

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier

**IDENTIFICATION D'UN PROFIL DE MARQUEURS PÉRIPHÉRIQUES
LIÉ AUX SCORES COGNITIFS
DANS LE PLASMA ET LES VÉSICULES EXTRACELLULAIRES
DURANT LE DÉVELOPPEMENT DE LA MALADIE D'ALZHEIMER :
ÉVOLUTION DE MARQUEURS LIÉS AU STRESS OXYDATIF
ET AUX MÉCANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES**

Par
Morgane Perrotte

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophiae doctor (Ph.D.) en biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Pr Kessen Patten
INRS-Institut Armand-Frappier,
Laval, Canada.

Examineurs externes

Pr Mélanie Plourde
Université de Sherbrooke, Faculté de
médecine et des sciences de la santé,
Sherbrooke, Canada.

Pr Caroline Ménard
Université de Laval, Faculté de
médecine, Québec, Canada.

Directeur de recherche

Pr Charles Ramassamy
INRS-Institut Armand-Frappier, Laval,
Canada.

À la mémoire de mon oncle, parrain, **Denis Cosson**

Parti trop tôt avec qui j'aurais aimé partager cette thèse.

« Remerciez vos ennemis, ils sont vos plus grands maîtres. Ils vous apprennent à faire face à la souffrance et à développer la patience, la tolérance, la compassion, sans rien attendre en retour. » **Dalai Lama**

« Que ton aliment soit ta seule médecine ! »

Hippocrate

REMERCIEMENTS

Même si le doctorat est un très bel exemple de long développement personnel, il ne peut se réaliser seul. Ainsi, avant de commencer ce manuscrit, je souhaite remercier les personnes qui m'ont épaulé et qui ont contribué de loin ou de près à ce projet.

Mes premiers remerciements vont à mon directeur de recherche, le **Pr Charles Ramassamy**. Merci pour votre accueil lors de mon stage et de m'avoir fait confiance pour ce beau projet. Je vous remercie pour le partage de vos connaissances, pour vos encouragements, votre patience (vos petits coups de pression aussi) et pour le temps que vous m'avez consacré durant ces cinq années. Vos conseils, votre écoute et votre aide m'ont permis de mener à bien ce projet et d'écrire ce manuscrit. Je tiens à vous remercier sincèrement de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis de communiquer mes résultats dans le monde entier (en anglais ce n'était pas gagné !) de Toronto, à Boston en passant par Vienne et jusqu'à Shanghai. Je vous remercie pour ces belles opportunités et d'avoir toujours cru en moi. Vous m'avez permis de développer mes compétences professionnelles mais également permis de murir et de faire grandir ma confiance en soi. Ce doctorat ne m'a pas uniquement apporté des connaissances et des compétences scientifiques, il m'a également permis de me développer sur le plan personnel. Pour tout cela, je vous remercie !

En second lieu je souhaite remercier le **Pr Tamas Fulop**, notre précieux collaborateur sans qui ce projet clinique n'existerait pas. Je remercie également les membres de l'équipe du Pr Tamas Fulop, l'infirmière **Odette Baril** et plus particulièrement **Aurélie Le Page** pour nous avoir aidé et pour avoir répondu à toutes nos questions au cours de ce projet.

Je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté de consacrer du temps à la lecture de mon document de thèse, d'avoir apporté leur expertise respective au service de l'évaluation de mes travaux de recherche. Je remercie tout d'abord le **Pr Kessen Patten** d'avoir accepté la présidence de ce jury. Je remercie également le **Pr Mélanie Plourde** et le **Pr. Caroline Ménard** d'avoir accepté d'y participer en tant qu'évaluateurs externes. Je tiens également à remercier les membres du jury de mes précédents examens pour leurs conseils tout au long de mes travaux de recherche (je pense aux

Pr Eric Rassart, Pr Jonathan Brouillette, Pr Kessen Patten, Pr Abdelouahed Khalil, Pr Danielle Laurin).

Je remercie également le personnel de recherche de l'INRS-Institut Armand Frappier comme **Myriam, Guylaine, Arnaldo et Micheline** et le personnel administratif de l'INRS comme **Josette et Michel Courcelles**.

Ce travail n'aurait pas pu voir le jour sans le soutien financier de nombreux organismes : La **Chaire Louise et André Charron sur la maladie d'Alzheimer**, la **Fondation Armand-Frappier**, le **CRSNG** et les **FQRNT**. Mes remerciements vont également aux organismes subventionnaires (Réseau Québécois de la Recherche sur le Vieillessement, le **RQRV** et l'Institut National des Aliments Fonctionnels, **INAF**) qui ont rendu possible la communication de ce projet lors de congrès internationaux.

Ensuite je souhaite remercier l'ensemble de l'équipe du laboratoire. Malgré nos différences, les hauts et les bas, nous avons toujours su garder une ambiance d'harmonie et de soutien que j'ai fortement apprécié. Mes premières pensées vont au plus anciens, rencontrés durant mon stage et côtoyés au début de mon doctorat. Merci à **Siheem Doggui**, mon ancienne maitre de stage et ma première colocatrice, Merci pour ton amitié, ta complicité, tes conseils, nos fous rires, nos repas et nos partages. Un gros Merci à **Abdenour Belkacemi**, malgré ton départ et la distance tu es toujours resté à l'écoute jusqu'à la fin du doctorat. Merci d'avoir été un véritable confident et ami durant ces cinq années. Merci pour ta maturité, ta sincérité, tes messages (parfois indéchiffrables), ton expérience et ta motivation. Ensuite je vais remercier du fond du cœur **Morgane Lambert** (petit Bouda) avec qui j'ai traversé ce doctorat (la moitié séparée). Tu as toujours su m'épauler, me secouer et surtout me relever quand j'en avais besoin. Je te remercie pour ta sincérité, ton amitié et de m'avoir donné des outils pour le développement personnel et la gestion des émotions. Je souhaite également remercier les moins anciens comme **Vincent Hervé, Mohamed Haddad** (Daïf) avec qui j'ai pu collaborer et avec qui je garderais de bons souvenirs de nos discussions scientifiques et de nos nombreux fous rires. Merci à vous pour avoir maintenu une atmosphère conviviale que ce soit au bureau ou au laboratoire. Je n'oublie pas de remercier également notre post-doc **Jean-Michel Rabanel**. C'était un plaisir d'échanger

avec toi et de recevoir tes conseils professionnels, tes savoirs et ton expérience (le tout accompagné de ton accent chantant du sud-ouest). Je remercie également les petits nouveaux de l'équipe : **Sarra Landri, Mohamed Raâfet Ben Kheder** et **Karolina Frankova**. Enfin, je souhaite remercier les stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer et avec qui j'ai travaillé sur ce projet. Ainsi, mes pensées vont à **Marianne Fournet, Mélanie Le Sayec, Laure Blanluet, Vanessa Gougeon, Camille De Jean, Sophie Duffes, Ophélie Vivier**. Je remercie également les nombreux autres stagiaires que j'ai pu côtoyer au laboratoire (la liste est trop longue, petit clin d'œil à **Estelle Messiet**).

Je tiens également à remercier les autres étudiants du PRF que j'ai pu j'ai pu rencontrer au cours de ce doctorat. Merci à **Etienne, Mathilde, Laura, Anissa, Guillaume, Louise**, ... pour les chalets, les soirées et tous les bons moments passés avec vous.

Mes remerciements vont aussi au comité organisateur du Congrès Armand-Frappier 2017 (**présidente Anissa, Morgane, Mathilde, Vincent, les Sarah(s), Arlette, Louise, Fabien, Guillaume, Aude, Amélie, Isabelle et Lian**). Je garderai de beaux souvenirs et une expérience enrichissante à vos côtés durant ces deux années intenses. Je remercie également les membres du comité socio actif de l'AGEIAF que j'ai pu côtoyer durant un an.

J'ai une énorme pensée à mes amis outre Atlantique qui ont été de véritables moteurs pour mon doctorat malgré les 6000 kilomètres qui nous ont séparés. Merci à mes meilleures amies d'enfance **Mylène** et **Marine**, qui m'ont toujours soutenue et motivée durant ces 5 années. Un gros merci à mes amis fidèles, **Anne-Lyse, Ewen, Lucie** et **Ludovic** pour leur soutien, leurs ondes positives, leur humour et leur écoute. À vous six, je vous remercie d'être restés les mêmes malgré la distance et le temps qui s'est écoulé !

Je remercie également tous les gens rencontrés au Québec (la liste serait trop longue). Merci aux Expat (**Vincent, Fabrice et Ophélie**) pour vos BBQ, vos sorties chalet, vos brunchs et vos repas de Noël. Durant cette fin de thèse et les moments les plus durs je remercie particulièrement **Chris**. Merci pour ton humour, ton agréable compagnie, ta maturité, tes jus alcalinisants et de nous avoir transmis le virus de la Naturopathie et du bien-être spirituel. Mon corps et mon esprit te remercie ! Merci à

Guisela, pour nos brunch, nos chocolats chauds, nos ballades et pour ta précieuse écoute.

Mes derniers remerciements, mais pas des moindres, vont à ma petite famille. Les mots ne sont pas assez forts pour remercier **mes parents**. Ces 5 dernières années n'ont pas été faciles, parsemées d'épreuves de la vie, mais vous êtes toujours restés forts pour me soutenir et me garder motivée. Merci pour vos nombreuses visites et les nombreux souvenirs et fous rires (vous avez été jusqu'à affronter les -42°C Québécois). Malgré la distance, vous avez vécu cette thèse quotidiennement avec moi avec les moments de joie, de doute et de stress. Merci à ma **grand-mère Jeanne** pour ses pensées, son soutien et ses coups de téléphone. Merci à Anne-Laure et mes petits cousins (Jocelyn, Mélanie et Grégoire) pour leurs pensées et leur soutien lors de mes visites en France. Je n'oublie pas non plus de remercier mon oncle **Philippe** et **ma marraine Michèle** pour leur petits mots d'encouragement. Merci à la **famille Lévénéz (Catherine et Jacques)** d'avoir toujours été présents pour soutenir mes parents durant ces cinq longues années, pour votre générosité, vos soirées crêpes et vos petits ravitaillements bretons. Merci à ma belle-famille (Françoise, Gaëtan et Valérie) pour vos pensées positives et vos mots d'encouragement.

Enfin, je souhaite remercier du fond du cœur **Benoît (bib)**. Durant ces cinq longues années tu as été l'épaule sur laquelle j'ai pu me reposer. Je n'ai pas de mots pour te remercier. Mille mercis pour ton soutien nuits et jours, ton amour, ta patience, ta maturité, ta ZEN attitude et ton relativisme. Un gros merci de m'avoir suivi à l'autre bout du monde pour cette longue aventure qui sans toi n'aurait pas été aussi belle♥.

RÉSUMÉ

La maladie d'Alzheimer (MA) représente la première cause de démence qui affectent actuellement 47,5 millions de personnes dans le monde et qui devrait tripler d'ici 2050 en absence de moyens de prévention et de traitements. Malgré plus de 100 ans de recherches et de grandes découvertes, la MA représente un véritable problème de santé mondial. Chaque année ce sont plus de 9,9 millions de nouveaux cas de démence qui sont diagnostiqués dans le monde, soit un nouveau cas tous les 3 secondes.

De nombreux défis sont à relever pour prévenir, ralentir ou traiter la maladie. Les deux principales caractéristiques neuropathologiques de la MA sont les plaques séniles extracellulaires composées du peptide Amyloïde beta ($A\beta$) et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) liées à l'hyperphosphorylation de la protéine Tau au niveau intracellulaire. Celles-ci vont se propager aux différentes régions cérébrales de façon organisée. Des études récentes ont indiqué qu'une des hypothèses pouvant expliquer ce phénomène de propagation neuronale serait l'implication des vésicules extracellulaires (EVs). Dans le cerveau, les EVs libérées par les différents types cellulaires sont importantes dans le maintien neuronal et la communication. Elles permettent également aux cellules d'éliminer et de transmettre leur contenu comme l' $A\beta$ et Tau aux cellules avoisinantes propageant ainsi les lésions toxiques et la mort neuronale. Les plaques $A\beta$ et les DNF représentent les critères du diagnostic dit certain de la MA par une analyse du cerveau en *post-mortem*. Pourtant, le bilan du développement thérapeutique de ces dernières années, ciblant ces deux voies importantes, affiche un taux d'échec frôlant les 100% et souligne la complexité et l'hétérogénéité de la MA.

L'augmentation du taux de réussite des traitements de la MA dépend d'un meilleur développement thérapeutique et de l'identification de biomarqueurs fiables et certains pour diagnostiquer les patients aux stades pré-démenciels et intervenir avant l'apparition d'altérations irréversibles. Comme toutes les maladies chroniques, la MA se développe insidieusement et engendre des dommages irréversibles au système nerveux central (SNC) entraînant une altération neuronale, une perte synaptique et un déclin des

fonctions cognitives globales. La démence est précédée d'un stade asymptomatique (préclinique) et d'une phase de transition avec des troubles cognitifs légers, appelée MCI. Ces stades représentent un espoir pour le diagnostic précoce de la maladie et pour le développement de moyens de prévention et de nouveaux traitements efficaces.

Malgré la mise à jour des critères de diagnostic, la redéfinition de la MA comme un « continuum » débutant par des phases pré dementielles et l'introduction des biomarqueurs, les moyens actuels pour sa détection présentent de nombreuses limites. Le diagnostic probabiliste du vivant des patients de la MA est basé sur une combinaison de tests cliniques incluant des tests cognitifs, l'imagerie cérébrale structurelle et fonctionnelle ainsi que le dosage dans le liquide céphalorachidien des deux protéines responsables des lésions caractéristiques de la MA (A β et Tau). Cependant, l'utilisation des biomarqueurs est restreinte en routine car les techniques sont invasives, coûteuses et leur accès est limité. Ils n'ont leur place que dans certaines situations pour conforter ou infirmer le diagnostic. Par conséquent, il est urgent d'identifier des biomarqueurs périphériques précoces (au stade pré dementiel), peu coûteux, non-invasifs et adaptés à des mesures répétées tout au long de l'évolution de la maladie. À l'heure actuelle, aucun biomarqueur sanguin n'a dépassé le stade de « candidat » dans le diagnostic de la MA. De plus, au vu des nombreux échecs thérapeutiques et de l'hétérogénéité clinique des patients atteints de la MA, il est également essentiel d'élargir notre vision de la pathogenèse au-delà de l'hypothèse de la protéine Tau et de l'A β pour l'identification de nouveaux biomarqueurs potentiels.

Dans ce contexte d'urgence, le projet ci-contre s'est intéressé à l'identification de nouveaux biomarqueurs périphériques potentiels pour la détection du stade MCI et l'évaluation de la progression de la maladie à différents stades. Ce projet est basé sur les échantillons plasmatiques de patients recrutés par l'Institut Universitaire de Gériatrie de Sherbrooke.

Dans un premier temps, l'importance du stress oxydatif dans les différents mécanismes pathogéniques de la MA et son implication précoce, nous a amené à nous intéresser à l'identification d'un profil de biomarqueurs reliés au stress oxydatif dans le plasma de sujets MCI et de patients atteints de la MA à différents stades. Nous avons testé la

relation entre les marqueurs périphériques étudiés et la performance cognitive globale pour mettre en évidence une relation possible entre le stress oxydatif systémique et les altérations cérébrales. Dans un deuxième temps, en se basant sur les études indiquant l'implication des EVs dans le développement de la MA et leur passage à travers la barrière hémato encéphalique, nous avons mis au point une technique pour isoler les vésicules extracellulaires plasmatiques totales (pEVs). Ainsi nous avons pu tester le potentiel du contenu protéique des pEVs comme un nouvel outil dans le diagnostic du *continuum* de la MA. Nous avons évalué la performance de l'A β , de Tau et d'autres protéines d'origine cérébrale renfermés dans les pEVs pour différencier les stades de la MA et leur relation avec les données cliniques comme la performance cognitive globale.

Nos résultats montrent que le profil plasmatique des altérations de l'homéostasie redox diffère en fonction des stades de la MA. Au stade pré démence, le plasma révèle une faiblesse dans sa capacité antioxydante qui engendre l'accumulation de protéines oxydées, de protéines chaperonnes et de protéines réponse au stress au stade de démence. Cette étude démontre pour la première fois qu'en parallèle de l'augmentation des protéines oxydées plasmatiques, l'activité du système de dégradation de celles-ci est affaiblie. En effet, l'activité du protéasome 20S circulant a pour la première fois été investiguée dans le domaine de la MA. Nous avons également pu mettre en évidence une corrélation entre ces phénomènes périphériques et la performance cognitive globale analysée par les tests complémentaires MMSE (mini mental state examination) et MoCA (*Montreal cognitive assessment*). Ces résultats confirment l'implication précoce du stress oxydatif dans la MA et souligne l'importance des désordres systémiques dans la MA et la nécessité d'élargir la vision de la maladie au-delà du compartiment du SNC.

Dans un deuxième temps, nos résultats mettent en évidence pour la première fois la pertinence du dosage du contenu protéique des pEVs totales dans le cas du diagnostic de la MA. Nous montrons que l'utilisation de différents profils de protéines renfermées dans les pEVs permet de distinguer les sujets MCI des participants témoins, les sujets MCI des patients atteints de la MA et de séparer les sujets témoins des patients atteints de la MA. La concentration de l'APP (précurseur de l'A β), le ratio de Tau totale/Tau phosphorylée (T181) ou encore le niveau de la NSE (Neuron-Specific Enolase), de la

Progranulin et du S100B dans les pEVs représentent des biomarqueurs potentiels pour le diagnostic du stade MCI. À l'inverse, le niveau de l'A β 40 et de l'A β 42 dans le pEVs ne sont pas utiles en termes de diagnostic. *In fine*, la standardisation des techniques d'isolation et de normalisation révélera tout le potentiel des pEVs dans le domaine du diagnostic des maladies neurodégénératives.

Pris ensemble, ces travaux montrent la pertinence de l'utilisation des biomarqueurs périphériques associés aux données cliniques pour pallier aux difficultés techniques que représentent les marqueurs centraux dans les maladies du SNC comme la MA. Les biomarqueurs périphériques sont le reflet d'un processus pathologique systémique présent au cours de la maladie. Ces résultats confirment également la nécessité d'utiliser plusieurs combinaisons de biomarqueurs pour différencier les stades de la maladie. À terme différents profils de biomarqueurs pourront distinguer les personnes à risque de développer la MA et les sous-populations de patients atteints de la MA afin de prévenir efficacement le développement de la maladie et de proposer des traitements adaptés à l'hétérogénéité des patients.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia affecting more than 47.5 million people worldwide and this number is projected to triple by 2050 in the absence of new effective treatment or early diagnosis. Despite more than 100 years of research and several discoveries in the field, AD represents a serious public health problem. Every year, more than 9.9 million new cases of dementia are diagnosed in the world, a new case every 3 seconds.

AD is a complex progressive neurodegenerative disorder leading to memory loss and cognitive decline with high clinicopathologic heterogeneity. AD is characterized neuropathologically by synaptic loss and the brain propagation of extracellular amyloid Beta ($A\beta$) aggregates and neurofibrillary tangles. Recent studies reveal that the spread of these pathogenic proteins can occur via extracellular vesicles (EVs).

During the progression of the disease, some alterations occur in the brain like oxidative stress, a deficiency of cellular survival factors, inflammation and a metabolic disorder. Like most chronic diseases, AD begins insidiously and no clear event defines onset of the disease. AD starts as a preclinical stage followed by a prodromal phase called mild cognitive impairment (MCI). This transition offers an important opportunity for possible diagnosis, prevention and therapeutic interventions. However, the current standardized criteria for the diagnosis of MCI and AD including cognitive changes, abnormal cerebrospinal fluid (CSF) levels of pathogenic proteins ($A\beta$, tTau and pTau-T181), and MRI scan and PET bioimaging data, have some limits. Clinicopathologic heterogeneity, high costs of imaging and the invasive nature of CSF collection limit their usefulness for routine clinical testing. Thus, there is a strong necessity to identify non-invasive blood biomarkers easily measurable that could facilitate early and accurate diagnosis, as well as to evaluate the therapeutic efficacy of new treatments. Consequently, all efforts focus on the identification and development of specific biomarkers to detect the disease as early as possible. It is now recognized that only a combination of biomarkers will define a patient-specific signature to diagnose AD in the future. Despite intense research in the field, there is no peripheral biomarker that has got beyond the discovery stage.

Although the brain accumulation of A β and Tau proteins is considered the core pathologic hallmarks for AD, other factors such as oxidative stress, inflammation, and lifestyle also contribute to its complex pathophysiology. It is now well established that oxidative stress plays a pivotal role in the pathophysiology and the progression of AD. In the brain, oxidative damages to biomolecules are largely reported in AD, MCI patients and in different transgenic mouse models for AD. In addition, there is convincing evidence that oxidative alterations in AD and in MCI patients are not limited to the brain but is extended to the blood compartment. Some common genes are dysregulated in entorhinal cortex, hippocampus and in blood. In addition, markers of oxidative stress were consistently identified as elements of blood-based signatures in AD. Interestingly, oxidative stress can precede the development of the neuropathological hallmarks of AD. However, defining the right pattern of oxidative markers remain a challenge and is still an ongoing process for peripheral markers in AD.

Therefore, the following work focus on the identification of some redox biomarkers in plasma from MCI and their evolution in AD from the early to the severe stages of the disease. We found an early peripheral reduction of hydrogen peroxide (H₂O₂) scavenging activity, a subsequent elevation of stress response proteins including ApoJ and Klotho in plasma from MCI subjects. Additionally, our findings highlight, for the first time, that the elevation of the plasma oxidized proteins reflects the impairment of circulating proteasome activity in mild AD stage. Finally, the present study provides evidence that some markers related to oxidative stress are associated with two cognitive scores, MoCA and the MMSE assays. Our data highlight the importance and the impact of peripheral antioxidant status and homeostasis systems during the early cognitive decline leading to dementia. Overall, our results strengthen the notion that oxidative markers could be considered as drivers behind the AD-related metabolic deregulation. Moreover, our study strengthens the notion that different strategies to improve the plasma antioxidant capacity could be effective intervention to prevent or to delay cognitive decline.

In the diagnostic field, some studies brought to light the potential for the protein cargo of extracellular vesicles (EVs) in blood to serve as a readily accessible source of central nervous system (CNS) biomarkers. A growing number of researches indicate that EVs

could contribute to the brain function and the pathogenesis of AD. EVs can be secreted by most cell types, including neurons, oligodendrocytes and astrocytes, and are detectable in different body fluids such plasma due to their transportation through the blood-brain barrier between the brain and bloodstream.

Hence, the second part of this work was devoted to study the potential of proteins cargo of total circulating EVs for the detection of MCI or the evaluation of the disease progression and their relationship with cognitive performance. First, we have isolated and characterized total plasma-based EVs (pEVs), established a specific pattern of AD-related protein content in MCI to early through severe stages of AD. We found an early reduction of tTau and APP and an increase of the ratio pTau-T181/tTau in pEVs from MCI as compared to controls. The decrease of APP concentration in pEVs remained until the mild stage of AD while the severe AD stage was associated with an increase of APP levels in comparison to controls. pTau-T181 concentration in pEVs was negatively correlated to both cognitive scores while APP levels were negatively correlated with the MMSE scores.

On the other hand, we have identified some proteins related to AD disorders in pEVs and revealed their association with cognitive scores. In pEVs from MCI and mild AD patients, we found an important reduction of the Progranulin/BDNF ratio and the levels of BDNF, NSE and S100B, compared to control participants. Levels of Progranulin in pEVs were reduced in MCI phase only, in comparison with control group. With our diagnostic accuracy analysis, we found that the ratio of Progranulin/BDNF could be used to classify samples from MCI patients and control subjects with a sensitivity of 90.9% and a specificity of 83.3%. Overall, our results strengthen the notion that this protein pattern in total pEVs could be considered as non-invasive blood-based biomarkers for an early MCI and AD diagnosis but not for monitoring the disease evolution.

Taken together, this work demonstrated the utility of peripheral biomarkers associated with clinical data to avoid invasive collection techniques. These systemic variations also suggested that pathological processes may co-exist in both brain and periphery and reflect a systemic pathological process during the course of the disease. Our results

also confirm the need to use several combinations of biomarkers to classify different stages of the disease. In the future, different biomarker profiles will be able to distinguish people at risk of developing AD and the sub-population of AD patients in order to prevent the development of the disease and to propose treatments adapted to the heterogeneity of patients.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ.....	VII
ABSTRACT.....	XI
TABLE DES MATIÈRES	XV
LISTE DES TABLEAUX.....	XX
LISTE DES FIGURES	XXII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XXVI
1. CHAPITRE I	1
REVUE DE LITTÉRATURE	1
1.1. La maladie d'Alzheimer.....	1
1.1.1. Historique.....	1
1.1.2. Épidémiologie	3
1.1.2.a. Prévalence et incidence de la maladie	3
1.2. Les différentes formes de la maladie d'Alzheimer et ses facteurs de risque	4
1.2.1. La forme familiale	4
1.2.1.a. La protéine précurseur de l'amyloïde (APP)	4
1.2.1.b. La préséniline 1 (PSEN1)	7
1.2.1.c. La préséniline 2 (PSEN2).....	8
1.2.2. La forme sporadique multifactorielle	8
1.2.2.a. Facteurs de risques génétiques	8
L'Apolipoprotéine E.....	9
Les études d'association pangénomique (GWAS)	11
1.2.2.b. Facteurs de risque non génétiques	11
1.3. Caractéristiques cliniques et histopathologiques	12
1.3.1. Caractéristiques cliniques et les différents stades	12

1.3.1.a. Les différents stades clinique de la maladie d'Alzheimer	13
Stade préclinique	13
Stade MCI	13
Stade de démence	14
1.3.1.b. Caractéristique clinique : altération des systèmes de mémoire.....	15
1.3.2. Caractéristiques histopathologiques.....	17
1.4. Mécanismes de la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer : plusieurs mécanismes (aucun traitement efficace)	18
1.4.1. La cascade amyloïde.....	18
1.4.2. Implication de la protéine tau.....	21
1.4.3. Les autres mécanismes : les théories cholinergiques, glutaminergiques et infectieuses	23
1.5. Implication précoce du stress oxydatif dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer	24
1.5.1. Généralités sur le stress oxydatif.....	24
1.5.1.a. Définition, origines et rôles physiologiques	24
1.5.2. Dommages oxydatifs	26
1.5.3. Systèmes de défense antioxydante.....	28
1.5.3.a. Les systèmes enzymatiques	28
Les superoxydes dismutases	28
Les catalases et les glutathion peroxydases	29
1.5.3.b. Les systèmes non-enzymatiques	29
Le glutathion	29
Les vitamines et caroténoïdes	30
Les minéraux	30
L'Acide urique, la bilirubine et certaines protéines : antioxydants plasmatiques.....	30
Antioxydants phénoliques	30
1.5.3.c. Voies de signalisation dépendantes du statut redox.....	31
1.5.3.a. Les systèmes d'élimination des produits oxydés	31
Le système ubiquitine-protéasome.....	32
La voie autophagie-lysosome.....	35
Les vésicules extracellulaires.....	36
1.5.4. Les moyens de mesure du stress oxydatif	37
1.5.4.a. Détection directe des espèces réactives	37
La Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)	37
La chimioluminescence	38
Utilisation d'électrodes spécifiques	38

1.5.4.b. Détection indirecte du stress oxydatif	39
Lipides oxydés	39
Protéines oxydées	41
ADN/ARN oxydés.....	43
Mesure de la capacité antioxydante.....	43
1.5.5. Le stress oxydatif dans le cas de la maladie d'Alzheimer	45
1.5.5.a. Évidences des dommages oxydatifs cérébraux	46
Lipides oxydés	46
Protéines oxydées	47
ADN et ARN altérés.....	47
Produits avancés de glycation	48
Statut antioxydant	48
1.5.5.b. Rôle du stress oxydatif dans la maladie d'Alzheimer	49
Implication des métaux.....	49
Altération mitochondriale	50
Implication de l'A β et de la protéine tau.....	50
Le génotype de l'ApoE	52
1.6. Diagnostic de la maladie d'Alzheimer	52
1.6.1. Démarche générale et utilisation des biomarqueurs dans le diagnostic de la maladie d'Alzheimer	52
1.6.1.a. Tests cognitifs.....	53
Le MMSE.....	53
Le MoCA.....	54
Les autres tests disponibles	55
1.6.1.a. Examens paracliniques	55
1.7. La place des biomarqueurs dans le diagnostic de la maladie d'Alzheimer	55
1.7.1. Définition, qualités d'un bon biomarqueur et ses limites	55
1.7.2. Introduction des biomarqueurs dans les critères de diagnostic de la maladie.....	56
1.7.2.a. Évolution des critères de diagnostic de la maladie	56
NINCDS-ADRDA, 1984 :	56
IWG-1 (2007) et IWG-2 (2014) :	57
NIA-AA 2011 :.....	57
1.7.2.b. Les biomarqueurs actuellement reconnus par les critères de diagnostic.....	59
Les biomarqueurs du liquide céphalo-rachidien.....	60
Les biomarqueurs cérébraux : atteintes structurales et fonctionnelles	61

1.7.2.c.	Limites des biomarqueurs actuels	64
1.7.3.	Identification de biomarqueurs plasmatiques potentiels.....	65
1.7.3.a.	Identification de biomarqueurs plasmatiques : les défis.....	65
1.7.3.b.	Amyloïde et Tau plasmatiques.....	66
1.7.3.c.	Les autres candidats potentiels.....	68
	Marqueurs de la neuroinflammation.....	69
	Marqueurs des lésions neuronales	71
	Marqueurs de l'altération du métabolisme lipidique et de la synaptogénèse.....	73
1.7.3.d.	Les marqueurs plasmatiques du stress oxydatif	78
1.7.4.	Utilisation des vésicules extracellulaires pour l'identification de nouveaux biomarqueurs potentiels	82
1.7.4.a.	Découverte des vésicules extracellulaires	82
1.7.4.b.	Les différentes vésicules extracellulaires et leur biogénèse	83
1.7.4.c.	Composition des vésicules extracellulaires	86
1.7.4.d.	Fonctions des vésicules extracellulaires	87
1.7.4.e.	Les vésicules extracellulaires dans le système nerveux central et leurs applications possibles dans le diagnostic	88
	Les vésicules extracellulaires dans le cerveau.....	88
	L'implication des vésicules extracellulaires dans les maladies neurodégénératives.....	90
	Les vésicules extracellulaires comme réservoir de biomarqueur périphérique	92
1.8.	Hypothèse et objectifs de recherche.....	94
3.	CHAPITRE II	97
	ARTICLE 1: Blood-based redox-signature and their association to the cognitive scores in MCI and Alzheimer's disease patients	97
3.1.	Résumé et objectifs de l'article 1 :.....	97
3.2.	Contribution de l'étudiant à l'article 1:.....	98
3.3.	Article 1	98
4.	CHAPITRE III	132
	ARTICLE 2: Profile of pathogenic proteins in total circulating extracellular vesicles in mild cognitive impairment and during the progression of Alzheimer's disease	132
4.1.	Résumé et objectifs de l'article 2	132
4.2.	Contribution de l'étudiant à l'article 2	133
4.3.	Article 2.....	133

ABSTRACT.....	133
5. CHAPITRE IV.....	163
ARTICLE 3: CLASSIFICATION OF MILD COGNITIVE IMPAIRMENT AND EARLY STAGE OF ALZHEIMER'S DISEASE BASED ON PROFILE OF BRAIN PROTEINS DERIVED IN CIRCULATING EXTRACELLULAR VESICLES	163
5.1. Résumé et objectifs de l'article 3 :.....	163
5.2. Contribution de l'étudiant à l'article 3:	164
5.3. Article 3.....	164
6. CHAPITRE V.....	191
DISCUSSION GENERALE	191
6.1. Le développement du biomarqueur périphérique idéal : du laboratoire à leur utilisation clinique.....	192
6.2. Positionnement, originalité et limites de l'étude dans le contexte des biomarqueurs pour la maladie d'Alzheimer.....	197
6.3. Le statut redox périphérique comme biomarqueurs et comme cible de prévention ou de traitement?	201
6.1. L'avenir des vésicules extracellulaires dans le domaine du diagnostic des maladies neuronales.....	206
6.2. La maladie d'Alzheimer : une maladie centrale ou périphérique ?.....	215
6.3. Le futur des biomarqueurs et leur place dans les essais cliniques et la médecine personnalisée.....	217
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	220
ANNEXES	223
RÉFÉRENCES.....	257

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Prévalence, incidence et coûts de la maladie d'Alzheimer (exemple du Canada, des États-Unis, de la France et de la Chine).	3
Tableau 2 : Impact des différents génotypes du gène de l'APOE sur le risque de développer la maladie d'Alzheimer. Tableau réalisé à partir de (Farrer, Cupples et al. 1997).....	10
Tableau 3 : Temps de demi-vie des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote et leur réactivité vis à vis de composés cellulaires (<i>Forkink, Smeitink et al. 2010</i>).....	26
Tableau 4: Liste des principales enzymes antioxydantes et leur réaction catalysée	28
Tableau 5 : Classification des différentes méthodes pour mesurer la capacité antioxydante.....	44
Tableau 6 : Utilisation des biomarqueurs dans les critères de diagnostic de la maladie d'Alzheimer (IWG-2 de 2014 et NIA-AA de 2011)	57
Tableau 7 : Comparaison des critères de diagnostic incluant les biomarqueurs pour la phase préclinique de la maladie d'Alzheimer	58
Tableau 8 : Comparaison des résultats du dosage des peptides A β et de la protéine Tau dans le sang et le plasma	66
Tableau 9 : Nouveaux biomarqueurs plasmatiques potentiels dans le diagnostic de la MA.....	76
Tableau 10 : Nouveaux biomarqueurs plasmatiques potentiels dans le diagnostic de la MA : les apolipoprotéines	77
Tableau 11 : Marqueurs plasmatiques du stress oxydatif dans le diagnostic des MCI et de la MA.....	80
Tableau 12 : Comparaison de la liste des protéines inclus dans les panels prometteurs pour le diagnostic de la MA (*en gras sont indiqués les protéines en commun).	196
Tableau 13 : Résumé des biomarqueurs capables de différencier les différentes populations.....	199

Tableau 14 : Analyse du statut oxydatif plasmatique d'autres démences	203
Tableau 15 : Résumé des travaux effectués dans le domaine des vésicules extracellulaires pour le diagnostic des maladies neurodégénératives.....	212

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Dégénérescences neurofibrillaires (A) dessinées après l'observation d'Aloïs Alzheimer en 1906 du cerveau d'Auguste Deter (B) (Maurer, Volk et al. 1997). Extrait du premier dialogue entre Aloïs Alzheimer et Auguste Deter lors de son admission à l'hôpital (C).	1
Figure 2 : Représentation schématique des deux différentes voies de clivage de l'APP (amyloïdogénique ou non) par les β , α et γ sécrétases aboutissant à la libération de différents peptides incluant l'A β (Brouwers, Sleegers et al. 2008).	5
Figure 3 : Trafic cellulaire de l'APP et localisation cellulaire des différentes voies de clivage de l'APP (Eggert, Thomas et al. 2018).	6
Figure 4 : Représentation des gènes ou <i>loci</i> associés à la maladie d'Alzheimer ainsi que leur niveau de risque et leur fréquence. Figure modifiée de (Karch and Goate 2015). ...	9
Figure 5 : Principaux moyens de prévention pour réduire les facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer. Figure adaptée de (Livingston, Sommerlad et al. 2017).	12
Figure 6 : Classification des différents systèmes de mémoire et les zones cérébrales impliquées pour chacune d'autres elles	15
Figure 7 : Accumulation spatio-temporelle des dégénérescences neurofibrillaires et des plaques amyloïdes au cours de la maladie d'Alzheimer. Figure modifiée de (Goedert 2015).	18
Figure 8 : Évolution de l'hypothèse de la cascade amyloïde de Hardy et Selkoe, 1992 et 2006.	20
Figure 9 : Hypothèse de la protéine Tau dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer	22
Figure 10 : Schématisation des différents systèmes de production des espèces de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN) ainsi que certaines voies de défenses antioxydantes (en vert).	26
Figure 11 : Schématisation des différents systèmes catalytiques de la cellule.	32

Figure 12 : Représentation des différentes variétés de protéasomes formés avec les différents complexes. Figure modifiée de (Tai and Schuman 2008)	33
Figure 13 : Représentation schématique des différentes étapes de la dégradation des protéines par le complexe 26S ubiquitine/ATP dépendant.....	34
Figure 14 : Représentation de la dégradation sélective des protéines oxydées par le protéasome 20S.....	35
Figure 15 : Représentation schématique de l'autophagie des composés cellulaires. Figure adaptée de (Dikic 2017).	36
Figure 16 : Schématisation du phénomène de peroxydation lipidique engendrant la formation de produits primaires et secondaires.....	40
Figure 17 : Représentation des différents mécanismes conduisant à l'oxydation des protéines.	42
Figure 18 : Formation des produits avancés de glycation (AGE)	48
Figure 19: Mécanismes impliquant le stress oxydatif dans la maladie d'Alzheimer.....	49
Figure 20 : Modèle classique des changements temporels des biomarqueurs lors de la progression de la maladie (i : préclinique ; ii : MCI ; iii : démence). Figure modifiée de (Jack and Holtzman 2013).....	60
Figure 21 : Interprétation des variations des protéines pathogéniques dans le LCR au cours de la maladie d'Alzheimer.	60
Figure 22 : Progression de l'atrophie de l'hippocampe (H) et de l'élargissement des ventricules (V) lors de la maladie d'Alzheimer visualisée en IRM (Lehericy, Marjanska et al. 2007).	62
Figure 23 : PET-scans au 18H-FDG pour visualiser l'hypométabolisme du glucose cérébral et PET-scans au PIB pour observer l'accumulation d'amyloïde dans la maladie d'Alzheimer (Klunk, Engler et al. 2004, Johnson, Fox et al. 2012).	63
Figure 24 : Prévalence des PET-Scan positifs pour l'A β chez les personnes témoins (sans troubles cognitifs), des patients MCI, Alzheimer ou atteints d'autres démences.	

Données provenant de deux études (Jansen, Ossenkoppele et al. 2015, Ossenkoppele, Jansen et al. 2015).....	64
Figure 25 : 1983, Image de microscopie électronique révélant la formation et la libération de vésicules extracellulaires par les réticulocytes (marquage des récepteurs à la transferrine). D'après (Harding, Heuser et al. 1983) à gauche et (Pan and Johnstone 1983) à droite.....	83
Figure 26 : La famille des vésicules extracellulaires et leur mécanisme de libération simplifié (Exosomes, microvésicules et corps apoptotiques). Figure modifiée de (Kanada, Bachmann et al. 2016).....	84
Figure 27 : schématisation de la libération des exosomes par les différents mécanismes cellulaires (ESCRT, tétraspanines, céramide, ALIX). D'après (van Niel, D'Angelo et al. 2018).....	85
Figure 28 : Schématisation de la formation des microvésicules à partir de la membrane plasmique impliquant le complexe ESCRT ou les tétraspanines. D'après (van Niel, D'Angelo et al. 2018).....	85
Figure 29 : Illustration de la composition variée des vésicules extracellulaires	87
Figure 30 : Illustration des différents devenir des EVs une fois libérées. Elles peuvent se fixer à des récepteurs ou être internalisées par une cellule réceptrice (van Niel, D'Angelo et al. 2018).....	88
Figure 31 : Illustration des différentes hypothèses expliquant la propagation de protéines toxique dans la maladie d'Alzheimer.	91
Figure 32 : Illustration en toile d'araignée des variations du niveau des marqueurs étudiés dans cette étude (A-objectif 1, marqueurs reliés au stress oxydatif et B-objectif 2 et 3, marqueurs mesurés dans les pEVs). Le niveau des marqueurs pour chaque groupe de patients est exprimé en pourcentage par rapport aux sujets contrôles (fixé à 100%).....	201

Figure 33 : Mesure du niveau des protéines carbonylées (à gauche) et de l'ApoD (à droite) dans les pEVs des sujets contrôles, MCI et des patients atteints de la MA aux différents stades (n=6/groupe).	209
Figure 34 : Différentes anomalies systémiques observées chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Wang, Gu et al. 2017).	215
Figure 35 : Représentation de la complexité des maladies neurologiques liées à l'âge et leur coexistence chez un même individu. À gauche la vision de coexistence, à droite la vision des maladies séparées.	219

LISTE DES ABRÉVIATIONS

$^1\text{O}_2$: Oxygène singulet	GSH : Glutathion réduit
3MS : <i>Modified Mini-Mental State</i>	GSSG : Glutathion-disulfure (oxydée)
4-HNE : 4-hydroxynonéal	GST : Glutathion S-transferase
8-OHdG : 8-hydroxydeoxyguanosine	H ₂ O ₂ : Peroxyde d'hydrogène
8-OHG : 8-hydroxyguanosine	MA : Maladie d'Alzheimer
AAPH : 2,2'-azobis-2-aminopropane dihydrochloride	MDA : Malondialdéhyde
ABTS : 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)	MMSE : <i>Mini Mental State Examination</i>
APP : Protéine précurseur de l'amyloïde-bêta	MoCA : <i>Montreal Cognitive Assessment</i>
ATP : Adénosine triphosphate	MVB : Corps multivésiculaires
A β : Amyloïde-bêta	O ₂ ^{•-} : Anion superoxyde
BHE : barrière hémato-encéphalique	OH [•] : Radical hydroxyle
CAT : Catalase	OMS : Organisation mondiale de la santé
DNF : Dégénérescences neurofibrillaires	ORAC : Oxygen radical absorbance capacity
DPPH : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	PRX : Peroxiredoxin
ENO1 : α -Enolase	PSEN1 : Préséniline 1
ERN : Espèce réactives de l'azote	PSEN2 : Préséniline 2
ERO : <i>Espèces réactives de l'oxygène</i>	pTau : <i>Protéine Tau hyperphosphorylée</i>
EVs : vésicules extracellulaires	ROO : Radicaux peroxydes
FRAP : <i>Ferric reducing antioxidant power</i>	ROOH : Peroxydes
GPX : Glutathion peroxydase	SOD : Superoxyde dismutase
GR : Glutathion réductase	TEAC : Trolox equivalent antioxidant capacity
GRX : Glutaredoxin	TRAP : Total radical-trapping antioxidant parameter
	TRX : Thioredoxin

1. CHAPITRE I

REVUE DE LITTERATURE

1.1. La maladie d'Alzheimer

1.1.1. Historique

La maladie d'Alzheimer (MA) a été décrite pour la première fois en 1907 par le psychiatre et neuropathologiste allemand Aloïs Alzheimer. Bien que les symptômes de la maladie aient été observés depuis des siècles, il est le premier à étudier et documenter avec précision la progression des symptômes d'Auguste Deter, admise à l'âge de 51 ans à l'hôpital de Francfort pour une démence associée à des hallucinations et des troubles de la mémoire et du sommeil. Il suit l'évolution de la démence de sa patiente jusqu'à sa mort en 1906. Lors de l'autopsie du cerveau, il découvre une atrophie corticale et deux lésions neuropathologiques : les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) (Figure 1). Ses travaux ont fait l'objet d'une présentation en 1906 lors de la 37^{ème} conférence des psychiatres allemands à Tübingen et d'une publication qu'il intitula "A characteristic serious disease of the cerebral cortex", en 1907. Paradoxalement, ces deux communications n'ont guère suscité d'enthousiasme à l'époque. Il faut attendre 1910 pour que la maladie soit nommée « Alzheimer » par Emil Kraepelin, le directeur d'A. Alzheimer et l'une des plus importante figure de la psychiatrie de l'époque (Maurer, Volk et al. 1997).

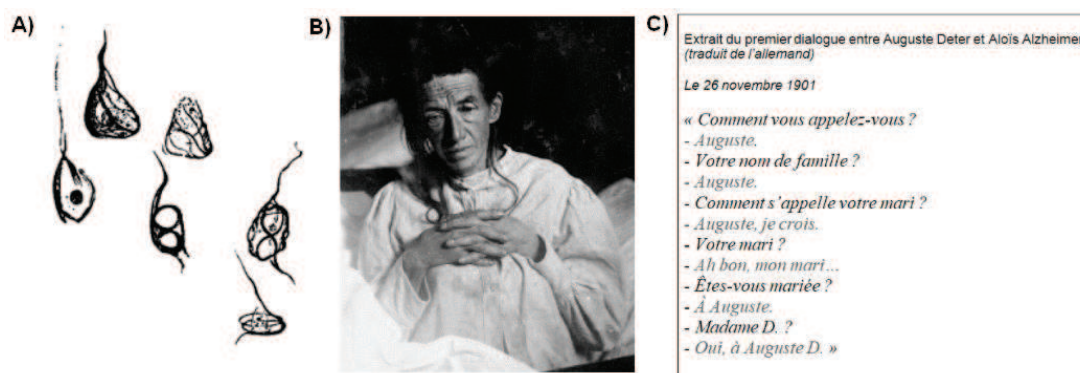


Figure 1 : Dégénérescences neurofibrillaires (A) dessinées après l'observation d'Aloïs Alzheimer en 1906 du cerveau d'Auguste Deter (B) (Maurer, Volk et al. 1997). Extrait du premier dialogue entre Aloïs Alzheimer et Auguste Deter lors de son admission à l' hôpital (C).

L'intérêt pour cette maladie n'a véritablement commencé que dans les années 1970, suite à l'éditorial du neurologue américain Robert Katzman qui affirmait que l'Alzheimer était la quatrième ou la cinquième cause de décès aux États-Unis (Katzman 1976). Au vu de son ampleur, la MA devient une des priorités dans le domaine de la recherche scientifique. À cette époque de nombreuses découvertes se sont succédées. Plusieurs chercheurs révèlent un déficit cholinergique dans le cerveau des patients atteints de la MA (Bowen, Smith et al. 1976, Davies and Maloney 1976, Perry, Gibson et al. 1977). La thérapie basée sur les inhibiteurs de la cholinestérase, encore utilisée de nos jours, sera approuvée qu'en 1993 et ne représentera pas la solution pour guérir cette maladie.

Parmi les plus importantes découvertes dans le domaine, on peut également citer la découverte de l'amyloïde-bêta ($A\beta$) responsable des plaques séniles (Glennner and Wong 1984, Glennner, Wong et al. 1984) puis l'implication de la protéine tau dans les DNF (Wood, Mirra et al. 1986).

Entre 1991 et 1995, l'émergence des nouveaux outils de biologie moléculaire a permis d'identifier trois gènes responsables des formes familiales à début précoce. Il s'agit du gène de la protéine précurseur de l' $A\beta$ (APP) et des gènes préséniline 1 (PSEN1) et 2 (PSEN2) (Goate, Chartier-Harlin et al. 1991, Levy-Lahad, Wijsman et al. 1995, Sherrington, Rogaev et al. 1995). Parallèlement, Strittmatter ainsi que Poirier et al. ont démontré l'association entre l'allèle $\epsilon 4$ de l'apolipoprotéine E (ApoE) et la maladie d'Alzheimer sporadique (Poirier, Davignon et al. 1993, Saunders, Strittmatter et al. 1993). Ces études génétiques ont rapidement entraîné la mise au point de nombreux modèles animaux transgéniques pour reproduire l'accumulation des plaques séniles dans le but de progresser dans la compréhension de la MA (Games, Adams et al. 1995, Hsiao, Chapman et al. 1996). Il faudra attendre les années 2000 pour être capable de mettre au point des modèles présentant à la fois des plaques séniles et des DNF (Oddo, Caccamo et al. 2003, Oddo, Caccamo et al. 2003).

Après plus de 100 ans de recherche, l'origine de la MA reste encore inconnue. De nombreuses cibles thérapeutiques ont été testées mais aucune d'entre elles ne peut guérir la maladie. Ainsi, il existe encore de nombreux défis dans la recherche sur la MA.

1.1.2. Épidémiologie

Initialement défini par A. Alzheimer comme une forme rare et précoce de démence présénile, la MA est maintenant devenue un problème majeur de santé publique puisqu'elle concerne plusieurs millions de personnes dans le monde.

1.1.2.a. Prévalence et incidence de la maladie

En 2017, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime que 47 millions de personnes dans le monde sont touchées par une démence et 10 millions de nouveaux cas sont dénombrés chaque année. Ce nombre devrait atteindre 82 millions en 2030 et 152 millions d'ici 2050 en absence de traitements efficaces et de diagnostic précoce.

La MA serait à l'origine de 60 à 70% des cas de démence. Le Tableau 1 répertorie la prévalence, l'incidence, la mortalité et le coût de la MA dans différents pays du monde. Cette prévalence augmente en fonction de l'âge. L'*Alzheimer's Association* estime à 3% le pourcentage de personnes vivant avec la MA entre 65 et 74 ans, 17% chez les personnes âgées entre 74 et 84 ans et 32% chez les personnes âgées de plus de 85 ans (2018). Il y a également une différence entre la prévalence chez les hommes et les femmes. Les femmes sont plus touchées par la MA. Cette différence pourrait être expliquée par des différences biologiques et hormonales mais également des différences socio-culturelles.

