blind to clinical information. CSF biomarkers were available for 36/48 AD patients, among whom 20/25 AD-MCI. Controls did not have lumbar punction for ethical reasons.

[C^{11}]PiB PET Imaging Procedures

Positron emission tomography imaging with [C^{11}]PiB was performed in 19 control subjects and in 41/48 AD patients, among whom 23/25 AD-MCI. The method was the same as previously described [33]. In summary, a global cortical index was defined by the mean standard uptake value ratio (with the cerebellum as the reference region) of the following cortical regions: 1) frontal cortex, by grouping the orbitofrontal, polar prefrontal, and dorsolateral cortex; 2) anterior cingulate; 3) medial cingulate; 4) posterior cingulate; 5) precuneus; 6) occipital cortex, by grouping the calcarine cortex, occipital cortex, and cuneus; 7) temporal cortex, by grouping the anterior and lateral temporal cortex; 8) hippocampus; and 9) parietal cortex, by grouping the inferior and superior parietal cortex and the parietotemporal junction.

Measures of enlarged endosomes

PBMC isolation from blood samples

For each participant, 10ml blood was collected in heparin coated tubes (Vacutainer®, Beckton-Dickinson). Blood samples were diluted in one volume of Phosphate Buffered Saline (PBS) and PBMCs isolated by centrifugation on a 1,077g/mL ficoll gradient (15mL prefilled filtered Leucosep PANCOLL tubes, PAN™ biotech GmbH) following the manufacturer's instructions. After centrifugation, PBMCs were re-suspended in 200µL of reduced serum culture medium (Gibco™ OPTI-MEM®) and incubated at 37°C, 5% CO_2 for 1h, then rinsed and fixed for 12min in 4 % cold paraformaldehyde (PFA) and rinsed in 10mL PBS.

Immunocytochemistry

PFA-fixed PBMCs were incubated with 2% normal goat serum (NGS) for 20min and permeabilized 20 min in Triton 0.1% X-100. For staining of Early-Endosome-Associated-Protein-1 (EEA1), cells were resuspended in 1:100 solution of Polyclonal antibody (Cell signalling, Rabbit-anti-Human #2411) in 2% NGS at 5°C overnight. Cells were rinsed in PBS twice and incubated with 1:500 Alexa-488®-conjugated Goat-anti-Rabbit antibody (A-11034, Invitrogen) in 2% NGS, for 2h at room temperature. Slides were mounted by mixing 10µL of re-suspended cells in 10µL mounting medium (SouthernBiotech, fluoromount-G®) and sealed after one night air-drying at room temperature.

Confocal imaging

Immunofluorescent labelling was observed under an upright confocal microscope (Olympus Fluoview Fv1000) using a 63x (NA 1.40) apochromatic objective. All images were made using the same magnification (Voxel size: XY =0.073 µm, Z= 0.25µm). Approximately twenty cells per subject were chosen randomly on the slides and scanned individually by defining the upper and lower position of the scanning device and by fixing the space between slides to 250nm (the actual depth of field of the objective) in order to sample the whole cell volume for subsequent 3D-image treatment.

Image analysis of the endosomes

The 3D-reconstructed images were analysed applying a wavelet-based detection method [35] implemented as a plugin *Spot detector* in Icy software [16] (http://icy.bioimageanalysis. org). The size was expressed as the number of voxels in the detection, and when needed, converted in cubic micrometers (μm^3) according to voxel size. Staining and image analysis were performed blindly to guarantee anonymous and unbiased interventions at all levels of sample processing.

Automated data processing

Data extraction and analysis of over 1000 individual files was automatized using MATLAB™ Version 8.3.0.73043 (R2014a). The function selects relevant data in the single result files provided by ICY software, and implements a concatenated database of all subjects by classifying them automatically with respect to clinical information file, relating every single detected endosome to the cell, as well as to the individual and his clinical information.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed with MATLAB's Statistics Toolbox Version 9.0 (R2014a Prerelease).

Comparison of the endosome number and mean volume per cell

The endosome numbers and mean volumes per cell of the three groups, i.e. the control group (23 patients, 459 cells), the MCI-AD group (25 patients, 497 cells) and the AD group (23 patients, 455 cells) were compared with an analysis of variance (ANOVA) with a fixed group effect and a random individual effect. In order to normalize the distributions and to homogenize their variances, the ANOVA was performed on the logarithm of the mean numbers and volumes.