Tableau 1 : Prévalence, incidence et coûts de la maladie d'Alzheimer (exemple du Canada, des États-Unis, de la France et de la Chine).

	Prévalence (nombre de personnes atteintes dans la population)	Incidence (nombre de nouveaux cas dans la population)	Coût pour le pays par an	Mortalité	Références
Canada	564 000	25 000 nouveaux cas	10,4 milliards de \$CA	8 ^{ème} cause de mortalité (2013)	(Prévalence et coûts financiers des maladies cognitives au Canada, 2016. Société Alzheimer du Canada)
États-Unis	5,7 millions	484 000 nouveaux cas	277 milliards \$US	6 ^{ème} cause de mortalité (2016) 4 ^{ème} cause de mortalité (2014)	(2018)
France	900 000	225 000 nouveaux cas	5,3 milliards €		(ISERM, Institut national de la santé et de la recherche médicale, 2014) (Rapport 2015 de l'Alzheimer's Disease International)
Chine	9,5 millions	1 million	1000 milliards de \$US	8 ^{ème} cause de mortalité (2014)	World Alzheimer Report 2015

La MA représente une cause importante de décès et correspond à la 5^{ème} cause de décès en 2016 (avec environ 1,992 millions de décès) alors qu'elle ne figurait pas dans le top 10 en 2000 (Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. Geneva, World Health Organization; 2018).

Le coût annuel mondial des démences est estimé à 818 milliards de dollars (US \$), soit plus de 1% du produit intérieur brut mondial. Un chiffre en hausse de 35 % par rapport à une évaluation de l'OMS réalisée cinq ans auparavant.

1.2. Les différentes formes de la maladie d'Alzheimer et ses facteurs de risque

1.2.1. La forme familiale

La forme familiale ou héréditaire de la MA est estimée à 1% ou moins (Bekris, Yu et al. 2010). Trois gènes responsables ont été associés à son développement. Il s'agit des gènes de l'APP, de la PSEN1 et de la PSEN2 (Cacace, Sleegers et al. 2016). La majorité de ces mutations semblent être héritées de manière autosomique dominante.

1.2.1.a. La protéine précurseur de l'amyloïde (APP)

Le gène APP, situé sur le chromosome 21 (21q21.2-21q21.3), est l'un des premiers gènes identifié comme étant associé à la MA. Il code pour l'APP, une protéine transmembranaire qui peut subir différents clivages et engendrer la formation de nombreux peptides incluant l'A β . Le clivage de l'APP peut suivre deux voies cataboliques suivant les sécrétases impliquées : la voie amyloïdogénique et la voie non-amyloïdogénique (Figure 2).

La voie non-amyloïdogénique, initiée par l' α -sécrétase, sépare la partie N-terminale extracellulaire nommée APP α soluble (sAPP α) et le fragment C-terminal (CTF α) restant ancré à la membrane. Le fragment C-terminal membranaire est ensuite clivé par l' γ -sécrétase produisant deux autres produits : un peptide de 3 kDa (P3) et le domaine intracellulaire de l'APP (AICD). L' γ -sécrétase est un complexe de haut poids moléculaire composé de quatre sous-unités essentielles : les présénilines (PSEN1 ou

PSEN2), la *nicastrin* (NCT), l'*anterior pharynx-defective-1* (APH-1), et la *préséniline enhancer-2* (Pen-2) (Gertsik, Chiu et al. 2014, Zhang, Li et al. 2014). Cette voie ne conduisant pas à la production du peptide A β représenterait le processus principal du clivage de l'APP (90%).

En parallèle, la voie amyloïdogénique est déclenchée par le clivage de l'APP par la β -sécrétase, nommée *beta-site APP cleaving enzyme* (BACE1). Deux protéines sont formées : la partie soluble N-terminale (sAPP β) et la partie C-terminale (CTF β). Par la suite, le fragment CTF β peut subir une nouvelle coupure protéolytique par l' γ -sécrétase et libérer l'AICD et le peptide A β . Environ 80 à 90% des peptides A β sécrétés dans le milieu extracellulaire ont une longueur de 40 acides aminés (A β 40), les 10 à 20% restant ont une longueur de 42 acides aminés (A β 42) (Ahmed, Holler et al. 2010). Les peptides A β sont essentiels pour le système nerveux central et jouent le rôle modulateur cellulaire dans la survie neuronale via les canaux au potassium. Lorsque l'A β est en trop grande quantité, il s'agrège et s'accumule en plaques amyloïdes (composées essentiellement d'A β 42), principale caractéristique histopathologique de la MA.

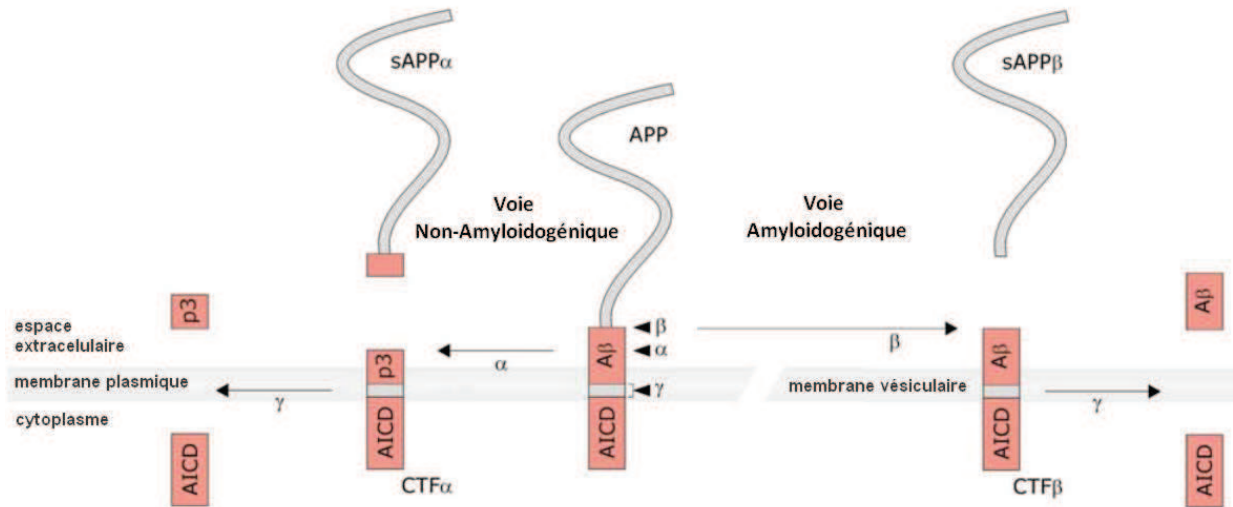


Figure 2 : Représentation schématique des deux différentes voies de clivage de l'APP (amyloïdogénique ou non) par les β , α et γ sécrétases aboutissant à la libération de différents peptides incluant l'A β (Brouwers, Slegers et al. 2008).

Ces deux voies diffèrent au niveau de l'initiation par l' α et la β -sécrétase mais également par leur localisation cellulaire. En effet, le clivage de l'APP peut survenir à différents endroits dans la cellule due à son trafic cellulaire permanent et bien régulé (Figure 3).

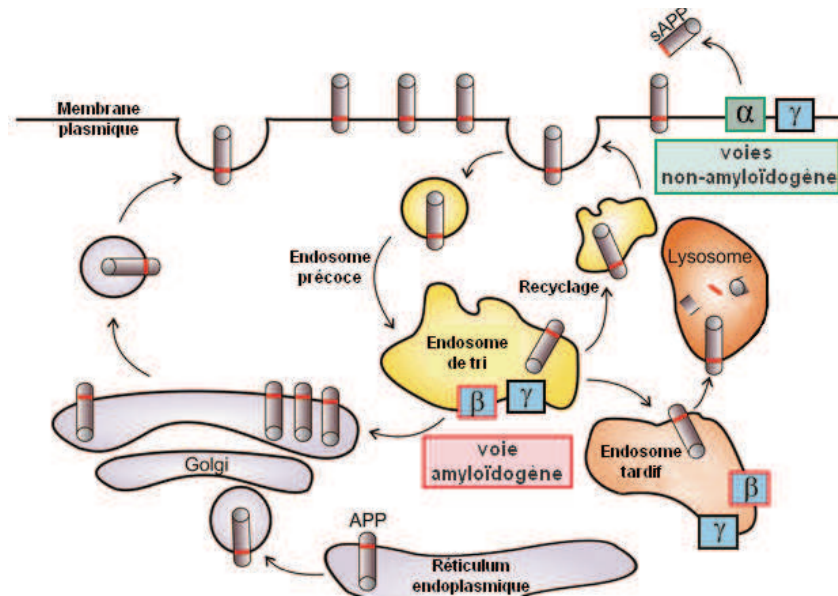


Figure 3 : Trafic cellulaire de l'APP et localisation cellulaire des différentes voies de clivage de l'APP (Eggert, Thomas et al. 2018).

L'APP est transportée du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique via l'appareil de Golgi, où elle est principalement localisée. Mais l'APP peut également être internalisée et se retrouver dans les endosomes précoces pour être triée selon trois voies: (I) une partie de l'APP est recyclée à la surface cellulaire, (II) une fraction retourne au Golgi et (III) le reste sera dégradé via la fusion des endosomes tardifs avec les lysosomes. Le clivage non-amyloïdogénique par l' α et l' γ se déroule principalement à la membrane plasmique alors que l'activité des β -sécrétases se trouve principalement dans les compartiments endosomaux. Selon sa composition en sous-unités, la localisation cellulaire de l' γ -sécrétase, impliquée dans les deux voies, diffère. Le complexe de l' γ -sécrétase comprenant la PSEN1 est concentré à la surface cellulaire, tandis que l' γ -sécrétase contenant la PSEN2 est prédominante dans les endosomes tardif et les lysosomes (Meckler and Checler 2016). De ce fait, le processus de clivage de l'APP en fragments amyloïdogènes ou non dépend fortement de son trafic intracellulaire et complique sa compréhension dans la MA. La plupart de l'A β généré au niveau subcellulaire est excrété dans le milieu extracellulaire bien qu'il ne faut pas nier la présence d'A β au niveau intracellulaire, observée chez des modèles animaux de la MA et chez des patients.

Les mutations sur le gène de l'APP ou dans les composants du complexe de l' γ -sécrétase entraînent une augmentation de la production d'A β . La plupart des mutations du gène APP sont situées dans la séquence de l'A β ou proche des sites de clivage exerçant ainsi leur effet pathogène. À ce jour, 32 mutations sur le gène APP ont été décrites dans le cas de la MA familiale incluant la mutation London (Goate, Chartier-Harlin et al. 1991), Swedish (Mullan, Crawford et al. 1992) ou encore Flemish (Hendriks, van Duijn et al. 1992). Les mutations de l'APP représentent 10 à 15% des cas d'Alzheimer héréditaire soit environ 0,15% de tous les cas d'Alzheimer et provoque la MA entre 45 et 60 ans (Bird 2008, Cruts, Theuns et al. 2012).

1.2.1.b. *La préséniline 1 (PSEN1)*

Le gène de la PSEN1, situé sur le chromosome 14 (14q24.3), code pour la préséniline 1, une protéine membranaire exprimée dans plusieurs tissus dont le cerveau avec une expression élevée dans les neurones de l'hippocampe et le cervelet. Elle est la cible de diverses activités protéolytiques (caspases et présénilinasés) qui engendrent des fragments peptidiques capables de moduler les processus de survie neuronale. Elle contribue également à la maturation de l'APP car elle représente une sous-unité du complexe de l' γ -sécrétase.

Les mutations retrouvées sur la PSEN1 représenteraient 20 à 70% des cas familiaux de la MA et correspondraient aux formes les plus précoces avec une moyenne d'apparition à 43 ans (Cruts, Theuns et al. 2012). À l'heure actuelle, on dénombrait plus de 228 mutations retrouvées sur le gène PSEN1 (Sun, Zhou et al. 2017). Les mécanismes par lesquels les mutations de PSEN1 conduisent à la neurodégénérescence et à la MA sont vivement débattus (Kelleher and Shen 2017). La PSEN1 mutée favoriserait une production exacerbée de peptide A β 42 (Hardy and Selkoe 2002). Cependant, cette hypothèse est valable pour un petit nombre de mutations. En effet, une étude récente a analysé 138 mutations pathogènes sur la PSEN1 et leur effet sur la production des peptides A β 42 et A β 40. *Sun et son équipe* montrent que 75% des mutations étudiées induisent une diminution sévère de la production d'A β 42 et A β 40. Une autre hypothèse définit l'effet pathogène des mutations de PSEN1 via l'augmentation du ratio A β 42/A β 40 produit (Wolfe 2007). Dans l'étude de *Sun et al.*, 30% des mutations de PSEN1

supprimaient totalement la synthèse d'A β 42. Pour le reste, les mutations sembleraient élever le rapport A β 42/A β 40 par la diminution du niveau d'A β 40 (Sun, Zhou et al. 2017). Une dernière hypothèse propose que les mutations de PSEN1 entraînent une perte des fonctions essentielles des présénilines dans le cerveau ce qui déclencherait la mort neuronale.

1.2.1.c. *La préséniline 2 (PSEN2)*

Les mutations du gène PSEN2, localisées sur le chromosome 1 (1q31-q42), représentent les formes les plus rares des cas familiaux de la MA (1%) avec une apparition variable entre 45 et 88 ans (Cruts, Theuns et al. 2012, Cai, An et al. 2015). À ce jour, 42 mutations ont été rapportées. Ces mutations seraient responsables d'une augmentation de l'activité de la γ -secrétase et certaines mutations induiraient l'augmentation de la production du peptide A β 42 (Citron, Westaway et al. 1997, Walker, Martinez et al. 2005). D'autres études montrent une altération de la signalisation du calcium conduisant à l'agrégation de l'A β et entraînant la mort neuronale (Giacomello, Barbiero et al. 2005, Zatti, Burgo et al. 2006).

1.2.2. **La forme sporadique multifactorielle**

La seconde forme de la MA représente la forme majoritaire, soit environ 99% des patients atteints de la MA. Il s'agit de la forme sporadique de la maladie. Selon sa définition le terme sporadique qualifie « ce qui touche irrégulièrement et seulement quelques individus au sein d'une population sans qu'il se forme une chaîne de transmission continue ». La forme sporadique est la conséquence d'un ensemble complexe de facteurs de risque génétiques et d'éléments touchant à l'environnement et au style de vie.

1.2.2.a. *Facteurs de risques génétiques*

Des résultats d'études d'observation suggèrent que 30 à 48% des patients atteints de la MA ont un parent au premier degré affecté, contre 13 à 19% des individus témoins (Cuyvers and Sleegers 2016). Différentes approches ont permis d'étudier et d'identifier certains gènes ou loci associés au développement de la MA (Figure 4).

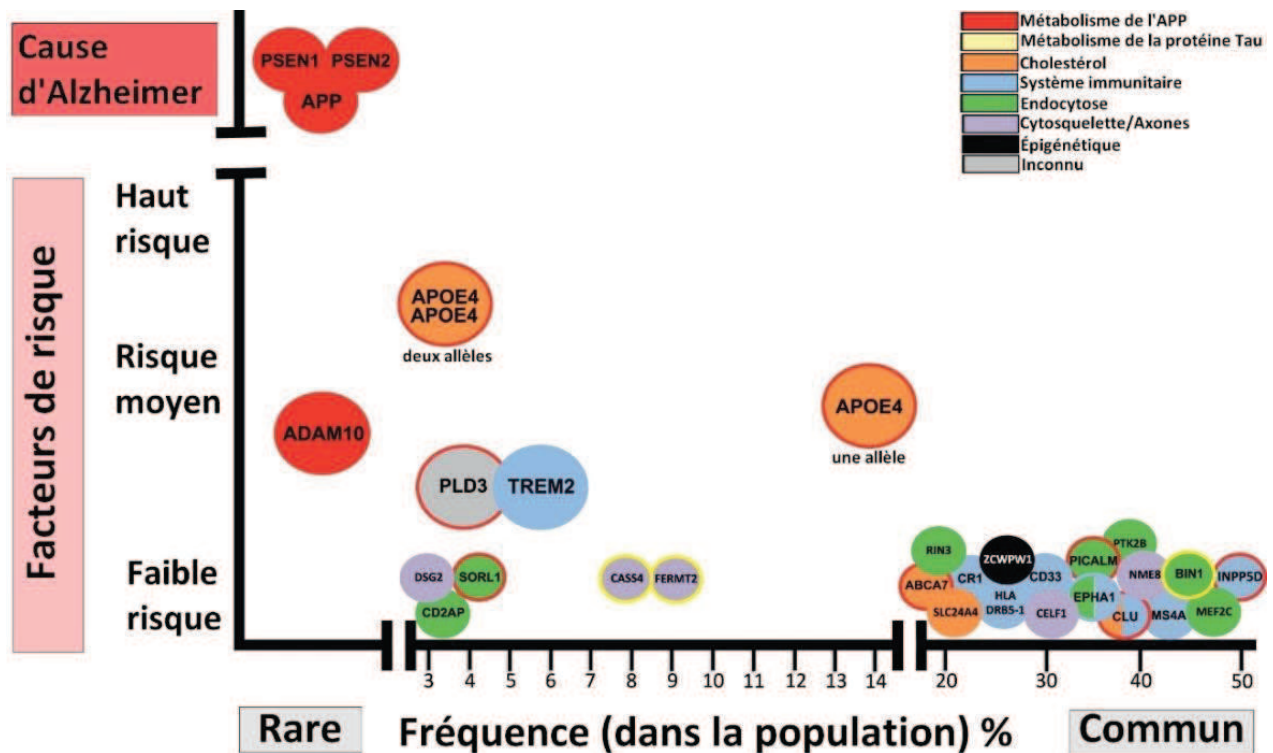


Figure 4 : Représentation des gènes ou *loci* associés à la maladie d'Alzheimer ainsi que leur niveau de risque et leur fréquence. Figure modifiée de (Karch and Goate 2015).

L'Apolipoprotéine E

Le gène de l'Apolipoprotéine E (ApoE), localisé sur le chromosome 19, code pour la protéine ApoE, une lipoprotéine participant à la régulation et au transport des lipides. Le gène ApoE possède 3 allèles différents dans la population générale nommés $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$ correspondant aux isoformes APOE2, APOE3 et APOE4, respectivement.

L'APOE3 est caractérisé par une arginine au codon 112 et une cystéine au codon 158, tandis que l'APOE4 diffère par une arginine au codon 158 et l'APO2 par une cystéine au codon 112. L'APOE3 est la plus fréquente (environ 80%) alors que les APOE2 et E4 sont plus rares (8% et 12%, respectivement).

C'est en 1993, que l'association entre la MA et l'allèle E4 de l'Apolipoprotéine E est mise en évidence (Poirier, Davignon et al. 1993, Saunders, Strittmatter et al. 1993, Brousseau, Legrain et al. 1994). Cette étude a révélé que 40% des personnes atteintes de la forme tardive de la MA possédaient l'allèle $\epsilon 4$. De nombreuses études ont confirmé cette association et ont démontré l'effet dose du nombre d'allèles $\epsilon 4$ sur le

risque de développer la maladie (Tableau 2). La présence d'un allèle $\epsilon 4$ élève le risque de 3 fois alors que la présence des deux allèles $\epsilon 4$ augmente le risque de 15 fois (Neu, Pa et al. 2017). Enfin, à l'inverse, l'allèle $\epsilon 2$ est associé à un effet protecteur (Farrer, Cupples et al. 1997). Ce risque peut varier en fonction des pays révélant l'impact important de l'environnement. En effet, un japonais ($\epsilon 4/\epsilon 4$) a un risque de plus de 20 fois de développer la MA comparativement à un japonais ($\epsilon 3/\epsilon 3$) alors qu'un nigérien n'a pas plus de risque de développer la maladie avec un génotype $\epsilon 4/\epsilon 4$ que $\epsilon 3/\epsilon 3$ (Yamazaki, Painter et al. 2016).

Tableau 2 : Impact des différents génotypes du gène de l'APOE sur le risque de développer la maladie d'Alzheimer. Tableau réalisé à partir de (Farrer, Cupples et al. 1997)

Génotypes de l'ApoE	Risque de développer la maladie (référence $\epsilon 3/\epsilon 3$ à 1) Risque (Odds ratio) [IC 95%]
$\epsilon 2/\epsilon 2$	0,6 [0,2-2,0]
$\epsilon 2/\epsilon 3$	0,6 [0,5-0,8] 0,6 [0,5-0,9]
$\epsilon 3/\epsilon 3$	Fixé à 1 (référence)
$\epsilon 2/\epsilon 4$	2,6 [1,6-4,0]
$\epsilon 3/\epsilon 4$	3,2 [2,8-3,8]
$\epsilon 4/\epsilon 4$	14,9 [10,8-20,6]

De nombreuses hypothèses ont été proposées pour comprendre l'effet néfaste de l'ApoE $\epsilon 4$. Étant donné que la présence d'un allèle $\epsilon 4$ corrèle avec l'augmentation des plaques amyloïdes dans des cerveaux de patients atteints de la MA, une des hypothèses définit l'ApoE $\epsilon 4$ comme un élément essentiel lors de la formation des dépôts d'A β . En effet, des études ont révélé la présence de l'ApoE au niveau des plaques A β (Namba, Tomonaga et al. 1991) ainsi que l'affinité de l'ApoE pour le peptide A β suggérant un comportement de protéine chaperonne envers le peptide (Strittmatter, Weisgraber et al. 1993). L'ApoE permettrait d'éliminer l'A β du cerveau au sang via ses récepteurs tels que le LPR1 et VLDLR avec une efficacité plus forte pour l'ApoE $\epsilon 2$ que l'ApoE $\epsilon 4$ (Ji, Permanne et al. 2001, Bell, Sagare et al. 2007, Deane, Sagare et al. 2008). Parallèlement à ce phénomène, des études ont mis en évidence l'implication de l'ApoE $\epsilon 4$ dans l'altération de la croissance des neurites (Nathan et coll., 1994), dans

l'augmentation du stress oxydatif via la perte de ses deux cystéines (Miyata and Smith 1996, Ramassamy, Averill et al. 1999), dans l'hyperphosphorylation de la protéine Tau (Strittmatter, Weisgraber et al. 1994) ou encore dans l'altération des fonctions mitochondriales (Gibson, Haroutunian et al. 2000).

Les études d'association pangénomique (GWAS)

L'émergence du séquençage et des études d'association pangénomique (GWAS, *genome-wide association study*) ont défini plus de 20 variants génétiques comme étant des facteurs de risque (Harold, Abraham et al. 2009, Hollingworth, Harold et al. 2011, Lambert, Ibrahim-Verbaas et al. 2013, Karch and Goate 2015). Certains de ces gènes sont liés au peptide A β (ADAM10) alors que d'autres sont impliqués dans le système immunitaire (TREM2, ABCA7, CD33, EPHA1), dans le fonctionnement synaptique (PICALM, CD33, CD2AP, EPHA1 et BIN1) ou encore dans le métabolisme des lipides (CLU et ABCA7). Ces variants génétiques sont plus ou moins communs dans la population et leur niveau de risque de développer la MA est également variable (Figure 4).

1.2.2.b. Facteurs de risque non génétiques

Il est maintenant bien établi que le développement de la MA est influencé par de nombreux facteurs non génétiques (Baumgart, Snyder et al. 2015, Livingston, Sommerlad et al. 2017).

L'âge est un facteur de risque élevé pour le développement des démences. En effet, la prévalence de la MA augmente dramatiquement avec l'âge avancée. Hormis l'âge, la majorité des facteurs de risque associés à la MA sont modifiables et peuvent représenter des moyens de prévention non négligeables (Figure 5).

Récemment en 2017, les résultats d'études sur la prévention des démences dans le monde, estiment que 35% des démences seraient attribuables à une combinaison de facteurs de risque (Livingston, Sommerlad et al. 2017). On retrouve le diabète, les maladies cardiovasculaires, un faible niveau d'éducation (absence totale ou un arrêt précoce dans les études), les lésions traumatiques cérébrales (Franzblau, Gonzales-Portillo et al. 2013, Li, Li et al. 2017), la perte de l'audition (Golub, Luchsinger et al.

2017, Livingston, Sommerlad et al. 2017, Thomson, Auduong et al. 2017, Zheng, Fan et al. 2017) ou encore l'isolement social et la dépression (Herbert and Lucassen 2016, Evans, Llewellyn et al. 2018). La qualité de la diète est également à prendre en compte car des études ont révélé l'effet bénéfique de certaine diète comme la diète méditerranéenne (Pelletier, Barul et al. 2015, Petersson and Philippou 2016).

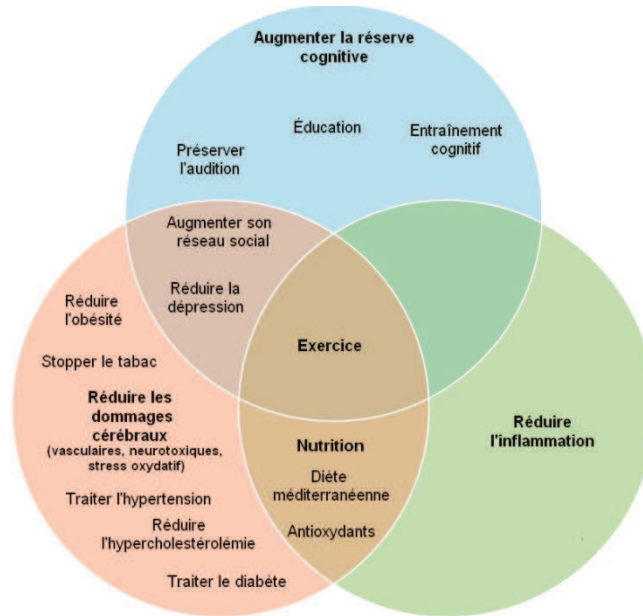


Figure 5 : Principaux moyens de prévention pour réduire les facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer. Figure adaptée de (Livingston, Sommerlad et al. 2017)

1.3. Caractéristiques cliniques et histopathologiques

Même si la forme familiale et la forme sporadique de la MA diffèrent dans la pathogénèse et la vitesse de progression, les deux formes sont cliniquement imperceptibles au niveau des symptômes et des lésions neurologiques induites.

1.3.1. Caractéristiques cliniques et les différents stades

La MA est définie au niveau clinique par un syndrome démentiel progressif qui engendre un ensemble de troubles cognitifs et comportementaux. Graduellement, la personne est atteinte d'un syndrome aphasique (trouble du langage), apraxique (mauvaise coordination gestuelle), agnosique (incapacité de reconnaissance d'objets et/ou des

personnes). Elle va également présenter des troubles dans l'orientation spatio-temporelle et des troubles de la pensée abstraite et du jugement. Même si les symptômes varient selon les individus, ces troubles finissent par avoir un impact sur les activités de la vie quotidienne en limitant l'autonomie de la personne et deviennent fatals avec l'avancement de la maladie.

La MA ne touche pas les personnes de la même manière ni à la même vitesse, c'est pourquoi l'ordre d'apparition, la sévérité et la durée des symptômes varient selon chaque cas. Après le diagnostic de la MA, les patients vivent entre 4 à 8 ans mais la maladie peut durer jusqu'à 20 ans pour certains.

1.3.1.a. *Les différents stades clinique de la maladie d'Alzheimer*

La progression générale de la maladie est lente et suit les stades décrits ci-dessous.

Stade préclinique

Le concept préclinique de la MA est apparu à la fin du 20e siècle et s'agissait des personnes sans déficit cognitif mais présentant des lésions cérébrales (Hubbard, Fenton et al. 1990). Depuis, différentes classifications d'états précliniques ont été proposées (Dubois, Hampel et al. 2016). Selon la récente révision de l'IWG (*International Work Group criteria for the diagnosis of Alzheimer disease*), l'état préclinique de la MA est caractérisé par l'absence de signes cliniques et de symptômes de la MA et la présence d'au moins un biomarqueur de la pathologie d'Alzheimer (Dubois, Feldman et al. 2010, Dubois, Feldman et al. 2014). Elle peut avoir lieu 10 à 20 ans avant les premiers signes cliniques. En 2011, ce terme est maintenant inclus dans les recommandations de l'Institut national sur le vieillissement et de l'Association Alzheimer (NIA-AA). Trois stades précliniques de la MA ont été proposés par le NIA-AA : amyloïdose asymptomatique, amyloïdose asymptomatique accompagnée d'une neurodégénérescence, amyloïdose accompagnée d'une neurodégénérescence et d'un déclin cognitif subtil (Sperling, Aisen et al. 2011).

Stade MCI

De nombreuses appellations ont été proposées pour caractériser cet état intermédiaire : *Mild Cognitive Decline* (CIM-10 ; OMS, 1992), *Mild Neuro-Cognitive Decline* (DSMIV,

American Psychiatric Association, 2000), Cognitively Impaired Not Demented (Ebly, Hogan et al. 1995) et Mild Cognitive Impairment (Flicker, Ferris et al. 1991). Le dernier terme est resté et correspond à la présence d'une inquiétude quant à un changement dans le fonctionnement cognitif relevé par le patient ou par une personne proche (Albert, DeKosky et al. 2011). Il existe deux sous-types de patients MCI. Le premier correspond au MCI de type amnésique (60 à 80% des cas). La personne va présenter des troubles légers de la mémoire et des déficits dans un ou plusieurs domaines cognitifs incluant les fonctions exécutives, l'attention, le langage et les habiletés visuospatiales (MCI amnésique à domaine unique ou à domaines multiples). Le second type est nommé MCI non amnésique (3 à 30% des cas). Il regroupe les personnes présentant un trouble touchant un domaine cognitif (MCI non amnésique à domaine unique) ou plusieurs domaines cognitifs (MCI non amnésique à domaines multiples) en absence de troubles de la mémoire (Morris, Storandt et al. 2001, Morris and Cummings 2005, Petersen, Caracciolo et al. 2014). Au stade MCI, la personne conserve son indépendance dans la vie quotidienne et ne présente pas de signes de démence. Les personnes dites MCI peuvent rester stables toute leur vie ou bien évoluer vers la MA ou d'autres démences. Le taux de conversion des patients MCI vers la démence est de 15% par an et de 50 à 60% en 5 ans (DeCarli 2003). Pour ces derniers, le stade MCI constitue une phase de transition entre la phase préclinique et la MA et serait appelée la phase prodromale de la MA.

Stade de démence

Classiquement, les cliniciens distinguent le stade léger, modéré et sévère (Hyman, Phelps et al. 2012). Au stade léger, les premiers symptômes de démence apparaissent tels que des troubles bénins de la mémoire et des modifications légères (mais détectables) de la personnalité. La personne est généralement consciente de son état. Au stade modéré, les symptômes démentiels et la détérioration des capacités mentales et physiques de la personne s'intensifient. En effet, la personne commence à perdre de son autonomie, les troubles de la mémoire s'aggravent et l'orientation spatiotemporelle et l'autonomie disparaissent au fur et à mesure. Enfin, le stade sévère représente la phase terminale de la maladie. La démence est très importante et l'autonomie ou la communication sont nulles. Cette phase nécessite des soins jour et nuit et se termine

par le décès de la personne, le plus souvent suite à des complications secondaires comme une pneumonie.

1.3.1.b. Caractéristique clinique : altération des systèmes de mémoire

L'homme dispose de nombreux systèmes de mémoire impliquant des zones cérébrales différentes (Figure 6).

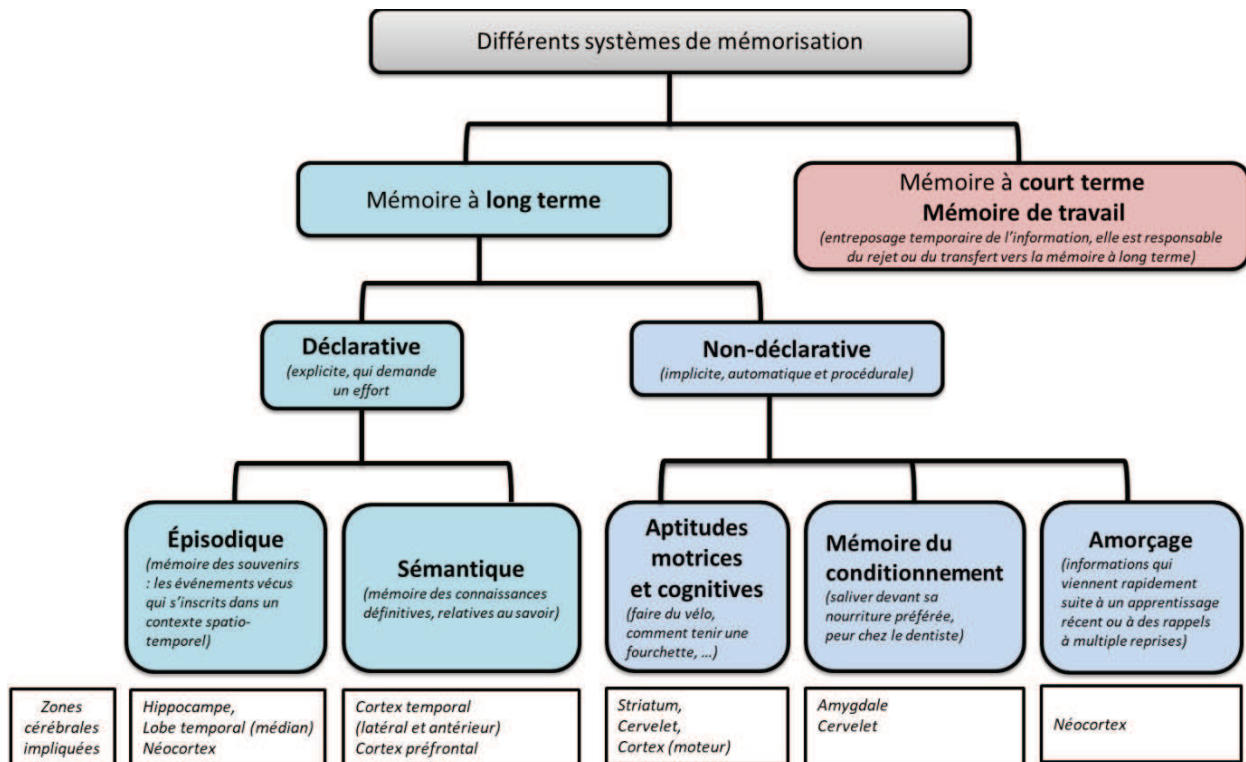


Figure 6 : Classification des différents systèmes de mémoire et les zones cérébrales impliquées pour chacune d'autres elles

Dans la MA, ces systèmes de mémoire ne vont pas tous s'altérer tous en même temps. L'ordre de ces déclin peut dépendre de chaque individu et de certains facteurs comme l'éducation et la réserve cognitive. Néanmoins, les déficits de la mémoire épisodique prédominent dans les premiers stades de la maladie et progresse de façon insidieuse dans le stade MCI amnésique (Small, Fratiglioni et al. 2000, Belleville, Sylvain-Roy et al. 2008). Dans sa définition, Tulving (1972 et revisitée en 1983) propose que la mémoire épisodique est chargée de la mémorisation d'événements personnellement vécus situés dans leur contexte temporel et spatial d'acquisition, mais aussi du sentiment qui caractérise leur récupération. Le rappel d'informations épisodiques requiert un « voyage

mental dans le temps et l'espace » et s'accompagne d'un type de conscience particulier, la conscience auto-noétique (conscience de soi) (Wheeler, Stuss et al. 1997, Tulving 2002). Cette mémoire implique un système complexe au niveau du lobe temporal médian de la région parahippocampique (cortex périrhinal et le cortex entorhinal) et de l'hippocampe qui interagit avec les structures corticales et sous-corticales (Dickerson and Eichenbaum 2010), des zones particulièrement touchées par l'atrophie au début de la maladie (Deweer, Lehericy et al. 1995, Fox, Warrington et al. 1996, Di Paola, Macaluso et al. 2007).

La mémoire sémantique correspond également à un autre système de mémoire altéré au début de la MA et dans le stade MCI (Perry, Watson et al. 2000, Thompson, Graham et al. 2002, Dudas, Clague et al. 2005, Adlam, Bozeat et al. 2006). Elle correspond à la mémoire des connaissances générales acquises (mots, attributs physiques d'objets, concepts sur le monde ainsi que sur soi-même) indépendamment de leur contexte d'acquisition (Tulving and Markowitsch 1998). Elle représente une caractéristique déterminante du comportement humain et fait appel à un système complexe spécialisé dans le stockage et la récupération qui occupe une grande partie du cortex temporal (latéral et inférieur), préfrontal, pariétal inférieur et hétéromodal (Binder, Desai et al. 2009, Binder and Desai 2011). L'atrophie peut également toucher ces zones au début de la maladie (Scahill, Schott et al. 2002).

Enfin, le dernier système de mémoire touché au début de la maladie est la mémoire de travail (Belleville, Rouleau et al. 2003, Belleville, Chertkow et al. 2007, Kochan, Breakspear et al. 2010, Saunders and Summers 2010). À la différence des deux précédentes, la mémoire de travail est une mémoire à court terme. Elle permet de se rappeler d'une petite information après un bref délai (30 secondes) (Cowan 2008). Elle est composée de la mémoire de travail verbale, la mémoire de travail visuospatiale et du système de contrôle attentionnel (Baddeley 1996). Au stade MCI, c'est essentiellement la composante visuospatiale qui est altérée (Dannhauser, Walker et al. 2005) alors que les trois composantes seront endommagées plus tard (Belleville, Chertkow et al. 2007). Le réseau fronto-pariétal comprenant le cortex préfrontal dorsolatéral, le cortex cingulaire antérieur et le cortex pariétal serait impliqué dans la mémoire de travail (Chai, Abd Hamid et al. 2018).

La MA affecte en priorité les systèmes les plus élaborés. En effet, les systèmes qui mettent en jeu des processus automatiques, comme la mémoire procédurale, semblent être atteints plus tardivement dans la maladie et donc plus résistants. (Park, Gabrieli et al. 1998, Ballesteros and Reales 2004). Les procédures acquises de longue date, comme marcher ou jouer d'un instrument sont relativement plus résistantes à la maladie (Cowles, Beatty et al. 2003).

1.3.2. Caractéristiques histopathologiques

Au niveau histopathologique, la MA est caractérisée par deux lésions cérébrales spécifiques. Les premières, les plaques séniles (ou plaques amyloïdes) sont formées par l'agrégation au niveau de l'espace extracellulaire du peptide A β . Les secondes lésions correspondent aux DNF liées à l'hyperphosphorylation et l'accumulation de la protéine Tau dans le milieu intracellulaire (Figure 1, section : Historique).

L'atrophie cérébrale (hippocampe et cortex entorhinal), visualisée en IRM, caractérise également la MA au niveau histopathologique. Cette atrophie est corrélée avec la perte de la mémoire épisodique (Overdorp, Kessels et al. 2014). Le cortex frontal et le cortex temporal seront également affectés par une atrophie (Scahill, Schott et al. 2002).

Au niveau neuropathologique, il existe une classification basée sur la localisation des DNF : les stades de Braak. H et Braak E (Figure 7). Elle se décompose en 6 stades : I-II) stade transentorhinale, cliniquement silencieux ; III-IV) stade limbique, début de la maladie et V-VI) stade du néo-cortex, maladie entièrement développée (Braak and Braak 1991). La cinétique d'apparition des DNF est bien définie dans l'évolution de la MA et corrèle avec le déclin cognitif. À l'inverse, même si c'est encore débattu, il est difficile d'établir une cinétique d'apparition des plaques d'A β et elles seraient peu spécifiques de la MA et du déclin cognitif (Chetelat, Villemagne et al. 2011, Serrano-Pozo, Qian et al. 2016).

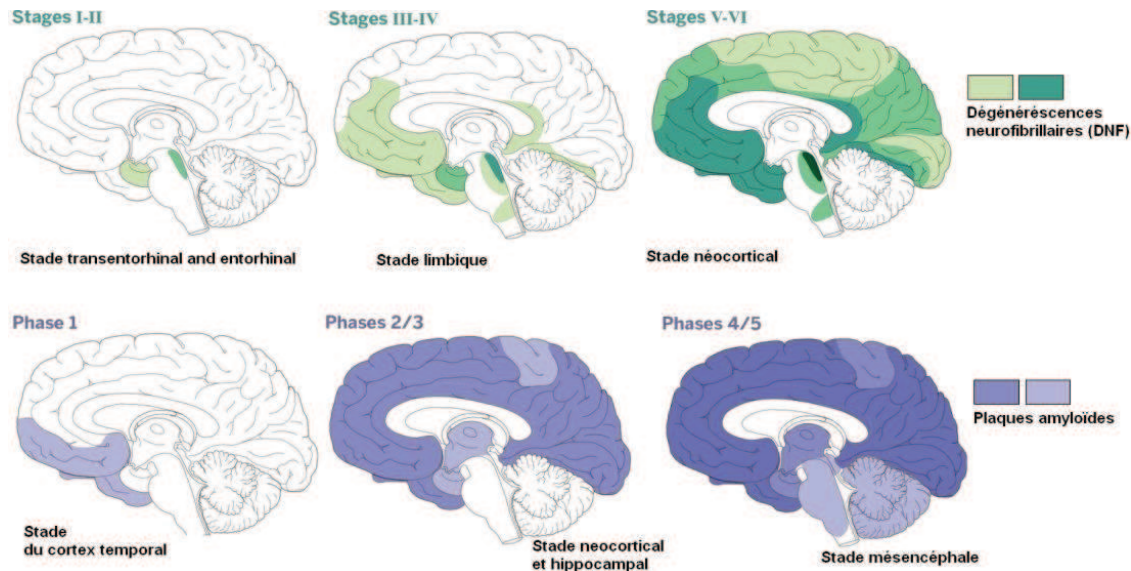


Figure 7 : Accumulation spatio-temporelle des dégénérescences neurofibrillaires et des plaques amyloïdes au cours de la maladie d'Alzheimer. Figure modifiée de (Goedert 2015).

1.4. Mécanismes de la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer : plusieurs mécanismes (aucun traitement efficace)

1.4.1. La cascade amyloïde

Dans les années 1990, Hardy et Selkoe proposent « l'hypothèse de la cascade amyloïde » comme l'explication du processus physiopathologique de la MA (Hardy and Allsop 1991, Selkoe 1991, Hardy and Higgins 1992). Selon eux, le dépôt d'A β serait la cause de tous les types de la MA. Les DNF liées à la protéine Tau, la mort cellulaire, les dommages vasculaires, l'inflammation et la démence seraient le résultat de ce dépôt. Cette hypothèse a été révisée plusieurs fois à partir de sa version originale (Figure 8).

Un nombre important de données fondamentales, précliniques et cliniques soutiennent cette hypothèse et elle est devenue le modèle dominant de la pathogénèse de la MA et guide le développement de traitements potentiels (Selkoe and Hardy 2016). La production excessive d'A β provient d'une modification du métabolisme de l'APP, décrit précédemment (1.2.1.a. La protéine précurseur de l'amyloïde (APP)). Selon Hardy et Selkoe, ce défaut au niveau des voies de clivage de l'APP peut être la conséquence des

mutations de la forme familiale ou des facteurs de risque génétiques ou non. L'accumulation d'A β peut également être le résultat d'une mauvaise élimination du peptide (Hardy and Selkoe 2002). Il est normalement éliminé par la dégradation enzymatique (*l'Insuline-Degrading Enzyme*, les aminopeptidases, les carboxypeptidases et l'enzyme de conversion de l'angiotensine/endothéline) ou par son passage vers la périphérie à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) via des protéines chaperonnes (APOE et APOJ) et les récepteurs LRP1 (*low-densité lipoprotein-receptor protein-1*). À l'inverse, grâce aux récepteurs RAGE (*Receptor of Advanced glycated End Products*), l'A β peut passer de la circulation générale vers le cerveau (Cai, Liu et al. 2015). En condition pathologique, le peptide A β possédant un pouvoir d'agrégation important, il peut s'oligomériser et former des plaques sphériques d'un diamètre de 5 à 100 micromètres. De nombreux composés sont présents dans les plaques notamment des composés inflammatoires, des ions métalliques (Fe, Cu, Zn), des apolipoprotéines ainsi que des protéines de défense antioxydante (Atwood, Martins et al. 2002). Les plaques se forment d'abord dans le cortex temporal puis le néocortex et l'hippocampe avant d'envahir la totalité du cerveau (Figure 7).

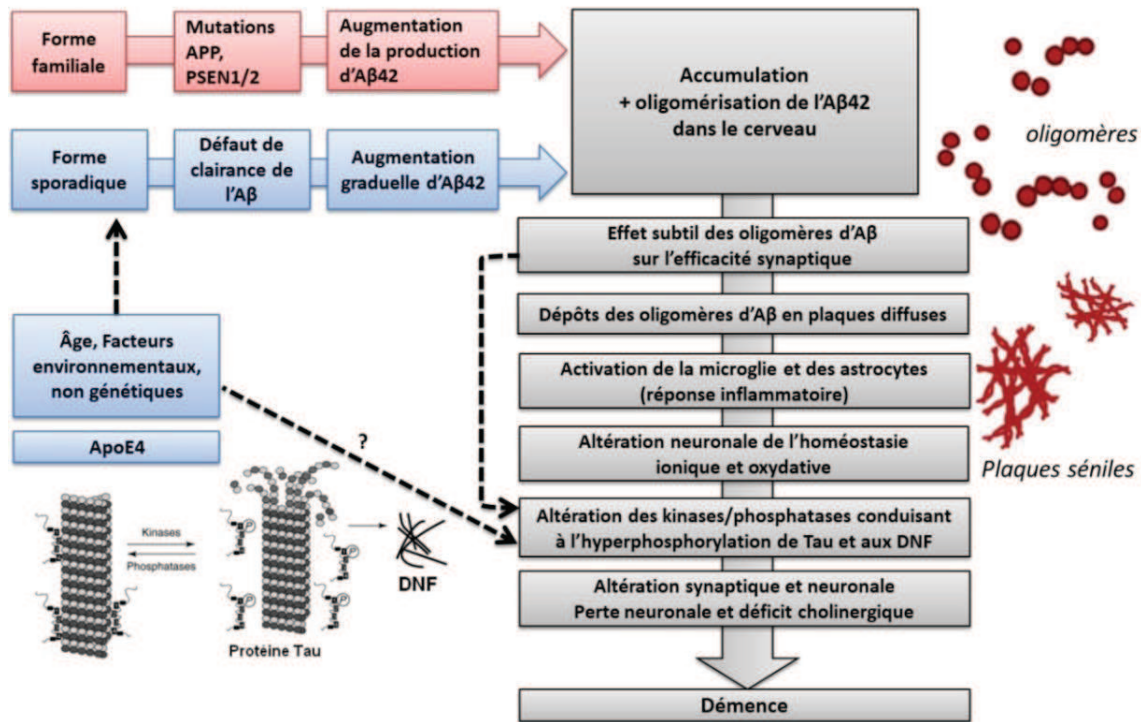
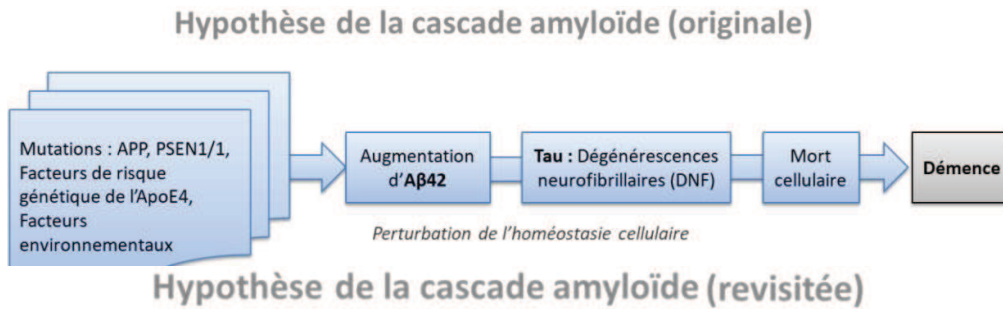


Figure 8 : Évolution de l'hypothèse de la cascade amyloïde de Hardy et Selkoe, 1992 et 2006.

L'hypothèse de la cascade amyloïde est devenue l'objet de nombreuses recherches sur la MA et reste une cible thérapeutique privilégiée. Cependant, plusieurs études semblent la contredire (Terry 2001, Herrup 2015). En effet, un argument majeur étant le manque de corrélation entre les dépôts et les troubles cognitifs (Chetelat, Villemagne et al. 2011, Serrano-Pozo, Qian et al. 2016). De plus, 33% des cerveaux de personnes témoins, ne présentant aucun trouble cognitif, révèlent une accumulation de plaques amyloïdes. À l'inverse, 12% des patients atteints de la MA ne présentent pas de plaques amyloïdes (Ossenkoppele, Jansen et al. 2015).

Ces différentes révélations expliqueraient ainsi les nombreux échecs thérapeutiques d'agents anti-amyloïdes (immunisation, inhibiteur de BACE1, ...) (Cummings, Morstorf et al. 2014). De plus, ces données indiquent que les dépôts amyloïdes ne semblent pas constituer la seule cause de la maladie.

1.4.2. Implication de la protéine tau

Face aux Baptistes (Bap, Beta amyloid protein), les Tauistes (Tau, protéine Tau) ont proposé une autre hypothèse concernant la pathogénèse de la MA. Cette hypothèse repose sur l'hyperphosphorylation de la protéine Tau conduisant au DNF et à la mort neuronale.

La protéine Tau est codée par le gène MAPT pour *microtubule associated protein Tau*, localisé sur le chromosome 17. L'épissage alternatif de ce gène permet de donner 6 isoformes de la protéine Tau chez l'humain adulte (Goedert, Spillantini et al. 1989). Il s'agit d'une protéine associée aux microtubules, fibres constitutives du cytosquelette. Elles se positionnent perpendiculairement à l'axone grâce à leur partie C-terminale qui possède des sites de fixation aux microtubules et joue ainsi un rôle crucial dans l'assemblage et la stabilisation des microtubules, dans la croissance des prolongements neuronaux, dans le transport le long des axones, et dans la plasticité neuronale. La fixation de cette protéine aux microtubules est fortement régulée par leur état de phosphorylation via un équilibre entre plusieurs kinases et phosphatases (Figure 9). Les kinases phosphorylant la protéine tau sont les suivantes : la glycogène synthase kinase-3 (GSK3 β /tau Protein Kinase I) considérée comme la kinase de tau majoritaire, la kinase dépendante du cycle cellulaire (CDK5/tau Protein Kinase II) ou encore c-jun N-terminal Kinase (JNK), Erk1/2 (Extracellular signal-regulated kinase 1/2), et p38. Inversement, les phosphatases telles que les phosphatases-1 (PP1), -2A (PP2A), -2B (PP2B), -5 (PP5), déphosphorylent Tau (Martin, Latypova et al. 2013, Martin, Latypova et al. 2013).

Hypothèse de la protéine Tau

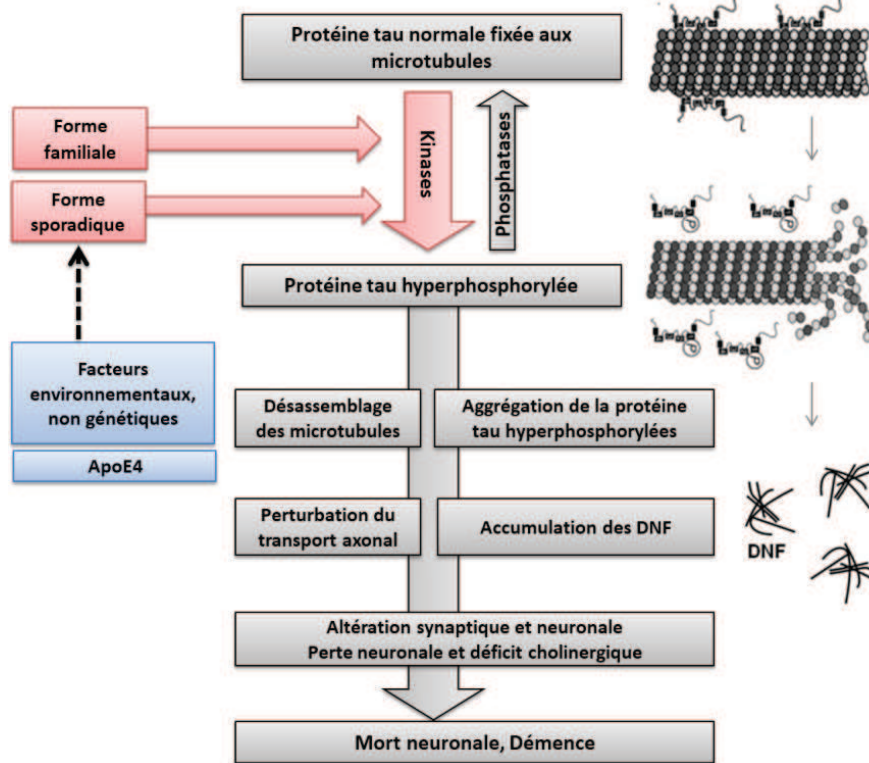


Figure 9 : Hypothèse de la protéine Tau dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer

En contexte pathologique, l'hyperphosphorylation exagérée de la protéine Tau empêche sa liaison aux microtubules et cause un mauvais assemblage de ces derniers (Alonso, Zaidi et al. 2001). Ainsi, elles restent dans le milieu intracellulaire provoquant la formation de neurofibrilles : les DNF et induisant une altération dans le fonctionnement neuronal et la mort neuronale (Takashima 2010). Comme décrit plus haut, ces DNF se propagent dans le cerveau dans des zones et dans un ordre bien précis chez les patients atteints de la MA avant même l'apparition de dépôts de l'A β dans le néocortex (Figure 7) (Arriagada, Growdon et al. 1992, Nelson, Alafuzoff et al. 2012, Bejanin, Schonhaut et al. 2017).

Les mécanismes précis aboutissant à la phosphorylation de la protéine Tau sont inconnus à ce jour. De plus, réguler à la baisse/hausse les kinases/phosphates, respectivement, s'avère un vrai défi et s'accompagne d'effets néfastes pour d'autres processus physiologiques vitaux (Hanger, Anderton et al. 2009).

Il est également important de souligner que l'accumulation de la protéine Tau hyperphosphorylée (pTau) est loin d'être spécifique à la MA car elle est observée dans plusieurs conditions neurodégénératives communément appelées « taupathies ». Elles comprennent la maladie de Pick, la démence fronto-temporelle, la dégénérescence cortico-basale ou encore le syndrome de Down. La spécificité de cette hypothèse est donc aussi débattue.

1.4.3. Les autres mécanismes : les théories cholinergiques, glutaminergiques et infectieuses

L'hypothèse cholinergique est apparue suite à la découverte du déficit cholinergique présynaptique dans le cerveau des patients atteints de la MA et son rôle dans l'apprentissage et la mémoire (Drachman and Leavitt 1974, Bowen, Smith et al. 1976, Perry, Gibson et al. 1977). L'hypothèse suggère que la dégénérescence des neurones cholinergiques et la perte associée de neurotransmission cholinergique contribuaient à la détérioration de la fonction cognitive des patients atteints de la MA. Les réductions de l'activité de la choline acétyltransférase et de la synthèse de l'Acétylcholine sont fortement corrélées au degré de déficience cognitive dans la MA (Perry, Tomlinson et al. 1978, Wilcock, Esiri et al. 1982). Cette hypothèse a depuis servi de base à la majorité des stratégies de traitement et a conduit au développement des seuls médicaments actuellement approuvés pour traiter la MA légère à modérée (excepté la Mémantine qui est un antagoniste des récepteurs NMDA). Cependant, les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase ne guérissent pas et ne ralentissent pas la MA mais permettent uniquement de diminuer certains symptômes. Ceci laisse à penser que le déficit cholinergique n'est pas la seule cause de la maladie.

Même si l'altération du système cholinergique est essentiel dans la MA, les autres neurotransmetteurs comme le glutamate, la sérotonine ou le GABA jouent également un rôle dans les processus cognitifs perturbés au cours de la maladie. Des modifications de leur expression et/ou de leur libération au cours de la MA ont été reportés (Mohr, Bruno et al. 1986, Meltzer, Smith et al. 1998, Parsons, Danysz et al. 1998, Revett, Baker et al. 2013). De plus, l'acétylcholine entretient des liens étroits avec la transmission sérotoninergique, noradrénergique, dopaminergique, GABAergique et glutamatergique.

Ainsi, le déficit cholinergique pourrait jouer un rôle dans les modifications des réseaux de neurotransmission.

La piste infectieuse est également une hypothèse prise en compte dans la communauté scientifique même si elle ne fait pas l'unanimité car elle diffère des autres au niveau de son origine et sous-entend que la MA serait transmissible. Cette hypothèse avance que l'origine de la maladie pourrait être virale ou bactérienne et pourrait impliquer plusieurs agents pathogènes, comme l'herpès simplex virus (Ball, Lewis et al. 1987, Jamieson, Maitland et al. 1991, Itzhaki 2017), *Chlamydia pneumoniae* (Little, Hammond et al. 2004, Balin, Little et al. 2008, Hammond, Hallock et al. 2010) ou les *Borrelia* (MacDonald 2006, Meer-Scherrer, Chang Loa et al. 2006, MacDonald 2007). D'autres équipes travaillent sur le lien entre la MA et les maladies à Prions du fait de la propagation de la protéine Tau et de l'Aβ dans le cerveau (Jucker and Walker 2013, Markx, Loos et al. 2018).

Enfin, un des éléments en commun dans toutes les hypothèses précédemment citées est le stress oxydatif. L'hypothèse du stress oxydatif est importante dans la pathogénèse de la MA, c'est pourquoi la partie suivante sera accordée à sa description.

1.5. Implication précoce du stress oxydatif dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer

1.5.1. Généralités sur le stress oxydatif

1.5.1.a. Définition, origines et rôles physiologiques

L'oxygène (O_2), en tant que récepteur final d'électrons, se transforme en molécules d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale pour produire 38 molécules d'adénosine triphosphate (ATP), l'énergie cellulaire. Cependant pendant cette réaction, 2-3% de l' O_2 sont transformés en espèces réactives de l'oxygène (ERO) particulièrement réactives. Ainsi, le radical libre anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est formé, ce qui conduit par la suite à la production d'autres ERO comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet (1O_2), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), l'acide hypochloreux (HOCl) ou encore des dérivés nitrés encore appelés espèce réactives de l'azote (ERN : NO_2^{\cdot} , $ONOO^-$). La formation des ERO ou ERN est détaillée dans la Figure 10. Ces espèces

réactives sont par définition des espèces chimiques possédant un électron célibataire sur leur couche périphérique, leur confère un fort degré de réactivité. La formation de ces espèces est essentielle pour la survie de la cellule car elles jouent le rôle de messagers cellulaires dans la signalisation cellulaire, participent au maintien de l'homéostasie de la cellule et représentent une défense contre les pathogènes. Pour réguler cette quantité d'ERO, l'organisme dispose de nombreuses défenses antioxydantes. On parlera alors de stress oxydatif lors d'un déséquilibre majeur entre la quantité d'antioxydants et d'oxydants (ERO et ERN) en faveur de ces derniers qui vont oxyder et causer des dommages à une série de substrats biologiques importants. Ils vont s'attaquer aux protéines, aux sucres, aux lipides et à l'ADN entraînant des altérations souvent irréversibles pour la cellule.

Ce déséquilibre peut résulter d'un dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale, d'une activation excessive de certains systèmes enzymatiques (xanthine oxydase, NADPH oxydase, glucose oxydase), d'une forte concentration en fer libre ou encore d'un déficit en antioxydants.

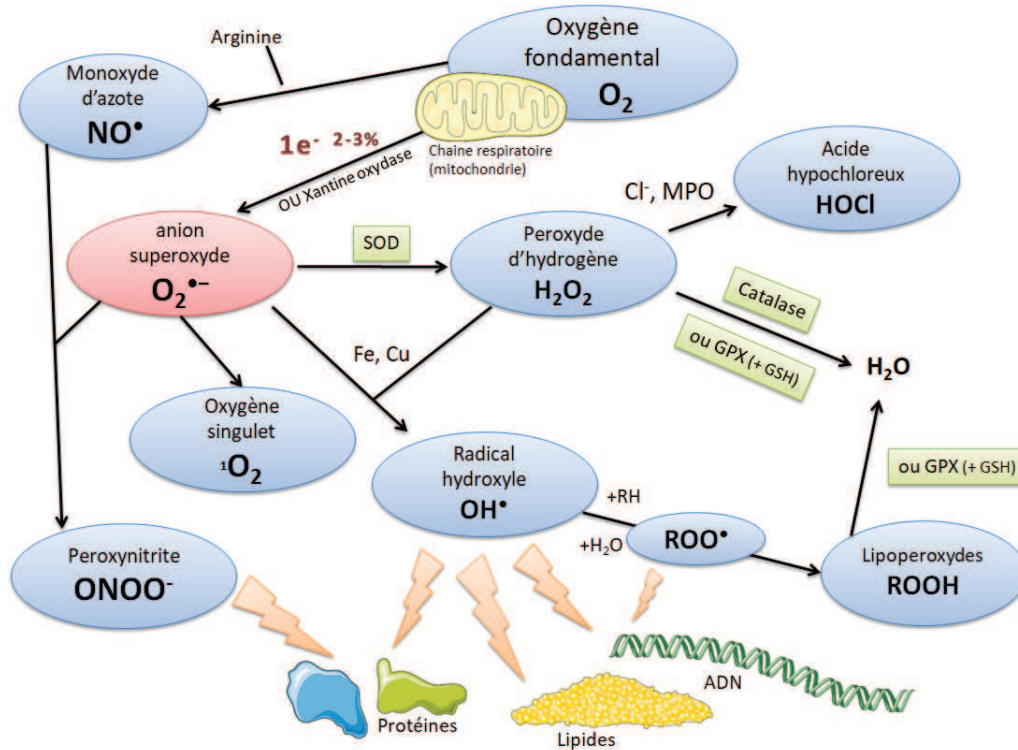


Figure 10 : Schématisation des différents systèmes de production des espèces de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN) ainsi que certaines voies de défenses antioxydantes (en vert).

1.5.2. Dommages oxydatifs

Les ERO et ERN ont une durée de demi-vie très courte allant de 10^{-9} secondes pour l' OH^\bullet à quelques minutes pour l' H_2O_2 (Tableau 3) car ils vont instantanément réagir avec différents composés cellulaires avec une force de réactivité et une spécificité différentes (Tableau 3).

Tableau 3 : Temps de demi-vie des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote et leur réactivité vis à vis de composés cellulaires (Forkink, Smeitink et al. 2010).

Espèces réactives	Temps de demi-vie (sec)	Dommages engendrés
Anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$	10^{-6} s	Faible réactivité (constante de vitesse faible) mais production d'autres radicaux beaucoup plus réactifs (toxicité indirecte) Réaction avec la SOD, le cytochrome c ou encore l'ascorbate. Forte diffusion.

Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)	<i>Quelques minutes</i>	Capacité à générer le radical hydroxyle en présence de Fe ²⁺ (réaction de Fenton). Forte diffusion
Radical hydroxyle (OH•)	<i>10⁻⁹ s</i>	Le plus puissant des ERO (constantes de vitesse très élevées), pas de cibles privilégiées (ADN, protéines, lipides, ...). Réaction selon 3 modes d'action différents. Faible diffusion.
Peroxynitrites (ONOO•)	<i>5–20x 10⁻³ s</i>	Le peroxynitrite peut pénétrer les membranes cellulaires. Forte réactivité avec différents constituants biologiques (protéines, lipides membranaires, lipoprotéines, acides nucléiques, ...). Modifications oxydatives directes ou indirectes (Pacher, Beckman et al. 2007).
Racidal peroxyde (ROO•)	<i>Quelques secondes</i>	Moins réactif que le radical hydroxyle. Ils sont à l'origine de réactions en chaîne et la peroxydation des lipides.

L'O₂^{•-} possède une faible réactivité vis-à-vis des substrats biologiques en raison de sa constante de vitesse faible, inférieure à 10² mol⁻¹.L.s⁻¹. Il a quelques cibles privilégiées comme la superoxyde dismutase, le cytochrome C et la vitamine C. Finalement, la toxicité d'O₂^{•-} réside de manière indirecte par la formation d'autres radicaux beaucoup plus réactifs. En effet, il peut donner lieu au H₂O₂ et réagir avec celui-ci pour donner l'OH• en présence de Fe²⁺ et Cu²⁺ (réaction de Fenton). L'OH• possède un très fort pouvoir réactionnel avec une constante de vitesse extrêmement rapide (10⁸ et 10¹⁰ mol⁻¹.L.s⁻¹). Il ne possède pas de cible privilégiée, il attaque tous les constituants biologiques (ADN, protéines et lipides, ...). L'O₂^{•-} et le H₂O₂, qui possèdent une durée de vie plus longue, ont la capacité de diffuser au travers les membranes cellulaires alors que l'OH• dispose d'un court rayon.

L'O₂^{•-} peut également donner forme aux peroxynitrites connus pour leur forte réactivité. Une fois formés par la réaction rapide du monoxyde d'azote (NO•) avec l'O₂^{•-}, ils peuvent pénétrer les membranes plasmiques, attaquer différentes cibles biologiques tels que les lipides, les acides nucléiques et induire l'apoptose (Pacher, Beckman et al. 2007). Enfin, les ERO et plus particulièrement l'OH• sont capables de peroxyder les lipides et de former des radicaux peroxydes (ROO•) et des peroxydes (ROOH) (Ayala, Munoz et al. 2014). Cette peroxydation conduit à la formation de produits instables, responsables de l'altération, de la diminution de la fluidité membranaire et de l'apoptose. Parmi les produits secondaires formés au cours de la peroxydation lipidique, on retrouve le malondialdéhyde (MDA), le propanal, l'hexanal et le 4-hydroxynonéal (4-HNE) (Esterbauer and Cheeseman 1990, Esterbauer, Eckl et al. 1990).

1.5.3. Systèmes de défense antioxydante

L'organisme possède de nombreuses stratégies antioxydantes pour contrer les effets néfastes des ERO et ERN. Elles peuvent agir à différents niveaux : limiter la production de ERO/ERN (antioxydants primaires), les piéger sous une forme moins réactive, recycler les antioxydants primaires ou encore protéger/réparer les constituants cellulaires (antioxydants secondaires). Elles peuvent être classées selon deux groupes: les systèmes enzymatiques et non-enzymatiques.

1.5.3.a. Les systèmes enzymatiques

Les enzymes antioxydantes sont considérées comme la première ligne de défense contre le stress oxydatif (Tableau 4).

Tableau 4: Liste des principales enzymes antioxydantes et leur réaction catalysée

Enzymes	Réactions catalysées
Superoxyde dismutase	SOD $M^{(n+1)+}\text{-SOD} + O_2^{\cdot-} \rightarrow M^{n+}\text{-SOD} + O_2$ $M^{n+}\text{-SOD} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow M^{(n+1)+}\text{-SOD} + H_2O_2$. où $M = Cu (n = 1), Mn (n = 2), Fe (n = 2) \text{ ou } Ni (n = 2)$
Catalase	CAT $2 H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2 H_2O$
Glutathion peroxydase	GPx $2 GSH + H_2O_2 \rightarrow GS-SG + 2 H_2O$ $2 GSH + ROOH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$
Thioredoxin	TRX Substrat oxydé + Trx(SS) + NADPH \rightarrow Substrat réduit + Trx(SH)₂ + NADP ⁺ La Trx(SH) ₂ est recyclée par la Thioredoxine réductase
Glutaredoxin	GRX Substrat oxydé + Grx(SS) + NADPH + GSH \rightarrow Substrat réduit + Grx(SH)₂ + NADP ⁺ + GSSG La Grx(SH) ₂ est recyclée par la Glutaredoxin réductase
Glutathion S-transferase	GST $RX + GSH \rightarrow HX + R-S-GSH$
Peroxiredoxin	PRX $2 R'-SH + ROOH \rightarrow R'-SS-R' + H_2O + ROH$

Les superoxydes dismutases

L'O₂^{·-} étant le principal précurseur de ROS, sa dismutation par la superoxyde dismutase (SOD) est importante pour l'organisme et la signalisation cellulaire. La SOD cytoplasmique Cu/ZnSOD (SOD1), la SOD mitochondriale MnSOD (SOD2) et la SOD extracellulaire Cu/ZnSOD (SOD3) sont produites à partir de gènes distincts et sont

localisées dans des compartiments différents mais elles catalysent la même réaction en convertissant l' $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 (Pisoschi and Pop 2015).

Les catalases et les glutathion peroxydases

Par la suite, la catalase (CAT) et la Glutathion peroxydase (GPX) sont toutes les deux capables de transformer le H_2O_2 généré par les SOD en eau et dioxygène.

La CAT se retrouve principalement dans les peroxysomes alors que la GPX est localisée dans des compartiments cellulaires différents (cellulaire ; extracellulaire et liée à la membrane). Lors de la réaction de la GPX avec le H_2O_2 , deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en sa forme oxydée, le glutathion-disulfure (GSSG). La glutathion réductase (GR) permet de régénérer le GSH à partir du GSSG. La quantité de GSH cellulaire étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour maintenir l'activité de la GPX. La GPX permet également de réduire les produits de la peroxydation lipidique (ROOH). D'autres enzymes sont également essentielles pour réduire des constituants biologiques altérés (protéines, lipides, ...) incluant la Thioredoxin (TRX), la glutaredoxin (GRX), la glutathion S-transferase (GST) et la peroxiredoxin (PRX).

1.5.3.b. *Les systèmes non-enzymatiques*

Les antioxydants non enzymatiques comprennent des composés de bas poids moléculaire endogènes ou exogènes, apportés par les aliments.

Le glutathion

Le GSH est un tripeptide composé de L- γ -glutamyl- L-cysteinyl- L-glycine. Sa cystéine lui confère sa fonction thiol et son activité antioxydante. Il est retrouvé dans les cellules à des concentrations de 1-10 mM. Non seulement, il participe à la détoxification du stress oxydatif et représente le principal « baromètre » du potentiel redox intracellulaire (rapport GSH/ GSSG) mais il participe également à la régulation du cycle cellulaire et aux fonctions immunitaires (Lu 2013). Il est capable de réagir directement avec les ERO ($O_2^{\cdot -}$ et OH^{\cdot}) pour limiter leur production. Enfin, il est également essentiel à différentes enzymes antioxydantes (Tableau 4) et peut régénérer la vitamine E.

Les vitamines et caroténoïdes

La vitamine E (α -tocophérol, forme liposoluble) est un antioxydant essentiel pour protéger les membranes cellulaires de la peroxydation en éliminant les radicaux lipoperoxydes (ROO \cdot) (Pratico, Tangirala et al. 1998). Contrairement à la vitamine E, la vitamine C est soluble dans l'eau. La vitamine C est capable de réduire divers ERO/ERN, des radicaux soufrés et l'HOCl. Certaines espèces comme les plantes sont capables de synthétiser ces deux vitamines mais chez l'homme elles doivent être apportées par la nourriture. Les caroténoïdes (vitamine A, bêta-carotène) présentent des propriétés antioxydantes en empêchant la peroxydation lipidique et en réagissant avec les radicaux libres via le transfert d'électron, d'hydrogène ou encore la liaison avec les radicaux. Ils sont également capables de régénérer la vitamine E.

Les minéraux

Le cuivre, le zinc, le fer, le manganèse et le sélénium sont essentiels pour le fonctionnement de certains enzymes antioxydantes et sont désignés comme des micronutriments antioxydants. Cependant certains sont également impliqués dans la production d'ERO (Tokarz, Kaarniranta et al. 2013).

L'Acide urique, la bilirubine et certaines protéines : antioxydants plasmatiques

L'acide urique est efficace pour réagir avec les ERO et protéger les membranes plasmiques de la peroxydation lipidique, particulièrement celles des érythrocytes car il représente environ 60% de la capacité antioxydante du plasma. La bilirubine est quant à elle importante pour lutter contre la peroxydation lipidique et peut être régénéré rapidement à partir de la biliverdine, impliquant la biliverdine réductase. La capacité antioxydante du plasma est également attribuée à différentes protéines incluant la ferritine, la transferrine, la céruloplasmine ou encore l'albumine. Elles agissent indirectement en piègeant les métaux de transition responsables de la production d'ERO (Fabbrini, Serafini et al. 2014).

Antioxydants phénoliques

Les polyphénols ou les composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal et représentent une large famille d'antioxydants. Leur propriété

antioxydante résulte de leur structure composée d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH). Ils sont capables de piéger directement les ERO ($O_2^{\cdot-}$, ROO^{\cdot} et OH^{\cdot}) par un transfert d'hydrogène ou d'induire la synthèse de certaines enzymes antioxydantes (Harasym and Oledzki 2014).

1.5.3.c. *Voies de signalisation dépendantes du statut redox*

Afin de limiter les dommages oxydatifs, l'organisme est également doté de systèmes de défense qui seront déclenchés suite à un déséquilibre de l'état redox. Il s'agit des voies de signalisation et des facteurs de transcription sensibles au potentiel redox. Ces systèmes permettent de rétablir un état redox physiologique (induction des enzymes de phase I et II, et des systèmes de piégeage non enzymatiques tel que le GSH). Différents systèmes ont été décrits comme la voie *Nuclear erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/Kelch-Like ECH-associated protein (Keap1)*, la voie *Nuclear factor kappaB (NF- κ B)*, la voie de la protéine adaptatrice p66Shc et la voie de survie cellulaire PIK3-PKB(AKT)/GSK3 (Schieber and Chandel 2014).

1.5.3.a. *Les systèmes d'élimination des produits oxydés*

En condition physiologique, la cellule possède différents systèmes de recyclage, de réparation ou d'élimination pour éviter l'accumulation des produits oxydés. Cette dernière ligne de défense est composée du système ubiquitine-protéasome et de la voie autophagie-lysosome (Figure 11). Deux prix Nobel ont reconnu l'importance fondamentale de ces deux systèmes de dégradation en 2004 (Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose) et en 2016 (Yoshinori Ohsumi), respectivement. Ces systèmes complémentaires sont interconnectés en cas d'attaques oxydatives.

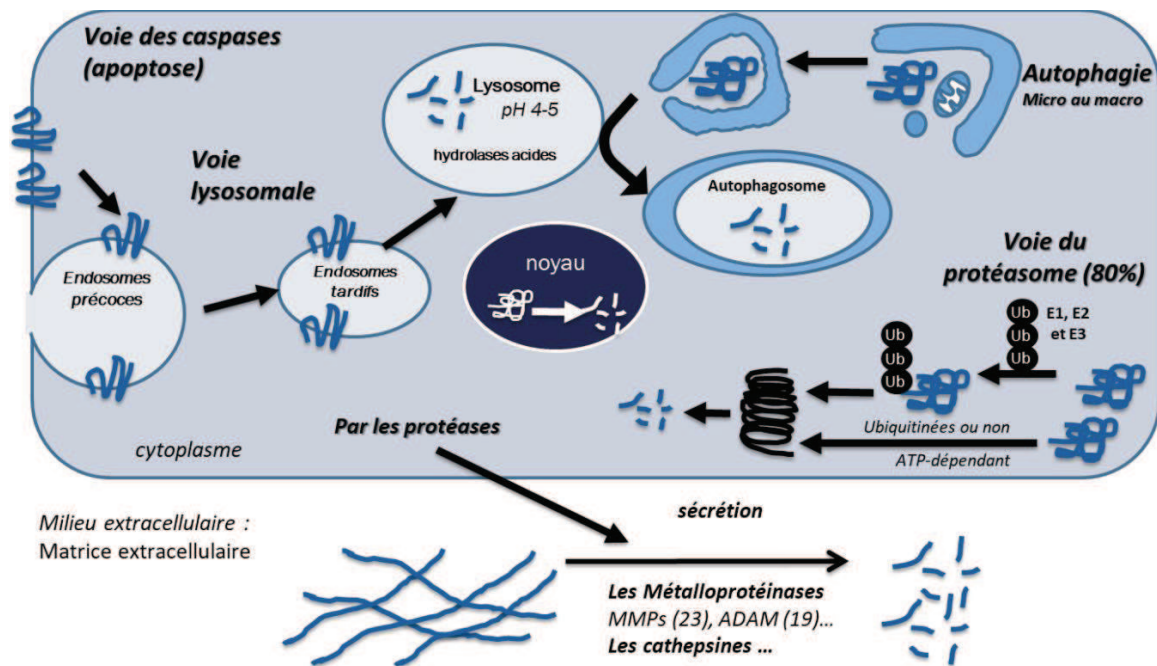


Figure 11 : Schématisation des différents systèmes catalytiques de la cellule.

Le système ubiquitine-protéasome

Le système ubiquitine-protéasome est à l'origine de plus de 80% de la dégradation des protéines à courte durée de vie mais également celles qui sont mal repliées ou oxydées. Le protéasome 26S fait intervenir un ensemble protéique complexe de plus de 2500 KDa. Ce complexe est constitué de différents sous-complexes : une particule centrale (20S) responsable de la fonction catalytique et des parties régulatrices (19S ou 11S). Cependant, l'association des différentes unités va donner naissance à une variété de protéasomes qui vont différer structurellement et fonctionnellement (Figure 12). Leurs cibles ne seront également pas les mêmes. Alors que le complexe 26S est ubiquitine/ATP dépendant, le 20S libre ne l'est pas (Tai and Schuman 2008). Le corps protéolytique 20S (700 KDa) est constitué de 28 sous-unités organisées en quatre cycles de sept sous-unités: deux cycles constitués de sous-unités α et deux autres cycles constitués de sous-unités β . Les anneaux sont empilés les uns sur les autres pour former un cylindre compact et une cavité creuse. Les six sites protéolytiques sont situés sur les sous-unités β de la cavité centrale et présentent trois activités protéolytiques différentes. Il s'agit des activités « Caspase-like » (β 1), « Trypsin-like »

couplant ($\beta 2$) et « Chymotrypsin-like » ($\beta 3$) (Figure 12). Ensemble, elles sont capables de découper les protéines en peptides de 2 à 24 résidus (Dikic 2017).

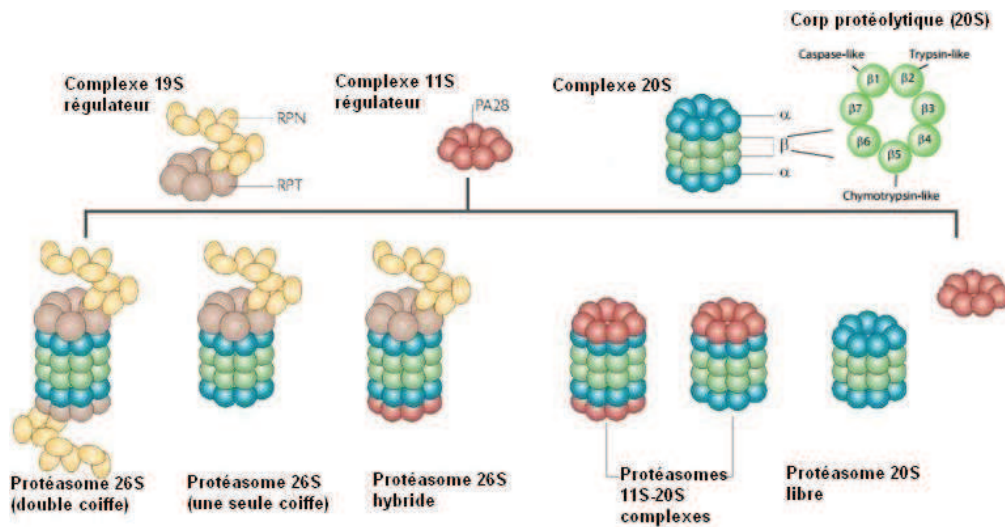


Figure 12 : Représentation des différentes variétés de protéasomes formés avec les différents complexes. Figure modifiée de (Tai and Schuman 2008)

Le complexe 26S dégrade les protéines en plusieurs étapes hautement régulées (Figure 13). Tout d'abord les protéines ciblées par la dégradation du 26S doivent être marquées par une chaîne d'ubiquitines faisant intervenir 3 enzymes : L'*ubiquitin-activating* (E1), l'*ubiquitin-conjugating* (E2) et l'*ubiquitin-ligase* (E3). Par la suite, la partie régulatrice 19S du protéasome va pouvoir reconnaître la chaîne d'ubiquitines et la lier. Le complexe 19S régule la liaison, le déploiement et l'entrée du substrat dans le 20S. Il est composé de deux parties : le couvercle et la base. Le couvercle est composé de 9 protéines non-ATPase (Rpn) qui participent à la reconnaissance de la chaîne d'ubiquitines et à l'élimination de l'ubiquitine des protéines lors de leur entrée dans le 20S. La base du 19S est composée de 4 protéines Rpn et 6 protéines avec une activité ATPase (Rpt) qui permettent l'ouverture de la cavité du 20S pour l'entrée des protéines dans le noyau catalytique (Dikic 2017).

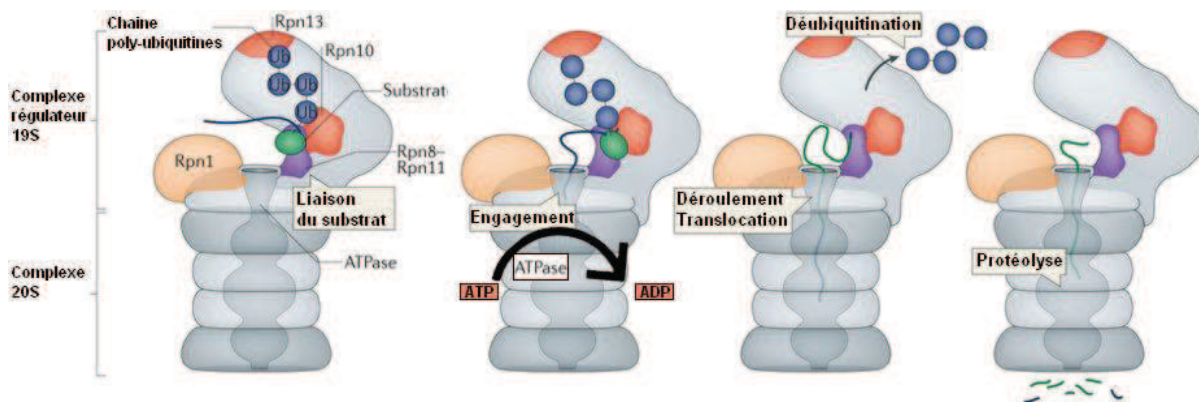


Figure 13 : Représentation schématique des différentes étapes de la dégradation des protéines par le complexe 26S ubiquitine/ATP dépendant

On a longtemps pensé que l'ubiquitination régulaît la fonction du protéasome et que cette étape était indispensable pour la dégradation des protéines. Cependant, la composition des protéasomes n'est pas statique car elle doit être ajustée dynamiquement suivant les besoins et l'état de la cellule. Le protéasome joue un rôle important dans l'adaptation de la cellule face au stress oxydatif (Raynes, Pomatto et al. 2016). Lors d'un stress aigu, la coiffe régulatrice 19S se dissocie du protéasome 26S pour libérer le complexe 20S qui représente le principal système capable d'hydrolyser directement les protéines oxydées (ATP et ubiquitine/indépendant).

Alors que le protéasome 20S a longtemps été considéré comme une protéase inactive sans sa liaison aux complexes régulateurs 19S, d'importantes études ont clairement démontré que le complexe 20S libre joue un rôle majeur dans la dégradation des protéines, indépendamment de l'ubiquitine et de l'ATP. De plus, il représente la forme majoritaire dans le cytoplasme et le noyau. Récemment, il a également été retrouvé actif dans les milieux extracellulaires incluant le plasma ou le liquide céphalorachidien où il est appelé protéasome circulant. Plusieurs études indépendantes ont confirmé que le système 20S représente la principale voie de dégradation des protéines oxydées. À l'inverse, ces études révèlent que le complexe 26S est incapable d'hydrolyser sélectivement les protéines oxydées (Davies 1993, Shringarpure, Grune et al. 2003). L'oxydation engendre des modifications et des changements de conformation des protéines qui entraînent l'exposition des résidus hydrophobes. Les résidus hydrophobes

sont essentiels pour la reconnaissance et l'entrée du substrat par le protéasome 20S, évitant ainsi les étapes d'ubiquitination et d'hydrolyse de l'ATP (Figure 14).

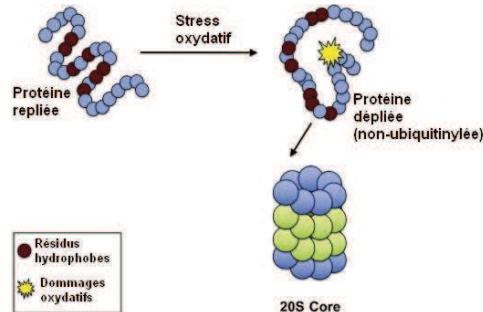


Figure 14 : Représentation de la dégradation sélective des protéines oxydées par le protéasome 20S

En 2012, Kastle et al ont révélé que les protéines oxydées étaient très peu ubiquitinées confirmant l'implication du 20S (Kastle, Reeg et al. 2012). De plus, des études *in vitro* indiquent que le protéasome 20S est relativement stable après une exposition au H₂O₂ contrairement au 26S qui devient inactif (Reinheckel, Sitte et al. 1998, Reinheckel, Ullrich et al. 2000)

Le protéasome est également essentiel dans la régulation de la signalisation et de la transcription cellulaires (dégradation d'inhibiteurs).

La voie autophagie-lysosome

Alors que le protéasome est sélectif des protéines, la voie de l'autophagie-lysosome est capable de dégrader des composés cellulaires hétérogènes. Ce système reconnaît et élimine des composants cellulaires plus volumineux et potentiellement toxiques tels que des agrégats de protéines et des organites dysfonctionnels. Cette voie est essentielle pour l'adaptation de la cellule face à divers stress cellulaires comme la privation de nutriments, l'hypoxie ou encore le stress oxydatif. Il existe trois types différents de voies d'autophagie : la microautophagie, la macroautophagie et l'autophagie liée aux protéines chaperones. Ces voies diffèrent dans la manière dont le matériel est amené au lysosome où se déroule la dégradation. La macroautophagie représente la forme la mieux caractérisée (Figure 15).

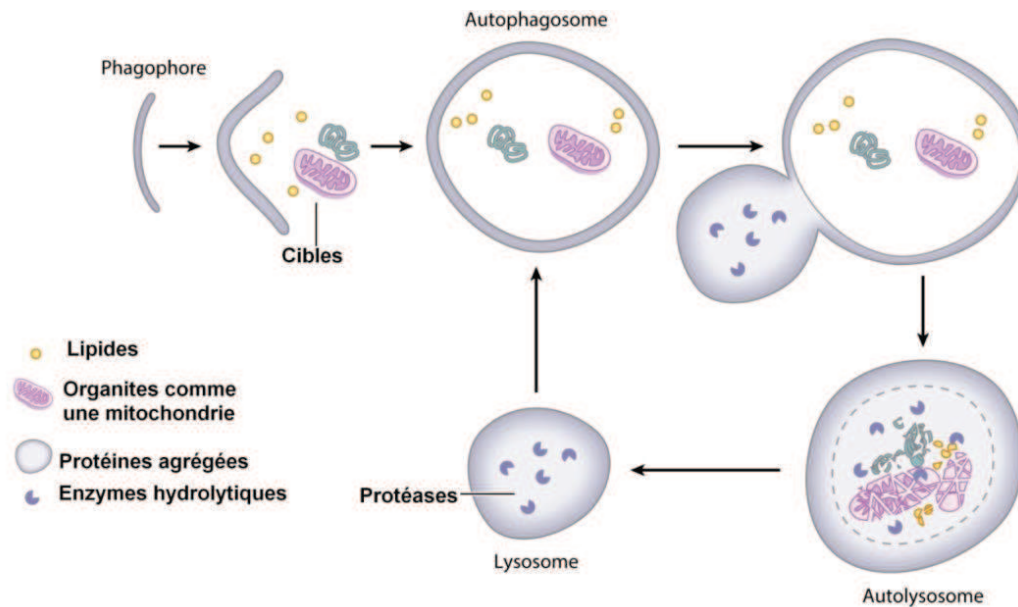


Figure 15 : Représentation schématique de l'autophagie des composés cellulaires. Figure adaptée de (Dikic 2017).

Le matériel cellulaire à éliminer est englouti par une structure à double membrane appelée phagophore qui se ferme pour former l'autophagosome. Les autophagosomes matures sont ensuite transportés le long des microtubules pour fusionner avec les lysosomes contenant un milieu acide et des hydrolases. Cette voie complexe fait intervenir un nombre important de protéines. Par le biais des récepteurs à l'autophagie présents à la membrane du phagophore, l'autophagie peut cibler de manière sélective des structures cellulaires telles que des organites, des composants nucléaires, le protéasome, des agrégats de protéines, des granules de stress ou des bactéries (Dikic and Elazar 2018).

Dans le contexte d'un stress oxydatif, l'autophagie est activée suite à l'inhibition ou la surcharge du protéasome. De plus l'autophagie est indispensable pour éliminer les organites endommagés ou les agrégats de protéines toxiques et résistants à la dégradation des protéasomes (Lee, Giordano et al. 2012). Cette voie est également responsable du renouvellement des mitochondries.

Les vésicules extracellulaires

En cas d'altérations des systèmes d'élimination, la cellule peut encore éliminer les composés altérés et toxiques dans le milieu extracellulaire via les vésicules

extracellulaires. Les fonctions et caractéristiques de ces vésicules extracellulaires seront décrites dans la partie consacrée aux vésicules extracellulaires (voir 1.7.4. Utilisation des vésicules extracellulaires pour l'identification de nouveaux biomarqueurs potentiels).

1.5.4. Les moyens de mesure du stress oxydatif

La mesure du stress oxydatif constitue un défi analytique important. Différentes méthodes sont disponibles pour évaluer le stress oxydatif *in vivo*, *in vitro* ou dans les liquides biologiques. Il existe des techniques directes qui mesurent les ERO/ERN mais il est important de noter que dépendamment du contexte leur utilité et leur fiabilité sont limités par la durée de vie infiniment courte des ERO/ERN (Tableau 3). C'est pourquoi, des méthodes indirectes ont été développées pour doser les produits d'oxydation ou encore la capacité antioxydante.

1.5.4.a. Détection directe des espèces réactives

Les propriétés réactives et peu diffuses des ERO/ERN rendent leur mesure difficile dans les milieux biologiques complexes. Les méthodes de détection doivent être suffisamment rapides et sensibles pour rivaliser avec les vitesses spontanées de leur réaction avec les composés biologiques ou les enzymes intracellulaires.

La Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)

La technique de Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) est une méthode de spectroscopie sous champ magnétique qui permet la détection directe de molécules possédant au moins un électron libre. Elle représenterait une des techniques les plus fiables pour la mesure directe des espèces réactive dans les modèles *in vivo* lorsque qu'elle est couplée à des traceurs qui correspondent à des piègeurs d'ERO/ERN, nommés « spin traps » (Matsumura, Emoto et al. 2015). Deux molécules utilisées comme piègeurs sont le 5,5-Dimethyl-pyrroline-1-oxide et l'alpha-(4-Pyridyl-1-oxide)-N-tert-butylnitron. La réaction entre l'ERO/ERN et le piègeur engendre la formation d'un nouveau composé paramagnétique mesurable et relativement plus stable que les ERO/ERN d'origine (Frejaville, Karoui et al. 1995, Fang, Zhang et al. 2016).

La chimioluminescence

La chimioluminescence peut être utilisée pour des molécules qui ont la propriété physique à l'état excité de réémettre la lumière en retournant à l'état basal. Certains ERO, tel que l'oxygène singulet possède cette particularité (Boveris, Cadenas et al. 1980). D'autres réactions impliquant des radicaux peuvent également émettre de la lumière telle que la réaction de Fenton (Gonzalez Flecha, Llesuy et al. 1991). Cette technique est peu utilisée pour la mesure du stress oxydatif mais elle peut être couplée à l'utilisation d'une sonde ou d'un amplificateur pour stimuler l'émission de lumière résultant de la réaction avec l'oxydant. Le Luminol est largement utilisé pour évaluer les ERO/ERN. Cette technique n'est cependant pas spécifique d'une espèce réactive en particulier car de nombreuses molécules peuvent réagir avec le Luminol (OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, ONOO^- ou encore le H_2O_2) (Lu, Song et al. 2006).

Les sondes fluorescentes

Les ERO/ERN intracellulaires peuvent être détectés par des sondes fluorescentes comme le DCFH-DA : 2'-7' dichlorofluorescéine diacétate. La sonde est assez lipophile pour traverser la membrane plasmique et se retrouver dans le cytoplasme où elle sera transformée dans sa forme active par les estérases cellulaires (DCFH). La réaction du DCFH avec les ERN/ERN entraîne la formation d'un produit fluorescent, la dichlorofluorescéine (DCF). Ainsi la quantité de fluorescence peut refléter la quantité d'ERO/ERN présents. De nombreuses sondes ont été mises au point sur ce principe comme la dihydrorhodamine 123 (DHR 123), la dihydroéthidium ou encore la diamino fluorescein. L'utilisation de sondes permet d'évaluer l'ensemble des ERO/ERN et non une espèce en particulier. Cette technique révèle de nombreuses limites à prendre en compte. Le radical intermédiaire de la réaction ($\text{DCF}^{\bullet-}$) peut rapidement réagir avec l'oxygène pour former l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ qui produira à son tour de l' H_2O_2 ce qui peut conduire à une amplification artificielle de l'intensité du signal de fluorescence (Kalyanaraman, Darley-Usmar et al. 2012).

Utilisation d'électrodes spécifiques

Il est possible de détecter les espèces réactives par des techniques électrochimiques en utilisant des électrodes spécifiques. En effet, il existe des électrodes pour mesurer l' $\text{O}_2^{\bullet-}$,

H_2O_2 , le NO^\bullet ou encore le ONOO^- . Le principe de la détection électrochimique consiste à oxyder (ou réduire en milieu anaérobie) la molécule d'intérêt, directement ou indirectement à la surface d'une électrode. La différence de potentiel, liée au flux d'espèces détectées, rendra compte de la quantité d'ERO/ERS. Il y a peu d'intérêt d'utiliser cette technique pour l'évaluation directe des espèces réactives du fait de leur durée de vie extrêmement courte. Elle peut cependant être utilisée pour des mesures indirectes comme l'évaluation de la capacité antioxydante d'un échantillon (Apollo 4000).

1.5.4.b. *Détection indirecte du stress oxydatif*

Le niveau du stress oxydatif peut être estimé par l'évaluation des dommages engendrés par les espèces réactives. Les produits oxydés sont relativement plus stables que les espèces réactives et peuvent être mesurés par différentes techniques.

Lipides oxydés

Les acides gras polyinsaturés comme l'acide arachidonique et docosahexaénoïque, sont des composés particulièrement vulnérables vis-à-vis du stress oxydatif. L'oxydation non enzymatique des lipides polyinsaturés des membranes ou des lipoprotéines par les ERO/ERN conduit à la formation de nombreux composés.

L'oxydation des lipides polyinsaturés est un processus radicalaire de réactions en chaîne, connue sous le nom de peroxydation lipidique, qui se décompose en trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison (Figure 16). La phase d'initiation correspond à l'attaque d'une espèce radicalaire (l'oxygène singulet, le peroxy-nitrite ou les radicaux hydroxyles, alcoxyles et peroxyles) sur la double liaison (hydrogène le plus labile) d'un acide gras polyinsaturé. Cette attaque engendre la formation d'un radical peroxy (ROO^\bullet) qui peut à son tour réagir en chaîne avec une nouvelle double liaison créant l'étape de propagation. La phase de terminaison et de dégradation entraîne la formation d'aldéhydes, parmi lesquels on retrouve l'acroléine, le MDA, le 4-HNE, ou les isoprostanes. De nombreuses méthodes peuvent être utilisées pour déterminer la concentration de ces lipides oxydés.

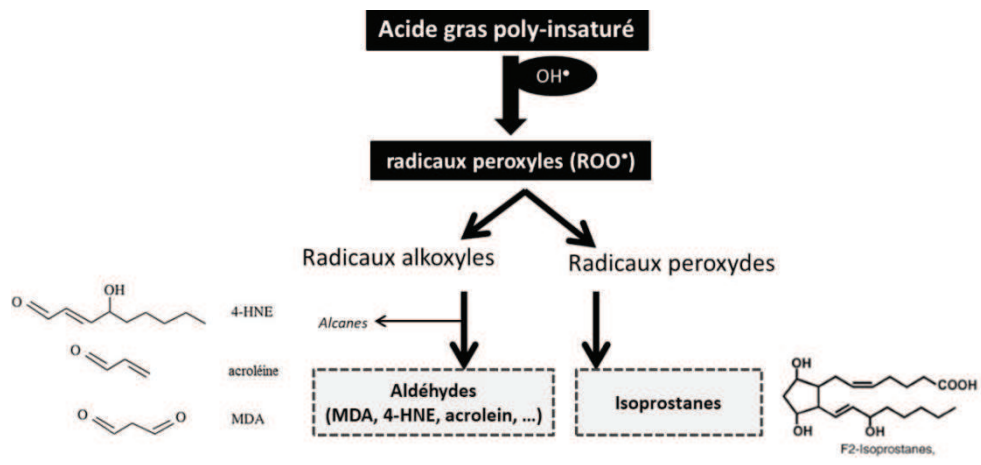


Figure 16 : Schématisation du phénomène de peroxydation lipidique engendrant la formation de produits primaires et secondaires.