Comparison of the mean endosome volume distribution between groups

To compare the distributions of the endosome volumes per cell in the three groups, we classified the mean volumes in three categories, small, medium and large. We chose the median and 9^{th} decile of the control group volumes as the limits of the size categories. The distributions of the mean endosome volumes per cell in the three size categories of the three groups were then compared with a χ^2 test. Further χ^2 tests were used to perform the three two-by-two comparisons between groups, i.e. controls/AD, controls/MCI-AD, and MCI-AD/AD; the p-values of the latter were adjusted for multiple testing using the Bonferroni correction.

Since the ANOVA had shown a significant individual effect on the mean endosome volume per cell, we used bootstrap sampling at the individual level (1000 samples were randomly drawn) to assess the stability of the distributions across the size categories and of the significance of the difference between the distributions in the control and AD groups.

Correlation of the mean endosome volume with the clinical data

Pearson's correlation was computed between the mean endosome volume of the patients (MCI-AD and AD) and their amyloid load measured by PiB retention. A generalized linear model was used to adjust for age and APOEε4.

Acknowledgements:

This study was supported by a grant from the French Ministry of Health (PHRC-0054-N 2013) and Institut Roche de Recherche et Médecine Translationnelle.

The research leading to these results has received funding from the program"Investissements d'avenir" ANR-10-IAIHU-06. Analysis by confocal microscopy was performed at the cellular imaging platform of Pitié-Salpêtrière.

We are thankful to Christian Czech and Tania Nikolcheva, representing Roche LA, for reviewing this work. We are greatly indebted to the chemical/radiopharmaceutical and nursing staff of Service Hospitalier Frédéric Joliot for the synthesis of the [C^{11}]PiB and patient management and gratefully acknowledge the team of CENIR (Centre de Neuroimagerie de Recherche) from the Salpêtrière Hospital for patients management during MRI acquisition. We also thank the CATI (Centre d'Acquisition et de Traitement d'Images), a French national platform supported by the Alzheimer's Foundation.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FC BD CD MS MCP. MS is the main investigator of ImaBio3 study. Performed the experiments: FC JL LH HC LD KA GF GD MB. Analyzed the data: FC IR CD MCP. Wrote the paper: FC KA CD MS MCP.

Figure legends:

Figure 1: Endosomal abnormalities are present in peripheral mononuclear blood cells (PBMCs) from individuals with AD-MCI and AD-D. (A-C) Immunofluorescence confocal images showing EEA1-labelled early endosomes in representative PBMCs from cognitively healthy subjects (A), AD-MCI (B) and AD-D cases (C). Scale bar 2 µm.

Figure 2: Mean endosome numbers (MEN) (A) and mean endosome volumes (MEV) (B) per PBMC are not significantly different between AD-D (455 cells), AD-MCI (497 cells) and controls (459 cells). p_{group}=0.63 for MEN and 0.61 for MEV according to ANOVA.

Figure 3: The percentage of cells containing enlarged endosomes is significantly higher in AD than in control individuals.
Classification of cells in 3 subclasses according to their MEV (small/medium-sized/large) (A) percentages of the available populations of cells, and (B) mean percentages and standard deviations on 1000 bootstrap samples drawn at the individual level.

Figure 4: Correlation between mean endosomal volume in AD-D and AD-MCI patients and their PiB retention, p=0.022 after adjusting for age and *APOE* ε4.

Table 1: Demographic and clinical data of studied groups.

Supplemental Material

Supplementary Video 1: Video of 3D reconstructed images of immunolabelled early endosomes (in green) in a PBMC from a Control subject.

Supplementary Video 2: Video of 3D reconstructed images of immunolabelled early endosomes (in green) in a PBMC from an AD-MCI subject.

Supplementary Video 3: Video of 3D reconstructed images of immunolabelled early endosomes (in green) in a PBMC from an AD-D subject.

Supplementary Table: Individual values of clinical parameters and endosomal volumes and numbers of the Controls, AD-MCI and AD-D subjects.

References:

1. Corbett A, Pickett J, Burns A, Corcoran J, Dunnett SB, et al. (2012) Drug repositioning for Alzheimer's disease. Nat Rev Drug Discov 11: 833-846.
2. Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, et al. (2011) The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement 7: 270-279.
3. Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC (2009) Classification and basic pathology of Alzheimer disease. Acta Neuropathol 118: 5-36.
4. Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TL, Fagan AM, Goate A, et al. (2012) Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. N Engl J Med 367: 795-804.
5. Jucker M, Walker LC (2011) Pathogenic protein seeding in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. Ann Neurol 70: 532-540.
6. Cataldo AM, Barnett JL, Berman SA, Li J, Quarless S, et al. (1995) Gene expression and cellular content of cathepsin D in Alzheimer's disease brain: evidence for early up-regulation of the endosomal-lysosomal system. Neuron 14: 671-680.
7. Cataldo AM, Barnett JL, Pieroni C, Nixon RA (1997) Increased neuronal endocytosis and protease delivery to early endosomes in sporadic Alzheimer's disease: neuropathologic evidence for a mechanism of increased beta-amyloidogenesis. J Neurosci 17: 6142-6151.
8. Cataldo AM, Petanceska S, Terio NB, Peterhoff CM, Durham R, et al. (2004) Abeta localization in abnormal endosomes: association with earliest Abeta elevations in AD and Down syndrome. Neurobiol Aging 25: 1263-1272.
9. Cataldo AM, Peterhoff CM, Troncoso JC, Gomez-Isla T, Hyman BT, et al. (2000) Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. Am J Pathol 157: 277-286.
10. Cataldo A, Rebeck GW, Ghetri B, Hulette C, Lippa C, et al. (2001) Endocytic disturbances distinguish among subtypes of Alzheimer's disease and related disorders. Ann Neurol 50: 661-665.
11. Coppus AM, Schuur M, Vergeer J, Janssens AC, Oostra BA, et al. (2012) Plasma beta amyloid and the risk of Alzheimer's disease in Down syndrome. Neurobiol Aging 33: 1988-1994.
12. Cataldo AM, Mathews PM, Boiteau AB, Hassinger LC, Peterhoff CM, et al. (2008) Down syndrome fibroblast model of Alzheimer-related endosome pathology: accelerated endocytosis promotes late endocytic defects. Am J Pathol 173: 370-384.
13. Cossec JC, Lavaur J, Berman DE, Rivals I, Hoischen A, et al. (2012) Trisomy for Synaptojanin1 in Down syndrome is functionally linked to the enlargement of early endosomes. Hum Mol Genet.
14. Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, et al. (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. Nat Genet 41: 1094-1099.

15. Armstrong A, Mattsson N, Appelqvist H, Janefjord C, Sandin L, et al. (2014) Lysosomal network proteins as potential novel CSF biomarkers for Alzheimer's disease. Neuromolecular Med 16: 150-160.
16. de Chaumont F, Dallongeville S, Chenouard N, Herve N, Pop S, et al. (2012) Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. Nat Methods 9: 690-696.
17. Snyder HM, Carrillo MC, Grodstein F, Henriksen K, Jeromin A, et al. (2014) Developing novel blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement 10: 109-114.
18. Jiang Y, Mullaney KA, Peterhoff CM, Che S, Schmidt SD, et al. (2009) Alzheimer's-related endosome dysfunction in Down syndrome is A{beta}-independent but requires APP and is reversed by BACE-1 inhibition. Proc Natl Acad Sci U S A.
19. Martinez-Morillo E, Hansson O, Atagi Y, Bu G, Minthon L, et al. (2014) Total apolipoprotein E levels and specific isoform composition in cerebrospinal fluid and plasma from Alzheimer's disease patients and controls. Acta Neuropathol 127: 633-643.
20. Zimmermann R, Huber E, Schamber C, Lelental N, Mroczko B, et al. (2014) Plasma concentrations of the amyloid-beta peptides in young volunteers: the influence of the APOE genotype. J Alzheimers Dis 40: 1055-1060.
21. Swaminathan S, Risacher SL, Yoder KK, West JD, Shen L, et al. (2014) Association of plasma and cortical amyloid beta is modulated by APOE epsilon4 status. Alzheimers Dement 10: e9-e18.
22. Zaghi J, Goldenson B, Inayathullah M, Lossinsky AS, Masoumi A, et al. (2009) Alzheimer disease macrophages shuttle amyloid-beta from neurons to vessels, contributing to amyloid angiopathy. Acta Neuropathol 117: 111-124.
23. Rembach A, Watt AD, Wilson WJ, Rainey-Smith S, Ellis KA, et al. (2014) An increased neutrophil-lymphocyte ratio in Alzheimer's disease is a function of age and is weakly correlated with neocortical amyloid accumulation. J Neuroimmunol.
24. Cossec JC, Marquer C, Panchal M, Lazar AN, Duyckaerts C, et al. (2010) Cholesterol changes in Alzheimer's disease: Methods of analysis and impact on the formation of enlarged endosomes. Biochim Biophys Acta.
25. Cossec JC, Simon A, Marquer C, Moldrich RX, Leterrier C, et al. (2010) Clathrin-dependent APP endocytosis and Abeta secretion are highly sensitive to the level of plasma membrane cholesterol. Biochim Biophys Acta 1801: 846-852.
26. Marquer C, Devauges V, Cossec JC, Liot G, Lecart S, et al. (2011) Local cholesterol increase triggers amyloid precursor protein-Bace1 clustering in lipid rafts and rapid endocytosis. FASEB J 25: 1295-1305.
27. Cutler RG, Kelly J, Storie K, Pedersen WA, Tammara A, et al. (2004) Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 2070-2075.
28. Lazar AN, Bich C, Panchal M, Desbenoit N, Petit VW, et al. (2012) Time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS) imaging reveals cholesterol overload in the cerebral cortex of Alzheimer disease patients. Acta Neuropathol 125: 133-144.