Parmi les aldéhydes insaturés, l'acroléine est le plus réactif des trois (Figure 16). Il est responsable de l'oxydation des protéines en réagissant avec les histidines, les lysines et les groupements sulfhydryls (S-H) des cystéines. Cette forte réactivité ne facilite pas son utilisation comme marqueurs du stress oxydatif. Le MDA peut également se combiner aux protéines. La majorité des dosages visant à mesurer la concentration de MDA repose sur sa dérivatisation avec l'acide thiobarbiturique communément appelée test TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactivity Reactive Substances*). Cependant, cette technique peut surestimer le taux de MDA car l'acide thiobarbiturique peut réagir avec de nombreux composés dans un milieu complexe (Knight, Pieper et al. 1988). Le 4-HNE est lui aussi très réactif vis-à-vis des protéines sur les lysines, histidine et cystéines. La liaison du 4-HNE aux différents résidus peut être mesurée grâce à des anticorps dirigés contre le 4-HNE lié à un résidu aminé ou par des méthodes de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Enfin, les isoprostanes sont une famille complexe de composés issus du métabolisme radicalaire de l'acide arachidonique nommées F2-isoprostanes ou d'autres acide gras polyinsaturés comme l'acide eicosapentaénoïque (isoprostanes de type F3) (Pratico, Barry et al. 1998). Les isoprostanes sont des produits spécifiques de la peroxydation lipidique, stables et quantifiables à l'état basal dans les liquides et tissus biologiques (Gopaul, Halliwell et al. 2000, Soffler, Campbell et al. 2010). Deux méthodes sont utilisées pour le dosage des isoprostanes : la chromatographie en phase gazeuse

couplée à la spectrométrie de masse et les méthodes immunologiques (Soffler, Campbell et al. 2010).

Protéines oxydées

Les ERO/ERN peuvent modifier les résidus d'acides aminés et entraîner des modifications de conformation et une perte de fonction des protéines. Le produit d'oxydation va dépendre des espèces réactives impliquées et des acides aminés ciblés. Par exemple, l'OH[•] favorise l'oxydation des acides aminés aromatiques tels que le tryptophane et la tyrosine, tandis que les radicaux peroxy (ROO[•]) entraînent l'oxydation des acides aminés aliphatiques. Certaines altérations sont réversibles comme la formation de Met-sulfoxyde à partir de l'oxydation de la méthionine par les peroxy-nitrites (Liang, Kaya et al. 2012). En effet, les groupements Met-sulfoxydes peuvent revenir à leur état réduit par les méthionine sulfoxyde reductases (MSR). En revanche, d'autres correspondent à des modifications irréversibles comme la formation de protéines carbonylées ou encore de 3-nitrotyrosine (Figure 17).

Les protéines carbonylées correspondent à un produit final stable. C'est pourquoi, elles sont très vite devenues un marqueur intéressant pour évaluer le stress oxydatif (Berlett and Stadtman 1997, Dalle-Donne, Rossi et al. 2003). La carbonylation est la formation de groupements aldéhydes ou cétones par l'oxydation de certains acides aminés sur les chaînes latérales. De nombreuses ERO peuvent être responsables de la carbonylation directe des protéines sur la lysine, l'arginine, la proline et la thréonine. Les groupements carbonyles peuvent également provenir de réactions secondaires. En effet, la réaction des produits de l'oxydation des lipides tels que l'acroléine, le MDA ou le 4-HNE avec la cystéine, l'histidine ou encore la lysine engendre la formation de protéines carbonylées. De plus, la réaction de la lysine avec des produits de la glycation entraîne l'ajout de groupements carbonyles. Ainsi, il est important de noter que la présence de carbonyles n'est pas nécessairement indicative de l'oxydation directe de résidus d'acides aminés mais leur présence révèle l'état de stress oxydatif général.

la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) couplée ou non à la spectrométrie de masse (Teixeira, Fernandes et al. 2016).

ADN/ARN oxydés

Les acides nucléiques représentent également une cible pour les ERO/ERN (Barzilai and Yamamoto 2004). L'OH• peut réagir avec l'ADN engendrant différentes lésions incluant l'oxydation de bases et la cassure de brins d'ADN. L'oxydation des bases correspond au dommage le plus fréquent et plus de 20 types d'oxydation de bases ont été identifiées. La guanine est la cible préférentielle de plusieurs processus oxydants. Ainsi, les deux marqueurs les plus fréquemment utilisés sont le 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) et le 8-hydroxyguanosine (8-OHG) pour mesurer l'oxydation de l'ADN et l'ARN, respectivement. Ils peuvent être mesurés avec l'ELISA ou encore par chromatographie liquide associée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC/MS/MS).

Mesure de la capacité antioxydante

Une autre manière indirecte de mesurer le stress oxydatif d'un échantillon est de mesurer sa capacité antioxydante. La capacité antioxydante représente la quantité et l'activité des différents composés antioxydants présents dans un échantillon (enzymatique ou non). Ainsi toutes les enzymes et les composés introduits plus haut (1.5.3.a. Systèmes de défense antioxydante) peuvent être mesurés. La mesure des thiols réduits, du glutathion et plus particulièrement le rapport GSH/GSSG peut également refléter l'état redox d'un échantillon biologique.

Enfin, il existe différentes méthodes pour évaluer la capacité dite « totale » d'un échantillon donné. Il s'agit des tests TEAC (*trolox equivalent antioxidant capacity*), DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*), FRAP (*ferric reducing antioxidant power*), ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*) ou encore TRAP (*total radical-trapping antioxidant parameter*). Ces méthodes reposent sur des principes différents et ne mesure pas forcément les mêmes composés antioxydants (Ghiselli, Serafini et al. 2000, Serafini and Del Rio 2004). Les antioxydants peuvent réduire les radicaux par deux mécanismes : par transfert d'électron ou par transfert d'atome d'hydrogène. Ainsi, ces tests peuvent être séparés en deux groupes suivant ces caractéristiques (Tableau 5).

Tableau 5 : Classification des différentes méthodes pour mesurer la capacité antioxydante.

Mécanismes	Méthodes
Méthodes basées sur le transfert d'électron	TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) FRAP (Ferric reducing antioxidant power) Réactif Folin-Ciocalteu (dosage des polyphenols totaux)
Méthodes basées sur le transfert d'hydrogène	ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) TRAP (Total radical-trapping antioxidant parameter)

Dans la méthode TEAC, l'activité antioxydante totale est évaluée par la capacité de l'échantillon à inhiber le radical ABTS^{•+}, obtenu à partir de l'ABTS (acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) comparativement à un antioxydant de référence : le Trolox (eq. à la Vitamine E). La diminution de l'absorbance à 734nm de l'ABTS^{•+} peut être évaluée par spectrophotométrie. Tout comme le TEAC, la technique utilisant le DPPH est une méthode colorimétrique basée sur la perte d'absorbance à 515 nm due à la réduction du DDPH par la présence d'antioxydants.

La méthode FRAP est un dosage colorimétrique basé sur la capacité d'un échantillon biologique à réduire le fer (le passage de la forme ferrique à ferreux). Cependant, d'autres molécules que les antioxydants sont capables de réagir lors de cette réaction.

La méthode de l'ORAC est également fréquemment utilisée pour mesurer la capacité antioxydante. Dans cet essai, l'AAPH (2,2'-azobis-2-aminopropane dihydrochloride) est utilisé comme source génératrice de radicaux peroxydes. L'addition de fluorescéine permet de quantifier la perte de fluorescence associée à la réaction avec les radicaux libres fournis par l'AAPH par un mécanisme de transfert d'atome d'hydrogène. La présence d'antioxydants empêche ou ralentit la perte de fluorescence.

Enfin, la méthode TRAP est basée sur la mesure de la protection fournie par les antioxydants sur la diminution de la fluorescence de la R-phycoérythrine au cours d'une réaction de peroxydation contrôlée.

La capacité antioxydante d'un échantillon vis-à-vis d'une espèce réactive spécifique peut également être évaluée par des techniques électrochimiques en utilisant des électrodes spécifiques. L'APOLLO 4000 permet d'analyser la capacité antioxydante

grâce à des électrodes spécifiques de l'H₂O₂ ou encore du NO[•]. La dégradation de l'espèce réactive en présence d'antioxydants peut être mesurée par les électrodes grâce à l'élaboration d'une gamme étalon de l'espèce réactive.

Une seule méthode ne peut tenir compte de la diversité de la nature des antioxydants (hydrophiles, hydrophobes) ainsi que la complexité des processus d'oxydo-réduction impliqués dans les réactions des différentes techniques citées ci-dessus. Bien que de fortes corrélations aient été établies entre les différentes techniques, il est important de caractériser la pouvoir antioxydant d'un échantillon par la combinaison de plusieurs méthodes.

1.5.5. Le stress oxydatif dans le cas de la maladie d'Alzheimer

Le stress oxydatif est également étroitement lié à la pathogenèse des maladies neurodégénératives. Nous ignorons encore comment le processus neuropathologique de la MA se déclenche précisément mais il est maintenant clair qu'il y joue un rôle capital. Un nombre considérable d'études *in vitro*, *in vivo* et en *post mortem* appuient ce propos.

Parmi les différents organes du corps, le cerveau est particulièrement vulnérable au stress oxydatif en raison de sa forte irrigation, sa forte utilisation d'oxygène (20%), sa faible quantité d'enzymes antioxydantes et sa teneur élevée en acides gras polyinsaturés facilement oxydables (Coyle and Puttfarcken 1993). L'hypothèse du stress oxydatif pourrait expliquer l'apparition lente et progressive de la MA. En effet, il est maintenant clair que la MA s'installe plusieurs décennies avant l'apparition des symptômes. L'augmentation du stress oxydatif correspond à un vieillissement physiologique (Harman 1956) mais dans certains cas, elle peut être exacerbée et engendrer des maladies neurodégénératives. Il est encore impossible d'expliquer l'origine de cette différence mais il est pourtant clair qu'il existe une augmentation marquée des marqueurs oxydatifs dans le cerveau des patients atteints de la MA par rapport aux patients témoins de même âge.

1.5.5.a. *Évidences des dommages oxydatifs cérébraux*

Différentes études révèlent que l'apparition des marqueurs oxydatifs précède (et accompagne) la pathologie de l'A β dans des modèles de souris transgéniques AD (Pratico, Uryu et al. 2001, Belkacemi and Ramassamy 2012). Les cerveaux de ces animaux révèlent une augmentation des produits de la peroxydation lipidique (MDA, les isoprostanes et le 4-HNE), des protéines oxydées (les carbonyles et le 3-nitrotyrosine) et une augmentation de certaines enzymes antioxydantes telles que la SOD ou la GPX. Des études en *post-mortem* ont confirmé ces études chez l'homme. En effet, on ne compte plus le nombre d'études qui montrent une augmentation des produits du stress oxydatif dans le cerveau des patients atteints de la MA et des sujets MCI, ce qui confirme l'implication précoce du stress oxydatif dans la MA (Nunomura, Perry et al. 2001). De plus, l'augmentation des marqueurs de l'oxydation est particulièrement présente dans les régions cérébrales touchées dans la MA.

Lipides oxydés

Les sous-produits de la peroxydation lipidique les plus étudiés dans les cerveaux MA sont les aldéhydes réactifs (4-HNE, le MDA et l'acroléine) et les isoprostanes (les F2-isoprostanes et F4-neuroprostanes). Les taux de ces différents produits couplés aux protéines sont significativement élevés dans l'hippocampe, le cortex entorhinal, le cortex temporal et l'amygdale chez les patients atteints MCI et MA par rapport à des personnes témoins du même âge (Lyras, Cairns et al. 1997, Montine, Reich et al. 1998, Markesbery, Kryscio et al. 2005, Williams, Lynn et al. 2006, Singh, Dang et al. 2010, Wang, Wang et al. 2014). Ces altération lipidiques sont moins visibles dans le cervelet des patients MA (Pratico, V et al. 1998). Ramassamy et son équipe ont démontré que l'acroléine peut conduire à la déplétion du glutathion, la génération du 4-HNE et des protéines carbonylées (Dang, Arseneault et al. 2010, Dang, Arseneault et al. 2011). De plus, ils ont mis en évidence que l'administration d'acroléine pouvait induire des caractéristiques de la MA *in vitro* et *in vivo* (Huang, Jin et al. 2013). La peroxydation lipidique est également étroitement liée au génotype de l'ApoE. En effet, Ramassamy et al ont révélé que les cerveaux des patients possédant le génotype ApoE $\epsilon 4/\epsilon 4$

présentaient une quantité de lipides peroxydés plus importante par rapport au ϵ_3/ϵ_3 (Ramassamy, Averill et al. 1999).

Protéines oxydées

On retrouve une plus forte quantité de protéines carbonylées et de 3-nitrotyrosine dans différentes régions cérébrales comme l'hippocampe de patients MCI ou MA (Hensley, Hall et al. 1995, Hensley, Maitt et al. 1998). Des études protéomiques ont été menées pour identifier les protéines susceptibles d'être oxydées dans la MA et les troubles MCI (Butterfield, Poon et al. 2006). Le laboratoire du D. Allan Butterfield, un pionnier dans ce domaine, montre que l' α -enolase (ENO1), la glutamine synthétase (GLUL), la pyruvate kinase M2 (PKM2) et l'isomérase 1 (PIN1) sont significativement oxydées dans l'hippocampe des sujets MCI par rapport aux témoins. Castegna A. et al. ont également révélé la présence de cibles protéiques spécifiques de l'oxydation dans le cerveau MA comme la *creatine kinase BB*, la *glutamine synthase*, l'*ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-* et l'ENO1 (Castegna, Aksenov et al. 2002, Castegna, Aksenov et al. 2002). Dans le cerveau des patients MA, les protéines les plus sensibles à la nitration ont également été identifiées comme le neuropolypeptide h3, l'ENO1, l' γ -enolase, la triosephosphate isomerase et la lactate dehydrogenase (Castegna, Thongboonkerd et al. 2003, Reed, Pierce et al. 2009). Certaines cibles protéiques spécifiques de l'oxydation confirment l'altération des fonctions cognitives et du métabolisme énergétique dans la MA (Martinez, Portero-Otin et al. 2010, Aluise, Robinson et al. 2011).

ADN et ARN altérés

Des altérations de l'ADN sont également retrouvées dans les cerveaux des patients atteints de la MA. Le niveau cérébral du principal marqueur de l'oxydation de l'ADN, l'8-OHdG, est augmenté dans l'ADN cellulaire et mitochondriale chez les patients MA et MCI (Mecocci, MacGarvey et al. 1994). Des études montrent que la capacité de réparation de l'ADN des cellules de patients MA (fibroblastes ou lymphocytes) est plus faible que celle des cellules de donneurs témoins. Ceci explique l'augmentation des cassures de l'ADN retrouvée dans le cortex cérébral des sujets MA (Mullaart, Boerrigter et al. 1990). Différentes études ont démontré que l'ARN était également oxydé de façon

plus importante dans les cerveaux de patients MA (Ding, Markesbery et al. 2006, Lovell and Markesbery 2008). Les ARNm oxydés ont été isolés dans les zones touchées par la MA (cortex frontal et hippocampe) et très peu dans les zones moins affectées par la maladie comme le cervelet.

Produits avancés de glycation

La glycation des protéines démarre par la réaction du glucose ou ses dérivés, les composés dicarbonylés, avec l'amine des protéines induisant la formation d'une base de Schiff qui suite à de nombreux réarrangements donnera les produits de glycation avancée (AGE). Le mécanisme de leur formation est schématisé sur la Figure 18. Ces produits, d'origine exogène et endogène, sont néfastes pour l'organisme et serait impliqués dans la MA et le stress oxydatif.

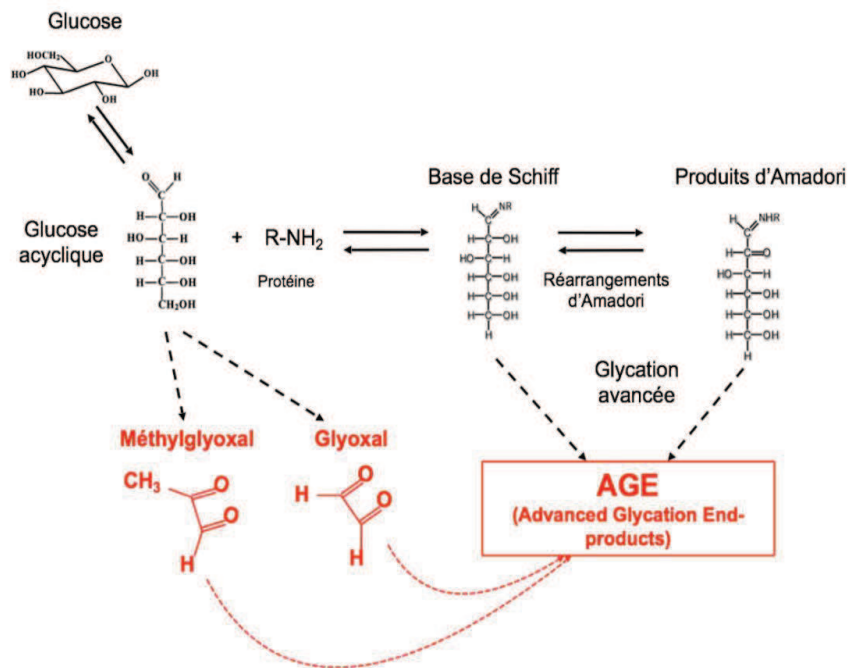


Figure 18 : Formation des produits avancés de glycation (AGE)

Statut antioxydant

Le statut redox cérébral est altéré au début de la maladie comme le confirme la diminution significative du rapport GSH/GSSG dans l'hippocampe des sujets MCI et MA

par rapport aux témoins (Benzi and Moretti 1995, Sultana, Piroddi et al. 2008). Les études analysant le taux ou l'activité de certaines enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GPX, TRX,) se contredisent. Certaines études révèlent une diminution cérébrale d'autre une augmentation en réponse au stress (Pratico 2008). Omar et al. révèlent que le niveau cérébral de certaines enzymes est augmenté mais que leur activité enzymatique est réduite (Omar, Chyan et al. 1999). Ces résultats sont confirmés par de nombreuses équipes (Venkateshappa, Harish et al. 2012).

1.5.5.b. Rôle du stress oxydatif dans la maladie d'Alzheimer

L'accumulation cérébrale de ces différents dommages cellulaires induits par le stress oxydatif est indiscutable mais la raison de cette accumulation fait débat. Plusieurs origines peuvent coexister comme l'âge avancé, le déséquilibre de certains métaux de transition, l'altération mitochondriale ou encore l'accumulation de l'A β (Figure 19).

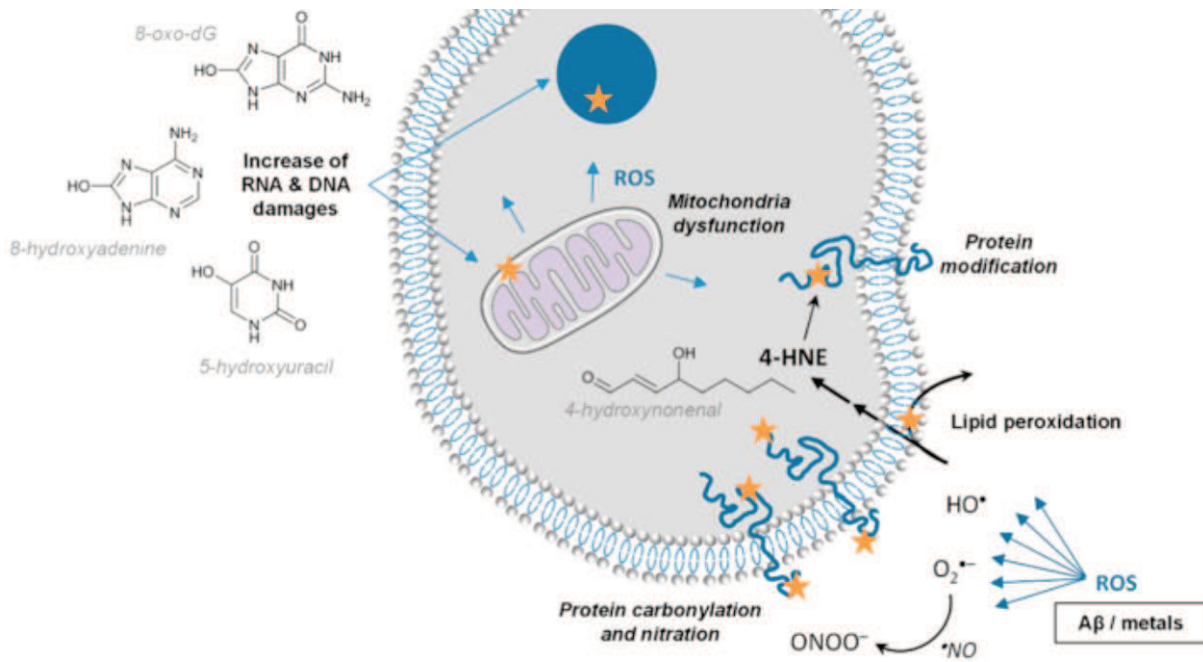


Figure 19: Mécanismes impliquant le stress oxydatif dans la maladie d'Alzheimer

Implication des métaux

Différentes études mettent en relation l'apparition de la MA avec le déséquilibre en oligo-éléments tels que l'Al, le Si, le Pb, l'Hg, le Zn, le Cu et le Fe (Greenough, Camakaris et al. 2013). La perturbation de l'homéostasie cérébrale de ces métaux serait

une des raisons de la production accrue d'ERO/ERN (Good, Perl et al. 1992). De plus, ces éléments pourraient être à l'origine ou accélérer la formation de plaques A β où ils sont retrouvés en grande quantité.

Altération mitochondriale

La mitochondrie représente le principal site de production des ERO (voir 1.5.1.a. Définition, origines et rôles physiologique). Il a donc été suggéré que le dysfonctionnement des mitochondries pourrait être à l'origine d'une production accrue d'ERO et la source majeure du déséquilibre oxydatif observé dans la MA. Ce dysfonctionnement précoce entraîne la réduction du métabolisme énergétique observé chez les patients MCI et MA (Yin, Sancheti et al. 2016). En effet, la réduction du métabolisme du glucose cérébral dans la MA est associé à la diminution de l'expression neuronale de certains gènes codant pour des sous-unités de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale incluant l' *α -ketoglutarate*, le *complexe dehydrogenase*, le *complexe pyruvate dehydrogenase* et le *cytochrome oxydase* (Cottrell, Blakely et al. 2001). L'altération de la morphologie, la dynamique structurelle ainsi que la diminution du nombre de mitochondries ont également été observés dans la MA (Hirai, Aliev et al. 2001).

Implication de l'A β et de la protéine tau

Il existe un lien étroit entre le stress oxydatif et les deux caractéristiques neuropathologiques de la MA. Même si l'ordre d'apparition est encore débattu, des études *in vivo* chez des animaux transgéniques ont indiqué la présence du stress oxydatif avant les premiers dépôts d'A β (Resende, Moreira et al. 2008, Belkacemi and Ramassamy 2012). Le stress oxydatif peut jouer à plusieurs niveaux sur l'A β entraînant un cercle vicieux toxique. La présence du stress oxydatif peut engendrer une production excessive d'A β . En effet, des études ont révélé que la présence du stress oxydatif peut augmenter la production de l'APP, précurseur de l'A β (Cheng and Trombetta 2004) et induire l'expression accrue de la β -sécrétase (BACE1), l'enzyme de la voie amyloïdogénique (Tamagno, Bardini et al. 2002, Tong, Zhou et al. 2005, Borghi, Patriarca et al. 2007). *In fine*, l'induction de la voie amyloïdogénique par le stress oxydatif va conduire à l'augmentation de l'A β (Misonou, Morishima-Kawashima et al.

2000). Notre laboratoire a confirmé que l'acroléine était capable de reproduire *in vitro* et *in vivo* des altérations retrouvées dans la MA (Huang, Jin et al. 2013). En parallèle, la formation d'A β entraîne la production d'H₂O₂ et la peroxydation lipidique qui vont à leur tour entraîner des dommages aux constituants cellulaires et renforcer la neurotoxicité de l'A β (Behl, Davis et al. 1994, Hensley, Carney et al. 1994). En effet, les ERO produits engendrent aux membranes synaptiques une vulnérabilité accrue à l'A β (Harris, Hensley et al. 1995). De plus, Butterfield et son équipe ont mis en évidence que des niveaux élevés d'A β 40 et d'A β 42 étaient associés à des taux importants de produits d'oxydation dans le cortex et l'hippocampe de patients MA (Butterfield and Lauderback 2002). Plusieurs mécanismes pourraient expliquer l'effet inducteur de l'A β . La liaison de l'A β aux ions métalliques tels que le cuivre favorisait la production d'ERO (Cheignon, Tomas et al. 2018). L'accumulation de l'A β serait également responsable de l'altération mitochondriale décrite précédemment, ce qui va indirectement engendrer la production accrue d'ERO (Butterfield and Boyd-Kimball 2004).

Dans un modèle murin transgénique de Tau P301S (mutation du gène MAPT), Dumont et al montre que le stress oxydatif est également présent avant la formation des DNF (Dumont, Stack et al. 2011). En effet, des études ont montré que l'accumulation du stress oxydatif favorise l'hyperphosphorylation de la protéine Tau (Su, Wang et al. 2010). Dans un modèle murin de la MA (Tg2576), une déficience en SOD mitochondriale engendre la phosphorylation de la serine 396 de la protéine Tau (Melov, Adlard et al. 2007). Le stress oxydatif active les kinases responsables de la phosphorylation de la protéine Tau comme la GSK3. Le traitement de cellules corticales de rat avec un mélange de cuivre de H₂O₂ induit l'activité de la GSK3 (Lovell, Xiong et al. 2004) En parallèle, le stress oxydatif engendre également une dysfonction des systèmes d'élimination de la protéine Tau. Les protéines Tau hyperphosphorylées peuvent être éliminées dans un premier temps par le protéasome et les DNF peuvent être dégradées en dernier recours par l'autophagie liée au lysosome. Cependant en cas d'un stress oxydatif, des études ont montré que ces deux systèmes sont inhibés ou altérés ce qui va engendrer l'accumulation des DNF (Hamano, Gendron et al. 2008, Jo, Gundemir et al. 2014).

Finalement, le stress oxydatif et l'accumulation d'A β et de la protéine Tau représente un cercle vicieux dans la pathogénèse de la MA.

Le génotype de l'ApoE

Le niveau du stress oxydatif serait également lié au génotype de l'ApoE4, car il présente un pouvoir antioxydant plus faible comparativement à l'ApoE2 et 3 (Jofre-Monseny, Minihane et al. 2008). De ce fait, l'augmentation des dommages oxydatifs, la réduction du GSH et la diminution de l'activité de certaines enzymes antioxydantes sont plus prononcées dans les cerveaux des patients MA possédant le génotype APOE4 (Ramassamy, Averill et al. 1999, Ramassamy, Averill et al. 2000).

Même si l'origine du stress oxydatif dans la maladie n'est pas encore totalement connu, ses effets néfastes conduisent à la neurodégénérescence. C'est un véritable cercle vicieux car les ERO/ERN et les dommages oxydatifs engendrés vont amplifier l'hyperphosphorylation de la protéine Tau et l'oligomérisation de l'A β . Les neurones, surchargés de produits oxydatifs et de protéines toxiques vont voir leur fonction synaptique diminuer jusqu'à la mort neuronale.

1.6. Diagnostic de la maladie d'Alzheimer

L'origine inconnue de la MA rend difficile son diagnostic certain ainsi que son traitement. À l'heure actuelle, le diagnostic certain de la maladie s'effectue à la mort du patient par la visualisation des lésions neuropathologiques lors de l'autopsie du cerveau. Il existe néanmoins des outils pour évaluer le stade MCI ou la MA dite « possible » ou « probable » au cours de la vie du patient. Ces outils ont évolué au fur et à mesure de la mise à jour des critères de diagnostic.

1.6.1. Démarche générale et utilisation des biomarqueurs dans le diagnostic de la maladie d'Alzheimer

Le diagnostic de la MA repose sur une démarche générale qui comprend plusieurs étapes (un entretien, un examen clinique et des examens paracliniques).

L'entretien est réalisé avec le patient avec ou sans un proche. Il permet de détailler les antécédents médicaux et familiaux de la personne pouvant engendrer des déficiences

cognitives. Il permet de reconstituer l'histoire de la maladie et d'apprécier l'impact des troubles sur les activités de la vie quotidienne. Ceci peut être évalué à l'aide d'échelles telles que l'IADL (Instrumental Activities of Daily Living), le FAST (Functional Assessment Staging Test) ou encore la GDS (Global deterioration scale). Ce rendez-vous permet également de rechercher la présence de signes de dépression ou comportementaux. La dépression survient avec une prévalence élevée allant jusqu'à 50% chez les patients atteints de la MA (Chi, Yu et al. 2014). Cette étape est cruciale car le déclin cognitif peut passer inaperçu chez 21 à 81% des patients à l'entretien (Cordell, Borson et al. 2013). Par la suite, le premier entretien est approfondi pour évaluer l'état général de la personne (poids, tension, vue, ouïe, mobilité, posture, ...). Le clinicien va également procéder à des tests neuropsychologiques pour évaluer les fonctions cognitives de la personne.

1.6.1.a. *Tests cognitifs*

En clinique, différents questionnaires rapides et standardisés ont été mis au point pour évaluer plusieurs fonctions cognitives.

Le MMSE

Le MMSE (Mini Mental State Examination) créé par Folstein (Folstein, Folstein et al. 1975, Folstein, Robins et al. 1983) permet une évaluation des fonctions cognitives globales. Il est composé de plusieurs questions sur 30 points (annexe I) qui évaluent sept domaines cognitifs : l'orientation dans le temps et dans l'espace, le rappel immédiat de trois mots, l'attention, le rappel différé de trois mots et le langage. L'âge, la langue maternelle, le niveau socio-culturel, le niveau d'éducation, l'état d'anxiété et de dépression ainsi que le niveau de vigilance du patient doivent être pris en compte lors de l'interprétation du score. Suivant le score obtenu, les personnes sont classées comme des personnes sans troubles cognitifs apparents (MMSE \geq 26 pts), des patients au stade léger (MMSE entre 25 à 22 pts), au stade modéré (MMSE entre 21 et 14 pts) ou sévère (MMSE \leq 14 pts) de la MA. Il est difficile de dépister les personnes MCI avec le MMSE car elles obtiennent des scores supérieurs à 26 pts. Cependant il est utile pour le suivi longitudinal de la MA.

Le 3MS (Modified Mini-Mental State), proposé par Teng en 1987, correspond à une modification et une extension du test MMSE dans le but d'améliorer la fidélité, la sensibilité et la spécificité de ce dernier (Teng, Chui et al. 1987). Le 3MS comporte 4 épreuves complémentaires à savoir l'information personnelle (lieu et date de naissance), la fluidité verbale, la pensée conceptuelle (aptitudes à détecter les similitudes). Quelques modifications mineures ont également été apportées telles que le comptage par ordre croissant et décroissant au lieu d'un comptage par multiples. Le score maximum est de 100 pts et un score inférieur à 79 révèle la présence d'une déficience cognitive et un score inférieur à 48 correspond à une déficience cognitive sévère.

Le MoCA

En 1996, le test MoCA (*Montreal Cognitive Assessment*) a été développé pour pallier au manque de sensibilité du MMSE dans la détection des personnes présentant des déficits cognitifs légers (Nasreddine, Phillips et al. 2005, Nasreddine and Patel 2016). Ce test est souvent réalisé en deuxième ligne pour les patients dont l'intégrité des fonctions cognitives est mise en doute et dont le score au MMSE est acceptable. Les questions (sur 30 pts) analysent les fonctions de l'attention, la concentration, des fonctions exécutives, la mémoire, le langage, les capacités visuo-constructives, les capacités d'abstraction, le calcul ou encore l'orientation (annexe 4). Les principales différences entre le MMSE et le MoCA résident dans le nombre de mots à retenir (3 versus 5 pour le MoCA), dans l'approfondissement des fonctions du langage et dans l'ajout du test de l'horloge pour évaluer les fonctions exécutives (Trzepacz, Hochstetler et al. 2015). Les personnes sans troubles cognitifs obtiennent un score > 26 pts alors que les personnes MCI vont avoir un score entre 26 et 18 pts. Les atteintes cognitives modérées sont détectables avec un score entre 10 et 17 pts et les atteintes cognitives sévères sont décelables avec un score <10pts. L'outil est de plus en plus connu à travers le monde (40 langues et dialectes). Il possède certaines limites comme la détection de faux positifs liée au niveau d'éducation par exemple.

Les autres tests disponibles

D'autres tests existent comme l'échelle de l'ADAS-cog (Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive Subscale), développée par Rosen et ses collaborateurs en 1984. Elle est composée de 11 épreuves (sur 70 pts) pour évaluer plusieurs domaines cognitifs détériorés dans la MA. Le mini-Cog peut également être utilisé en contexte clinique. Il comprend un rappel de 3 mots et le dessin de l'horloge. L'échelle CDR (Clinical Dementia Rating) est utilisée en clinique pour évaluer la progression de la maladie et les différents stades de la démence (Morris 1997).

En présence d'un trouble cognitif avéré, la prescription d'examens paracliniques est recommandée en fonction de l'hypothèse étiologique.

1.6.1.a. Examens paracliniques

Il est nécessaire de réaliser des examens biologiques pour éliminer certaines causes de déclin cognitif telles que le trouble thyroïdien, les désordres ioniques, le diabète ou encore certaines maladies infectieuses et carences. C'est pourquoi, en fonction du contexte clinique, différents paramètres sont dosés au niveau sanguin comme le dosage des hormones thyroïdiennes, la réalisation d'un hémogramme, ionogramme, natrémie, calcémie, glycémie et albuminémie, le bilan rénal et hépatique ainsi que des tests sérologiques pour écarter certaines maladies infectieuses. L'imagerie cérébrale est également recommandée lors des examens paracliniques pour exclure d'autres troubles neurologiques comme la présence de tumeur. Les examens paracliniques spécialisés peuvent ensuite être prescrits. Ils correspondent à l'étude des biomarqueurs de la maladie.

1.7. La place des biomarqueurs dans le diagnostic de la maladie d'Alzheimer

1.7.1. Définition, qualités d'un bon biomarqueur et ses limites

Un biomarqueur est défini comme «une caractéristique qui est **objectivement évaluée** comme un **indicateur de processus biologiques** normaux ou pathologiques, ou de

réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique » selon le National Institute of Health (NIH).

Dans le cas du diagnostic de la MA, le biomarqueur idéal doit posséder les qualités suivantes (Mayeux 2004) :

- Reflet d'un processus pathologique de la MA
- La relation biologique entre le biomarqueur et le processus de la maladie est fondamentalement connue
- Détectable dans les premiers stades de la maladie pour permettre une détection précoce
- Concorder avec la progression de la maladie
- Dosage fiable, standardisé et reproductible
- Détection peu coûteuse, non-invasive, rapide et simple
- Avoir une sensibilité supérieure ou égale à 80 % et une spécificité supérieure ou égale à 80 % pour un bon diagnostic différentiel

Pour atteindre ou se rapprocher au plus près de ces critères, il est essentiel d'utiliser une combinaison de biomarqueurs.

1.7.2. Introduction des biomarqueurs dans les critères de diagnostic de la maladie

1.7.2.a. Évolution des critères de diagnostic de la maladie

La classification des différents types de démence a été actualisée à plusieurs reprises. Avant 2007, il était impossible d'établir un diagnostic fiable qu'aux stades avancés de la maladie. Or, de plus en plus, des outils tels que les biomarqueurs sont mis à disposition des cliniciens dans le but d'orienter plus rapidement le diagnostic (Tableau 6).

NINCDS-ADRDA, 1984 :

En 1984, McKhann propose des critères diagnostiques pour la démence de type Alzheimer (McKhann, Drachman et al. 1984) d'après les critères du DSM IV (manuel diagnostic et clinique des troubles mentaux, publié par l'American Psychiatric Association) et du NINCDS-ADRDA (*National Institute of Neurological and Communicative Diseases and Stroke/ Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*). Les critères du DSM IV permettent le diagnostic de la démence et ceux du

NINCDS-ADRDA pose le diagnostic de MA « possible », « probable » ou « certaine » (annexe III et IV).

IWG-1 (2007) et IWG-2 (2014) :

En 2007, L'*International Working Group (IWG) for New Research Criteria for the Diagnosis of Alzheimer's Diseases* met en évidence les limitations des critères de 1984 et propose de redéfinir la MA pour permettre de détecter la maladie avant le stade de démence (Dubois, Feldman et al. 2007). Ainsi, pour la première fois les termes « préclinique » et « MCI » sont définis. Cette proposition de Dubois et al. (IWG-1), inclut également pour la première fois l'utilisation des biomarqueurs. En prenant en compte la nouvelle définition de la MA, ils proposent un diagnostic qui repose sur la mise en évidence d'un trouble significatif de la mémoire épisodique associé à un biomarqueur (une atrophie hippocampique, une modification des biomarqueurs dans le liquide céphalorachidien ou d'un profil métabolique spécifique) (annexe V). En 2014, l'IWG met à jour ses critères (IWG-2) (Dubois, Feldman et al. 2014). Cette mise à jour sépare les biomarqueurs en deux catégories : les biomarqueurs pathophysiologiques définis comme statiques et les biomarqueurs topographiques considérés comme des marqueurs dynamiques (Tableau 6). Les biomarqueurs statiques peuvent être utilisés à n'importe quel stade de la maladie alors que les biomarqueurs dynamiques sont réservés pour évaluer la progression de la maladie.

NIA-AA 2011 :

En 2011, Le groupe du *National Institute of Aging-Alzheimer's Association (NIA-AA)* publie à leur tour de nouveaux critères pour définir les différents stades (Albert, DeKosky et al. 2011, Jack, Albert et al. 2011, McKhann, Knopman et al. 2011, Sperling, Aisen et al. 2011). Ils intègrent également la notion de biomarqueurs mais ne les considèrent pas comme des critères principaux mais comme des éléments complémentaires pour augmenter la certitude du diagnostic (annexe VI). Il s'agit des marqueurs d'A β des lésions neuronales (Tableau 6).

Tableau 6 : Utilisation des biomarqueurs dans les critères de diagnostic de la maladie d'Alzheimer (IWG-2 de 2014 et NIA-AA de 2011)

Critères IWG-2

Critères NIA-AA

<ul style="list-style-type: none"> • Marqueurs pathophysiologiques ou marqueurs de diagnostic <p>↓ Aβ42 + ↑T-tau ou p-tau (LCR) ↑ Aβ (PET-SCAN)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Marqueurs topographiques ou marqueurs de progression <p>Atrophie cérébrale (IRM) Hypométabolisme cérébral du glucose (PET-FDG)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mutation autosomique dominante <p>PSEN1, PSEN2 ou APP</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Marqueurs d'Aβ <p>↓ Aβ42 (LCR) ↑ Aβ (PET-SCAN)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Marqueurs de lésion neuronale <p>↑ T-tau ou p-tau (LCR) Atrophie cérébrale (IRM) Hypométabolisme cérébral du glucose (PET-FDG)</p> <p><i>(Chez les patients symptomatiques, ces marqueurs sont utilisés pour préciser la probabilité (forte, intermédiaire ou faible) mais pas comme critère principal (annexe VI))</i></p>
--	--

Les critères de l'IWG-2 et du NIA-AA intègrent la notion de biomarqueurs pour essayer de définir les phases précliniques de la maladie (Tableau 7). Les critères de l'IWG différencient les personnes asymptomatiques à risque de développer la MA des personnes MA présymptomatiques alors que ceux du NIA-AA divisent le stade préclinique en trois phases selon la présence de certains biomarqueurs.

Tableau 7 : Comparaison des critères de diagnostic incluant les biomarqueurs pour la phase préclinique de la maladie d'Alzheimer

<i>IWG-2, 2014</i>		Cognition	Biomarqueurs
Asymptomatique à risque de MA		Pas d'atteinte	Tout marqueur pathophysiologique ↓ Aβ42 + ↑T-tau ou p-tau dans le LCR ou ↑ amyloïde (PET-SCAN)
MA présymptomatique		Pas d'atteinte	Mutation autosomique dominante PSEN1, PSEN2 ou APP
<i>NIA-AA, 2011</i>	Stade 1	Pas d'atteinte	Marqueurs d'Aβ (+) Marqueurs de lésion neuronale (-) Marqueurs d' Aβ = ↓ Aβ42 dans le LCR ↑ amyloïde (PET-SCAN)
	Stade 2	Pas d'atteinte	Marqueurs d'Aβ (+) Marqueurs de lésion neuronale (+) Marqueurs de lésions neuronales =
	Stade 3	Changements subtils	Marqueurs d'Aβ (+) Marqueurs de lésion neuronale (+) ↑ T-tau ou p-tau (LCR) Atrophie (IRM) Hypométabolisme cérébrale du glucose (TEP-FDG)

1.7.2.b. *Les biomarqueurs actuellement reconnus par les critères de diagnostic*

Même si les biomarqueurs ont maintenant leur place dans les critères de diagnostic proposés par les différents groupes d'experts, leur utilisation et leur validité clinique reste à prouver par des études longitudinales et sont encore peu utilisés en dehors du domaine de la recherche. Les biomarqueurs, de plus en plus nombreux révèlent également la grande hétérogénéité des profils clinico-pathologiques des patients (Dubois 2018).

En 2010 et en 2013, Jack et al. ont proposé un modèle représentant les changements temporels des différents biomarqueurs établis dans les critères de diagnostic lors de la progression de la MA (Figure 20) (Jack, Knopman et al. 2010, Jack and Holtzman 2013). Selon eux, ces marqueurs peuvent se décomposer en deux catégories : les mesures de l'accumulation de l'A β et les mesures de la neurodégénérescence. Ce modèle ressemble aux critères établis par le NIA-AA. Les marqueurs de l'accumulation de l'A β (augmentation de l'A β cérébrale et diminution de l'A β dans le LCR) seraient les premiers détectables aux stades précliniques suivis de l'augmentation de tau et pTau dans le LCR. L'atrophie du cerveau et l'hypométabolisme du glucose cérébral seraient détectables plus tard et reflèteraient la neurodégénérescence.

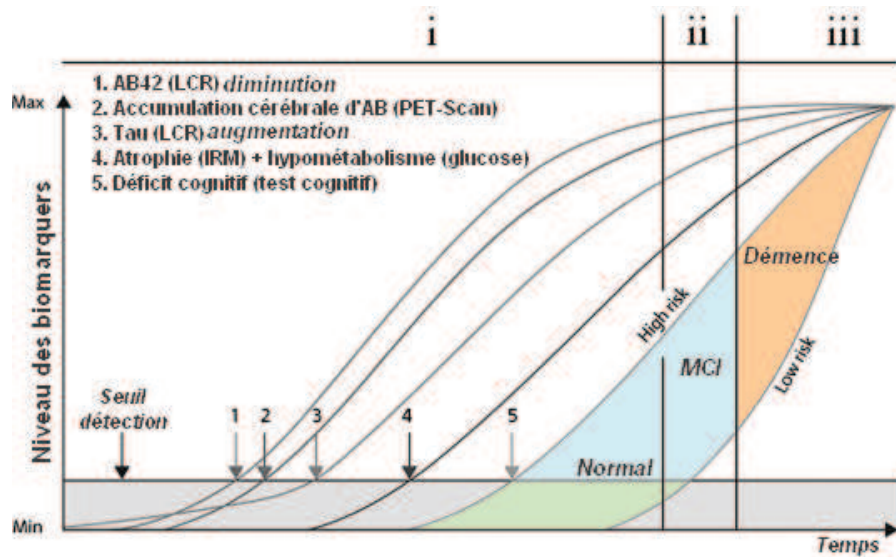


Figure 20 : Modèle classique des changements temporels des biomarqueurs lors de la progression de la maladie (i : préclinique ; ii : MCI ; iii : démence). modifiée de (Jack and Holtzman 2013)

Figure

Les biomarqueurs du liquide céphalo-rachidien

Le LCR est en contact direct avec l'espace extracellulaire cérébral. Ainsi, les variations retrouvées dans le LCR peuvent refléter les processus pathologiques centraux. Pour le moment seuls le peptide A β et les protéines Tau (totales et phosphorylées) sont mesurés dans le LCR dans un contexte clinique (Hoglund, Fourier et al. 2015).

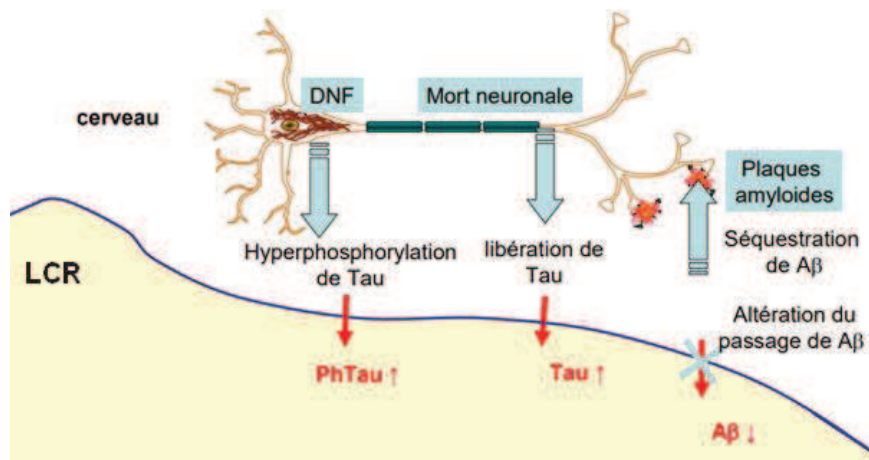


Figure 21 : Interprétation des variations des protéines pathogéniques dans le LCR au cours de la maladie d'Alzheimer.

Un nombre important d'études ont mesuré le taux de ces trois biomarqueurs dans le LCR pour diagnostiquer les patients MCI et atteints de la MA (Blennow 2004, Herukka, Simonsen et al. 2017). Selon l'hypothèse de la cascade amyloïde, l'agrégation de l'A β serait un phénomène survenant bien avant les symptômes. C'est pourquoi, la diminution d'A β 42 observée dans le LCR refléterait sa rétention cérébrale dans les plaques séniles (Figure 21). L'augmentation dans le LCR des protéines tTau et pTau refléterait la destruction neuronale (Vandermeeren, Mercken et al. 1993, Clark, Xie et al. 2003, Maddalena, Papassotiropoulos et al. 2003, Buerger, Ewers et al. 2006). Alors que le taux d'AB42 dans le LCR ne corrèle pas avec les déficits cognitifs et les plaques séniles, le niveau de pTau dans le LCR corrèle avec le déclin des fonctions cognitives, les DNF et l'atrophie cérébrale (de Souza, Chupin et al. 2012). La combinaison des deux marqueurs comme le ratio de l'A β 42/pTau augmenterait leur performance (Janelidze, Zetterberg et al. 2016). Cependant, selon un groupe d'expert, l'application de biomarqueurs du LCR dans un contexte de routine reste encore entravée par un manque d'harmonisation et de standardisation entre les tests utilisés ainsi qu'une absence de valeurs seuils définis (Arneric, Batrla-Utermann et al. 2017, Herukka, Simonsen et al. 2017). De plus, certaines maladies révèlent également une variation de ces marqueurs. En effet, on retrouve un taux très élevé de tTau dans la maladie de Creutzfeldt-Jakob et dans la démence frontotemporale (Yang, Chiu et al. 2017).

Il existe de nombreux biomarqueurs potentiels dans le LCR comme le NFL (Neurofilament light), NSE (Neuron specific Enolase), VLP-1 (Visinin-like protein 1), HFABP (Heart-type fatty acid binding protein) et YKL-40 (Chitinase-3-Like Protein 1) (Olsson, Lautner et al. 2016). Cependant, aucun n'est encore validé dans les critères de diagnostic.

Les biomarqueurs cérébraux : atteintes structurales et fonctionnelles

Atteinte structurale

L'atrophie de l'hippocampe et du cortex entorhinal ainsi que l'élargissement des ventricules représentent des événements précoces dans la MA et peuvent se visualiser avec l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (Figure 22) (Bobinski, de Leon et al. 2000, Whitwell, Dickson et al. 2012, Whitwell, Wiste et al. 2012). Cette altération

cérébrale corrèle avec la propagation des DNF (stades de Braak et Braak) et avec le déclin cognitif. Au fur et à mesure de la progression de la maladie, l'atrophie se répand dans les autres régions cérébrales. C'est pourquoi, Dubois et al. proposent d'utiliser l'atrophie comme un marqueur de progression (Dubois, Feldman et al. 2014). Il existe un accord général sur la signification clinique et sur la reproductibilité de la mesure de l'atrophie (Jack 2011). Par contre, l'atrophie cérébrale peut également être observée dans d'autres démences. C'est pourquoi, les données de l'IRM doivent être replacées dans le contexte de l'évaluation cognitive et clinique.

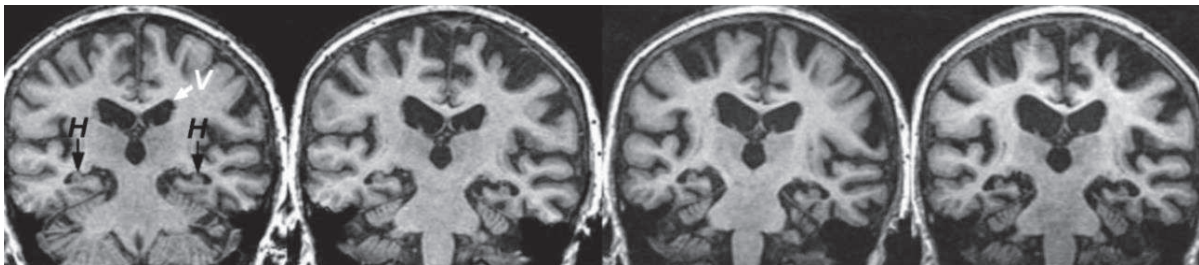


Figure 22 : Progression de l'atrophie de l'hippocampe (H) et de l'élargissement des ventricules (V) lors de la maladie d'Alzheimer visualisée en IRM (Lehericy, Marjanska et al. 2007).

Atteinte du métabolisme cérébral

L'imagerie cérébrale fonctionnelle permet d'évaluer, *in vivo*, le métabolisme régional du glucose. Dans le cas de la MA, la tomographie par émission de positrons (PET-scans) permet d'observer la consommation cérébrale du glucose grâce à un traceur analogue au glucose, le fluorodésoxyglucose (le 2-désoxy-2-(¹⁸F)fluoro-D-glucose ou ¹⁸F-FDG) (Figure 23). De nombreuses études ont confirmé la présence d'un hypométabolisme cérébral du glucose avec des diminutions plus intenses dans le cortex temporopariétal et frontal. Cette technique est proposée comme mesure dynamique pour évaluer la progression de la MA dans les critères de diagnostic (Dubois, Feldman et al. 2014). En effet, le métabolisme cérébral diminue en fonction de la sévérité de la démence.

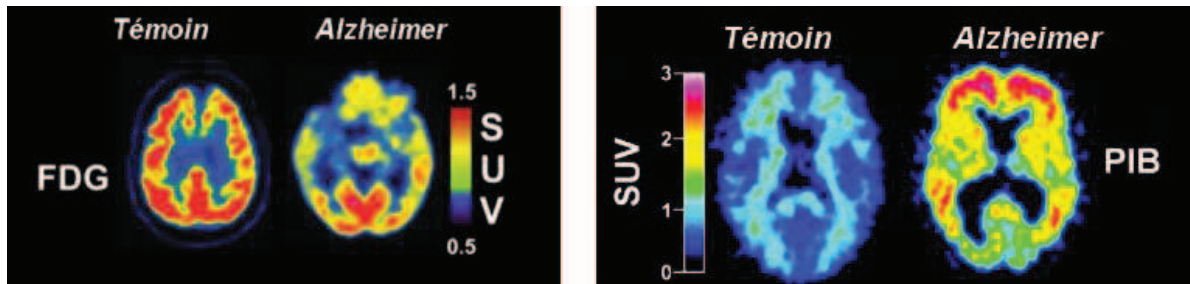


Figure 23 : PET-scans au ^{18}F -FDG pour visualiser l'hypométabolisme du glucose cérébral et PET-scans au PiB pour observer l'accumulation d'amyloïde dans la maladie d'Alzheimer (Klunk, Engler et al. 2004, Johnson, Fox et al. 2012).

Accumulation cérébrale de l'A β

Les progrès importants dans le domaine de l'imagerie ont permis de concevoir des sondes moléculaires pour visualiser les protéines impliquées dans la pathogénèse de la MA. Le PET-scan associé à l'utilisation du traceur [^{11}C -PiB] (*Pittsburgh compound B*), permet de visualiser les plaques séniles cérébrales (Figure 23). D'autres traceurs ont vu le jour après le PiB comme le florbetapir (AV-45), le flutemetamol (^{18}F -PiB) ou encore le florbetaben (AV-1) (Herholz and Ebmeier 2011). Même si l'analyse de l'accumulation cérébrale de l'A β est recommandée dans les critères de diagnostic comme un marqueur pathophysiologique (Dubois, Feldman et al. 2014), son interprétation doit être rigoureuse et combinée à d'autres données cliniques. En effet, différentes études ont révélé la présence de dépôts cérébraux d'A β chez des personnes ne présentant pas de troubles cognitifs (Rowe, Ng et al. 2007, Aizenstein, Nebes et al. 2008, Jansen, Ossenkoppele et al. 2015). À l'inverse, quelques personnes atteintes de la MA peuvent fournir un PET-scan négatif pour l'A β (Leinonen, Alafuzoff et al. 2008, Cairns, Ikonovic et al. 2009). De plus ces dépôts peuvent être observés dans d'autres maladies neurodégénératives comme la démence à corps de Lewy (Rowe, Ng et al. 2007, Armstrong and Cairns 2009, Ossenkoppele, Jansen et al. 2015). C'est pourquoi, la présence de PET-scans A β -positifs chez les personnes cognitivement normales ou présentant une autre démence (non-MA) posent les limites de cette techniques (Figure 24) et explique également le manque de corrélation entre les PET-Scans et la sévérité de la MA.

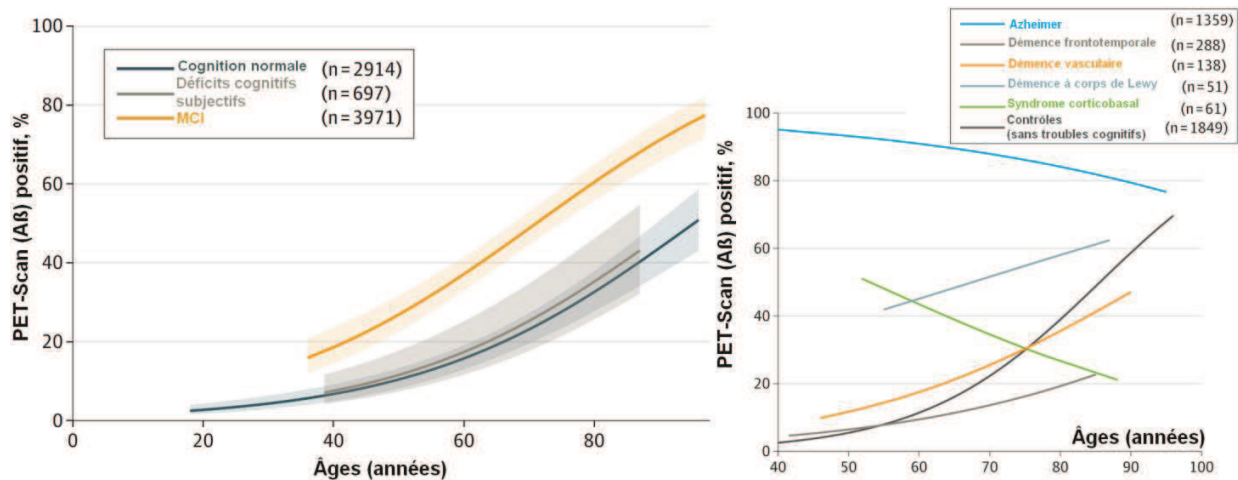


Figure 24 : Prévalence des PET-Scan positifs pour l'Aβ chez les personnes témoins (sans troubles cognitifs), des patients MCI, Alzheimer ou atteints d'autres démences. Données provenant de deux études (Jansen, Ossenkoppele et al. 2015, Ossenkoppele, Jansen et al. 2015).

Le développement de traceurs spécifiques de l'accumulation de Tau a été plus compliqué en raison de la localisation intracellulaire des DNF. En effet, les traceurs doivent être capables de traverser les membranes plasmiques. Trois radiotraceurs se sont révélés prometteurs pour visualiser les DNF : le ^{18}F -THK5117, le ^{18}F -THK5351, le ^{18}F -Flortaucipir l' (également connu sous le nom d'AV-1451) ou encore le PBB3. Cependant, ces marqueurs possèdent un faible ratio de fixation et peuvent se lier fortement à la substance blanche. Les marqueurs de la protéine Tau sont intéressants mais il est important de noter que ces marqueurs peuvent également être utilisés pour d'autres tauopathies telles que la démence frontotemporale ou la dégénérescence cortico-basale. Ils ne sont pas recommandés dans les critères de diagnostic actuels.

Enfin, différents traceurs ont été conçus pour visualiser d'autres altérations cérébrales observées dans la MA comme l'altération du système cholinergique (^{11}C -MP4A et ^{11}C -PMP), la réduction du débit sanguin cérébral (^{15}O -H₂O) ou encore la diminution du métabolisme de l'oxygène (^{15}O -O₂) (Roy, Niccolini et al. 2016, Lajoie, Nugent et al. 2017).

1.7.2.c. Limites des biomarqueurs actuels

Malgré l'introduction de ces différents biomarqueurs pathophysiologiques et topographiques dans les critères de diagnostic, la limite de chacun a été décrite ci-

dessus. À l'heure actuelle, leur combinaison et leur association contexte clinique et aux données cognitives sont indispensables. D'autre part, la quantification de ces biomarqueurs représente des méthodes invasives pour les patients avec le besoin d'une ponction lombaire. De plus, le coût de l'imagerie diminue fortement l'accessibilité de la technique. Finalement, quand c'est possible, ces tests servent pour le moment de compléments lors de la démarche clinique classique. C'est pourquoi, le développement de biomarqueurs sanguins non invasifs, fiables et accessibles sont essentiels pour un diagnostic précoce de la MA.

1.7.3. Identification de biomarqueurs plasmatiques potentiels

À ce jour, aucun biomarqueur sanguin n'est recommandé pour le diagnostic de la MA. Cependant, pour les raisons précédentes, il est indispensable de trouver des marqueurs accessibles et non-invasifs. Depuis quelques années, des recherches intensives sont en cours dans ce domaine.

1.7.3.a. Identification de biomarqueurs plasmatiques : les défis

La mise en place de biomarqueurs sanguins pour le diagnostic des maladies neurodégénératives est plus délicate en raison de différents défis à surmonter.

Le sang est un fluide complexe où se déroule de nombreuses réactions métaboliques. On y retrouve des protéines (60-80g/L), des acides aminés, des lipides, des acides nucléiques, des glucides et de nombreux métabolites. De plus, ce contenu complexe est sujet à des variations circadiennes importantes. Dans le cas des maladies neurodégénératives, le défi majeur est de trouver un biomarqueur plasmatique qui reflète un processus pathologique cérébral. Cela signifie que les molécules d'intérêt doivent passer la BHE. Une fois dans le sang, elles seront diluées par rapport au compartiment cérébral et pourront être excrétées par les reins, subir des dégradations potentielles au niveau du foie ou directement dans le sang par des protéases. L'ensemble de ces éléments peuvent réduire la concentration des molécules d'intérêt et réduire la fenêtre de temps pour leur étude. À titre d'exemple, la concentration de l'A β est dix fois plus faible dans le sang comparativement au LCR (35 pg/ml versus 350 pg/ml) (Hampel, O'Bryant et al. 2018). Le dernier défi dans le domaine des

biomarqueurs plasmatique est le chevauchement de la MA avec certains états pathologiques comme les maladies cardiovasculaires, le diabète, les syndromes métaboliques, qui peuvent affecter le contenu plasmatique. Néanmoins, depuis plusieurs années, il y a eu un nombre important d'efforts pour mettre au point des techniques de mesure ultrasensibles et l'accès aux cohortes cliniques est rendue plus facile.

1.7.3.b. Amyloïde et Tau plasmatiques

Tout comme les études sur le LCR, les protéines les plus étudiées dans le sang sont l'Aβ40, l'Aβ42 et les différentes formes de la protéine Tau (tTau et pTau). Cependant les résultats ne sont pas aussi prometteurs (Tableau 8).

Tableau 8 : Comparaison des résultats du dosage des peptides Aβ et de la protéine Tau dans le sang et le plasma

Biomarqueurs	LCR	Plasma	Corrélation LCR/Sang
Aβ40	↓, ↑ ou = Aβ40 <i>Résultats incohérents pour Aβ40 seul</i>	↓, ↑ ou = Aβ40 <i>Résultats incohérents pour Aβ40 seul</i>	non
Aβ42	↓ Aβ42 = rétention cérébrale dans les plaques (<i>critères de Dubois, 2014</i>)	↓, ↑ ou = Aβ42 <i>résultats incohérents, forte variabilité entre les techniques</i>	non
tTau Tau totale)	↑ tTau (<i>critères de Dubois, 2014</i>)	↑ tTau (<i>forte variabilité entre les techniques, durée de demi-vie courte dans le sang</i>)	non
pTau (T181)	↑ pTau-T181 (<i>critères de Dubois, 2014</i>)	↑ pTau-T181 (<i>besoin d'autres évaluations</i>)	non
Combinaisons ou autres	Recommandation : Combinaison de Aβ42 avec tTau ou pTau (↑ tTau/ Aβ42 ou pTau/ Aβ42) ↓ Ratio Aβ42/ Aβ40	↓ Ratio Aβ42/ Aβ40 (<i>relativement reproductible</i>) ↑ tTau/ Aβ42 (<i>corrèle avec PET-scan Tau</i>)	oui

Concernant l'Aβ42 et Aβ40, un nombre important d'études ont étudié leur concentration plasmatique et ont révélé une très forte variabilité. En effet, certaines études montrent une diminution, une augmentation ou aucune différence significative entre les groupes (Fukumoto, Tennis et al. 2003, Schupf, Tang et al. 2008, Sedaghat, Dedousi et al. 2009). Tout comme dans le LCR, l'Aβ40 plasmatique seul est inutile pour le diagnostic de la MA (Mehta, Pirttila et al. 2000, Dorey, Perret-Liaudet et al. 2015). De plus, il n'existe pas de corrélations entre le niveau d'Aβ42 et d'Aβ40 dans le sang et dans le LCR. La plupart de ces études ont été réalisées par des techniques ELISA. C'est

pourquoi, d'autres techniques ont été développées comme le *Single-molecule-assay* (SIMOA) (Rissin, Kan et al. 2010, Zetterberg, Mortberg et al. 2011) ou l'immunoprécipitation associée à la spectrophotométrie de masse. En 2016, Janelidze et al, ont révélé que la technique Simoa permettait de mettre en évidence la diminution du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ chez les patients atteints de la MA et la corrélation entre le niveau d' $A\beta_{42}$ du plasma et du LCR (Janelidze, Stomrud et al. 2016). La première technique utilisant la spectrophotométrie de masse ne mettait pas en évidence une différence significative pour les niveaux d' $A\beta$ entre les groupes témoins et les groupes MA (Pannee, Tornqvist et al. 2014). En 2017, une équipe trouve une diminution significative du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ chez les patients MA (Ovod, Ramsey et al. 2017). Enfin, en 2018, Nakamura et al. démontrent que ce ratio permettrait de diagnostiquer les personnes ayant un PET-Scan positif à l' $A\beta$ avec une efficacité de 90% (Nakamura, Kaneko et al. 2018). Comme dans le LCR, le rapport de l' $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ dans le plasma est plus utile que l' $A\beta_{42}$ seul (Olsson, Lautner et al. 2016). Enfin, Wang et al. ont montré une augmentation d'oligomères d' $A\beta$ dans le plasma de patients MA à l'aide d'un ELISA conçu pour les multimères (Wang, Yi et al. 2017). Cependant, ces résultats et les techniques utilisées sont à valider. En prenant en compte les différentes études, la mesure des peptides $A\beta$ représente un potentiel limité en raison des grandes variabilités entre les anticorps et les tests utilisés ainsi que les cohortes de patients étudiées.

La concentration sanguine de tTau a également été évaluée avec les techniques ELISA et SIMOA. Certaines études montrent une augmentation significative de tTau plasmatique alors que d'autres révèlent une légère différence ou encore l'absence de corrélation entre le sang et le LCR (Mattsson, Zetterberg et al. 2016, Olsson, Lautner et al. 2016, Mielke, Hagen et al. 2017). Cette différence entre les études pourrait provenir de la courte demi-vie de la protéine Tau en circulation (10h) par rapport au LCR (une semaine) ou au cerveau (plusieurs semaines) (Zetterberg 2017, Sato, Barthelemy et al. 2018). Aucune différence significative de tTau n'a été rapportée entre les sujets MCI et les témoins. Par contre, la combinaison du dosage de Tau avec l' $A\beta_{42}$ serait plus efficace comme le ratio tTau/ $A\beta_{42}$ ou pTau/ $A\beta_{42}$. Une étude récente, utilisant la technique SIMOA, révèle que le ratio tTau/ $A\beta_{42}$ dans le plasma permettrait de prédire

les dépôts de Tau au niveau cérébrale avec une sensibilité de 80% et une spécificité de 91% (Park, Han et al. 2019).

Les différentes phosphorylations de Tau ont également été dosées dans le plasma. Les tests actuels comme l'INNOTEST™ dosent la protéine Tau phosphorylée sur la thréonine 181 (pTau-T181). Une augmentation du niveau de pTau-T181 est retrouvée chez les patients MA et chez les MCI (Mielke, Hagen et al. 2018) et son niveau est fortement corrélé avec les scores cognitifs (MMSE et MoCA) (Shekhar, Kumar et al. 2016). Récemment, l'utilisation de la technique SIMOA révèle une augmentation tardive du niveau de pTau-T181 dans le sang des patients atteints de la MA (Stade III/IV de Braak et Braak) (Park, Han et al. 2019). Ces résultats demandent d'être validés avec des études supplémentaires et sur des patients présentant une autre taupathie que la MA comme la démence frontotemporale ou la maladie de Creutzfeldt-Jakob. De plus, lors d'une lésion traumatique cérébrale, on peut également visualiser une augmentation de pTau (Rubenstein, Chang et al. 2017). Les autres phosphorylations de Tau (sérines 199, 396 ou 235 et thréonine 231) ont été testées sur le LCR. Les résultats ont montré une augmentation de ces différentes formes phosphorylées de Tau dans le LCR des patients atteints de la MA (Ishiguro, Ohno et al. 1999, Itoh, Arai et al. 2001, Buerger, Teipel et al. 2002, Buerger, Zinkowski et al. 2002, Hu, He et al. 2002). Par contre, dans le sang, il n'y a pas de résultats satisfaisants au regard de ces autres formes phosphorylées de Tau.

Bien que la plupart des analyses de Tau plasmatique soient concentrées sur les protéines tTau et pTau-T181, certaines études suggèrent qu'une variété de fragments de Tau peuvent être détectés dans le LCR et dans le sang, et que certains de ces fragments pourraient devenir des biomarqueurs potentiels de la MA (Meredith, Sankaranarayanan et al. 2013, Inekci, Henriksen et al. 2015).

Malgré l'implication de ces deux protéines au niveau cérébral et leur utilisation comme biomarqueurs du LCR, leur niveau plasmatique est encore remis en question.

1.7.3.c. *Les autres candidats potentiels*

De nombreuses études ont révélé de nouveaux biomarqueurs plasmatiques potentiels qui reflètent différentes altérations du SNC dans la MA comme la neuroinflammation, les

lésions neuronales, l'altération du métabolisme et de la synaptogénèse (Molinuevo, Ayton et al. 2018) (Tableau 9).

Marqueurs de la neuroinflammation

- La protéine S100B fait partie des protéines liant le calcium. Elle est principalement exprimée dans le cerveau par les astrocytes et les cellules gliales. À faible concentration, elle permet de maintenir les fonctions essentielles du cerveau mais à forte concentration elle devient toxique. La surexpression de S100B retrouvée au niveau des cerveaux de patients atteints de la MA a engendré de nombreuses études sur son implication dans l'homéostasie cérébrale et la pathogénèse de la MA. Sa surexpression serait le reflet de l'activation de la microglie et des astrocytes caractéristique de la MA. Des études ont montrés que la production massive de S100B augmente la vulnérabilité des neurones face à la toxicité de l'A β et entraîne l'hyperphosphorylation de la protéine Tau (Sheng, Mrak et al. 1994, Esposito, Scuderi et al. 2008, Roltsch, Holcomb et al. 2010). C'est pourquoi, plusieurs équipes se sont intéressées au niveau de S100B au niveau périphérique. L'augmentation de S100B au niveau du LCR reflète l'inflammation du SCN dans la MA et corrèle avec les scores cognitifs et l'atrophie cérébrale (Peskind, Griffin et al. 2001, Petzold, Jenkins et al. 2003, Llorens, Schmitz et al. 2017). Étonnement, sa concentration plasmatique est diminuée chez les patients atteints de la MA sans corrélation avec l'atrophie cérébrale (Chaves, Camozzato et al. 2010). Cette diminution plasmatique pourrait être expliquée par l'importante inflammation locale au niveau du cerveau. Ces résultats demandent d'être confirmés par d'autres études.

- Au niveau cérébral, TREM2 (*Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2*) est également sécrétée par les cellules gliales pour jouer un rôle dans l'inflammation et l'apoptose. À faible dose elle serait neuroprotectrice mais à forte concentration elle deviendrait toxique pour les cellules environnantes (Yeh, Hansen et al. 2017). Par conséquent, elle peut avoir un effet protecteur aux stades précoces de la MA (clairance de l'A β) mais un effet toxique aux stades ultérieurs (activation prolongée de la réponse inflammatoire). Elle est retrouvée

en forte concentration dans le cerveau et dans le LCR des patients MA et MCI et est associée au déclin cognitif (Suarez-Calvet, Araque Caballero et al. 2016, Brosseron, Traschutz et al. 2018, Liu, Cao et al. 2018). Les études plasmatiques indiquent une concentration plus élevée de TREM2 chez les patients MA (Hu, Tan et al. 2014, Piccio, Deming et al. 2016, Liu, Cao et al. 2018). On retrouve également une augmentation de TREM2 dans les cellules sanguines incluant les leucocytes, les monocytes, les granulocytes des patients (Hu, Tan et al. 2014). D'autres études sont nécessaires pour confirmer le potentiel de TREM2 comme biomarqueurs périphériques.

- Enfin, la protéine YKL-10 qui tient son nom de ces trois premiers acides aminés, reflète également la neuroinflammation. Elle joue un rôle dans les processus de prolifération cellulaire, de l'inflammation et dans la régulation du remodelage de la matrice extracellulaire. Lors de la neuroinflammation dans la MA, YKL-10 est fortement exprimé dans le cerveau par les astrocytes activés (Colton, Mott et al. 2006, Bonneh-Barkay, Wang et al. 2010). Elle est retrouvée en grande quantité autour des plaques séniles et a été identifiée comme un biomarqueur potentiel dans le LCR au stade léger de la MA et dans la phase MCI (Craig-Schapiro, Perrin et al. 2010, Olsson, Hertze et al. 2013, Kester, Teunissen et al. 2015, Janelidze, Hertze et al. 2016, Zhang, Ng et al. 2018). Récemment, Hampel et son équipe ont révélé que la combinaison du niveau de la YKL-10, de la neurogranin et du NfL était prometteur (Hampel, Toschi et al. 2018). Au niveau plasmatique, il est également augmenté aux premiers stades de la MA et sa concentration plasmatique corrèle avec la quantité présente dans le LCR (Craig-Schapiro, Perrin et al. 2010, Choi, Lee et al. 2011).

De nombreux autres marqueurs inflammatoires ont été étudiés pour leur utilisation potentielle en tant que biomarqueurs de la MA, mais les résultats présentent une plus forte variabilité. On peut citer l'IL-6, le TNF- α et β , l'IL-1 β , l'IL-12 et 18, ou encore l'interferon- γ , l'homocysteine et la protéine C réactive (Swardfager, Lanctot et al. 2010, Lai, Liu et al. 2017).

Marqueurs des lésions neuronales

- La protéine NfL (*neurofilament light chain*) correspond aux filaments cytoplasmiques considérés comme étant des éléments structuraux essentiels. Ils confèrent aux axones une rigidité et une solidité. L'accumulation et l'hyperphosphorylation des neurofilaments reflètent les lésions neuronales engendrés dans la MA (Sternberger, Sternberger et al. 1985, Wang, Tung et al. 2001). Les taux de NfL sont augmentés dans le LCR et dans le sang des patients atteints de la MA et des sujets MCI (Sjogren, Blomberg et al. 2001, Hu, He et al. 2002, Verbeek, De Jong et al. 2003, Pijnenburg, Janssen et al. 2007, Olsson, Lautner et al. 2016, Lista, Toschi et al. 2017, Weston, Poole et al. 2017, Hampel, Toschi et al. 2018).
- L'énolase est une enzyme de la glycolyse qui catalyse la conversion du 2-phosphoglycérate en phosphoénolpyruvate. Une des trois isoformes, nommée l'énolase β ou NSE, est spécifique des neurones. La NSE peut être produite à partir des cellules neuronales et gliales et peut exercer à la fois une activité métabolique, inflammatoire et neurotrophique régulant la croissance, la différenciation, la survie et la mort neuronale (Haque, Polcyn et al. 2018). En *post-mortem*, l'ARNm de la NSE est retrouvée en plus faible quantité avec une disparité régionale dans le cerveau de patients MA alors qu'elle est augmentée dans le LCR des patients (Blennow, Wallin et al. 1994, Parnetti, Palumbo et al. 1995, Harada, Tamaoka et al. 2006, Palumbo, Siepi et al. 2008, Baig, Palmer et al. 2012, Schmidt, Mergl et al. 2014). La performance de diagnostic de la NSE du LCR serait améliorée en combinaison avec le dosage de tTau et pTau. Concernant le compartiment sanguin, NSE est retrouvée diminuée chez les sujets MCI et les patients atteints de la MA avec un niveau élevé d'atrophie cérébrale (Chaves, Camozzato et al. 2010, Rosen, Mattsson et al. 2011, Hye, Riddoch-Contreras et al. 2014). De plus, nous avons pu voir précédemment que l'équipe de Butterfield a identifié la NSE comme une protéine susceptible d'être oxydée de façon importante dans la MA (Castegna, Aksenov et al. 2002, Butterfield, Poon et al. 2006, Aluise, Robinson et al. 2011). L'altération de la NSE reflète un dysfonctionnement des fonctions cérébrales.

- Le facteur neurotrophique BDNF (brain-derived neurotrophic factor) est important dans le maintien des fonctions neuronales. Les facteurs neurotrophiques stimulent la neurogénèse et jouent un rôle clé dans la survie neuronale, le transport axonal ainsi que dans le maintien de la cognition (Schindowski, Belarbi et al. 2008). En réponse aux altérations neurologiques, de nombreux facteurs neurotrophiques sont synthétisés dans les zones touchées par la MA au début de la pathologie, en particulier le cortex entorhinal, l'hippocampe et l'amygdale (Phillips, Hains et al. 1991, Hock, Heese et al. 2000, Holsinger, Schnarr et al. 2000). Des preuves croissantes révèlent que des changements dans les taux de BDNF cérébraux et des altérations dans sa voie de signalisation pourraient être impliqués dans la pathogénèse de la MA (Song, Yu et al. 2015). Son rôle dans la MA suggèrent qu'il pourrait être utilisé comme biomarqueur pour le diagnostic. Dans le LCR, le taux de BDNF est également diminué tout comme dans la circulation sanguine (Yasutake, Kuroda et al. 2006, Laske, Stransky et al. 2007, Gezen-Ak, Dursun et al. 2013, Forlenza, Diniz et al. 2015). Cependant il existe une variabilité dans les résultats (Laske, Stransky et al. 2006, O'Bryant, Hobson et al. 2009).
- Des mutations de la progranulin (GRN) sont retrouvées chez les patients de la démence frontotemporale et peuvent également représenter un facteur de risque dans la MA (Perry, Lehmann et al. 2013). Au niveau cérébral, elle est exprimée dans les microglies, les neurones corticaux, les cellules pyramidales de l'hippocampe et les cellules Purkinje du cervelet. Elle jouerait le rôle de facteur neurotrophique avec des fonctions pléiotropiques et serait impliquées dans la croissance et la survie neuronale ainsi que dans la fonction du lysosome (Chitramuthu, Bennett et al. 2017, Kao, McKay et al. 2017). Dans les maladies neurodégénératives, elle est retrouvée en faible quantité et corrèlerait avec la dégénérescence cérébrale (Sleegers, Brouwers et al. 2010). Cependant elle serait également retrouvée à de forte concentration autour des plaques séniles et dans le LCR des patients atteints de la MA (Pereson, Wils et al. 2009, Suarez-Calvet, Capell et al. 2018) et son augmentation serait le reflet d'une dégénérescence cérébrale (Philips, De Muynck et al. 2010). Ces résultats sont à confirmer mais son implication dans la MA est non négligeable. Récemment,

Suarez-Calvet et al. ont mis en évidence que l'augmentation de la progranulin dans le LCR des patients MA serait associée à l'augmentation de la neuroinflammation (augmentation de TREM2). Une augmentation est également retrouvée chez les patients MA et MCI mais ces récents résultats doivent être répétés pour être affirmés (Cooper, Nachun et al. 2018).

Marqueurs de l'altération du métabolisme lipidique et de la synaptogénèse

Au cours de ces dernières années, de nombreuses études ont montré la participation importante des apolipoprotéines (Apo) dans les processus de réparation neuronale et dans la MA. Les Apo, constituantes des lipoprotéines, sont des protéines qui transportent les lipides (cholestérol, triglycérides, phospholipides, acide arachidonique, ...). Elles représentent une famille de dix Apo différentes qui diffèrent par leur structure et leurs fonctions métaboliques. Leur rôle ne se limite pas à maintenir la stabilité et l'intégrité structurelle des lipoprotéines, elles participent également au métabolisme des lipides et au bon fonctionnement cérébral. Depuis la découverte de l'ApoE4 comme le principal facteur de risque reconnu de la forme sporadique de la MA, les recherches se sont intensifiées pour identifier le rôle des Apo dans la pathogénèse de la MA. Ces études révèlent un fort potentiel sur leur possible utilisation comme biomarqueurs de la maladie (Tableau 10).

- Suite à la découverte de son implication génétique (voir 1.2.2.a. Facteurs de risques génétiques), de nombreuses équipes ont imaginé utiliser le dosage de l'ApoE comme un biomarqueur de la MA ou du stade MCI. Les résultats sont variables dans le LCR (Terrisse, Poirier et al. 1998, Fukumoto, Ingelsson et al. 2003, Bekris, Millard et al. 2008). Une diminution est observée mais l'influence du génotype est encore discuté (Cruchaga, Kauwe et al. 2012). Dans le sang, différentes équipes ont trouvé une diminution du taux d'ApoE chez les sujets MCI et Alzheimer et cette diminution corrèle avec l'accumulation d'A β 42 cérébrale (PiB-PET-Scans) (Siest, Bertrand et al. 2000, van Vliet, Westendorp et al. 2009, Gupta, Laws et al. 2011). Cependant, il n'y a pas de corrélation entre le taux d'ApoE dans le plasma et dans le LCR (Cruchaga, Kauwe et al. 2012). L'ApoE plasmatique représenterait un biomarqueur potentiel pour le diagnostic de la MA en combinaison avec l'A β (PET-Scan ou taux du LCR).

- L'ApoJ, encore appelée clusterin, est impliquée dans le vieillissement et la neurodégénérescence. Elle possède également le rôle d'une protéine chaperone pour agir contre le mauvais repliement des protéines. Différentes études GWAS (voir 1.2.2.a. Facteurs de risques génétiques) indique que la clusterin représente un facteur de risque génétique de la MA sporadique. Cette révélation a induit un grand nombre de recherches sur le lien entre l'ApoJ et la pathogénèse de la MA. Comme l'ApoE, l'ApoJ pourrait aider l'organisme à diminuer le taux cérébral d'A β via la BHE et les récepteurs LRP. Son activité chaperone lui permet également d'éviter l'agrégation des plaques séniles. Enfin, elle jouerait également un rôle antioxydant en réponse à l'altération du potentiel redox dans la MA (McGeer, Kawamata et al. 1992, Calero, Rostagno et al. 2000, Strocchi, Smith et al. 2006). En réponse au stress, un niveau élevé d'ApoJ est mis en évidence dans l'hippocampe et le cortex entorhinal des patients atteints de la MA par rapport aux contrôles de même âge (McGeer, Kawamata et al. 1992). C'est pourquoi, de nombreuses études ont évalué l'utilité de son dosage dans le LCR et dans le plasma dans le diagnostic de la MA. Ses analyses périphériques ont indiqué que son augmentation était associée aux scores cognitifs et à l'atrophie cérébrale (Jones 2010, Thambisetty, Simmons et al. 2010, Hardy, Guerreiro et al. 2011, Schrijvers, Koudstaal et al. 2011, Deming, Xia et al. 2016, Prikrylova Vranova, Henykova et al. 2016). Certaines études ont également montré aucune différence significative ou une diminution (L, Dekker et al. 2011, Silajdzic, Minthon et al. 2012). Tout ceci laisse à penser que l'ApoJ pourrait être un biomarqueur potentiel de la MA en le combinant à d'autres biomarqueurs.
- Enfin, l'ApoD représente également une molécule prometteuse. Moins connue que les deux précédentes, elle joue un rôle tout aussi important dans la pathogénèse de la MA. Il s'agit d'une lipocaline capable de transporter de petites molécules hydrophobes et le cholestérol. Chez l'homme, l'ApoD est faiblement exprimée dans le foie et les intestins (sites majeurs de synthèse des autres Apo). Par contre, nous la retrouvons exprimée dans le pancréas, le placenta, le rein, les testicules, les ovaires et le SNC et périphérique. Chez les rongeurs, elle est synthétisée en majorité dans le

cerveau (Rassart, Bedirian et al. 2000). C'est une protéine de réponse au stress car son niveau est augmentée dans différentes conditions (stress oxydatif, lésion neuronale ou maladies neurodégénératives). De nombreuses études montrent l'effet neurotoxique de la suppression de l'ApoD. En effet, sur des modèles transgéniques, la perte de l'ApoD augmente la vulnérabilité du cerveau face au stress oxydatif (peroxydation lipidique) et altère les fonctions locomotrices et les capacités d'apprentissage. À l'inverse, l'étude des souris transgéniques présentant une surexpression de l'ApoD humaine, révèle des effets opposés : une augmentation de la survie et une protection vis-à-vis de la peroxydation lipidique après l'induction d'un stress oxydatif (Ganforina, Do Carmo et al. 2008, Najyb, Do Carmo et al. 2017). Elle semble être impliquée dans les processus de régénération (Terrisse, Seguin et al. 1999, Ganforina, Do Carmo et al. 2010) via le transport des lipides et le recyclage des lipides lors de la réparation axonale. Dans la MA, on retrouve une concentration d'ApoD élevée au niveau cérébral, plus particulièrement dans l'hippocampe et le cortex temporal des patients atteints de la MA (Terrisse, Poirier et al. 1998, Kalman, McConathy et al. 2000, Desai, Ikonovic et al. 2005). De plus, sa concentration serait corrélée au nombre de DNF, au génotype de l'ApoE mais pas aux plaques séniles (Belloir, Kovari et al. 2001, Glockner and Ohm 2003). L'ApoD représente donc un biomarqueur potentiel et pourrait refléter les altérations et la présence du stress oxydatif au début de la MA et au stade MCI. L'analyse plasmatique de l'ApoD aux différents stades de la MA mérite d'être examinée car celle-ci n'a jamais été évaluée.

Aucun biomarqueur plasmatique n'est pour le moment accepté en clinique mais ces différentes études révèlent l'intensité de la recherche dans ce domaine et le potentiel de certaines protéines plasmatiques spécifiques du cerveau à refléter les mécanismes moléculaires de la MA pour son diagnostic. Leur combinaison est importante pour augmenter leur efficacité (Hampel, Toschi et al. 2018). L'absence de validation croisée entre les laboratoires, les cohortes, les étapes pré-analytiques et les méthodologies utilisées reste une limitation permanente. Des recherches complémentaires et de futures études longitudinales sont nécessaires pour valider certains de ces biomarqueurs.

Tableau 9 : Nouveaux biomarqueurs plasmatiques potentiels dans le diagnostic de la MA

Biomarqueurs	Rôles physiologique	Niveau cérébral implication dans la pathogénèse de la MA	Niveau du LCR	Niveau Sanguin
Marqueurs de l'inflammation				
S100B	Exprimée par les astrocytes et les cellules gliales Module l'activité des neurones. S100B déclenche des effets trophiques, inflammatoires ou toxiques, en fonction de sa concentration.	↑ S100B hippocampe, cortex et lobe temporal surexpression = inflammation, vulnérabilité plus forte à l'Aβ et formation des DNF	↑ S100B	↓ S100B séquestration au niveau cérébral ?
TREM2	Exprimée par les cellules gliales. Fonction dans l'apoptose et l'inflammation	↑ TREM2	↑ TREM2 Corrélation avec les scores cognitifs	↑ TREM2 plasma et dans les cellules sanguines
YKL-10	Produite par les cellules impliquées dans l'inflammation. Rôle dans l'inflammation, la prolifération et la différenciation cellulaires ou encore la régulation du remodelage du tissu extracellulaire	↑ YKL-10 Retrouvée en grande quantité autour des plaques amyloïdes	↑ YKL-10 Au stade léger	↑ YKL-10 Au stade léger Corrélation LCR/sang
Marqueurs des lésions neuronales				
NfL	Neurofilaments = éléments structuraux essentiels pour la rigidité des axones	↑ NfL Accumulation et hyperphosphorylation des Neurofilaments = perturbation de la structure et des fonctions neuronales.	↑ NfL MCI et AD	↑ NfL
NSE	Enzyme de la glycolyse. Spécifique des neurones, rôle métabolique, dans l'inflammation, la croissance, la différenciation, la survie et la mort neuronale. Marqueurs de lésion cérébrale.	↓ NSE Disparité régionale avec une réduction sélective de l'ARNm de NSE dans le cortex temporal et le thalamus, le cortex	↑ NSE	↓ NSE MA et MCI ayant une atrophie cérébrale importante
BDNF	Facteurs neurotrophiques essentiels pour la survie neuronale, le transport axonal et la cognition (mémoire à long terme). Important pour la croissance et la différenciation de nouveaux neurones et des synapses. Stimule la neurogénèse.	↓ taux d'ARNm de BDNF et de pro-BDNF Zones touchées par la MA. Des études suggèrent que les facteurs neurotrophiques ont un rôle protecteur contre la toxicité de l'Aβ.	↓ BDNF Associé au niveau d'Aβ42 et au déclin cognitif (MMSE)	↓ BDNF Mais certaines études montrent aucun changement ou une augmentation- Grande variabilité
Progranulin (PGRN)	Fonctions pléiotropiques : croissance et la survie neuronale ainsi que dans la fonction du lysosome	↓ PGRN Localisée autour des plaques séniles Facteur de risque de la MA	↑ PGRN serait associée à l'augmentation de la neuroinflammation (TREM2)	↑ PGRN

Tableau 10 : Nouveaux biomarqueurs plasmatiques potentiels dans le diagnostic de la MA : les apolipoprotéines

Biomarqueurs	Rôles physiologique	Niveau cérébral et implication dans la pathogénèse de la MA	Niveau du LCR	Niveau Sanguin
Apolipoprotéines				
ApoE	Constituant des lipoprotéines pour transporter les lipides. Rôle dans le métabolisme lipidique et dans la synaptogénèse. Propriété antioxydante ($\epsilon 2 > \epsilon 3 > \epsilon 4$)	Principal facteur de risque génétique de la MA sporadique ($\epsilon 4$) ↓ ApoE (génotype-dépendant)	↓ ApoE Associée au taux d'A β 42 du LCR indépendante du génotype ? débat et variabilité entre les études	↓ ApoE corrèle avec l'accumulation d'A β 42 cérébrale (PiB-PET-Scans)
ApoJ (clusterin)	Protéine chaperone, fonction dans le transport des lipides, propriété antioxydante (réponse à l'altération du ratio GSH/GSSH)	↑ ApoJ (co localisée avec les plaques séniles) GWAS : facteur de risque génétique (MA sporadique) Interaction avec l'A β (clairance via les LPR)	↑ ApoJ	↑ ApoJ (en règle générale) Mais présence d'une variabilité entre les études.
ApoD	Lipocaline, transport de petites molécules hydrophobes. protéine multifonctionnelle. Protéine de réponse au stress oxydatif et aux lésions neuronales	↑ ApoD Dans la MA et au cours du vieillissement Hippocampe et cortex temporal Corrélation génotype ApoE, DNF	↑ ApoD Indépendamment du génotype de l'ApoE	À déterminer

1.7.3.d. *Les marqueurs plasmatiques du stress oxydatif*

Le stress oxydatif est un événement primordial et précoce dans le développement de la MA. Qu'il soit la cause, la conséquence ou un événement parallèle dans la pathogénèse de la MA, il représente une caractéristique bien établie au niveau central (voir 1.5.5.a Évidences des dommages oxydatifs cérébraux). C'est pourquoi l'étude du stress oxydatif en périphérie a attiré l'attention ces dernières années. En effet, les marqueurs du stress oxydatif pourraient également représenter des biomarqueurs intéressants (Schrag, Mueller et al. 2013, de Leeuw, Peeters et al. 2017, Garcia-Blanco, Baquero et al. 2017, Collin, Cheignon et al. 2018).

Une revue de la littérature à ce sujet est synthétisée dans le Tableau 11 et un chapitre de livre y est consacré dans l'annexe IV. Des preuves constantes ont mis en évidence l'augmentation des dommages oxydatifs aux composés biologiques dans le LCR et dans le sang. Tout comme dans le cerveau, on peut observer une augmentation des lipides, des protéines et des acides nucléiques oxydés circulants. Il existe une certaine variabilité dans les études pour certains marqueurs comme les isoprostanes alors que d'autres présentent une grande reproductibilité (lipoprotéines oxydées ou 4-HNE).

Dans le sang il existe également les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques. À noter que dans le plasma, l'antioxydant le plus puissant est l'acide urique qui représenterait 60% du pouvoir antioxydant total. Il est retrouvé en plus faible quantité chez les patients atteints de la MA. Les protéines incluant l'albumine, la transferrine et la céruloplasmine correspondent à des facteurs antioxydants importants dans la circulation sanguine par leur action chélatrice (antioxydants indirects). Enfin, on peut également trouver les vitamines (C, A et E), les carotènes et les polyphénols dans le sang (Harasym and Oledzki 2014). Le dosage des vitamines circulantes chez les sujets MCI et les patients atteints de la MA ont donné des résultats variables. Ceci peut s'expliquer par les différences de style de vie et d'alimentation. Cependant, plusieurs études ont révélé une diminution des vitamines E, C et A. Certaines enzymes cellulaires antioxydantes peuvent être retrouvées dans la circulation et dans les cellules sanguines. C'est le cas de la SOD3 (extracellulaire), la CAT, la GPX et la GR. Les études révèlent dans la plupart des cas une diminution de leur activité enzymatique. Cependant il existe

des variabilités entre ces études. La capacité antioxydante totale plasmatique (TAC) a également été mesurée par certaines équipes dans la MA. La majorité des analyses mettent en évidence une diminution de la TAC plasmatique. Quelques études révèlent des résultats contradictoires car les techniques utilisées étaient différentes et ne mesuraient pas les mêmes composés antioxydants (Wayner, Burton et al. 1987).

Tableau 11 : Marqueurs plasmatiques du stress oxydatif dans le diagnostic des MCI et de la MA

Biomarqueurs	Niveau sanguin
Marqueurs des dommages du stress oxydatif	
Lipides peroxydés	<p>MDA : ↑ dans le plasma (>25%) des patients MA (Kalman, Dey et al. 1994, Ozcankaya and Delibas 2002, Zafrilla, Mulero et al. 2006, Greilberger, Koidl et al. 2008, Serra, Dominguez et al. 2009, Padurariu, Ciobica et al. 2010, Torres, Quaglio et al. 2011, Puertas, Martinez-Martos et al. 2012) ↑ chez les MCI (Martin-Aragon, Bermejo-Bescos et al. 2009, Torres, Quaglio et al. 2011)(limite : problème de spécificité de la technique TBARS)</p> <p>4-HNE : ↑ dans le plasma des patients MA (>90%) (McGrath, McGleenon et al. 2001, Selley, Close et al. 2002, Polidori, Mattioli et al. 2004, Calabrese, Sultana et al. 2006)</p> <p>F₂-isoprostane : ↑ chez les MA (mais d'autres études contradictoires : aucune différence significative) (Feillet-Coudray, Tourtauchaux et al. 1999, Montine, Quinn et al. 2002) (Waddington E, et al. 1999) (Pratico, Clark et al. 2000, Pratico, Clark et al. 2002, Irizarry, Yao et al. 2007) (Sundelof, Kilander et al. 2009)</p>
Protéines oxydées	<p>↑ Protéines carbonylées : MA et MCI (Conrad, Marshall et al. 2000, Choi, Malakowsky et al. 2002, Bermejo, Martin-Aragon et al. 2008, Greilberger, Koidl et al. 2008, Greilberger, Fuchs et al. 2010, Rommer, Fuchs et al. 2016) ; d'autres études contradictoires : pas de différences significatives (Aldred, Bennett et al. 2010) ; ↑ Lipoprotéines oxydées (55%) (Kassner, Bonaterra et al. 2008, Aldred, Bennett et al. 2010, Dildar, Sinem et al. 2010)</p> <p>Protéines oxydées spécifiquement dans la MA (études protéomiques) : <i>human transferrin, hemopexin, alpha-1-antitrypsin, fibrinogen gamma-chain precursor protein et l'alpha-1-antitrypsin precursor</i> (Choi, Malakowsky et al. 2002, Yu, Chertkow et al. 2003).</p> <p>3-Nitrotyrosine : pas de différences entre les patients MCI, MA et les témoins (Calabrese, Sultana et al. 2006, Korolainen and Pirttila 2009)</p>
Acides nucléiques oxydés	<p>↑ 8-OHdG dans les cellules sanguines (60%) (lymphocytes des patients MA) (Mecocci, Polidori et al. 1998, Mecocci, Polidori et al. 2002)</p> <p>↑ des purines et pyrimidines oxydées dans les lymphocytes de patients MA et MCI (Kadioglu, Sardas et al. 2004, Migliore, Fontana et al. 2005)</p>
Antioxydants	
Enzymes antioxydantes	<p>SOD : grande variabilité dans les résultats ↓ ou = de l'activité (Snaedal, Kristinsson et al. 1998, Tabet, Mantle et al. 2001, Rinaldi, Polidori et al. 2003, Puertas, Martinez-Martos et al. 2012, Arce-Varas, Abate et al. 2017) ↓ dans les globules rouges (de Lustig, Serra et al. 1993, Repetto, Reides et al. 1999, Rinaldi, Polidori et al. 2003, Serra, Dominguez et al. 2009, Padurariu, Ciobica et al. 2010, Arce-Varas, Abate et al. 2017)</p> <p>CAT : ↓ activité (Casado, Encarnacion Lopez-Fernandez et al. 2008, Cristalli, Arnal et al. 2012)</p> <p>GPX : ↓ chez les patients MCI et MA (Rinaldi, Polidori et al. 2003, Padurariu, Ciobica et al. 2010, Torres, Quaglio et al. 2011)</p>
Molécules antioxydantes	<p>GSH, ratio GSH/GSSH : ≈ Pas de différence significative (Baldeiras, Santana et al. 2008, Bermejo, Martin-Aragon et al. 2008, Gironi, Bianchi et al. 2011, Cristalli, Arnal et al. 2012)</p> <p>Acide Urique : ↓ 25% (Mecocci, Polidori et al. 2002, Polidori and Mecocci 2002, Rinaldi, Polidori et al. 2003, Polidori, Mattioli et al. 2004, Kim, Pae et al. 2006, Zafrilla, Mulero et al. 2006)</p> <p>Vitamines E et C and A : ↓ (Wayner, Burton et al. 1987, Henning, Stewart et al. 1992, Zaman, Roche et al. 1992, Battino, Bompadre et al. 2003, Rinaldi, Polidori et al. 2003, Charlton, Rabinowitz et al. 2004, Mangialasche, Kivipelto et al. 2010, Mangialasche, Westman et al. 2013) mais certaines études contradictoires</p> <p>β-carotène : ↓ 50% MA et MCI (Zaman, Roche et al. 1992, Schippling, Kontush et al. 2000, Polidori and Mecocci 2002, Rinaldi, Polidori et al. 2003)</p>
Capacité antioxydante totale (TAC)	

ABTS, FRAP, ORAC, ...	↓ TAC Mais forte variabilité dans les études causée par la technique utilisée. (Sinclair, Bayer et al. 1998, Skoumalova and Hort 2012, Chang, Chang et al. 2014) (Tabet, Mantle et al. 2001, Pulido, Jimenez-Escrig et al. 2005, Baldeiras, Santana et al. 2008, Aldred, Bennett et al. 2010, Gironi, Bianchi et al. 2011, Cristalli, Arnal et al. 2012)
----------------------------------	---

En prenant en compte l'ensemble de ces analyses, nous pouvons affirmer qu'il existe également des altérations du stress oxydatif en périphérie dans le stade MCI et dans la MA. Malgré le nombre important d'études sur ce sujet, peu d'étude ont cependant évalué leur corrélation avec les données cliniques comme le déclin cognitif, les PET-Scans ou les marqueurs actuellement utilisés dans le LCR. Les possibles associations des biomarqueurs du stress oxydatif avec les données cliniques ont besoin d'être évaluées et l'utilisation de combinaison de ces biomarqueurs pourraient augmenter leur efficacité.