29. Panchal M, Loeper J, Cossec JC, Perruchini C, Lazar A, et al. (2010) Enrichment of cholesterol in microdissected Alzheimer's disease senile plaques as assessed by mass spectrometry. J Lipid Res 51: 598-605.
30. Pani A, Mandas A, Diaz G, Abete C, Cocco PL, et al. (2009) Accumulation of neutral lipids in peripheral blood mononuclear cells as a distinctive trait of Alzheimer patients and asymptomatic subjects at risk of disease. BMC Med 7: 66.
31. Mandas A, Abete C, Putzu PF, la Colla P, Dessi S, et al. (2012) Changes in cholesterol metabolism-related gene expression in peripheral blood mononuclear cells from Alzheimer patients. Lipids Health Dis 11: 39.
32. Koric L, Felician O, Ceccaldi M (2011) [Use of CSF biomarkers in the diagnosis of Alzheimer's disease in clinical practice]. Rev Neurol (Paris) 167: 474-484.
33. de Souza LC, Corlier F, Habert MO, Uspenskaya O, Maroy R, et al. (2011) Similar amyloid-beta burden in posterior cortical atrophy and Alzheimer's disease. Brain 134: 2036-2043.
34. de Souza LC, Lamari F, Belliard S, Jardel C, Houillier C, et al. (2011) Cerebrospinal fluid biomarkers in the differential diagnosis of Alzheimer's disease from other cortical dementias. J Neurol Neurosurg Psychiatry 82: 240-246.
35. Olivo-Marin JC (2002) Extraction of spots in biologicalimages using multiscale products. Pattern Recognition 35: 1989-1996.