1.7.4. Utilisation des vésicules extracellulaires pour l'identification de nouveaux biomarqueurs potentiels

Un des défis majeurs dans l'identification et la validation d'un biomarqueur plasmatique pour les maladies neurodégénératives est la spécificité de la maladie. En effet, le marqueur doit refléter en périphérie une altération pathologique au niveau central. Il est bien souvent difficile de distinguer un dysfonctionnement plasmatique lié à une pathologie centrale ou une perturbation systémique. Dans ce contexte les vésicules extracellulaires plasmatiques pourraient pallier à ce problème de spécificité cérébrale. En effet, les vésicules extracellulaires sécrétées par les cellules neuronales peuvent traverser la BHE et se retrouver dans la circulation sanguine avec un contenu pouvant refléter l'état de leurs cellules sécrétrices et du cerveau. Ainsi, les vésicules extracellulaires représentent un outil prometteur dans le diagnostic des maladies neurodégénératives.

1.7.4.a. Découverte des vésicules extracellulaires

Les vésicules extracellulaires sont présentes dans la littérature depuis 50 ans mais le terme de ces vésicules a évolué. Wolf et al. ont mis en évidence des particules riches en lipides isolées des plaquettes par ultracentrifugation (Wolf 1967). Elles seront ensuite détaillées en 1981 (Trams, Lauter et al. 1981) et seront nommées « exosomes ». Ils révèlent des vésicules riches en phospholipides et en acides gras polyinsaturés provenant de la membrane plasmique de différents types cellulaires (40 à 500nm). En 1983, une autre équipe confirme la libération de vésicules contenant les récepteurs à la

transferrine par les réticulocytes lors de leur maturation en érythrocytes par microscopie électronique (Figure 25). Avant la découverte de ce nouveau mécanisme de recyclage, il était admis que les récepteurs étaient dégradés par la voie lysosomale lors de la maturation des réticulocytes par la fusion des endosomes tardifs aux lysosomes (Harding, Heuser et al. 1983). En parallèle, une autre équipe publie également une étude montrant la libération de « microvésicules » ou « ectosomes » pour l'élimination du récepteur à la transferrine par les réticulocytes (Figure 25) (Pan, Blostein et al. 1983, Pan and Johnstone 1983). Cette découverte met en évidence un nouveau mécanisme de recyclage de la cellule via les endosomes.

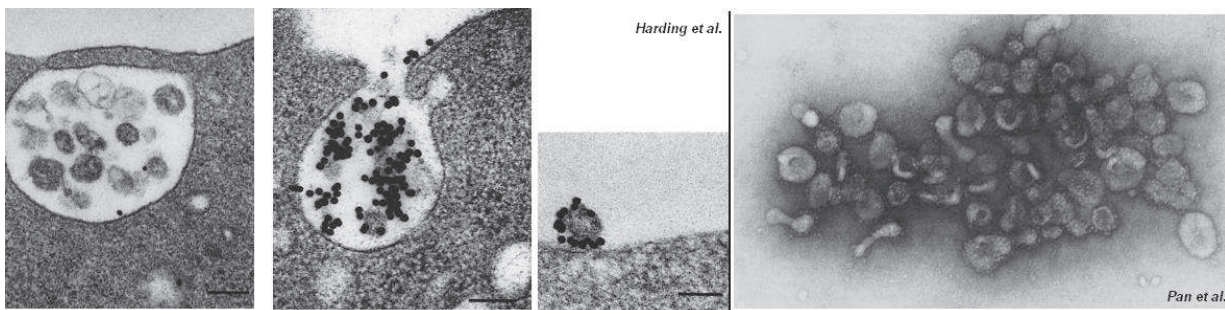


Figure 25 : 1983, Image de microscopie électronique révélant la formation et la libération de vésicules extracellulaires par les réticulocytes (marquage des récepteurs à la transferrine). D'après (Harding, Heuser et al. 1983) à gauche et (Pan and Johnstone 1983) à droite.

1.7.4.b. *Les différentes vésicules extracellulaires et leur biogénèse*

Suite à ces expériences de nombreuses études ont été publiées sur différents types cellulaires et les termes d'exosomes, de microvésicules ou encore d'ectosomes ont été utilisés pour décrire les vésicules formées et libérées par les cellules de manière confondue. Avec l'évolution des connaissances dans le domaine, les termes ont été précisés suivant leurs mécanismes de formation et de libération (microvésicule, exosomes, corps apoptotiques, ...) ou leur origine cellulaire (oncosomes, prostasome, ...). Cependant, encore aujourd'hui, les termes ne sont pas encore utilisés de façon uniforme. C'est pourquoi ici, nous parlerons de vésicules extracellulaires qui englobent différentes familles de vésicules difficiles à séparer par les techniques actuelles.

Les vésicules extracellulaires (EVs) sont très hétérogènes et sont divisées en différentes catégories suivant leur taille et leur mécanisme de libération (Figure 26). À

noter que cette classification est sujette à changement avec l'avancée des connaissances.

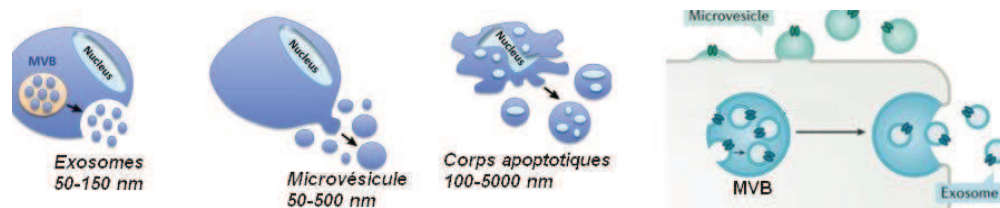


Figure 26 : La famille des vésicules extracellulaires et leur mécanisme de libération simplifié (Exosomes, microvésicules et corps apoptotiques). Figure modifiée de (Kanada, Bachmann et al. 2016).

Les corps apoptotiques sont de grosses vésicules hétérogènes (100 nm-5µm) provenant du phénomène d'apoptose qui provoque une fragmentation de la cellule. Elles peuvent donc contenir du cytoplasme, des organites et de l'ADN fragmenté. Ces corps seront ensuite éliminés par les cellules environnantes.

Les exosomes (50-150 nm) sont libérés par le mécanisme d'endocytose et nécessite la formation des vésicules intraluminales appelées également «corps multivésiculaires» (MVB). C'est à ce niveau qu'existe un recyclage cellulaire important. Le MVB peut fusionner au lysosome pour la dégradation de son contenu ou se diriger vers la membrane plasmique pour relarguer ces vésicules à l'extérieur de la cellule (Figure 26). Leur formation est un mécanisme complexe faisant intervenir une machinerie cellulaire importante dépendante ou non des complexes ESCRT-I, II et III (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*). Les différentes voies ont été identifiées dans les dernières années. Les exosomes peuvent se former avec l'aide du système ESCRT qui fait intervenir quatre complexes protéiques majeurs ainsi que des protéines associées (TSG101) (Schuh and Audhya 2014, Christ, Raiborg et al. 2017). Ce système permet la formation des MVB et l'invagination de la membrane par des étapes successives. Il existe également une autre voie de formation des exosomes (ESCRT indépendante) via ALIX (Baietti, Zhang et al. 2012), via des protéines membranaires nommées tétraspanines (CD63, CD9, CD81, ...) (Theos, Truschel et al. 2006, Buschow, Nolte-t Hoen et al. 2009, van Niel, Charrin et al. 2011, Charrin, Jouannet et al. 2014) ou encore via la formation de céramides nécessitant la sphingomyélinase II (Trajkovic, Hsu et al. 2008, Kajimoto, Okada et al. 2013). Un blocage d'une de ces voies réduit la

sécrétion d'exosomes mais ne la supprime pas totalement étant donné qu'il existe de nombreux mécanismes parallèles. C'est en inhibant les composés ESCRT que certaines équipes ont découvert l'existence de plusieurs mécanismes de biogénèse des exosomes (Stuffers, Sem Wegner et al. 2009).

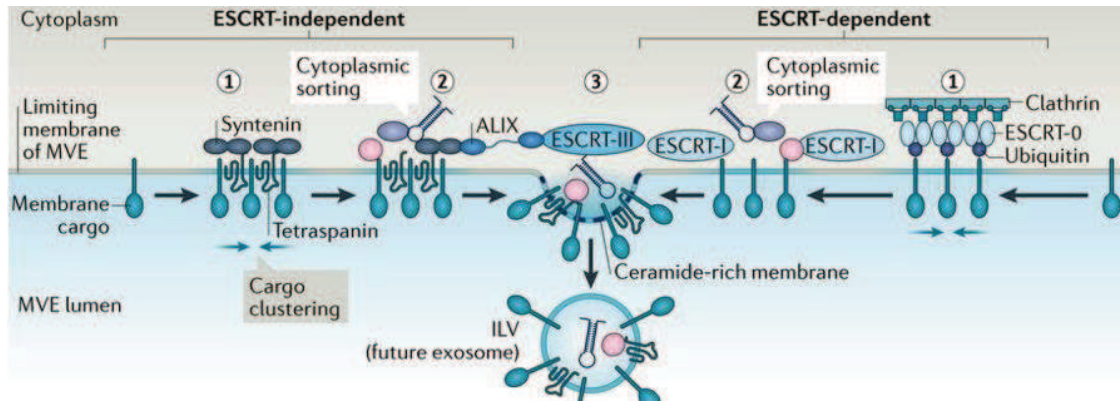


Figure 27 : schématisation de la libération des exosomes par les différents mécanismes cellulaires (ESCRT, tétraspanines, céramide, ALIX). D'après (van Niel, D'Angelo et al. 2018)

Les microvésicules (50-500 nm) se forment par le bourgeonnement de la membrane plasmique. C'est pourquoi leur composition est similaire à la membrane plasmique et peuvent contenir des composés cytoplasmiques divers. Le bourgeonnement de la membrane peut également impliquer la machinerie protéique ESCRT (van Niel, D'Angelo et al. 2018). Le mécanisme de formation est schématisé en Figure 28.

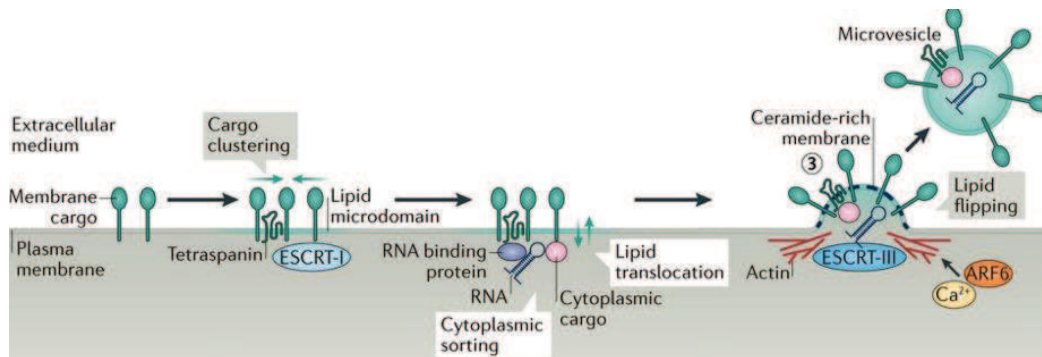


Figure 28 : Schématisation de la formation des microvésicules à partir de la membrane plasmique impliquant le complexe ESCRT ou les tétraspanines. D'après (van Niel, D'Angelo et al. 2018)

Bien que la génération de microvésicules et d'exosomes se produise à différents endroits de la cellule, des mécanismes intracellulaires et des mécanismes de tri communs sont impliqués dans la biogénèse des deux entités (Figure 27 et Figure 28).

C'est pourquoi, à ce jour, il est difficile de différencier les exosomes des microvésicules avec les techniques d'isolation et la connaissance des marqueurs de ces populations. De plus, il est difficile de déterminer l'origine des EVs produites en altérant simplement la fonction d'un mécanisme impliqué dans la biogenèse de ces vésicules car certains mécanismes sont en commun. Ainsi, nous parlerons dans ce projet de la famille d'EVs sans faire la distinction entre les sous types de vésicules.

1.7.4.c. *Composition des vésicules extracellulaires*

Toutes les cellules sont capables de produire des EVs et ce processus est conservé tout au long de l'évolution (bactéries, plantes, homme). Il est maintenant bien établi que la composition et l'abondance des produits contenus dans les EV sont spécifiques du type cellulaire et de l'état physiologique ou pathologique de la cellule, des stimuli qui modulent leur production et leur libération et les mécanismes moléculaires conduisant à leur biogenèse cellulaire. Elles peuvent contenir des constituants cellulaires variés (Figure 29) tels que des protéines, des lipides, des acides nucléiques (ARN, ADN, ...).

La composition protéique des EVs a dans un premier temps été évaluée par des techniques de Western Blot et d'immunomicroscopie électronique, mais le développement des techniques de protéomique a permis de les identifier à plus grande échelle. La base de données ExoCarta, créée en 2009, est dédiée à ce domaine (<http://www.exocarta.org/>). On peut retrouver plus de 10.000 protéines : des protéines membranaires (tétraspanines, rab(s), intégrines et les protéines MHC immuno-régulatrice), des enzymes du métabolisme (GAPDH, ATPase, Enolase, SOD, ...), des protéines de signalisation et des protéines impliquées dans la formation des EVs (TSG101, ALIX, ...) ou encore des protéines du cytosquelette (actine, kératine, tubuline, ...).

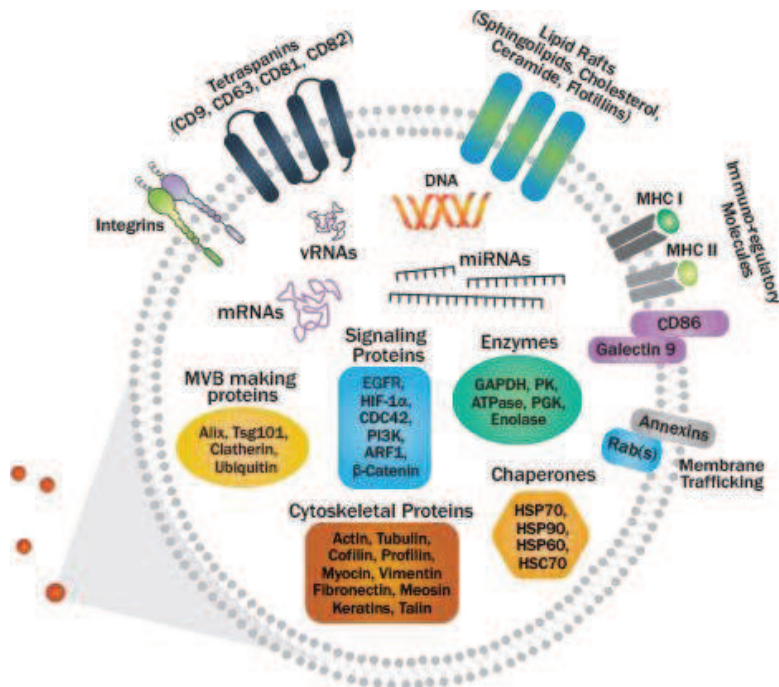


Figure 29 : Illustration de la composition variée des vésicules extracellulaires .

Les lipides retrouvés dans les EVs sont majoritairement les radeaux lipidiques (« raft »), le cholestérol, les céramides, les sphingolipides et la flotillin. On peut également trouver des acides nucléiques comme des mARN, des miARN, des ARN non codant et même de l'ADN (Guescini, Genedani et al. 2010).

Différentes études ont essayé de trouver des marqueurs spécifiques de chaque sous-population d'EVs. Cependant, ces analyses révèlent la présence de molécules communes rendant une fois de plus leur sous-isolation difficile (Ortiz 2017, van Niel, D'Angelo et al. 2018). La GAPDH, les protéines de chocs (HSP), les tétraspanines ou encore TSG101 et ALIX sont couramment utilisés comme marqueurs d'EVs mais ne permettent pas de séparer les deux familles.

1.7.4.d. Fonctions des vésicules extracellulaires

Les EVs ont été découvertes la première fois pour leur rôle d'élimination de composés cellulaires inutiles pour la cellule. Un nombre important de travaux ont par la suite essayé de comprendre les différents rôles des EVs. Il est maintenant clair que les EVs jouent un rôle dans de nombreuses fonctions de l'organisme. Elles sont importantes dans l'immunité, dans la présentation d'antigène avec leurs protéines MHC (They,

Regnault et al. 1999) et dans la communication intercellulaire (Yanez-Mo, Siljander et al. 2015). En effet, le contenu des EVs peut être transmis aux cellules avoisinantes pour stimuler la cellule ou engendrer un changement phénotypique. Elles peuvent stimuler une voie de signalisation via des récepteurs, être captées et internalisées par une cellule voisine selon différents mécanismes illustrés en Figure 30.

En fonction de chaque organe et type cellulaire, les EVs vont jouer des rôles différents. Nous aborderons ici plus en détail les fonctions des EVs dans le SNC et plus particulièrement leur implication dans les maladies neurodégénératives.

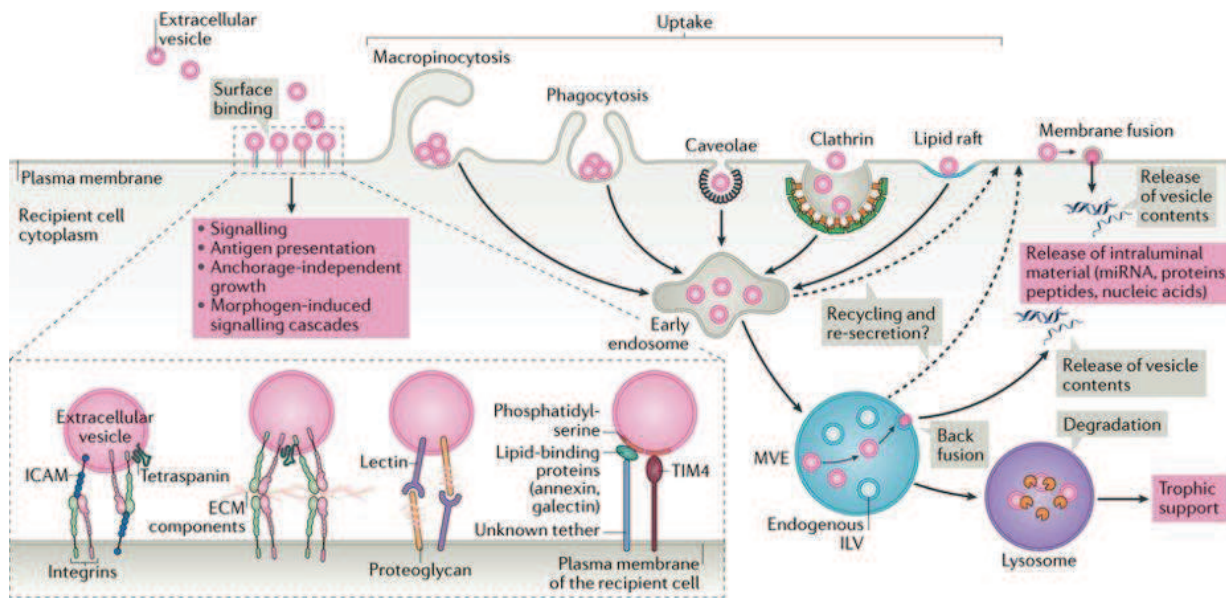


Figure 30 : Illustration des différents devenir des EVs une fois libérées. Elles peuvent se fixer à des récepteurs ou être internalisées par une cellule réceptrice (van Niel, D'Angelo et al. 2018).

1.7.4.e. Les vésicules extracellulaires dans le système nerveux central et leurs applications possibles dans le diagnostic

Les vésicules extracellulaires dans le cerveau

Les cellules du cerveau sont toutes capables de produire des EVs incluant les neurones, les oligodendrocytes et les astrocytes. Elles participent à la communication entre ces différents types cellulaires permettant le maintien de la fonction cérébrale, le

développement neuronal, l'inflammation ou encore l'échange de molécules neurotrophiques (Cossetti, Iraci et al. 2014, Paolicelli, Bergamini et al. 2018).

Différentes études ont révélé leur implication dans les fonctions synaptiques ainsi que dans la survie cellulaire face à des stress cellulaires (Buchheit and Tytell 1992, Lachenal, Pernet-Gallay et al. 2011, Fruhbeis, Frohlich et al. 2013, Fruhbeis, Frohlich et al. 2013, Korkut, Li et al. 2013, Morel, Regan et al. 2013, Frohlich, Kuo et al. 2014, Bahrini, Song et al. 2015). L'analyse électrophysiologique de neurones en culture a indiqué une augmentation du potentiel d'action lorsqu'ils sont en contact d'EVs (Frohlich, Kuo et al. 2014).

Les EVs de la microglie induisent un certain nombre de réponses physiologiques dans les neurones cibles. Celles-ci représentent un système antioxydant supplémentaire avec la sécrétion d'EV contenant différentes enzymes de défense (SOD, CAT, peroxiredoxin) par les oligodendrocytes. Les neurones qui vont recevoir ces EVs auront une résistance plus élevée au stress oxydatif (Kramer-Albers, Bretz et al. 2007, Fruhbeis, Frohlich et al. 2013). Les EVs permettraient également de régénérer les axones après une lésion ou un stress (Lopez-Verrilli, Picou et al. 2013).

Plusieurs études ont révélé la capacité des EVs à traverser la BHE dans les deux sens (Skog, Wurdinger et al. 2008, Alvarez-Erviti, Seow et al. 2011, Wood, O'Loughlin et al. 2011, Takahashi, Nishikawa et al. 2013, Choi and Lee 2016, Matsumoto, Stewart et al. 2017, Yuan, Zhao et al. 2017). Ainsi, la libération d'EVs serait également un mécanisme de protection et un système de drainage pour éliminer des contenus cellulaires toxiques ou altérés. Elles seraient particulièrement utiles pour éliminer certains déchets dans le LCR où ils seront ensuite dégradés. Cependant les mécanismes de passage de la BHE restent à être déterminer et méritent plus d'attention.

En prenant en compte les études sur le sujet, on peut affirmer que les EVs sont essentiels au maintien cérébral et à la survie neuronale. Cependant en condition pathologique, le système peut s'emballer et les EVs peuvent devenir neurotoxiques et propager rapidement la maladie de cellules en cellules.

L'implication des vésicules extracellulaires dans les maladies neurodégénératives

Les EVs peuvent être le moyen de transfert de molécules bénéfiques tout comme de produits toxiques. Des récentes études ont mis en évidence leur implication dans la progression de la MA en parallèle de l'altération du trafic endosomal et de l'inhibition des systèmes de dégradation cellulaires (lysosomes et protéasomes) et via leur pouvoir de propagation des protéines toxiques incluant l'A β et les protéines Tau.

On a pu voir précédemment que la propagation des deux protéines pathogéniques était une caractéristique importante de la MA (voir 1.3.2. Caractéristiques histopathologiques). Différentes hypothèses ont été émises (Figure 31) pour expliquer ce phénomène organisé (Costanzo and Zurzolo 2013). Certains pensent que c'est la mort neuronale qui libère le contenu toxique de la cellule permettant de contaminer les cellules avoisinantes. D'autres ont mis en évidence la formation de nanotubes entre deux cellules pour s'échanger du contenu cytoplasmique (Victoria and Zurzolo 2017). Les vésicules synaptiques ont également été suspectées dans la transmission de protéines toxiques. Enfin, plus récemment, des études ont révélé l'implication potentiel des EVs dans la propagation des DNF et de l'agrégation et la clairance de l'A β (Bellingham, Guo et al. 2012, Fyfe 2018).

Cette dernière hypothèse est supportée par la présence des protéines Tau (pTau et tTau) et de l'A β dans les MVs et par le fait que le clivage de l'APP par BACE-1 se déroule au niveau des endosomes (Figure 3) (Koo and Squazzo 1994). C'est dans les années 2000 que deux équipes ont démontré par microscopie électronique la co-localisation de l'A β avec le MVB dans les cerveaux de souris transgéniques porteuses de mutation de la MA et dans le cerveau de patients atteints de la MA (Takahashi, Milner et al. 2002, Langui, Girardot et al. 2004). Puis en 2006, l'équipe de Rajendran et al. confirme la présence d'A β dans les EVs (Rajendran, Honsho et al. 2006). Les peptides sont retrouvés majoritairement autour des plaques séniles, ce qui révèle le rôle des EVs dans la formation des plaques. On peut également retrouver l'A β sous forme oligomère, l'APP et ces produits de clivage comme le CTF et le l'AICD dans les EVs (Vingtdeux, Hamdane et al. 2007, Sharples, Vella et al. 2008, Perez-Gonzalez, Gauthier et al. 2012, Kumar, Bhartiya et al. 2018). Saman et al., ont mis en évidence la protéine

Tau dans les EVs des neuroblastomes (Saman, Kim et al. 2012). L'élimination par les EVs de Tau lors d'une surexpression de celle-ci, montre l'importance des EVs dans l'élimination des composés cellulaires inutiles ou toxiques. Différents modèles de propagation *in vivo* ont été développés pour mettre en évidence l'implication des EVs dans la propagation de l'A β et Tau (Asai, Ikezu et al. 2015, Polanco, Scicluna et al. 2016). Ces études ont révélé que sans la génération d'EVs via le blocage de leur biogénèse, la propagation cérébrale est atténuée.

L'altération précoce du système endosomal dans la MA pourrait perturber la libération des EVs et leur bon fonctionnement cérébral. De plus, l'altération de la fonction du lysosome et de l'autophagie va exacerber la propagation de la pathologie via les EVs. En effet, pour se protéger la cellule utilise ce système comme dernier recours pour éliminer les produits toxiques mais engendre une accumulation et la mort neuronale.

Les mécanismes des EVs dans la propagation méritent d'être approfondis pour comprendre le phénomène de la propagation et essayer de trouver des nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

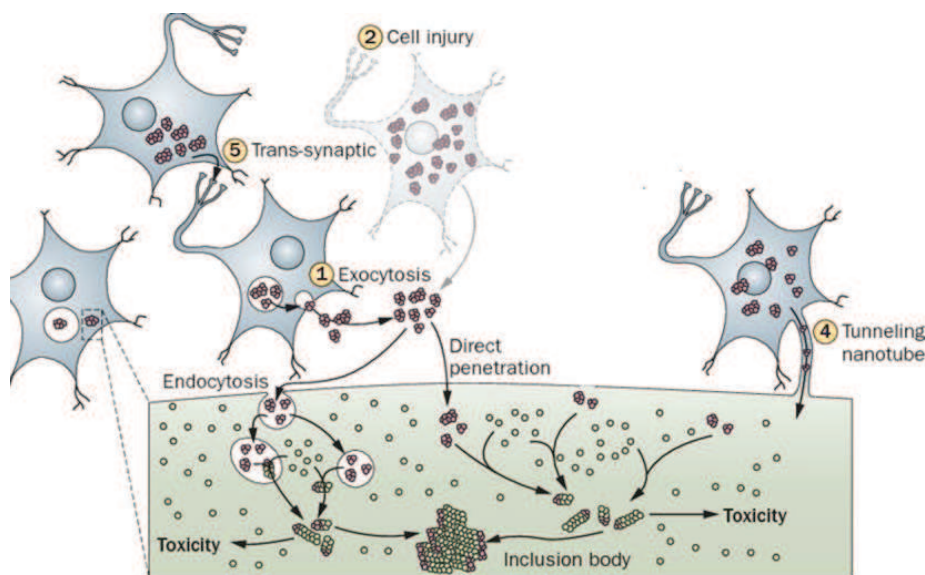


Figure 31 : Illustration des différentes hypothèses expliquant la propagation de protéines toxique dans la maladie d'Alzheimer.

Les vésicules extracellulaires comme réservoir de biomarqueur périphérique

L'étude des EVs dans le SNC correspond à un nouveau domaine de recherche. C'est pourquoi, des connaissances supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si cette forme de communication intercellulaire peut être exploitée pour le traitement des troubles neuronaux ou comme véhicule pour transporter des médicaments au cerveau.

Par contre, ils peuvent être utilisés dans un premier temps comme des outils de diagnostic pour les maladies neurodégénératives. En effet, il est possible de récupérer et d'analyser le contenu des EVs du plasma dont une partie peuvent provenir du cerveau via le passage de la BHE. Ainsi, les variations retrouvées dans les EVs plasmatiques peuvent refléter des altérations au niveau central. Leur implication dans la propagation de la pathologie font d'eux de bons candidats comme biomarqueurs de la MA.

À ce jour, encore peu d'études se sont consacrées à ce domaine. Quelques équipes ont d'abord démontré que l'A β et Tau pouvait être retrouvé dans les EVs du LCR et du sang (Saman, Kim et al. 2012, Fiandaca, Kapogiannis et al. 2015, Goetzl, Mustapic et al. 2016, Winston, Goetzl et al. 2016, Hamlett, Goetzl et al. 2017). Ensuite, certaines études se sont intéressées aux niveaux de ces marqueurs pathogéniques ainsi que certaines protéines altérées dans la MA comme les protéines synaptiques, les protéines neurotrophiques ou encore les marqueurs de stress ou du lysosome dans les EVs plasmatiques des patients MA (Goetzl, Boxer et al. 2015, Goetzl, Boxer et al. 2015, Kapogiannis, Boxer et al. 2015, Goetzl, Kapogiannis et al. 2016, Goetzl, Abner et al. 2018, Goetzl, Nogueras-Ortiz et al. 2018). À noter que la grande majorité de ces études ont été réalisées par l'isolation des EVs plasmatiques suivie d'une purification des EVs d'origine neuronale en utilisant une technique d'immunocapture par un anticorps anti-L1CAM (Neural cell adhesion molecule L1 precursor). Cependant, cette technique est fortement remise en question. En effet, elle entraîne un biais important car il s'avère que L1CAM est présent en périphérie dans d'autres organes que le cerveau (Tsutsumi, Morohashi et al. 2011, Smogeli, Davidson et al. 2016). C'est pourquoi, il est nécessaire de continuer l'investigation de biomarqueurs potentiel et de se concentrer sur l'étude du

contenu des EVs plasmatiques totales. Ce nouveau domaine de recherche ouvre de nombreuses perspectives.

1.8. Hypothèse et objectifs de recherche

La MA, la principale cause de démence dans le monde, est devenue un véritable problème de santé publique. Les prévisions mondiales sont inquiétantes car le nombre de personnes atteintes de démences devrait atteindre 82 millions en 2030 et 152 millions d'ici 2050 en absence de traitements efficaces et de diagnostic précoce. Chaque année ce sont plus de 9,9 millions de nouveaux cas de démence qui sont diagnostiqués dans le monde, soit un nouveau cas tous les 3 secondes.

Cependant, après plus de 100 ans de recherche sur la MA et de découvertes importantes dans le domaine, il reste d'importants défis à relever. En effet, comme nous avons pu le voir dans ce chapitre, l'origine exacte de la MA reste méconnue et les signes cliniques présentent une forte hétérogénéité ce qui explique l'absence de traitements efficaces, les failles et les limites du diagnostic actuel.

Progressivement, la MA s'installe et engendre des dommages irréversibles au SNC entraînant une altération neuronale, une perte synaptique et un déclin des fonctions cognitives globales. Les deux principales caractéristiques neuropathologiques de la MA sont les plaques amyloïdes au niveau extracellulaire et les DNF liées à l'hyperphosphorylation de la protéine Tau au niveau intracellulaire. Les mécanismes de la formation des plaques séniles et des DNF sont inconnus mais ceux-ci vont se propager petit à petit dans différentes régions cérébrales. Une des hypothèses serait l'implication des vésicules extracellulaires dans la propagation toxique des plaques et des DNF. Ces deux caractéristiques neuropathologiques représentent les critères du diagnostic dit certain de la MA par une analyse du cerveau en *post-mortem*. Durant les deux dernières décennies, de nombreuses approches thérapeutiques ont ciblé les voies de l'A β et de Tau afin de prévenir ou de stopper la progression de la MA avec des résultats non satisfaisants. Ces nombreux échecs révèlent le caractère multifactoriel de la MA et la nécessité de commencer un traitement le plus rapidement possible avant l'altération irréversibles du SNC. Tout comme la plupart des maladies chroniques, la MA commence insidieusement à s'installer en absence de symptômes (stades précliniques) puis progresse doucement avec l'apparition de troubles cognitifs légers (phase MCI). À ce stade, les patients peuvent encore éviter la démence et demeurer MCI jusqu'à la fin

de leur vie. Il est encore difficile d'identifier les personnes à risque de développer une démence de type Alzheimer ou encore de comprendre pourquoi certaines personnes évoluent vers la démence et d'autres non. Néanmoins, ces deux phases représentent une opportunité importante que ce soit pour le diagnostic et pour le début d'un traitement afin de prévenir la conversion vers la démence et sa progression.

C'est pourquoi, au vu de l'évolution lente de la MA, de son caractère irréversible et compte tenu de sa détection tardive, il est primordial d'identifier des biomarqueurs pour un diagnostic fiable et précoce afin de modifier les facteurs de risque et de ralentir sa progression. Les efforts dans ce domaine se concentrent principalement sur l'analyse du niveau d'A β et de la protéine Tau totale ou hyperphosphorylée dans le LCR ou dans le cerveau par imagerie cérébrale. Cependant, malgré l'introduction récente de ces biomarqueurs dans les critères de diagnostic de l'IWG-2 et du NIA-AA, leur utilisation est restreinte car ils présentent des limites de sensibilité et spécificité et se révèlent invasifs et coûteux dans de nombreux pays. Ainsi, l'identification de marqueurs périphériques et la mise à jour des critères actuels sont indispensables pour permettre un diagnostic certain et rapide de la MA. De plus, il est également essentiel d'élargir notre vision de la pathogenèse au-delà de l'hypothèse de la protéine Tau et de l'A β et d'identifier de nouveaux biomarqueurs potentiels.

L'association entre le stress oxydatif et les principales caractéristiques neuropathologiques de la MA est maintenant clairement établie. Le stress oxydatif est impliqué dans chacun des mécanismes pathogéniques étudiés et apparaît bien avant l'apparition des troubles cognitifs et des plaques A β *in vivo* chez des animaux transgéniques. De plus, on observe en *post-mortem* une grande quantité cérébrale de produits d'oxydation chez les sujets MCI ou chez les patients atteints de la MA. La présence précoce du stress oxydatif a également été confirmée dans le sang ou dans le LCR des patients MCI mais peu d'études ont étudié leur association possible avec les données cliniques comme les scores cognitifs.

Récemment, dans le domaine des biomarqueurs, les études s'intéressent également aux vésicules extracellulaires périphériques. Les vésicules extracellulaires, libérées par de nombreux types cellulaires comme les cellules du SNC, sont impliquées dans

l'élimination de constituants cellulaires (lipides, protéines, ARN, ...), dans la communication intracellulaire et seraient responsables de la propagation cérébrale des protéines toxiques (Tau, A β , ...) dans les maladies neurodégénératives. Elles sont capables de passer la barrière hémato-encéphalique et de se retrouver dans la circulation sanguine. Ainsi les vésicules extracellulaires périphériques pourraient renfermer des biomarqueurs potentiels ainsi que des protéines d'origine neuronale reflétant les mécanismes pathologiques centraux. Cependant, peu d'études ont été réalisées dans ce nouveau domaine de recherche. L'investigation du contenu des vésicules extracellulaires plasmatiques ouvrent de nombreuses perspectives.

De ce fait, l'hypothèse de cette thèse se décompose en deux parties. Tout d'abord, un profil de biomarqueurs périphériques liés au stress oxydatif dans le plasma peut constituer une signature moléculaire potentielle pour le diagnostic du stade MCI et de la progression de la MA et peut être associé au déclin cognitif. Dans un second temps, le contenu protéique des vésicules extracellulaires plasmatiques totales peut représenter un nouvel outil afin d'identifier des signatures moléculaires potentielles pour le diagnostic du stade MCI et de la progression de la MA.

Ce travail se décompose en 3 objectifs spécifiques, décrits ci-dessous :

Objectif 1 :

Identification d'un profil de marqueurs plasmatiques lié au stress oxydatif et leur association au scores cognitifs chez les sujets MCI et les patients atteints de la MA à différents stades de la maladie.

Objectif 2 : Dosage des protéines pathogéniques de la MA dans les exosomes totaux plasmatiques comme un nouvel outil potentiel pour prédire le stade MCI et la progression de la MA.

Objectif 3 : Étude du niveau de protéines d'origine cérébrale, impliquées dans les mécanismes pathogéniques de la MA, dans les vésicules extracellulaires plasmatiques pour le diagnostic des sujets MCI et de la progression de la MA.

3. CHAPITRE II

ARTICLE 1: BLOOD-BASED REDOX-SIGNATURE AND THEIR ASSOCIATION TO THE COGNITIVE SCORES IN MCI AND ALZHEIMER'S DISEASE PATIENTS

Statut de l'article : Publié dans le journal *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 130, January 2019, Pages 499-511

Auteurs de l'article : Morgane Perrotte ^{a,b}, Aurélie Le Page ^c, Marianne Fournet ^a, Mélanie Le Sayec ^a, Éric Rassart ^d, Tamas Fulop ^c, Charles Ramassamy ^{a,b}

^a INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada

^b Institut sur la Nutrition et les Aliments Fonctionnels, Laval University, Québec, Canada

^c Department of Medicine, Geriatric Division, Research Center on Aging, Université de Sherbrooke, QC, Canada

^d Université Québec à Montréal, Dept. Sciences biologiques, QC, Canada

3.1. Résumé et objectifs de l'article 1 :

Le stress oxydatif joue un rôle primordial et précoce dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer (MA). De nombreuses évidences montrent que les altérations oxydatives chez les patients atteints de MA et chez les patients présentant un déficit cognitif léger (MCI) ne se limitent pas au cerveau mais s'étendent au compartiment sanguin. Cependant, le statut oxydatif plasmatique et son association potentielle avec les scores cliniques MMSE (mini-examen de l'état mental) et MoCA (Montreal Cognitive Assessment) est mal étudié. Le but de notre étude était d'établir une signature des altérations oxydatives dans le sang des patient MCI et MA et leur évolution au cours de la progression de la maladie. Nos résultats ont montré une réduction de la capacité antioxydante totale (CAT) et une augmentation des protéines de réponse au stress, l'apolipoprotéine J (ApoJ) et Klotho chez les sujets atteints de MCI. Pour la première fois, nous avons mis en évidence une modification de l'activité du protéasome circulant chez les patients MCI et MA. Nous avons constaté que l'altération de l'activité du protéasome circulant est associée à l'accumulation de protéines oxydées dans le plasma au début de la MA. Fait intéressant, la CAT, les niveaux de vitamine D et l'activité du protéasome sont positivement associés aux scores cliniques (MMSE et MoCA). Les niveaux de protéines carbonylées et d'ApoJ étaient négativement associés

aux scores MMSE et MoCA. Les niveaux d'apolipoprotéine D (ApoD) n'étaient pas différents entre les groupes. D'autre part, nos analyses ROC (*Receiver Operating Characteristic*) indiquent que certains de ces marqueurs fournissent une bonne performance pour séparer les différents groupes. Globalement, nos résultats démontrent que certains marqueurs oxydatifs pourraient être considérés comme des biomarqueurs plasmatiques non invasifs pour un diagnostic précoce du stade MCI et de la progression de la MA.

3.2. Contribution de l'étudiant à l'article 1:

L'article a été publié dans le journal *Free Radical Biology and Medicine (Impact Factor 2017 : 6.02)*, un journal réputé dans le domaine du stress oxydatif. L'ensemble des expériences décrites dans cette publication ont été réalisées par moi-même avec l'aide de deux stagiaires sous ma supervision pour le dosage des protéines carbonylées (Mélania Le Sayec) et la mise au point de la mesure des capacités antioxydantes (ABTS et Apollo 4000) avec Marianne Fournet. Ce projet n'aurait pas pu voir le jour sans le don généreux des échantillons plasmatiques de l'étude clinique de l'institut gériatrique de Sherbrooke. Aurélie Le Page, sous la supervision du Professeur Tamas Fulop, a réalisé le recrutement des patients, la collecte et la préparation des échantillons sanguins. J'ai également réalisé les figures, l'analyse et la compilation des résultats. J'ai écrit l'article au complet qui a ensuite été révisé et corrigé par le Professeur Charles Ramassamy. J'ai ensuite répondu aux commentaires et aux questions des évaluateurs sous la supervision du Professeur Charles Ramassamy.

3.3. Article 1

Abstract

Oxidative stress plays a pivotal and early role in the pathophysiology of Alzheimer's disease (AD). There is convincing evidence that oxidative alterations in AD and in mild cognitive impairment (MCI) patients are not limited to the brain but are extended to the blood compartment. However, the oxidative pattern in plasma is still inconclusive. Moreover, their potential association with the clinical scores MMSE (Mini-Mental State Examination) and MoCA (Montreal Cognitive Assessment) is poorly investigated. The

aim of our study was to establish a pattern of blood-based redox alterations in prodromal AD and their evolution during the progression of the disease. Our results showed a reduction in the total antioxidant capacity (TAC) and an increase of the stress-response proteins apolipoprotein J (ApoJ) and Klotho in MCI subjects. For the first time, we evidenced circulating-proteasome activity. We found that the alteration of the circulating-proteasome activity is associated with the accumulation of oxidized proteins in plasma form early AD. Interestingly, the TAC, the levels of vitamin D and the activity of proteasome are positively associated to the clinical scores MMSE and MoCA. The levels of protein carbonyl and of ApoJ were negatively associated to the MMSE and MoCA scores. The levels of apolipoprotein D (ApoD) were not different between groups. Interestingly, the receiver operating characteristic (ROC) curves analysis indicates that these redox markers provide a fair classification of different groups with high accuracy. Overall, our results strengthen the notion that some specific oxidative markers could be considered as non-invasive blood-based biomarkers for an early MCI diagnosis and AD progression.

Highlights

- **Early Impairment of the plasma ability to degrade H₂O₂ in MCI patients.**
- **Rise of some stress-response proteins from the MCI status.**
- **Inverse correlation between the circulating-proteasome activity and protein oxidation in AD plasma.**
- **Some plasma oxidative markers are linked to cognitive scores (MoCA and MMSE).**
- **A combination of oxidative markers can be considered for the MCI diagnosis and the progression of AD.**

Keywords:

Protein oxidation; Apolipoprotein J, Apolipoprotein D, Klotho, Circulating-proteasome, Clusterin, MoCA, MMSE, Total antioxidant capacity, Reduced thiols.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a complex, multifactorial neurodegenerative disorder with a clinically heterogeneous pathologic entity. In 2016, the World Health Organization estimated that 47.5 million people are affected by dementia. According to Prince et al., the prevalence is 65.7 million in 2030 and 115.4 million in 2050 in the absence of new treatments and early diagnosis tools [1]. The AD diagnosis remains challenging despite the standardized criteria of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth edition (DSM-IV-TR) and the National Institute of Neurological Disorders and Stroke–Alzheimer Disease and Related Disorders (NINCDS–ADRDA) [2]. In 2011, the National Institute on Aging (NIA) and the Alzheimer's Association (AA) updated the original recommendations formulated in 1984 and introduced the use of imaging and cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers [3-5]. Currently, the probable AD diagnosis is based on a combination of cognitive tests, neuroimaging and the p-tau/A β 42 ratio in CSF. However, these criteria present a relative specificity (70%) and a fair sensitivity (81%) due to the fact that amyloid plaques and neurofibrillary tangles are necessary but not sufficient to lead to the development of AD [6-9]. In addition, the present diagnosis represents a late stage associated with an irreversible brain damage. Numerous longitudinal follow-up studies clearly demonstrated that AD dementia is preceded by a long asymptomatic (preclinical) phase followed by a transitional stage with mild cognitive impairment (MCI) [4,10,11]. This transitional stage offers an important opportunity for possible diagnosis, prevention and therapeutic interventions. Consequently, all efforts focus on the identification and development of specific biomarkers to detect the disease as early as possible. It is now recognized that only a combination of biomarkers will define a patient-specific signature to diagnose AD in the future [12].

Although the accumulation of amyloid and tau proteins is considered the core pathologic hallmark for AD, other factors such as oxidative stress, inflammation, and lifestyle also contribute to its complex pathophysiology. It is now well established that oxidative stress plays a pivotal role in the pathophysiology and the progression of AD. In the brain, oxidative damages to biomolecules are largely reported in AD and MCI patients [13-15] and in the brain of different transgenic mouse models related to AD [16,17]. In addition, there is convincing evidence that oxidative alterations in AD and in MCI patients are not limited to the brain but is extended to the blood compartment [18,19]. Some common

genes are dysregulated in entorhinal cortex, hippocampus and in blood [20]. In addition, markers of oxidative stress were consistently identified as elements of blood-based signatures in AD [21]. Interestingly, oxidative stress can precede the development of the neuropathological hallmarks of AD [17,22-24]. However, defining the right pattern of oxidative markers remain a challenge and is still an ongoing process for peripheral markers in AD. An elevation of many redox markers i.e. lipid peroxidation, protein carbonyl and the decrease of antioxidant capacity were described in plasma from AD or MCI patients [19]. Different antioxidant enzymes levels and their activities are also dysregulated in peripheral during the progression of AD [25]. However, only a few of them had indicated an association with cognitive decline. These associations were mainly performed with the Mini-Mental State Examination (MMSE) [26] while very limited studies have examined their associations with the Montreal Cognitive Assessment (MoCA) [27].

The aim of this study was to identify some redox biomarkers in plasma from MCI and their evolution in AD from the early to the severe stages of the disease. In order to validate their relation with brain changes in AD pathology, we analyzed their association with cognitive performance assessed by the two complementary cognitive tests (MMSE and MoCA). We found an early peripheral reduction of hydrogen peroxide (H₂O₂) scavenging activity, a subsequent elevation of stress response proteins including ApoJ and Klotho in plasma from MCI subjects. Additionally, our findings highlight, for the first time, that the elevation of the plasma oxidized proteins reflects the impairment of circulating proteasome activity in mild AD stage. Finally, the present study provides evidence that some markers related to oxidative stress are associated with two cognitive scores, MoCA and the MMSE assays.

2. Materials and methods

2.1. Study design and participants

Plasma samples from healthy control, MCI and AD patients were generously given by the Memory Clinic of the Sherbrooke. The main characteristics of the population enrolled in this study are summarized in Table 1. The healthy control subjects were defined according to the SENIEUR protocol (from SENIor EURopean), a standard selection

protocol for immunogerontological studies [28]. Selection of MCI subjects was based on cognitive test scores and Pertersen criteria [29]. The AD patients were selected depending on criteria developed by the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS_ADRDA) and the fourth edition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) published by the American Psychiatric Association in 1994 [2]. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the University of Sherbrooke and informed written consent was obtained from all participants and/or their representatives (protocol #2010-21/Fülöp). The inclusion/exclusion criteria used in the study were indicated in the Fig.1.