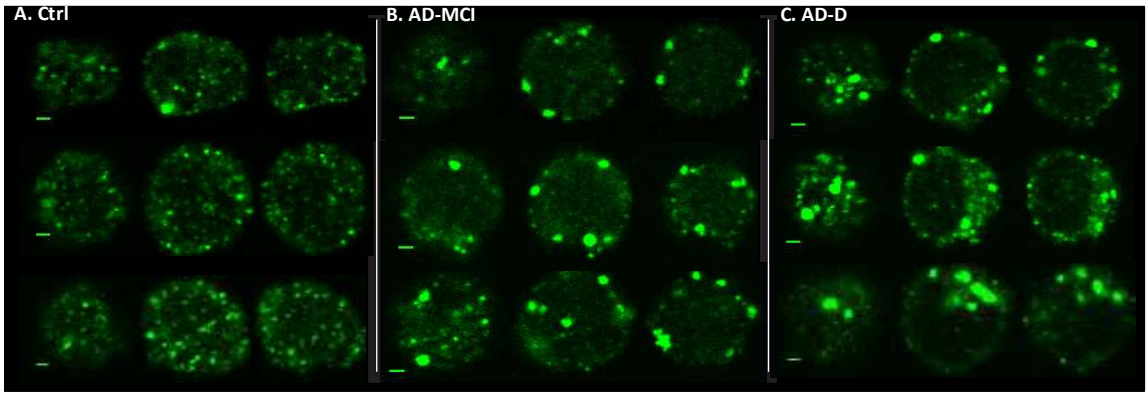


Figure 1

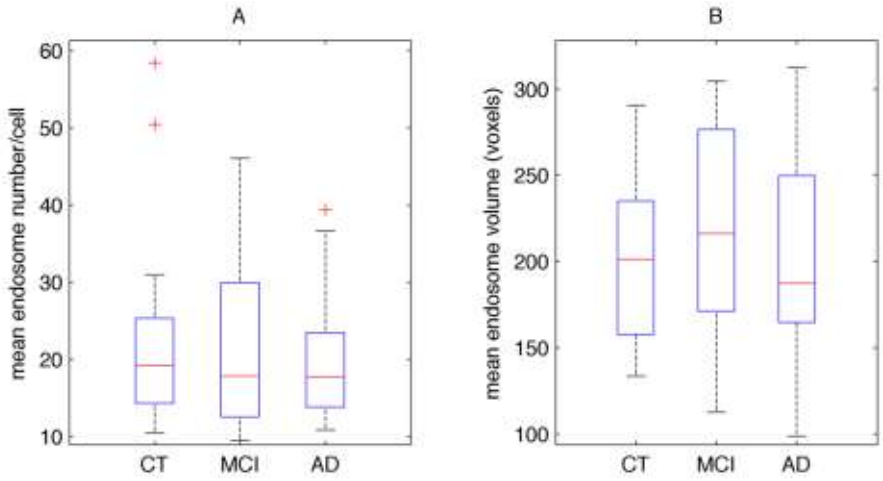

A
B
mean endosome number/cell
mean endosome volume (voxels)
60
50
40
30
20
10
300
250
200
150
100
CT
MCI
AD
CT
MCI
AD