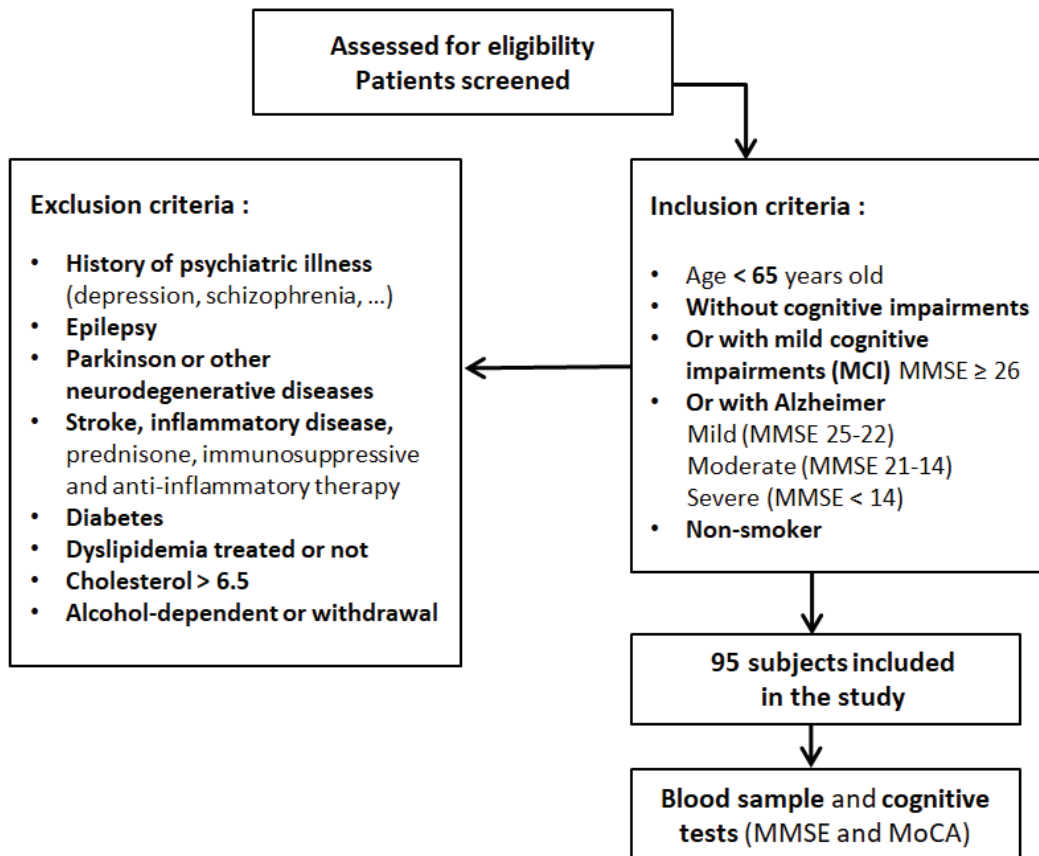


Fig. 1. Inclusion/exclusion criteria used in the study in the patient's recruitment phase

2.2. Cognitive assessments and plasma collection

All selected subjects underwent clinical and neuropsychological evaluation included the MoCA and MMSE [26,27]. 80 mL of blood was obtained after overnight fasting in heparin-containing vacuum tubes. The plasma was immediately separated by low speed centrifugation (260 x g, 15 min, 22°C) and stored at -80°C until used. The total protein concentration was measured using bicinchoninic acid (BCA) assay (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific, Inc).

Table 1. General characteristics of study participants.

Parameters	Healthy	MCI	AD		
			Mild AD	Moderate AD	Severe AD
N	24	24	18	15	14
Males/Females ratio	6/18	4/20	3/15	6/9	3/11
Age (years)	71.0 ± 1.3	74.0 ± 0.9	79.7 ± 1.2^c	79.6 ± 1.0^c	81.4 ± 1.6^c
MMSE scores (/30)	29.5 ± 0.2	27.3 ± 0.4	23.9 ± 0.9^c	20.5 ± 1.1^c	-
MoCA scores (/30)	26.8 ± 0.5	23.5 ± 0.7^b	17.4 ± 0.8^c	14.5 ± 1.2^c	-
BMI (kg/m ²)	26.2 ± 0.9	25.1 ± 1.2	31.3 ± 2.1	28.1 ± 1.8	26.2 ± 1.3
Glucose (mM)	4.6 ± 0.1	5.4 ± 0.3^a	4.8 ± 0.2	5.2 ± 0.2	4.5 ± 0.1
Albumin (g/L)	43.2 ± 0.5	44.1 ± 0.6	44.5 ± 0.7	44.3 ± 1.0	38.1 ± 0.8^c
Vitamine D (nM)	96.9 ± 4.3	85.6 ± 5.2	85.7 ± 7.5	84.4 ± 11.0	62.6 ± 11.4^a
LDL (mM)	2.3 ± 0.2	2.5 ± 0.3	2.6 ± 0.3	2.5 ± 0.2	2.8 ± 0.3
HDL (mM)	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.2 ± 0.1
Triglycerides (mM)	2.4 ± 0.4	2.0 ± 0.3	2.0 ± 0.4	2.1 ± 0.4	1.6 ± 0.2
Total cholesterol (mM)	4.3 ± 0.3	4.5 ± 0.3	4.5 ± 0.3	4.9 ± 0.3	4.6 ± 0.4
Urea nitrogen (mM)	5.6 ± 0.3	6.1 ± 0.3	5.8 ± 0.5	5.9 ± 0.4	7.3 ± 1.2
Apolipoprotein A1 (g/L)	1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.4 ± 0.1^a
ApoE genotype (ApoE4 ⁽⁺⁾ /ApoE4 ⁽⁻⁾ ratio)	14/10	15/9	10/8	12/3	12/2

Values are expressed as means ± standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed using the one way ANOVA followed by Tukey post hoc test ($\alpha = 0.05$), ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.001$ compared to healthy controls. MMSE. mini-mental state examination; MoCA. Montreal cognitive assessment; BMI. body mass index; LDL. low-density lipoprotein; HDL. high-density lipoprotein.

2.3. Measure of plasma antioxidant and antiradical activities

Two different methods were used for evaluating the antioxidant activity.

Firstly, the plasma total antioxidant capacity (TAC) was evaluated with an electrochemical examination of the plasma ability to degrade hydrogen peroxide (H₂O₂). The detection of H₂O₂ was measured in real-time with the Apollo 4000 free radical analyzer (World Precision Instruments) equipped with a H₂O₂ electrode. In order to generate a calibration curve, the electrode was stabilized and calibrated by addition of different amounts of H₂O₂ (H1009 Sigma) ranging from 0 to 18 mmol in 3ml of reaction medium (10 mM of Phosphate buffer, pH 7.4). There is a linear relationship between the

quantity of H₂O₂ (mmol) and the change in current (pA). During the process, the H₂O₂ solutions were kept on ice to minimize degradation. Immediately after the calibration, in a new vial with 3ml of reaction medium, 12mmol of H₂O₂ were injected and the electrode was stabilized for 5 minutes before the injection of 255 ng of plasma proteins. Following current stabilization, the same dose of H₂O₂ (12mmol) was added. For both H₂O₂ injections, the picoampere variations were measured and the difference was calculated to estimate the quantity of degraded H₂O₂ by the plasma.

Secondly, the radical scavenging ability of plasma was based on the decolorization assay using the pre-formed radical of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS^{•+}). The test was adapted from Roberta Re et al. [30] as described below. The radical ABTS^{•+} was produced by reacting 2.5 mM potassium persulfate with 7 mM ABTS in water overnight at room temperature protected from light. Shortly before the assay, the ABTS^{•+} solution was diluted with PBS, pH 7.4, to get an absorbance of 0.70 at 734 nm and each plasma sample was diluted at 1:40. For the test, 10 ul of plasma samples or Trolox standards (Sigma 238813, final concentration 0-100 μM) was mixed to 90 ul of ABTS^{•+} solution in triplicate in a 96-well plate and after 10 minutes the decrease in absorbance was read at 734 nm. The ABTS radical scavenging activity was expressed as μM Trolox equivalent/μg of protein was calculated with Trolox standard curve.

The plasma concentration of vitamin D (25-OH-D) has been also evaluated using electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) from ROCHE Diagnostics according to the recommendations of the manufacturer.

2.4. Evaluation of protein carbonyls

Protein carbonyl level was determined according to Edyta Augustyniak et al. [31]. Briefly, plasma proteins (40μg) were separated by reducing SDS-PAGE using 10% polyacrylamide gel and transferred to PVDF membrane. The carbonyl groups were derivatised with 1 mM di-nitrophenol hydrazine (DNPH) in 2M hydrochloric acid for 1 hour and blocked at 4°C overnight with TBS-T (Tris buffer saline with 0.1% Tween 20 and 3% BSA). The dinitrophenol hydrazone (DNP)-carbonyl produced were detected using an anti-DNP antibody for 1 hour (D9656 Sigma, at 1:2000 dilution in TBS with 5%

BSA) followed by an incubation for 1 hour with HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (A6154 Sigma, at 1:10000 in TBS with 5% BSA). Between each step, the membrane was washed six times for 5 minutes in TBS-T (0.05% Tween 20). Lastly, oxidized proteins were visualised and analyzed by chemiluminescence detection using ECL substrate (Biorad) and the luminescent imaging system FluorChem. Total proteins stained with Coomassie blue were used to normalize the loading.

2.5. Measurement of plasma reduced thiol groups

Plasma reduced thiol groups were detected using a spectrophotometric assay based on 2,2-dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB or Ellman's reagent). Briefly, 30 µl of plasma was mixed with 1mM DTNB in buffer assay (phosphate 0.1 M, EDTA 1 mM, pH 7.4). In parallel, the GSH (reduced glutathione) was used as standard in order to establish the calibration curve (0 to 3 µg of GSH). The absorbance was read at 412 nm after 20 minutes of incubation. The level of plasma reduced thiol groups was expressed as an amount of GSH (ng) per µg protein.

2.6. Evaluation of total apolipoproteins J and D

The levels of Apolipoprotein D (ApoD) and J (ApoJ) were evaluated by immunoblotting. Briefly, 40µg of plasma protein was mixed with loading buffer, heated at 95°C and separated using 10% SDS-PAGE gel electrophoresis. The gel was transferred to Immuno-blot PVDF membranes (0.2µm) (Bio-Rad). The membrane was blocked 1 hour at room temperature with TBS containing 5% BSA and incubated overnight at 4°C with following primary antibody in TBS with 5% BSA : 2B9 mouse monoclonal antibody [32] for the detection of ApoD (1:5000) and rabbit clusterin polyclonal antibody from MyBioSource to visualized ApoJ (1:2500). After 3 washes for 5 minutes, HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody (A9044 Sigma, 1:10000) and HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (A6154 Sigma, 1:10000) were incubated in TBS with 5% BSA. Finally, the membrane was washed 3 times for 5 minutes and apolipoproteins were visualised by chemiluminescence detection using ECL substrate (Biorad) and their level was analysed with the luminescent imaging system FluorChem. Total proteins stained with Coomassie blue were used as a loading control. The Images of immunoblot were shown in supplemented Fig.1.

2.7. Measure of plasma concentration of klotho

The klotho concentration was assessed using Human Klotho DuoSet Enzyme-linked immunosorbent assay (R&D Systems, Inc.) and was performed according to the manufacturer's guidebook.

2.8. Measure of circulating-proteasome activity

The determination of circulating-proteasome activity was based on the measurement of chymotrypsin-like activity using the fluorogenic peptide Suc-Leu-Leu-Val-Tyr- 7-amino-4-methylcoumarin (Suc-LLVY-AMC). The proteolytic activity of 20S proteasome releases highly fluorescent AMC. Briefly, plasma was activated by 10% SDS for 15 minutes at room temperature. In a 96-well plate, 10 μ l of activated plasma and Suc-LLVY-AMC, at a final concentration of 100 μ M, were added in assay buffer (20mM HEPES, 0.5mM EDTA, 0.035% SDS). In order to ensure the specificity and to eliminate the non-proteasome activity, each assay was performed with or without 250 nM of Marizomib, an irreversible proteasome inhibitor. After an incubation for 30 minutes at 37°C, the fluorescent AMC was read (Ex/Em = 350/440 nm) and the released AMC quantity was calculated using AMC standard curve (1 μ M to 0 μ M). Finally, the specific circulating-proteasome activity was expressed in AMC/min/ μ l of plasma.

2.9. Statistical and correlation analysis

Results were expressed as mean \pm standard error of the mean (S.E.M). After Shapiro-Wilk test to verify the normal distribution, the one way analysis of variance (ANOVA) was followed by Tukey post hoc test for comparison between groups. For non-normally distributed data including the radical scavenging ability (ABTS assay), plasma Klotho concentrations and circulating-proteasome activity, we performed the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test to determine significant differences between groups. Correlations were assessed using Pearson's correlation analysis. A p-value < 0.05 was considered statistically significant (Prism 7.04, Graphpad Inc., San Diego, USA). Receiver operating characteristic (ROC) curves were used to evaluate the accuracy of each biomarker. The area under the ROC curve (AUC) was calculated to quantify the ability of the biomarker to discriminate between clinical subgroups.

3. Results

3.1. Reduction of the plasma antioxidant capacity from the mild cognitive impairment stage and its relation to the gradual cognitive decline

The main characteristics of the five groups of subjects enrolled in this study were reported in the Table 1. AD patients are older than the healthy control and MCI subjects. The MMSE scores were lower in AD groups while the MoCA scores decreased earlier, in MCI and AD groups. As previously described, the MoCA had greater sensitivity than MMSE in detecting MCI versus control subjects [33]. Compared to the healthy controls, significantly higher proportion patients with AD were ApoE4 carriers. The MoCA scores were significantly lower among E4 allele carriers (p value = 0.0464) but the MMSE scores were independent of the E4 allele presence (p value = 0.8495). There was no difference in the MMSE/MoCA values between women ($26.4 \pm 0.5/21.7 \pm 0.7$) and men ($24.7 \pm 1.2/23.4 \pm 1.5$). As indicated in the figure 1, patients with other recognized neurodegenerative disorders, diabetes or with anti-inflammatory treatments were not included.

Plasma contains various antioxidants including enzymatic (catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase ...) and non-enzymatic (uric acid, albumin, bilirubin, vitamins, reduced thiol groups, glutathione, and phenolic acids) systems with different scavenging property. Therefore, the total antioxidant status should be measured using different analytical methods that differ in terms of reaction mechanisms. We have determined the TAC in plasma from the healthy control subjects, MCI and AD patients, using three different assays.

Our results showed that the plasma TAC, as measured by electrochemical examination to determine its ability to degrade H₂O₂, was significantly reduced in MCI (1.07 ± 0.15 mmol of degraded H₂O₂), mild (1.20 ± 0.20 mmol) and moderate (1.04 ± 0.16 mmol) AD patients compared to the control subjects (1.87 ± 0.25 mmol) (Fig.2.A). However, the plasma radical scavenging activity measured by ABTS radical cation decolorization assay was not different between the groups (Fig.2.B). Furthermore, the levels of reduced thiols were not different among groups (Fig.2.C). Hence, the early deterioration of the plasma antioxidant capacity from MCI stage is linked to its ability to degrade

H₂O₂. These results strongly suggest that the antioxidant defenses involved in the degradation of H₂O₂ (catalase or glutathione peroxidase...) are impaired.

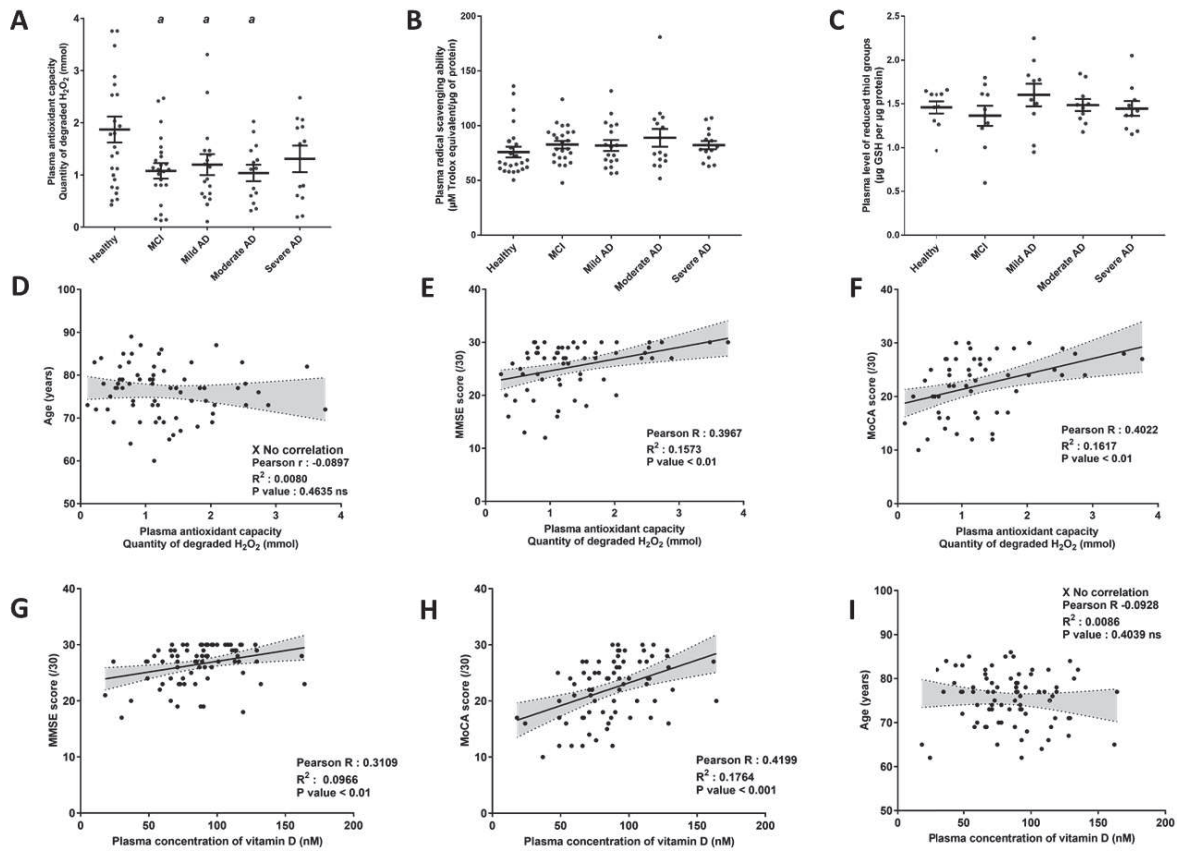


Fig. 2. Antioxidant capacity and radical scavenging activity of plasma samples from healthy controls, MCI and AD patients. The plasma antioxidant capacity evaluated through its ability to degrade hydrogen peroxide (H₂O₂) by electrochemical detection (A). Plasma free radical quenching capacity determined by ABTS assay (B) and the level of plasma reduced thiol groups with N=10 for each group (C). Data are presented as means \pm SEM. For plasma antioxidant capacity and plasma level of reduced thiols groups, statistical analysis was performed using the one way ANOVA followed by Tukey post hoc test ($\alpha = 0.05$) with $^a p < 0.05$ compared to healthy controls. For plasma radical scavenging ability, statistical analysis was performed by the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test. Scatter plots of plasma antioxidant capacity in relation to age (D), MMSE and MoCA scores (E, F). Scatter plots of plasma concentration of vitamin D in relation to MMSE and MoCA scores (G,H) and age (I). Correlation coefficients (Pearson R and R²) and p values were determined using Pearson correlation. The confidence interval (CI) range was plotted in correlation plots (grey area).

We then attempt to highlight the relationship between plasma TAC and the cognitive decline. Interestingly, there was a positive correlation between the plasma TAC and the clinical scores MMSE and MoCA (Fig.2.E and F). The plasma TAC was not age related (Fig.2.D).

It was found that vitamin D pretreatment can significantly improve spatial learning and memory functions, reduced neuronal oxidative stress, mitochondrial aberrations and improved cholinergic functions following an intracerebroventricular injection of streptozotcin [34].

In our subjects, the mean plasma concentration of vitamin D was higher in control subjects as compared to severe AD group but there was no difference between control and MCI or mild and moderate AD groups (Table 1). However, a significant correlation was observed between the level of vitamin D and the clinical scores MMSE and MoCA with no age effect (Fig.2.G, H and I).

3.2. Rise of the plasma protein carbonyls level in early AD is associated with cognitive decline

The plasma protein carbonyl levels were significantly higher in all AD groups compared to the control and MCI groups and were independent of the progression of the disease (Fig.3.A and Fig.S1A).

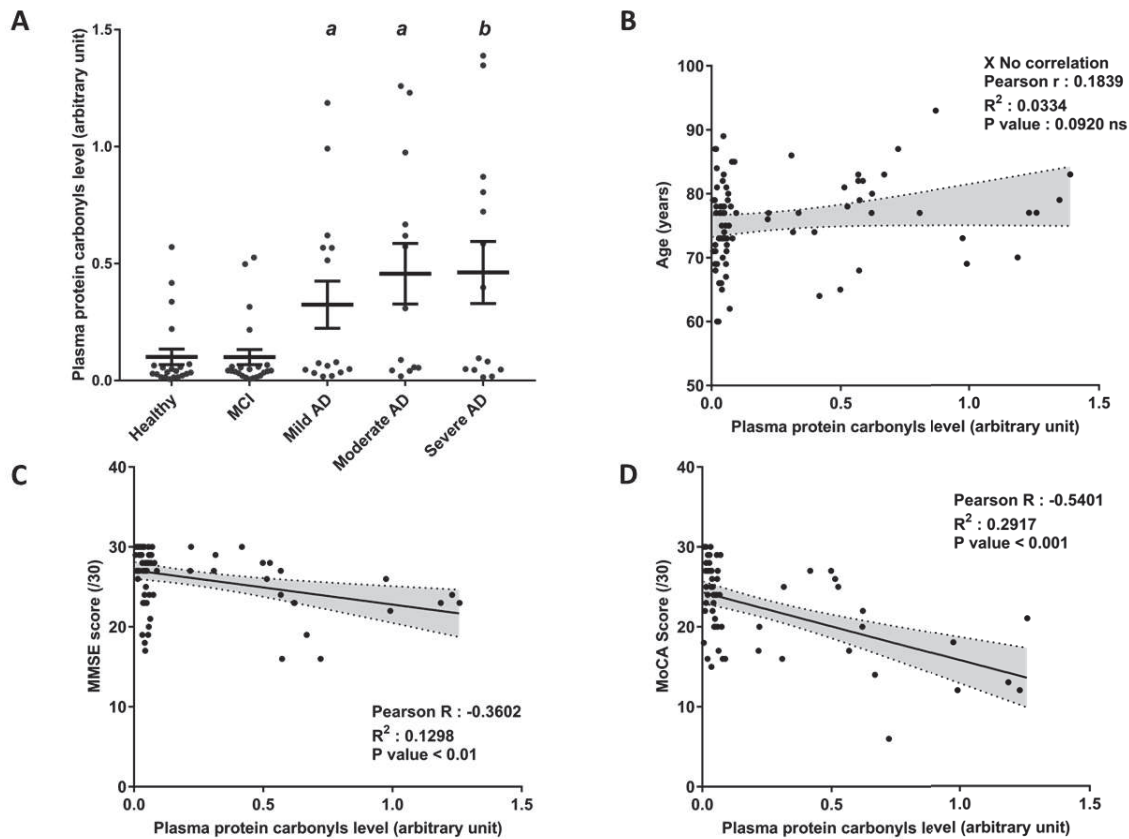


Fig. 3. Level of protein carbonyls in plasma from healthy controls, MCI and AD patients (A). Data are presented as means \pm SEM. Statistical analysis was performed using the one way ANOVA followed by Tukey post hoc test ($\alpha = 0.05$) with ^a $p < 0.05$ and ^b $p < 0.01$ compared to healthy controls and MCI patients. Scatter plots of plasma protein carbonyls level in relation to age (B), MMSE and MoCA scores (C,D). Correlation coefficients (Pearson R and R²) and p values were determined using Pearson correlation. The confidence interval (CI) range was plotted in correlation plots (grey area).

A significant correlation was reported between the plasma protein carbonyls levels and both cognitive scores with higher correlation with the MoCA scores ($R = -0.5041$ and -

0.3602 for MoCA and MMSE, respectively) (Fig.3.C and D). Our results also indicate that protein carbonyl levels were not age-related (Fig.3.B).

3.3. Decrease of the circulating-proteasome activity is strongly linked to the increase in plasma protein carbonyls

The intracellular 20S proteasome activity represents an important indicator of protein homeostasis. It is also present in plasma as circulating-proteasome and can be measured with the chymotrypsin-like activity. We found a significant reduction of the chymotrypsin-like peptidase activity in plasma from all AD patients. This activity decreased with the progression of the disease with a significant difference between mild and severe AD while no difference was observed between MCI and control subjects (Fig.4.A).

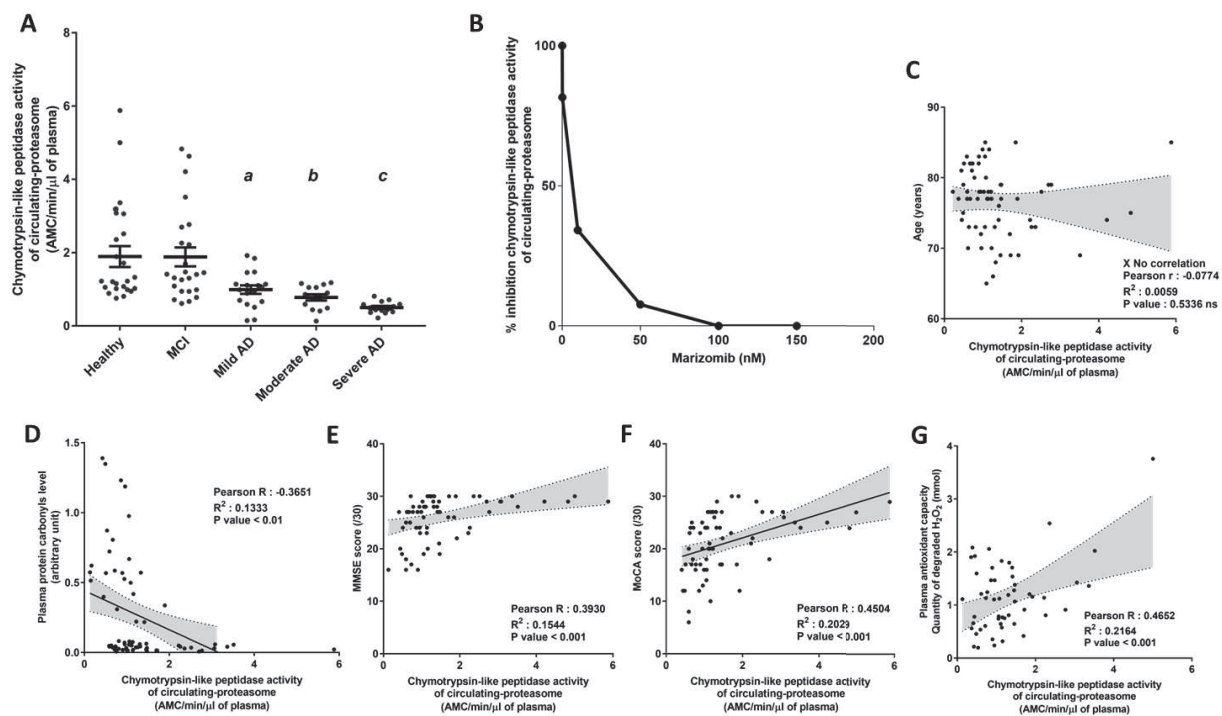


Fig. 4. The specific circulating-proteasome activity expressed in AMC/min/ μ l of plasma from healthy controls, MCI and AD patients (A). Data presented as means \pm SEM. Statistical analysis was performed by the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test ($\alpha = 0.05$) with ^a $p < 0.05$ compared to healthy controls, MCI and severe AD patients, ^b $p < 0.01$ compared to healthy controls and MCI patients and ^c $p < 0.001$ compared to healthy controls and MCI patients. Marizomib inhibits the chymotrypsin-like activity of the proteasome in plasma (B). Data are presented as percent proteasome inhibition in relation to concentration of Marizomib. Scatter plots of circulating-proteasome activity in relation to age (C), plasma protein carbonyls level (D), MMSE and MoCA scores (E,F) and plasma antioxidant capacity (G). Correlation coefficients (Pearson R and R^2) and p values were determined using Pearson correlation. The confidence interval (CI) range was plotted in correlation plots (grey area).

The specificity of the proteasome activity was validated using different concentrations of marizomib, a proteasome inhibitor (Fig.4.B). Its activity was age-independent (Fig.4.C).

As proteasomes are also involved in the removal of the oxidized proteins, we have studied the correlation between their activity and the levels of protein carbonyls and found a negative correlation (Fig.4.D).The activity of circulating-proteasome was positively correlated with both clinical scores, MMSE and MoCA (Fig.4.E and F). Finally, as the catalytic activity of proteasomes is susceptible to oxidative inactivation or by S-glutathionylation, we demonstrated a positive correlation between the activity of circulating-proteasome and the plasma TAC (Fig.4.G).

3.4. Differential levels of ApoJ and ApoD in plasma from MCI and AD patients.

Apolipoproteins (Apo) are known to be involved in the pathophysiology of AD. ApoJ and apoD are documented to be implicated in redox homeostasis and ApoJ is considered as a sensor of oxidative stress [35]. Our results showed that ApoJ (also known as clusterin) levels were significantly higher in both MCI and AD groups compared to the healthy group but they are not associated with the severity of the disease (Fig.5.A and Fig.S1B).

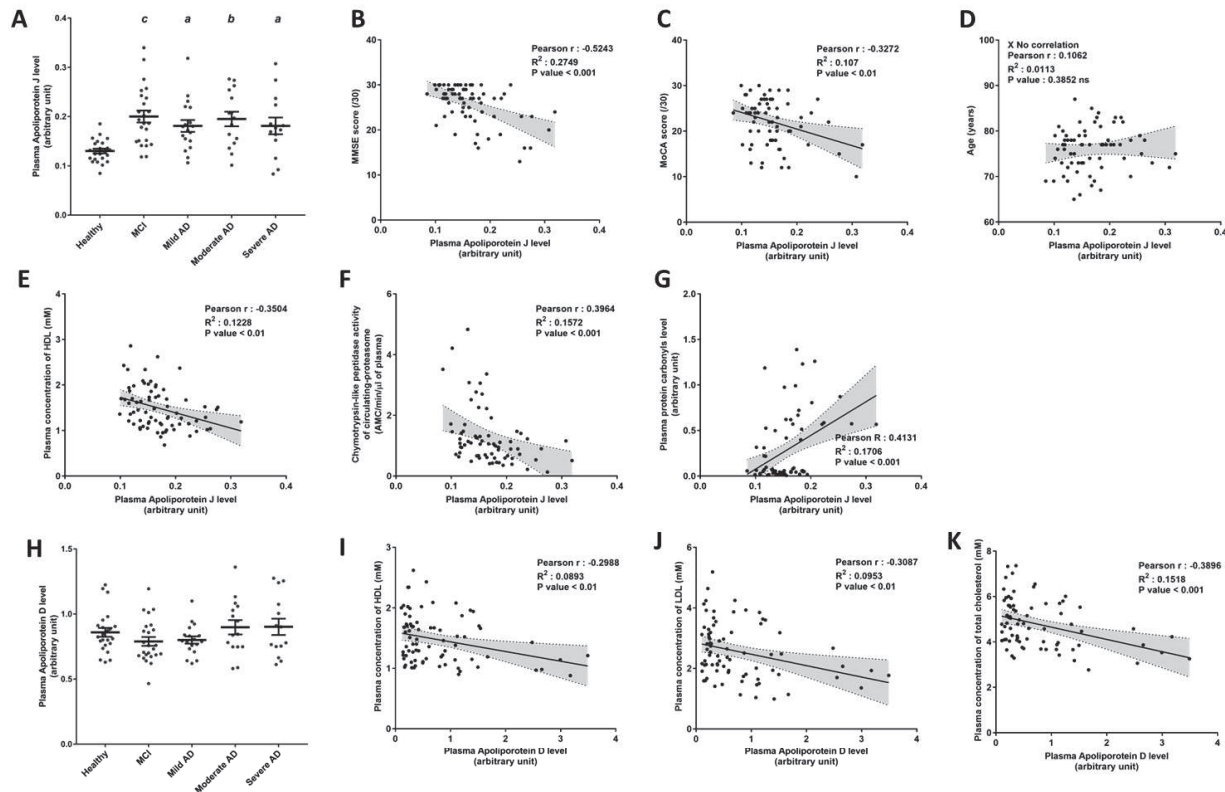


Fig. 5. Apolipoprotein J level (A) and Apolipoprotein D levels (H) in plasma from healthy controls, MCI and AD patients. Data are presented as means \pm SEM. Statistical analysis was performed using the one way ANOVA followed by Tukey post hoc test ($\alpha = 0.05$) with ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$ and ^c $p < 0.001$ compared to healthy controls. Scatter plots of plasma Apolipoprotein J level in relation to MMSE and MoCA scores (B,C), age (D), concentration of HDL (E), circulating-proteasome activity (F) and plasma protein carbonyls level (G). Scatter plots of plasma Apolipoprotein D level in relation to concentration of HDL (I), LDL (J) and total cholesterol (K). Correlation coefficients (Pearson R and R^2) and p values were determined using Pearson correlation. The confidence interval (CI) range was plotted in correlation plots (grey area). LDL: low-density lipoprotein; HDL: high-density lipoprotein.

The increase of the ApoJ level was negatively correlated to the clinical scores MMSE and MoCA (Fig.5.B, C). Moreover, ApoJ levels were also positively correlated with protein carbonyls (Fig.5. G). These variations of ApoJ levels were age-independent (Fig.5.D). As clusterin circulates in plasma as a HDL complex and as a regulator of lipid transport and local lipid redistribution [36], we have thus analyzed the association between its plasma level and the HDL-cholesterol concentration and found a negative correlation (Fig.5.E).

The turnover of ApoJ protein is very rapid and tightly regulated by ubiquitin-proteasome mediated degradation [37]. Our results showed that ApoJ levels are negatively associated to the proteasomes activity (fig.5.F).

Plasma ApoD is present mainly in HDL and to a lesser extent in low density lipoproteins (LDL) and very low-density lipoproteins (VLDL). It is associated with anti-oxidation property. We found that ApoD levels were not different between the control, MCI and AD

groups (Fig.5.H and Fig.S1C) but were negatively correlated with HDL, LDL and total cholesterol concentrations (fig.5.I, J, K).

3.5. High level of plasma secreted Klotho in MCI, mild and moderate AD but it is not related to cognitive decline

Klotho is a transmembrane protein but it can also be found in soluble form. Soluble Klotho (α -Klotho) is secreted and circulates in biofluids (blood, urine and cerebrospinal fluid). Secreted Klotho acts as a humoral factor with pleiotropic actions including anti-aging and antioxidant. Our results showed that plasma klotho concentration was significantly higher and reached a plateau in plasma from MCI, mild and moderate AD patients compared to the healthy subjects. Surprisingly, in the late AD stage, the plasma concentration of secreted Klotho was comparable to the healthy subjects (Fig.6.A).

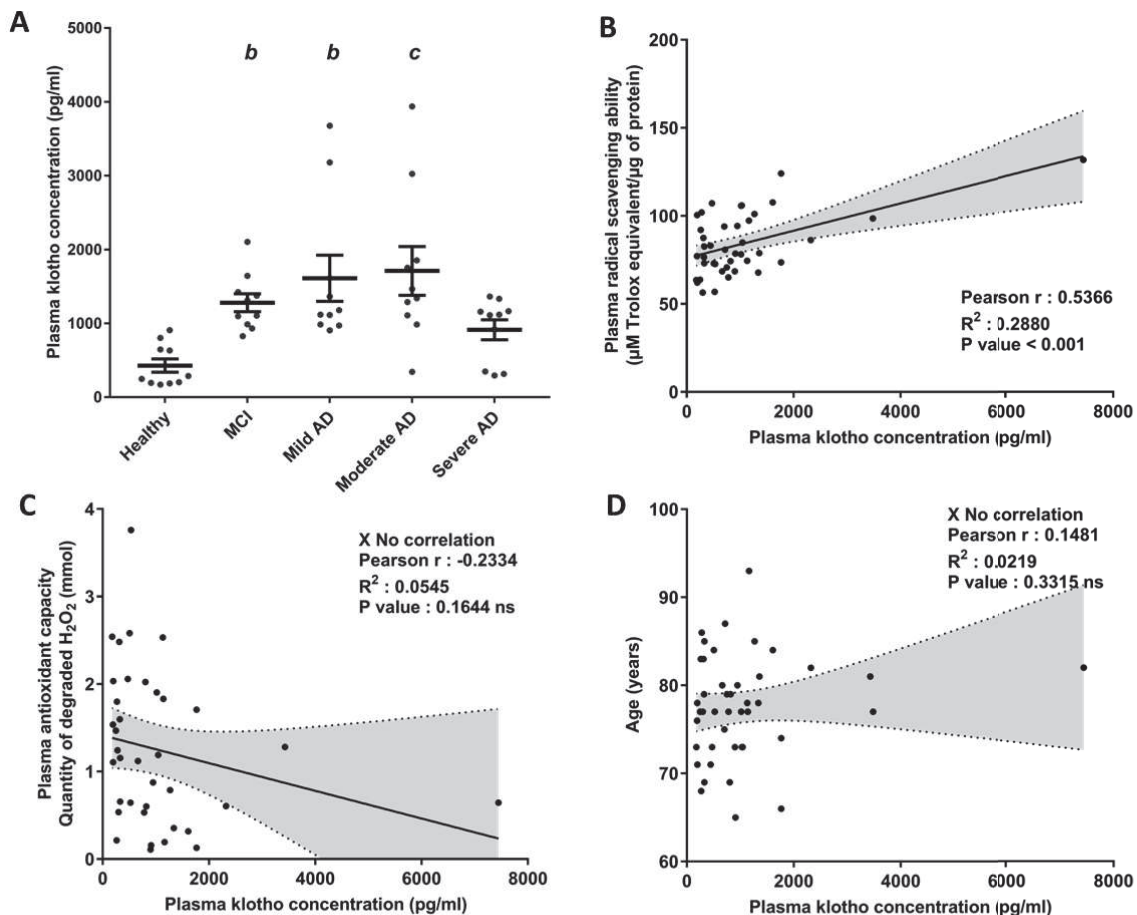


Fig. 6. Klotho concentration in plasma from healthy controls, MCI and AD patients (n=10/group) (A). Data are presented as means \pm SEM. Statistical analysis was performed by the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test (α = 0.05) with ^b p < 0.01 and ^c p < 0.001 compared to healthy controls. Scatter plots of plasma Klotho level in relation to plasma radical scavenging ability (B), plasma antioxidant capacity (C) and age (D). Correlation coefficients (Pearson R and R^2) and p values were determined using Pearson correlation. The confidence interval (CI) range was plotted in correlation plots (grey area).

Higher circulating klotho levels had been found to predict enhanced connectivity in brain regions that are selectively vulnerable to degeneration in AD [38,39]. We found that the concentration of circulating Klotho was not related to cognitive scores (results not shown) and age (Fig.6.D).

Klotho has been reported to protect different cell types against oxidative damages [40]. We have thus analyzed the association between the plasma level of Klotho and the plasma radical scavenging ability by ABTS assay and found a positive correlation (Fig.6.B). In contrast, there was no association with the ability of plasma to degrade hydrogen peroxide measured by electrochemical examination (Fig.6.C).

3.6. Diagnostic accuracy evaluation of analyzed biomarkers

In addition, receiver operating characteristic (ROC) curves were built to evaluate the diagnostic and discrimination power of biomarkers. ROC curve is a plot of the sensitivity (true positive rate) versus $1 - \text{specificity}$ (false positive rate) of a diagnostic test and represents the average value of the sensitivity for a test over all possible values of specificity. One common measure of diagnostic test accuracy is the area under the ROC curve (AUC). AUC, therefore, should be greater than 0.75 for a model to be significantly fair [41].

AUC of analyzed plasma biomarkers were calculated for the discrimination between the healthy and the MCI groups, the healthy and AD groups, and the MCI and AD groups.

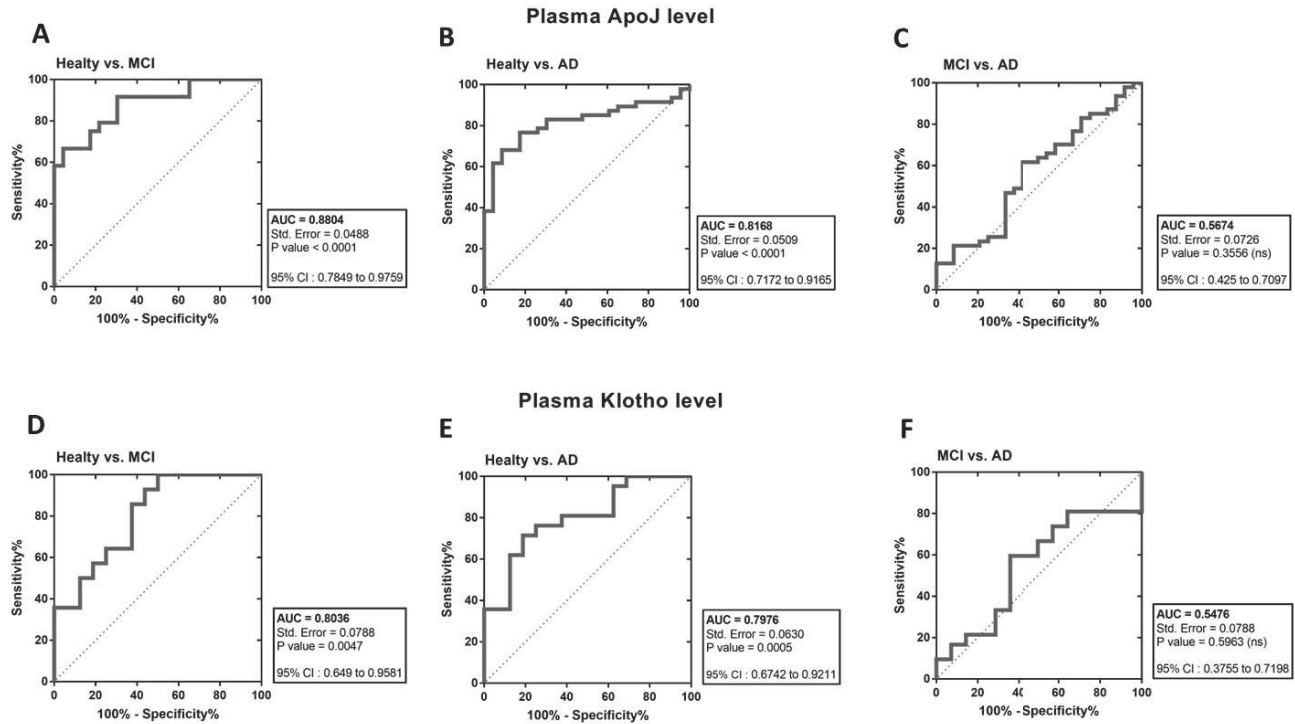


Fig. 7. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. The plot represents the performance of the ApoJ levels in plasma to differentiate healthy subjects to MCI patients (A), healthy subjects to AD patients (B), MCI patients to AD patients (C). Klotho levels to separate healthy subjects to MCI patients (E), healthy subjects to AD patients (F) and MCI patients to AD patients (G) is also analysed. Area under the curve (AUC) values, standard errors, p values and 95% confidence intervals (CI) are indicated on the curve. (ns), not significant.

The level of plasma ApoJ and secreted Klotho provided a fair classification of MCI patients and healthy subjects (Fig.7.A and D; AUC of ApoJ= 0.8804 [95% CI: 0.7849 to 0.9759]; AUC of Klotho= 0.8036 [95% CI: 0.649 to 0.9581]) and a good separation of AD patients and healthy subjects (Fig.7.B and E; AUC of ApoJ= 0.8168 [95% CI: 0.7172 to 0.9165]; AUC of Klotho= 0.7976 [95% CI: 0.6742 to 0.9211]). However, the level of these circulating proteins was not sufficient to significantly distinguish MCI to AD patients (Fig.7.C and F; AUC close to 0.5).

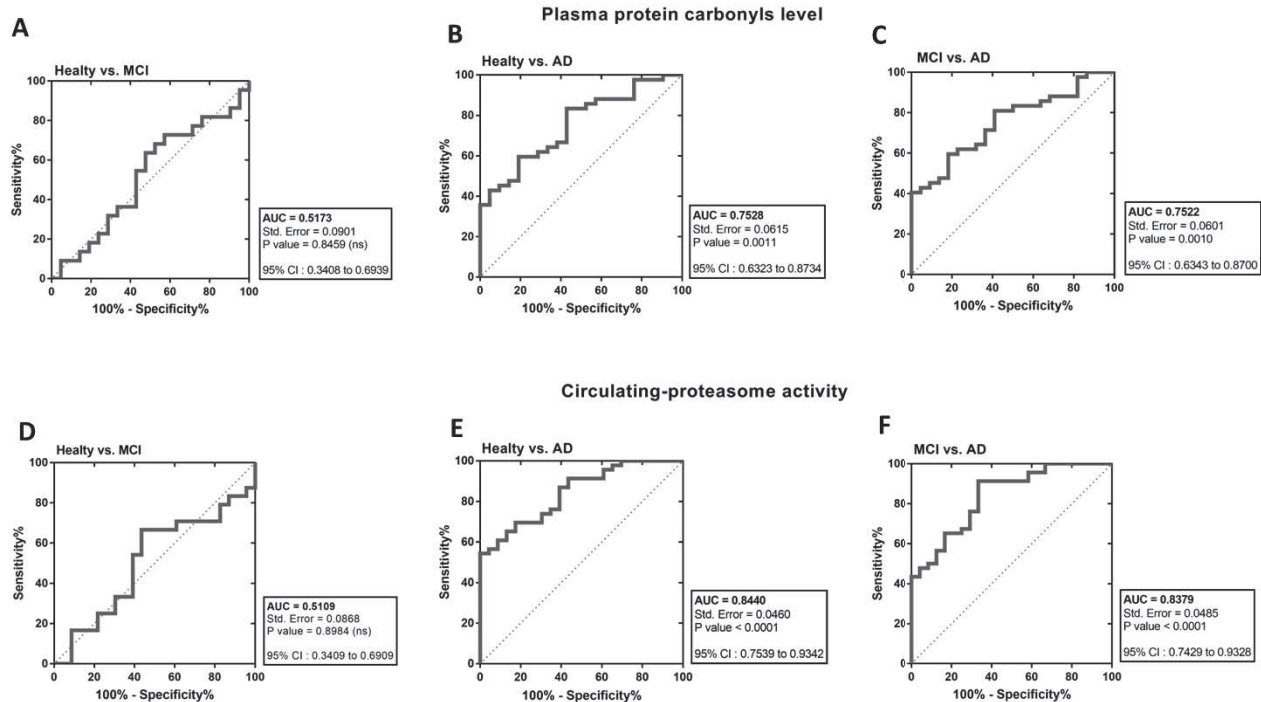


Fig. 8. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. The plot represents the performance of the plasma protein carbonyls levels to differentiate healthy subjects to MCI patients (A), healthy subjects to AD patients (B), MCI patients to AD patients (C). The efficacy of the circulating-proteasome activity to separate healthy subjects to MCI patients (E), healthy subjects to AD (F) and MCI patients to AD patients (G) is also analysed. Area under the curve (AUC) values, standard errors, p values and 95% confidence intervals (CI) are indicated on the curve. (ns), not significant.

The level of plasma protein carbonyls was able to discriminate AD to the healthy groups (Fig.8.B; AUC= 0.7528 [95% CI: 0.6323 to 0.8734]) and to classify MCI to AD patients (Fig.8.C; AUC= 0.7522 [95% CI: 0.6343 to 0.8700]). In the same way, the activity of circulating-proteasome was a fair discriminating parameter to significantly distinguish AD to healthy group (Fig.8.E; AUC= 0.8440 [95% CI: 0.7539 to 0.9342]) and AD to MCI population (Fig8.F; AUC= 0.8379 [95% CI: 0.7429 to 0.9328]). By contrast, a poor discrimination power was found for these two markers to distinguish MCI patients to healthy subjects (Fig.8.A and D; AUC close to 0.5).

4. Discussion

This study highlights differential regulations of some peripheral redox markers in MCI and in AD and their relationships with the scores of two complementary cognitive tests (MMSE and MoCA). In MCI subjects, we found a decrease of the TAC, while the ApoJ and Klotho levels increased. The raise of protein carbonyls was observed later in all AD groups. Interestingly, our results also demonstrated that the plasma redox status and the vitamin D levels were positively associated with the MoCA and MMSE scores regardless of age. The plasma protein carbonyls and the ApoJ levels were negatively associated with the clinical scores. As oxidized proteins are mostly degraded by the proteasome activity, we have determined, for the first time the circulating chymotrypsin-like peptidase activity and found that it was reduced in plasma from all AD patients. Apolipoproteins are documented to be implicated in redox homeostasis and our results strengthen that ApoJ levels were higher in both MCI and AD groups. In contrast, we did not find any difference in ApoD levels among the five groups of subjects.

Oxidative markers in blood may reflect the systemic effects rather than specific brain changes. Interestingly, we found that some of them could be correlated to the clinical scores. We used two tests, the MoCA and the MMSE, because the MoCA is more sensitive for early detection while the MMSE test is appropriate to discriminate between moderate to severe stages of AD [33]. Finally, our ROC analysis indicated that levels of plasma ApoJ and secreted Klotho provided a fair classification of MCI patients and healthy subjects while the activity of circulating-proteasome could discriminate AD to the healthy subjects.