Figure 2

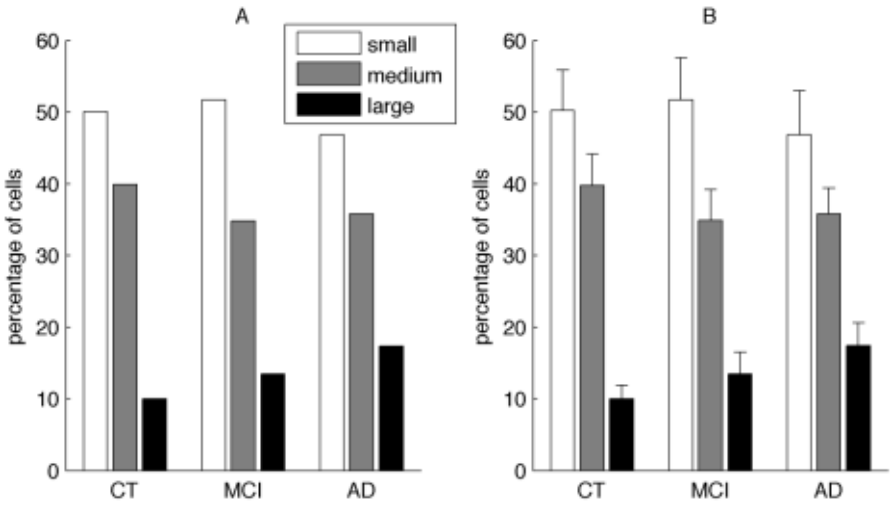

A
B
small
medium
large
percentage of cells
60
50
40
30
20
10
0
CT
MCI
AD

Figure 3

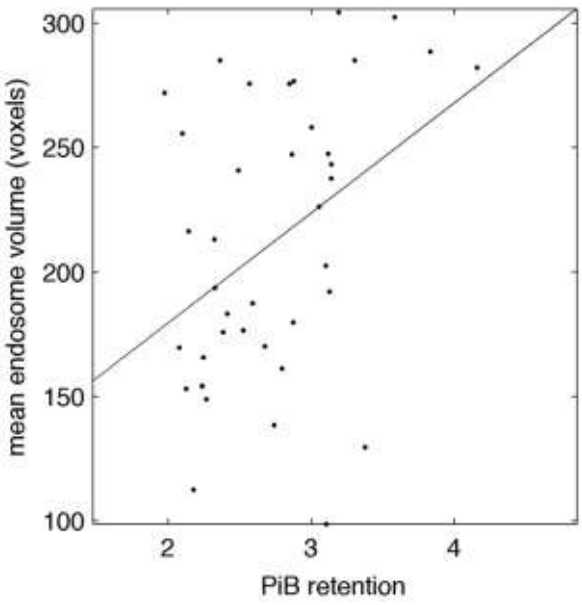

300
250
200
150
100
mean endosome volume (voxels)
2
3
4
PiB retention

Figure 4

	Controls	AD-MCI	AD-D
	N=23	N=25	N=23
sex ratio (F/M)	13/10	14/11	12/11
age	67 ± 10.39 (51 - 86)	67.68 ± 9.7 (52 - 82)	69.43 ±11.6 (51 – 91)
MMSE	29.9 ± 0.92 (27 - 30)	23.7 ±3.19 (18 - 30)	15.43 ±4.9 (4 – 22)
CDR = 0.5	-	25	-
CDR = 1	-	-	23
Genotyped *APOE*	22/24	22/25	23/23
***APOE* ε4/ -**	2/22	9/22	7/23
ε4/ε4	0/22	6/22	5/23
[11]C-PIB PET scan	20/24	23/25	18/23
Lumbar puncture (LP)	-	20/25	16/23
# of analyzed cells	454	460	427

Table 1

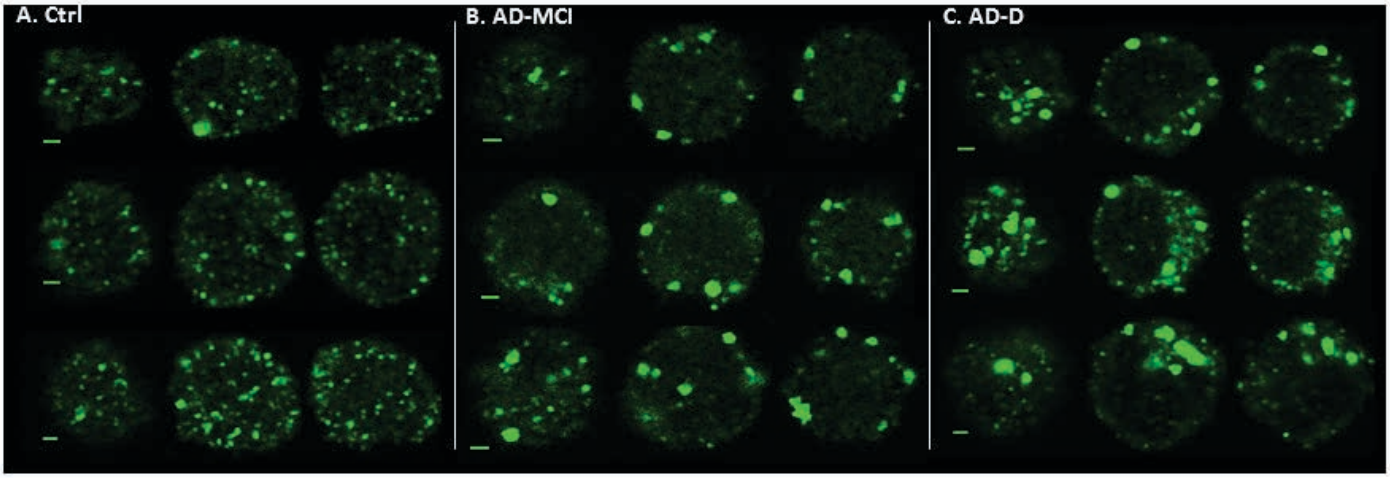
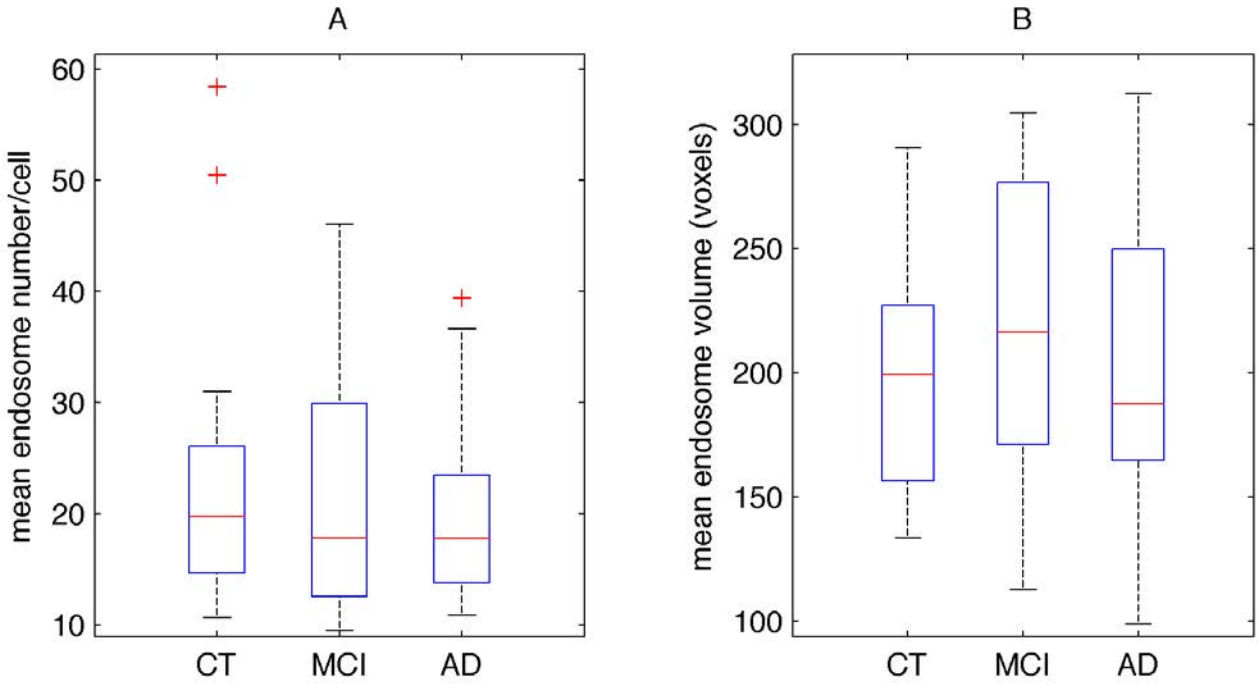
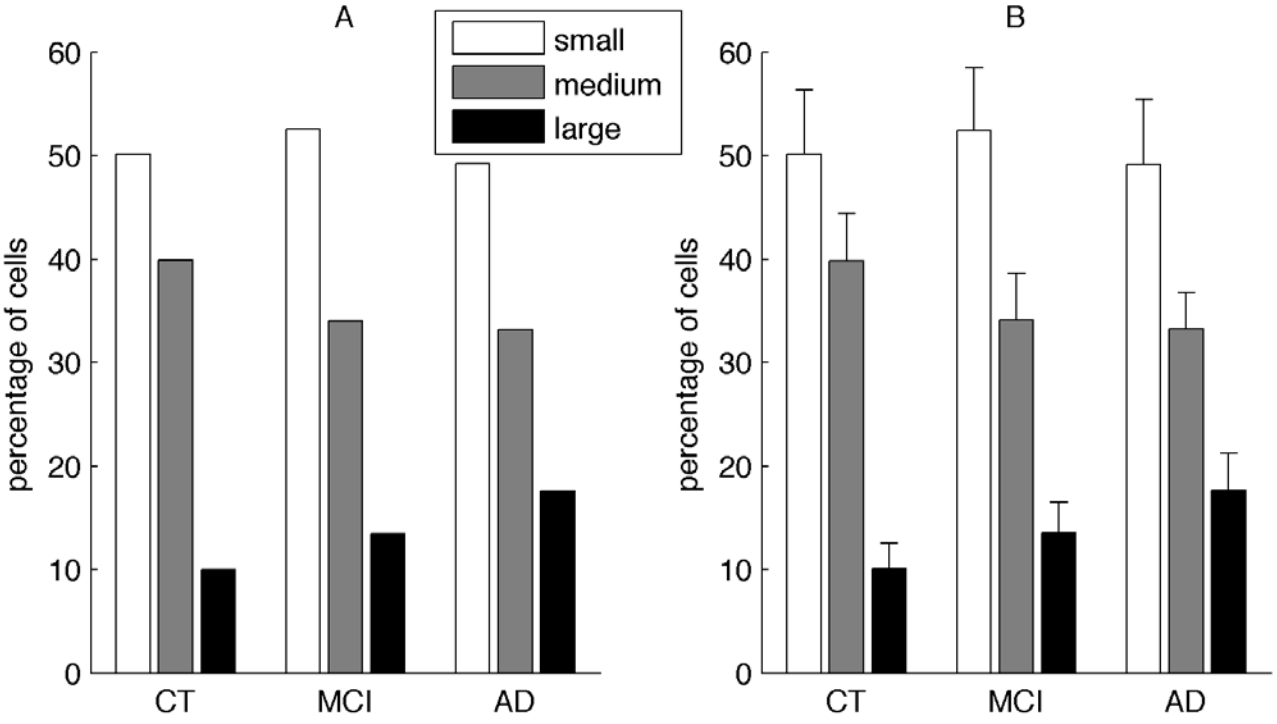
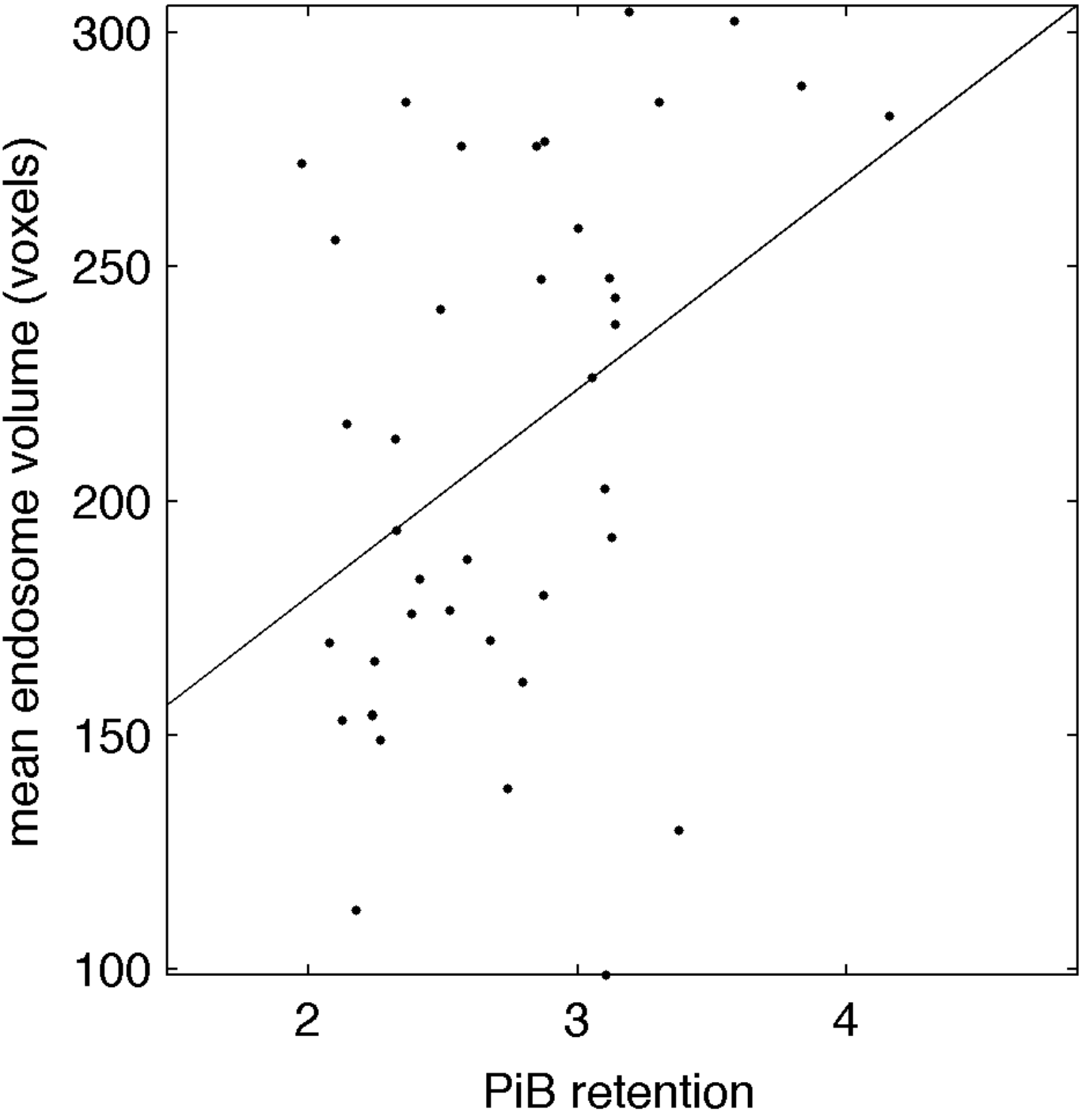


Figure 1


A
mean endosome number/cell
60
50
40
30
20
10
CT
MCI
AD
B
mean endosome volume (voxels)
300
250
200
150
100
CT
MCI
AD


A
small
medium
large
percentage of cells
60
50
40
30
20
10
0
CT
MCI
AD
B
percentage of cells
60
50
40
30
20
10
0
CT
MCI
AD


300
250
200
150
100
mean endosome volume (voxels)
2
3
4
PiB retention