Animal and human studies have repeatedly shown that oxidative stress markers precede the appearance of AD neuropathological hallmarks [18,24]. These results indicate that oxidative stress may play an early role in the pathogenesis of AD. Corroborating these findings, we have shown that the plasma TAC is decreased from the MCI status, indicating a drastic reduction of the ability of plasma to degrade the H₂O₂. The changes in the redox status of the plasma could be important as the concentration of H₂O₂ is approximately 100-5000 times higher in plasma than in cells reaching 1 to 50 μ M concentration [42]. In the bloodstream, H₂O₂ is produced by

xanthine oxidase or released by cells. It is rapidly removed by catalase, glutathione peroxidase, and peroxiredoxin and its partner thioredoxin. Our results support the deficiency in these antioxidant enzymes [25,43,44]. However, we and others found no difference between controls, MCI and AD groups using ABTS or the FRAP assays (ferric reducing ability of plasma) [45]. ABTS assay analysed the lipophilic and hydrophilic antioxidants such as glutathione, ascorbic acid, α -tocopherol, carotenoids, flavonoid and uric acid (60%) [46] but their peripheral levels in AD remain controversial [47,48]. Regarding the level of the antioxidant vitamin D, we found a late reduction in severe AD subjects. This reduction was recently shown to be associated to cognitive decline [49]. These peripheral stress responses could induce the overexpression of both antioxidants ApoJ and Klotho.

Within the “redoxome”, protein cysteine thiols are used to sense changes of the redox environment [50] as they represent a very important component of the oxidoreductive homeostasis. They can undergo a range of redox modifications which include sulfenylation (i.e. formation of SOH by direct SH oxidation), protein thiyl radical formation (e.g. modification of a cysteine residue by the superoxide anion radical) or protein S-glutathionylation [51]. We observed no change of reduced thiols level in plasma from AD and MCI compared to the healthy subjects. These results suggest that the alteration of the oxidoreductive homeostasis in plasma (as evidenced by the TAC assay) is not due to the modifications of thiols proteins. Overall, our data suggest that the early reduction in the activity of the plasma antioxidant depends predominantly on specific enzymatic systems.

Protein carbonyls analysis is used to provide a global indication of protein oxidation irrespective of the initiating radical species [31]. We found an elevation of protein carbonyls in AD patients from the mild stage which are in line with several studies [25,43,52]. However, its level is inconsistent in the literature which depends on many factors. Many studies have assessed protein carbonyls level using the classical spectrophotometric approach or ELISA but several drawbacks and pitfalls have been identified with these experimental procedures [31]. Interestingly, we highlighted a correlation between plasma oxidized proteins content and cognitive decline assessed by MMSE and MoCA tests without the influence of age. In CSF, oxidatively modified

proteins increased in amnesic MCI [53]. Taken together, these results indicate that oxidized proteins are elevated earlier in CSF many years before the diagnosis of dementia and later in plasma.

The accumulation of protein carbonyls is due to increased protein damage and/or decreased repair and removal. The proteasome complexes (26S, 20S and immunoproteasome) have been described as the intracellular proteolytic pathway involved in the protein degradation [54]. The 26S proteasome consisted of two 19S regulators bound to a 20S core. Numerous studies have demonstrated that cellular oxidized proteins are preferentially degraded by the 20S proteasome (ATP- and ubiquitin-independent) [55,56]. The proteasome systems have been discovered and mainly studied in cells. However, the extracellular proteasome, also known as circulating-proteasome [57] also possesses a proteolytic activity [58-60]. Interestingly, two recent proteomic studies report that the circulating-proteasome is represented exclusively by the 20S complex which could be involved in the degradation of oxidized proteins. We demonstrated that the circulating-proteasome activity was significantly impaired in plasma from all AD groups with a reduction in severe AD subjects. Its activity was positively correlated with the cognitive performance assessed by MMSE and MoCA. Although the etiology and role of the circulating-proteasome remain unclear, our data strongly indicate an alteration of the protein homeostasis in plasma from AD subjects. Protein homeostasis processes are also ensured by recruitment of chaperone proteins in order to clear misfolded proteins. ApoJ has been described as a chaperone-like protein that stabilizes misfolded proteins and protein aggregates in cells and in extracellular space [61]. Accordingly, proteasomal stress can directly influence secreted ApoJ [62]. In neurodegenerative diseases, some studies suggest that proteasomal stress results in the upregulation of ApoJ [63]. In line with these results, we found that the increase of secreted or plasma ApoJ was correlated with a reduction of circulating-proteasome activity. However, the chaperone activity of ApoJ is also dependent on the redox environment and is impaired under oxidative conditions [64].

Circulating ApoJ are mostly free (79.5%) and only 21.5% are associated to lipoproteins (18.5% HDL, 0.9% LDL and 1.1% VLDL) [65]. We also found a negative correlation between level of plasma ApoJ and HDL-cholesterol but not with LDL-cholesterol levels

[65]. This result is in line with the notion that ApoJ contributes to the antioxidant properties of HDL. Finally, this correlation suggests that the percentage of ApoJ associated to HDL-cholesterol increases in AD.

The association between plasma ApoJ levels and MoCA/MMSE scores highlighted in this study support a recent demonstration of the association between plasma ApoJ levels and the hippocampal volume, the white matter atrophy, the plasma A β 1-42/A β 1-40 ratio and a reduction of global cognition [66-68]. Accordingly, we have found a strong discrimination power with ROC analysis. ApoJ provided a fair classification of MCI patients and healthy subjects and differentiate AD patients to healthy subjects.

Two different genome-wide association studies (GWAS) had identified ApoJ as risk factors for developing AD [69]. In the AD pathophysiology, ApoJ is associated with amyloid plaques [70]. It is also considered as a transporter of A β peptides from the brain to the circulation across the blood-brain barrier [71]. Our results and others demonstrated that plasma ApoJ level increase in MCI and AD stages and it is negatively associated to cognitive performance and with AD pathology. Therefore, our results strengthen the proposition to consider ApoJ as a biomarker of AD in brain and in peripheral [72,73].

The involvement of ApoE in the pathophysiology of AD is well established during the last two decade while the role of ApoD remains to be investigated. ApoD level has been shown to be elevated in the brain during aging and in AD [74]. There is growing evidence that ApoD represents a defense against inflammatory and oxidative stress in the aging and neurodegenerative diseases [75,76]. Different studies on ApoD-deficient mice indicated some deficits in learning, a reduced tolerance to the ROS generator paraquat [77]. Increased ApoD level has been found after traumatic neural injuries such as stroke, ischemia, excitotoxicity [78,79]. Therefore, we have assessed for the first time the plasma ApoD level and found no difference in plasma ApoD level between different groups. We found that plasma ApoD levels are associated with HDL, LDL and total cholesterol concentrations which is in line with its role in cholesterol transport, mainly associated with plasma HDL and to a lesser extent with LDL [80,81].

Finally, we have measured the plasma level of Klotho, another protein involved in aging, in the control of the oxidative status and in the clearance of the amyloid peptide [82,83]. Klotho exists in two forms: one is membrane bound and one is secreted in fluids including urine, CSF and blood and acts like a humoral factor [84]. We found that the level of secreted Klotho was increased in MCI and in AD. The overexpression of secreted Klotho has been associated with a decrease of oxidative damage such as H₂O₂-induced apoptosis, mitochondrial DNA fragmentation, superoxide anion generation, lipid peroxidation, and Bax protein expression [85-87]. In the other hand, secreted Klotho can increase antioxidant defenses including manganese superoxide dismutase (MnSOD) via FOXO3a phosphorylation [88]. Accordingly, we found that its plasma level was related to the plasma radical scavenging ability. Only a few studies have determined the levels of klotho in AD with controversial pattern. High level of Klotho in serum was associated with cognitive enhancement [89]. In line with our results, Brombo et al. observed no association with circulating Klotho concentration and AD progression [90]. Further investigations are necessary to clarify the levels of Klotho in the blood circulation and its relation with cognitive decline.

To date, considerable progress has been made on biomarkers in AD using numerous expensive and/or invasive studies including imaging (magnetic resonance imaging, positron emission tomography), and biochemical analysis which require collection of CSF via lumbar puncture. Therefore, there is an urgent need for less costly and intrusive, and more widely available blood-based (serum or plasma) biomarkers that can aid in the early diagnosis of AD and to predict disease progression. However, the development of blood-based biomarkers is challenging. It was found that a set of 30 serum proteins involved in inflammatory, vascular functions or signaling proteins has 80% of sensitivity and 91% of specificity for detecting AD and are correlated with neuropsychological test performance [91,92] and oxidative stress biomarkers are currently under examination in the diagnostic guidelines for MCI and AD [93].

In conclusion, the major strength of our study is that we performed analysis in plasma from patients with MCI and AD with different stages of the disease. Our results extend the understanding of the complex regulation of oxidative balance in bloodstream before dementia symptoms and during the progression of AD. We demonstrated that some

redox markers were reduced in MCI and others later, in AD. For some of them, we found better associations with MoCA scores rather than MMSE test. Thus, our data highlight the importance and the impact of peripheral antioxidant status and homeostasis systems during the early cognitive decline leading to dementia. The combination of these peripheral variations could be used as potential panel of biomarkers to define MCI stage or the progression of AD. Overall, our results strengthen the notion that oxidative markers could be considered as drivers behind the AD-related metabolic deregulation.

As potential limitation, the sample size of the present study was relatively small which weakens the statistical power. It should, however, be recognized that this preliminary work will lead to further studies in much larger, longitudinal cohorts and will add value to any meta-analysis performed in the future. Although estrogens can influence the circulating redox [94], we were not able to consider whether the circulating redox markers is sex-related due to the limited number of male in our groups of subjects.

Finally, our study strengthens the notion that different strategies to improve the plasma antioxidant capacity could be effective intervention to prevent or to delay cognitive decline [95-99]. For instance, high antioxidant-supplemented diet or a high intake of fruits and vegetables combined to some physical exercise were shown to increase antioxidant enzymes like glutathione peroxidase or superoxide dismutase or to decrease oxidative markers [95,96,98].

5. Acknowledgements

This work was supported by Chaire Louise & André Charron sur la Maladie d'Alzheimer.

6. References:

[1] M. Prince, R. Bryce, E. Albanese, A. Wimo, W. Ribeiro, C.P. Ferri, The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis, *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 9(1) (2013) 63-75 e2.

[2] G. McKhann, D. Drachman, M. Folstein, R. Katzman, D. Price, E.M. Stadlan, 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) (1984) 939-44.

[3] C.R. Jack, Jr., M.S. Albert, D.S. Knopman, G.M. McKhann, R.A. Sperling, M.C. Carrillo, B. Thies, C.H. Phelps, Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association

workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease, *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 7(3) (2011) 257-62.

[4] R.A. Sperling, P.S. Aisen, L.A. Beckett, D.A. Bennett, S. Craft, A.M. Fagan, T. Iwatsubo, C.R. Jack, Jr., J. Kaye, T.J. Montine, D.C. Park, E.M. Reiman, C.C. Rowe, E. Siemers, Y. Stern, K. Yaffe, M.C. Carrillo, B. Thies, M. Morrison-Bogorad, M.V. Wagster, C.H. Phelps, Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease, *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 7(3) (2011) 280-92.

[5] B. Dubois, H. Hampel, H.H. Feldman, P. Scheltens, P. Aisen, S. Andrieu, H. Bakardjian, H. Benali, L. Bertram, K. Blennow, K. Broich, E. Cavedo, S. Crutch, J.F. Dartigues, C. Duyckaerts, S. Epelbaum, G.B. Frisoni, S. Gauthier, R. Genthon, A.A. Gouw, M.O. Habert, D.M. Holtzman, M. Kivipelto, S. Lista, J.L. Molinuevo, S.E. O'Bryant, G.D. Rabinovici, C. Rowe, S. Salloway, L.S. Schneider, R. Sperling, M. Teichmann, M.C. Carrillo, J. Cummings, C.R. Jack, Jr., Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria, *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 12(3) (2016) 292-323.

[6] T.G. Beach, S.E. Monsell, L.E. Phillips, W. Kukull, Accuracy of the clinical diagnosis of Alzheimer disease at National Institute on Aging Alzheimer Disease Centers, 2005-2010, *Journal of neuropathology and experimental neurology* 71(4) (2012) 266-73.

[7] P.T. Nelson, I. Alafuzoff, E.H. Bigio, C. Bouras, H. Braak, N.J. Cairns, R.J. Castellani, B.J. Crain, P. Davies, K. Del Tredici, C. Duyckaerts, M.P. Frosch, V. Haroutunian, P.R. Hof, C.M. Hulette, B.T. Hyman, T. Iwatsubo, K.A. Jellinger, G.A. Jicha, E. Kovari, W.A. Kukull, J.B. Leverenz, S. Love, I.R. Mackenzie, D.M. Mann, E. Masliah, A.C. McKee, T.J. Montine, J.C. Morris, J.A. Schneider, J.A. Sonnen, D.R. Thal, J.Q. Trojanowski, J.C. Troncoso, T. Wisniewski, R.L. Woltjer, T.G. Beach, Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature, *Journal of neuropathology and experimental neurology* 71(5) (2012) 362-81.

[8] H. Crystal, D. Dickson, P. Fuld, D. Masur, R. Scott, M. Mehler, J. Masdeu, C. Kawas, M. Aronson, L. Wolfson, Clinico-pathologic studies in dementia: nondemented subjects with pathologically confirmed Alzheimer's disease, *Neurology* 38(11) (1988) 1682-7.

[9] A. Haldenwanger, P. Eling, A. Kastrup, H. Hildebrandt, Correlation between cognitive impairment and CSF biomarkers in amnesic MCI, non-amnesic MCI, and Alzheimer's disease, *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 22(3) (2010) 971-80.

[10] H. Amieva, M. Le Goff, X. Millet, J.M. Orgogozo, K. Peres, P. Barberger-Gateau, H. Jacqmin-Gadda, J.F. Dartigues, Prodromal Alzheimer's disease: successive emergence of the clinical symptoms, *Annals of neurology* 64(5) (2008) 492-8.

- [11] J.L. Price, D.W. McKeel, Jr., V.D. Buckles, C.M. Roe, C. Xiong, M. Grundman, L.A. Hansen, R.C. Petersen, J.E. Parisi, D.W. Dickson, C.D. Smith, D.G. Davis, F.A. Schmitt, W.R. Markesbery, J. Kaye, R. Kurlan, C. Hulette, B.F. Kurland, R. Higdon, W. Kukull, J.C. Morris, Neuropathology of nondemented aging: presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease, *Neurobiology of aging* 30(7) (2009) 1026-36.
- [12] C. Humpel, Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease, *Trends in biotechnology* 29(1) (2011) 26-32.
- [13] C. Ramassamy, D. Averill, U. Beffert, S. Bastianetto, L. Theroux, S. Lussier-Cacan, J.S. Cohn, Y. Christen, J. Davignon, R. Quirion, J. Poirier, Oxidative damage and protection by antioxidants in the frontal cortex of Alzheimer's disease is related to the apolipoprotein E genotype, *Free radical biology & medicine* 27(5-6) (1999) 544-53.
- [14] J.N. Keller, F.A. Schmitt, S.W. Scheff, Q. Ding, Q. Chen, D.A. Butterfield, W.R. Markesbery, Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment, *Neurology* 64(7) (2005) 1152-6.
- [15] A.M. Swomley, D.A. Butterfield, Oxidative stress in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: evidence from human data provided by redox proteomics, *Archives of toxicology* 89(10) (2015) 1669-80.
- [16] R. Resende, P.I. Moreira, T. Proenca, A. Deshpande, J. Busciglio, C. Pereira, C.R. Oliveira, Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease, *Free radical biology & medicine* 44(12) (2008) 2051-7.
- [17] A. Matsumura, M.C. Emoto, S. Suzuki, N. Iwahara, S. Hisahara, J. Kawamata, H. Suzuki, A. Yamauchi, H. Sato-Akaba, H.G. Fujii, S. Shimohama, Evaluation of oxidative stress in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer disease by in vivo electron paramagnetic resonance imaging, *Free radical biology & medicine* 85 (2015) 165-73.
- [18] C. Pena-Bautista, C. Vigor, J.M. Galano, C. Oger, T. Durand, I. Ferrer, A. Cuevas, R. Lopez-Cuevas, M. Baquero, M. Lopez-Nogueroles, M. Vento, D. Hervas, A. Garcia-Blanco, C. Chafer-Pericas, Plasma lipid peroxidation biomarkers for early and non-invasive Alzheimer Disease detection, *Free radical biology & medicine* 124 (2018) 388-394.
- [19] M. Schrag, C. Mueller, M. Zabel, A. Crofton, W.M. Kirsch, O. Ghribi, R. Squitti, G. Perry, Oxidative stress in blood in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a meta-analysis, *Neurobiology of disease* 59 (2013) 100-10.
- [20] X. Pang, Y. Zhao, J. Wang, Q. Zhou, L. Xu, Kang, A.L. Liu, G.H. Du, The Bioinformatic Analysis of the Dysregulated Genes and MicroRNAs in Entorhinal Cortex, Hippocampus, and Blood for Alzheimer's Disease, *BioMed research international* 2017 (2017) 9084507.
- [21] F.A. de Leeuw, C.F.W. Peeters, M.I. Kester, A.C. Harms, E.A. Struys, T. Hankemeier, H.W.T. van Vlijmen, S.J. van der Lee, C.M. van Duijn, P. Scheltens, A. Demirkan, M.A. van de Wiel, W.M. van der

Flier, C.E. Teunissen, Blood-based metabolic signatures in Alzheimer's disease, *Alzheimers Dement (Amst)* 8 (2017) 196-207.

[22] A. Nunomura, G. Perry, G. Aliev, K. Hirai, A. Takeda, E.K. Balraj, P.K. Jones, H. Ghanbari, T. Wataya, S. Shimohama, S. Chiba, C.S. Atwood, R.B. Petersen, M.A. Smith, Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease, *Journal of neuropathology and experimental neurology* 60(8) (2001) 759-67.

[23] H. Xie, S. Hou, J. Jiang, M. Sekutowicz, J. Kelly, B.J. Bacskai, Rapid cell death is preceded by amyloid plaque-mediated oxidative stress, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(19) (2013) 7904-9.

[24] A. Belkacemi, C. Ramassamy, Time sequence of oxidative stress in the brain from transgenic mouse models of Alzheimer's disease related to the amyloid-beta cascade, *Free radical biology & medicine* 52(3) (2012) 593-600.

[25] M.C. Puertas, J.M. Martinez-Martos, M.P. Cobo, M.P. Carrera, M.D. Mayas, M.J. Ramirez-Exposito, Plasma oxidative stress parameters in men and women with early stage Alzheimer type dementia, *Experimental gerontology* 47(8) (2012) 625-30.

[26] M.F. Folstein, S.E. Folstein, P.R. McHugh, "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician, *Journal of psychiatric research* 12(3) (1975) 189-98.

[27] Z.S. Nasreddine, N.A. Phillips, V. Bedirian, S. Charbonneau, V. Whitehead, I. Collin, J.L. Cummings, H. Chertkow, The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment, *Journal of the American Geriatrics Society* 53(4) (2005) 695-9.

[28] G.J. Ligthart, J.X. Corberand, C. Fournier, P. Galanaud, W. Hijmans, B. Kennes, H.K. Muller-Hermelink, G.G. Steinmann, Admission criteria for immunogerontological studies in man: the SENIEUR protocol, *Mechanisms of ageing and development* 28(1) (1984) 47-55.

[29] R.C. Petersen, G.E. Smith, S.C. Waring, R.J. Ivnik, E.G. Tangalos, E. Kokmen, Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome, *Archives of neurology* 56(3) (1999) 303-8.

[30] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free radical biology & medicine* 26(9-10) (1999) 1231-7.

[31] E. Augustyniak, A. Adam, K. Wojdyla, A. Rogowska-Wrzesinska, R. Willetts, A. Korkmaz, M. Atalay, D. Weber, T. Grune, C. Borsa, D. Gradinaru, R. Chand Bollineni, M. Fedorova, H.R. Griffiths, Validation of protein carbonyl measurement: a multi-centre study, *Redox biology* 4 (2015) 149-57.

[32] L. Terrisse, J. Poirier, P. Bertrand, A. Merched, S. Visvikis, G. Siest, R. Milne, E. Rassart, Increased levels of apolipoprotein D in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer's patients, *Journal of neurochemistry* 71(4) (1998) 1643-50.

- [33] P.T. Trzepacz, H. Hochstetler, S. Wang, B. Walker, A.J. Saykin, Relationship between the Montreal Cognitive Assessment and Mini-mental State Examination for assessment of mild cognitive impairment in older adults, *BMC geriatrics* 15 (2015) 107.
- [34] P. Yamini, R.S. Ray, K. Chopra, Vitamin D3 attenuates cognitive deficits and neuroinflammatory responses in ICV-STZ induced sporadic Alzheimer's disease, *Inflammopharmacology* 26(1) (2018) 39-55.
- [35] I.P. Trougakos, The molecular chaperone apolipoprotein J/clusterin as a sensor of oxidative stress: implications in therapeutic approaches - a mini-review, *Gerontology* 59(6) (2013) 514-23.
- [36] D.E. Jenne, B. Lowin, M.C. Peitsch, A. Bottcher, G. Schmitz, J. Tschopp, Clusterin (complement lysis inhibitor) forms a high density lipoprotein complex with apolipoprotein A-I in human plasma, *The Journal of biological chemistry* 266(17) (1991) 11030-6.
- [37] F. Rizzi, A.E. Caccamo, L. Belloni, S. Bettuzzi, Clusterin is a short half-life, poly-ubiquitinated protein, which controls the fate of prostate cancer cells, *Journal of cellular physiology* 219(2) (2009) 314-23.
- [38] J.S. Yokoyama, G. Marx, J.A. Brown, L.W. Bonham, D. Wang, G. Coppola, W.W. Seeley, H.J. Rosen, B.L. Miller, J.H. Kramer, D.B. Dubal, Systemic klotho is associated with KLOTHO variation and predicts intrinsic cortical connectivity in healthy human aging, *Brain imaging and behavior* 11(2) (2017) 391-400.
- [39] A. Masso, A. Sanchez, A. Bosch, L. Gimenez-Llort, M. Chillon, Secreted alphaKlotho isoform protects against age-dependent memory deficits, *Molecular psychiatry* (2017).
- [40] E. Zeldich, C.D. Chen, T.A. Colvin, E.A. Bove-Fenderson, J. Liang, T.B. Tucker Zhou, D.A. Harris, C.R. Abraham, The neuroprotective effect of Klotho is mediated via regulation of members of the redox system, *The Journal of biological chemistry* 289(35) (2014) 24700-15.
- [41] K. Soreide, Receiver-operating characteristic curve analysis in diagnostic, prognostic and predictive biomarker research, *Journal of clinical pathology* 62(1) (2009) 1-5.
- [42] H.J. Forman, A. Bernardo, K.J. Davies, What is the concentration of hydrogen peroxide in blood and plasma?, *Archives of biochemistry and biophysics* 603 (2016) 48-53.
- [43] M. Padurariu, A. Ciobica, L. Hritcu, B. Stoica, W. Bild, C. Stefanescu, Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease, *Neuroscience letters* 469(1) (2010) 6-10.
- [44] N. Arce-Varas, G. Abate, C. Prandelli, C. Martinez, F. Cuetos, M. Menendez, M. Marziano, D. Cabrera-Garcia, M.T. Fernandez-Sanchez, A. Novelli, M. Memo, D. Uberti, Comparison of Extracellular and Intracellular Blood Compartments Highlights Redox Alterations in Alzheimer's and Mild Cognitive Impairment Patients, *Current Alzheimer research* 14(1) (2017) 112-122.
- [45] R. Pulido, A. Jimenez-Escrig, L. Orensanz, F. Saura-Calixto, A. Jimenez-Escrig, Study of plasma antioxidant status in Alzheimer's disease, *European journal of neurology* 12(7) (2005) 531-5.

- [46] S.G. Lee, T. Wang, T.M. Vance, P. Hubert, D.O. Kim, S.I. Koo, O.K. Chun, Validation of Analytical Methods for Plasma Total Antioxidant Capacity by Comparing with Urinary 8-Isoprostane Level, *Journal of microbiology and biotechnology* 27(2) (2017) 388-394.
- [47] P. Rinaldi, M.C. Polidori, A. Metastasio, E. Mariani, P. Mattioli, A. Cherubini, M. Catani, R. Cecchetti, U. Senin, P. Mecocci, Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease, *Neurobiology of aging* 24(7) (2003) 915-9.
- [48] F. Mangialasche, W. Xu, M. Kivipelto, E. Costanzi, S. Ercolani, M. Pigliautile, R. Cecchetti, M. Baglioni, A. Simmons, H. Soininen, M. Tsolaki, I. Kloszewska, B. Vellas, S. Lovestone, P. Mecocci, Tocopherols and tocotrienols plasma levels are associated with cognitive impairment, *Neurobiology of aging* 33(10) (2012) 2282-90.
- [49] C. Feart, C. Helmer, B. Merle, F.R. Herrmann, C. Annweiler, J.F. Dartigues, C. Delcourt, C. Samieri, Associations of lower vitamin D concentrations with cognitive decline and long-term risk of dementia and Alzheimer's disease in older adults, *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 13(11) (2017) 1207-1216.
- [50] M. Thamsen, U. Jakob, The redoxome: Proteomic analysis of cellular redox networks, *Current opinion in chemical biology* 15(1) (2011) 113-9.
- [51] M.A. Comini, Measurement and meaning of cellular thiol:disulfide redox status, *Free radical research* 50(2) (2016) 246-71.
- [52] C.C. Conrad, P.L. Marshall, J.M. Talent, C.A. Malakowsky, J. Choi, R.W. Gracy, Oxidized proteins in Alzheimer's plasma, *Biochemical and biophysical research communications* 275(2) (2000) 678-81.
- [53] F. Di Domenico, G. Pupo, E. Giraldo, M.C. Badia, P. Monllor, A. Lloret, M.E. Schinina, A. Giorgi, C. Cini, A. Tramutola, D.A. Butterfield, J. Vina, M. Perluigi, Oxidative signature of cerebrospinal fluid from mild cognitive impairment and Alzheimer disease patients, *Free radical biology & medicine* 91 (2016) 1-9.
- [54] J.D. Etlinger, A.L. Goldberg, A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(1) (1977) 54-8.
- [55] T. Reinheckel, N. Sitte, O. Ullrich, U. Kuckelkorn, K.J. Davies, T. Grune, Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress, *The Biochemical journal* 335 (Pt 3) (1998) 637-42.
- [56] A.M. Pickering, A.L. Koop, C.Y. Teoh, G. Ermak, T. Grune, K.J. Davies, The immunoproteasome, the 20S proteasome and the PA28alpha proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes, *The Biochemical journal* 432(3) (2010) 585-94.
- [57] M. Wada, M. Kosaka, S. Saito, T. Sano, K. Tanaka, A. Ichihara, Serum concentration and localization in tumor cells of proteasomes in patients with hematologic malignancy and their pathophysiologic significance, *The Journal of laboratory and clinical medicine* 121(2) (1993) 215-23.

- [58] A. Zoeger, M. Blau, K. Egerer, E. Feist, B. Dahlmann, Circulating proteasomes are functional and have a subtype pattern distinct from 20S proteasomes in major blood cells, *Clinical chemistry* 52(11) (2006) 2079-86.
- [59] W. Ma, H. Kantarjian, S. O'Brien, I. Jilani, X. Zhang, Z. Estrov, A. Ferrajoli, M. Keating, F. Giles, M. Albitar, Enzymatic activity of circulating proteasomes correlates with clinical behavior in patients with chronic lymphocytic leukemia, *Cancer* 112(6) (2008) 1306-12.
- [60] O. Mueller, T. Anlasik, J. Wiedemann, J. Thomassen, J. Wohlschlaeger, V. Hagel, K. Keyvani, I. Schwieger, B. Dahlmann, U. Sure, S.U. Sixt, Circulating extracellular proteasome in the cerebrospinal fluid: a study on concentration and proteolytic activity, *Journal of molecular neuroscience : MN* 46(3) (2012) 509-15.
- [61] S. Poon, S.B. Easterbrook-Smith, M.S. Rybchyn, J.A. Carver, M.R. Wilson, Clusterin is an ATP-independent chaperone with very broad substrate specificity that stabilizes stressed proteins in a folding-competent state, *Biochemistry* 39(51) (2000) 15953-60.
- [62] F. Loison, L. Debure, P. Nizard, P. le Goff, D. Michel, Y. le Drean, Up-regulation of the clusterin gene after proteotoxic stress: implication of HSF1-HSF2 heterocomplexes, *The Biochemical journal* 395(1) (2006) 223-31.
- [63] I. Carreras, R. Garrett-Young, M.D. Ullman, P.B. Eisenhauer, R.E. Fine, J.M. Wells, K.J. Conn, Upregulation of clusterin/apolipoprotein J in lactacystin-treated SH-SY5Y cells, *Journal of neuroscience research* 79(4) (2005) 495-502.
- [64] P. Rohne, H. Prochnow, S. Wolf, B. Renner, C. Koch-Brandt, The chaperone activity of clusterin is dependent on glycosylation and redox environment, *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 34(5) (2014) 1626-39.
- [65] A. Rull, M. Martinez-Bujidos, M. Perez-Cuellar, A. Perez, J. Ordonez-Llanos, J.L. Sanchez-Quesada, Increased concentration of clusterin/apolipoprotein J (apoJ) in hyperlipemic serum is paradoxically associated with decreased apoJ content in lipoproteins, *Atherosclerosis* 241(2) (2015) 463-70.
- [66] V.B. Gupta, J.D. Doecke, E. Hone, S. Pedrini, S.M. Laws, M. Thambisetty, A.I. Bush, C.C. Rowe, V.L. Villemagne, D. Ames, C.L. Masters, S.L. Macaulay, A. Rembach, S.R. Rainey-Smith, R.N. Martins, Plasma apolipoprotein J as a potential biomarker for Alzheimer's disease: Australian Imaging, Biomarkers and Lifestyle study of aging, *Alzheimers Dement (Amst)* 3 (2016) 18-26.
- [67] W. Jongbloed, K.D. van Dijk, S.D. Mulder, W.D. van de Berg, M.A. Blankenstein, W. van der Flier, R. Veerhuis, Clusterin Levels in Plasma Predict Cognitive Decline and Progression to Alzheimer's Disease, *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 46(4) (2015) 1103-10.
- [68] T. Haight, R.N. Bryan, O. Meirelles, R. Tracy, M. Fornage, M. Richard, I. Nasrallah, K. Yaffe, D.R. Jacobs, Jr., C. Lewis, P. Schreiner, S. Sidney, C. Davatzikos, L.J. Launer, Associations of plasma

clusterin and Alzheimer's disease-related MRI markers in adults at mid-life: The CARDIA Brain MRI sub-study, *PloS one* 13(1) (2018) e0190478.

[69] J.C. Lambert, S. Heath, G. Even, D. Campion, K. Sleegers, M. Hiltunen, O. Combarros, D. Zelenika, M.J. Bullido, B. Tavernier, L. Letenneur, K. Bettens, C. Berr, F. Pasquier, N. Fievet, P. Barberger-Gateau, S. Engelborghs, P. De Deyn, I. Mateo, A. Franck, S. Helisalmi, E. Porcellini, O. Hanon, M.M. de Pancorbo, C. Lendon, C. Dufouil, C. Jaillard, T. Leveillard, V. Alvarez, P. Bosco, M. Mancuso, F. Panza, B. Nacmias, P. Bossu, P. Piccardi, G. Annoni, D. Seripa, D. Galimberti, D. Hannequin, F. Licastro, H. Soininen, K. Ritchie, H. Blanche, J.F. Dartigues, C. Tzourio, I. Gut, C. Van Broeckhoven, A. Alperovitch, M. Lathrop, P. Amouyel, Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *CR1* associated with Alzheimer's disease, *Nature genetics* 41(10) (2009) 1094-9.

[70] M.D. Martin-Rehrmann, H.S. Hoe, E.M. Capuani, G.W. Rebeck, Association of apolipoprotein J-positive beta-amyloid plaques with dystrophic neurites in Alzheimer's disease brain, *Neurotoxicity research* 7(3) (2005) 231-42.

[71] J.T. Yu, L. Tan, The role of clusterin in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis, and therapy, *Molecular neurobiology* 45(2) (2012) 314-26.

[72] A.M. Lidstrom, N. Bogdanovic, C. Hesse, I. Volkman, P. Davidsson, K. Blennow, Clusterin (apolipoprotein J) protein levels are increased in hippocampus and in frontal cortex in Alzheimer's disease, *Experimental neurology* 154(2) (1998) 511-21.

[73] E.M. Schrijvers, P.J. Koudstaal, A. Hofman, M.M. Breteler, Plasma clusterin and the risk of Alzheimer disease, *Jama* 305(13) (2011) 1322-6.

[74] J. Kalman, W. McConathy, C. Araoz, P. Kasa, A.G. Lacko, Apolipoprotein D in the aging brain and in Alzheimer's dementia, *Neurological research* 22(4) (2000) 330-6.

[75] R. Bajo-Graneras, D. Sanchez, G. Gutierrez, C. Gonzalez, S. Do Carmo, E. Rassart, M.D. Ganfornina, Apolipoprotein D alters the early transcriptional response to oxidative stress in the adult cerebellum, *Journal of neurochemistry* 117(6) (2011) 949-60.

[76] S. Do Carmo, L.C. Levros, Jr., E. Rassart, Modulation of apolipoprotein D expression and translocation under specific stress conditions, *Biochimica et biophysica acta* 1773(6) (2007) 954-69.

[77] M.D. Ganfornina, S. Do Carmo, J.M. Lora, S. Torres-Schumann, M. Vogel, M. Allhorn, C. Gonzalez, M.J. Bastiani, E. Rassart, D. Sanchez, Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress, *Aging cell* 7(4) (2008) 506-15.

[78] M.D. Ganfornina, S. Do Carmo, E. Martinez, J. Tolia, A. Navarro, E. Rassart, D. Sanchez, ApoD, a glia-derived apolipoprotein, is required for peripheral nerve functional integrity and a timely response to injury, *Glia* 58(11) (2010) 1320-34.

- [79] G. Franz, M. Reindl, S.C. Patel, R. Beer, I. Unterrichter, T. Berger, E. Schmutzhard, W. Poewe, A. Kampfl, Increased expression of apolipoprotein D following experimental traumatic brain injury, *Journal of neurochemistry* 73(4) (1999) 1615-25.
- [80] S. Suresh, Z. Yan, R.C. Patel, Y.C. Patel, S.C. Patel, Cellular cholesterol storage in the Niemann-Pick disease type C mouse is associated with increased expression and defective processing of apolipoprotein D, *Journal of neurochemistry* 70(1) (1998) 242-51.
- [81] K. Ali, E.M. Abo-Ali, M.D. Kabir, B. Riggins, S. Nguy, L. Li, U. Srivastava, S.M. Thinn, A Western-fed diet increases plasma HDL and LDL-cholesterol levels in apoD^{-/-} mice, *PloS one* 9(12) (2014) e115744.
- [82] X. Kuang, H.J. Zhou, A.H. Thorne, X.N. Chen, L.J. Li, J.R. Du, Neuroprotective Effect of Ligustilide through Induction of alpha-Secretase Processing of Both APP and Klotho in a Mouse Model of Alzheimer's Disease, *Frontiers in aging neuroscience* 9 (2017) 353.
- [83] M. Kuro-o, Y. Matsumura, H. Aizawa, H. Kawaguchi, T. Suga, T. Utsugi, Y. Ohyama, M. Kurabayashi, T. Kaname, E. Kume, H. Iwasaki, A. Iida, T. Shiraki-Iida, S. Nishikawa, R. Nagai, Y.I. Nabeshima, Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing, *Nature* 390(6655) (1997) 45-51.
- [84] A. Imura, A. Iwano, O. Tohyama, Y. Tsuji, K. Nozaki, N. Hashimoto, T. Fujimori, Y. Nabeshima, Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane, *FEBS letters* 565(1-3) (2004) 143-7.
- [85] M. Mitobe, T. Yoshida, H. Sugiura, S. Shirota, K. Tsuchiya, H. Nihei, Oxidative stress decreases klotho expression in a mouse kidney cell line, *Nephron. Experimental nephrology* 101(2) (2005) e67-74.
- [86] Z. Zuo, H. Lei, X. Wang, Y. Wang, W. Sonntag, Z. Sun, Aging-related kidney damage is associated with a decrease in klotho expression and an increase in superoxide production, *Age (Dordr)* 33(3) (2011) 261-74.
- [87] C.C. Hsieh, M. Kuro-o, K.P. Rosenblatt, R. Brobey, J. Papaconstantinou, The ASK1-Signalosome regulates p38 MAPK activity in response to levels of endogenous oxidative stress in the Klotho mouse models of aging, *Aging* 2(9) (2010) 597-611.
- [88] B.M. Emerling, F. Weinberg, J.L. Liu, T.W. Mak, N.S. Chandel, PTEN regulates p300-dependent hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activity through Forkhead transcription factor 3a (FOXO3a), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(7) (2008) 2622-7.
- [89] R.D. Semba, A.R. Moghekar, J. Hu, K. Sun, R. Turner, L. Ferrucci, R. O'Brien, Klotho in the cerebrospinal fluid of adults with and without Alzheimer's disease, *Neuroscience letters* 558 (2014) 37-40.
- [90] G. Brombo, F. Bonetti, B. Ortolani, M.L. Morieri, C. Bosi, A. Passaro, G.B. Vigna, C. Borgna, M.V. Arcidicono, V. Tisato, G. Zuliani, Lower Plasma Klotho Concentrations Are Associated with Vascular Dementia but Not Late-Onset Alzheimer's Disease, *Gerontology* (2018) 1-8.

- [91] S.E. O'Bryant, G. Xiao, R. Barber, J. Reisch, R. Doody, T. Fairchild, P. Adams, S. Waring, R. Diaz-Arrastia, A serum protein-based algorithm for the detection of Alzheimer disease, *Archives of neurology* 67(9) (2010) 1077-81.
- [92] S. Ray, M. Britschgi, C. Herbert, Y. Takeda-Uchimura, A. Boxer, K. Blennow, L.F. Friedman, D.R. Galasko, M. Jutel, A. Karydas, J.A. Kaye, J. Leszek, B.L. Miller, L. Minthon, J.F. Quinn, G.D. Rabinovici, W.H. Robinson, M.N. Sabbagh, Y.T. So, D.L. Sparks, M. Tabaton, J. Tinklenberg, J.A. Yesavage, R. Tibshirani, T. Wyss-Coray, Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins, *Nature medicine* 13(11) (2007) 1359-62.
- [93] M.S. Albert, S.T. DeKosky, D. Dickson, B. Dubois, H.H. Feldman, N.C. Fox, A. Gamst, D.M. Holtzman, W.J. Jagust, R.C. Petersen, P.J. Snyder, M.C. Carrillo, B. Thies, C.H. Phelps, 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 : the journal of the Alzheimer's Association* 7(3) (2011) 270-9.
- [94] F. Bellanti, M. Matteo, T. Rollo, F. De Rosario, P. Greco, G. Vendemiale, G. Serviddio, Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: impact of estrogen therapy, *Redox biology* 1 (2013) 340-6.
- [95] J.F. Young, S.E. Nielsen, J. Haraldsdottir, B. Daneshvar, S.T. Lauridsen, P. Knuthsen, A. Crozier, B. Sandstrom, L.O. Dragsted, Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status, *The American journal of clinical nutrition* 69(1) (1999) 87-94.
- [96] Y. Wang, M. Yang, S.G. Lee, C.G. Davis, S.I. Koo, O.K. Chun, Dietary total antioxidant capacity is associated with diet and plasma antioxidant status in healthy young adults, *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* 112(10) (2012) 1626-35.
- [97] J. Harasym, R. Oledzki, Effect of fruit and vegetable antioxidants on total antioxidant capacity of blood plasma, *Nutrition* 30(5) (2014) 511-7.
- [98] A. Khalil, P. Gaudreau, M. Cherki, R. Wagner, D.M. Tessier, T. Fulop, B. Shatenstein, Antioxidant-rich food intakes and their association with blood total antioxidant status and vitamin C and E levels in community-dwelling seniors from the Quebec longitudinal study NuAge, *Experimental gerontology* 46(6) (2011) 475-81.
- [99] B. Franzke, B. Schober-Halper, M. Hofmann, S. Oesen, A. Tosevska, T. Henriksen, H.E. Poulsen, E.M. Strasser, B. Wessner, K.H. Wagner, Age and the effect of exercise, nutrition and cognitive training on oxidative stress - The Vienna Active Aging Study (VAAS), a randomized controlled trial, *Free radical biology & medicine* 121 (2018) 69-77.

4. CHAPITRE III

ARTICLE 2: PROFILE OF PATHOGENIC PROTEINS IN TOTAL CIRCULATING EXTRACELLULAR VESICLES IN MILD COGNITIVE IMPAIRMENT AND DURING THE PROGRESSION OF ALZHEIMER'S DISEASE

Statut de l'article : à soumettre dans le journal *Neurobiology of Disease*

Auteurs de l'article : Morgane, Perrotte^{1,2,3} ; Mohamed, Haddad^{1,2} ; Aurélie, Le Page⁴ ; Eric H. Frost⁵ ; Tamas, Fulop⁴ ; Charles, Ramassamy^{1,2,3}

¹ INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada,

² Institut sur la Nutrition et les Aliments Fonctionnels, University of Laval, Québec, Canada

³ Quebec Network for Research on Aging, University of Montreal, Québec, Canada

⁴ Department of Medicine, Geriatric Division, Research Center on Aging, University of Sherbrooke, Qc, Canada

⁵ Department of Microbiology and Infectiology, and Centre de Recherches Cliniques de CHUS, University of Sherbrooke, Qc, Canada

4.1. Résumé et objectifs de l'article 2

Les vésicules extracellulaires, sécrétées par les tous les types cellulaire y compris les cellules du cerveau, jouent un rôle important dans le maintien des fonctions cérébrales. Cependant, récemment, des études ont mis en évidence leur implication dans la propagation cérébrale des protéines toxiques telles que l'amyloïde β , Tau ou encore l' α -synucléine dans les maladies neurodégénératives. Les vésicules sont également capables de passer la barrière hémato-encéphalique et se retrouver dans la circulation sanguine. Ainsi, le contenu en protéines pathogéniques des vésicules extracellulaires représente un outil potentiel dans le diagnostic des sujets MCI et des patients atteints de la MA. C'est pourquoi l'objectif de cette étude est d'isoler les vésicules extracellulaires totales provenant du plasma (pEV) de patients contrôles, MCI et atteints de la MA à différents stades de la maladie et de mesurer le niveau des protéines impliquées dans les mécanismes pathogéniques de la MA. Nos résultats montrent une réduction du niveau de tTau et APP dans les pEV des patients MCI et des patients atteints de la MA au stade léger par rapport aux sujets contrôles. Une augmentation des taux d'A β 42 et de pTau-181 dans les pEV est observée au stade modéré de la maladie

d'Alzheimer. De plus, nous avons mis en évidence une corrélation négative entre la performance cognitive et les niveaux d'APP et de pTau-T181 dans les pEV. Comme observé dans le cerveau, il n'y avait pas de corrélation entre la quantité d'A β 42 dans les pEV et les scores cognitifs. Enfin, nos résultats ont démontré que les taux de protéines liées à la MA étaient enrichis dans les pEV par rapport au sang mais restaient plus élevés dans le compartiment neuronal. Pris ensemble, nos résultats mettent en évidence les modifications de certaines protéines pathogéniques dans les pEV et suggèrent que les niveaux de certaines d'entre elles pourraient distinguer les contrôles des groupes MCI ou des patients atteints de la MA. Cette approche pourrait être utilisée pour surveiller le développement précoce de la maladie d'Alzheimer.

4.2. Contribution de l'étudiant à l'article 2

L'article va être soumis dans le journal *Neurobiology of Disease*. L'ensemble des expériences décrites dans cette publication ont été réalisées par moi-même. La mise au point de l'extraction des vésicules extracellulaires et des dosages Luminex ont été réalisés avec l'aide de Mohamed Haddad, étudiant au laboratoire du Pr Charles Ramassamy. Ce projet n'aurait pas pu voir le jour sans le don généreux des échantillons plasmatiques de l'étude clinique de l'institut gériatrique de Sherbrooke. Aurélie Le Page, sous la supervision du Professeur Tamas Fulop, a réalisé le recrutement des patients, la collecte et la préparation des échantillons sanguins. J'ai également réalisé les figures, l'analyse et la compilation des résultats. J'ai écrit l'article au complet qui a ensuite été révisé et corrigé par Eric H. Frost et le Professeur Charles Ramassamy.

4.3. Article 2

Abstract

Alzheimer disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by pathological aggregation of hyperphosphorylated Tau protein and β -amyloid peptide (A β) into senile plaques and neurofibrillary tangles, respectively. Recent evidences indicate that the brain propagation of AD-related proteins can be mediated by extracellular vesicles (EVs) and might constitute one mechanisms of AD progression. EVs can be secreted by most

cell types, including brain cells, and are detectable in different body fluids such blood due to their transportation between the brain and bloodstream. The molecular content of EVs provides insight into the biochemical status of their originating cells and represents potential markers to predict early stage of AD as the mild cognitive impairment (MCI) phase and to allow staging of AD. Pending the availability of more specific and robust methods to isolate brain-derived EVs, we proposed to use the protein cargo in the total plasma EVs (pEVs) for the detection of MCI and the evaluation of AD progression. pEVs were isolated from plasma of control, MCI and AD subjects at different stages of the disease. Size and shape of pEVs were characterized following their isolation. pEVs specific proteins were confirmed by Western Blot and AD-proteins were quantified by Luminex assays. A reduction of tTau was observed in pEVs from MCI subjects while the APP concentration was reduced in pEVs from MCI and early AD. Interestingly, pTau-T181 and APP concentrations in pEVs were correlated with cognitive performances. A β 42 and pTau-T181 levels in pEVs were unchanged in MCI but elevated in moderate AD patients compared to controls. Abnormal levels of APP and pTau-T181/tTau ratio in pEVs levels demonstrated good accuracy to define MCI and AD staging.

Keywords: Exosomes, APP, Amyloid, Tau, biomarkers, MMSE, MoCA.

Highlights:

- Circulating EVs contained potential biomarkers of AD pathogenesis.
- A β 42 and pTau-T181 represented late biomarkers in circulating EVs in AD.
- Modification of tTau and APP levels as well as pTau-T181/tTau ratios in circulating EVs corresponded to early events in MCI and AD.
- Systemic variations of APP in EVs indicated an early impairment in regulating endocytosis and trafficking.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia affecting more than 47.5 million people worldwide and this number is expected to triple by 2050 in the absence of new treatment or early diagnosis (Prince, Bryce et al. 2013). AD is a complex progressive neurodegenerative disorder leading to memory loss and cognitive decline. Like most chronic diseases, AD is known to begin insidiously decades before the diagnosis of dementia. This long preclinical phase is followed by mild cognitive impairment (MCI) phases (Sperling, Aisen et al. 2011). MCI is defined as impairment of one or more cognitive domains that is more advanced than expected for a patient's age, but is not accompanied by significant impairment of functional abilities (Albert, DeKosky et al. 2011). MCI is thus considered the earliest clinical manifestation of AD and a significant proportion of patients with these symptoms progress to AD within 5 years (Petersen, Doody et al. 2001). Alterations observed from preclinical stages that persist throughout the continuum of AD pathophysiology could be considered as good candidates biomarkers for the diagnosis of AD. However, the early diagnosis of MCI and AD remains challenging due to clinicopathologic heterogeneity (Dubois, Feldman et al. 2007, Jack, Albert et al. 2011, Sperling, Aisen et al. 2011). Currently, probable AD diagnosis requires a clinical evaluation including cognitive tests, functional brain imaging (MRI, PET and SPECT scans) and an evaluation of t-tau, p-tau, and A β 42 levels in cerebrospinal fluid (CSF) (Albert, DeKosky et al. 2011, Parnetti, Chiasserini et al. 2012). The high costs of imaging and the invasive nature of CSF collection limit their usefulness for routine clinical testing and for follow-up assessments.

Actually, the search for peripheral biomarkers for AD that reflect AD-related processes in the brain has received considerable attention but the clinical utility of blood-based biomarkers is not validated (Zetterberg and Blennow 2006, O'Bryant, Mielke et al. 2017). Therefore, it is urgent to identify non-invasive blood-based biomarkers.

Accumulating evidence supports the central role of exosomes or extracellular vesicles (EVs) in the pathophysiology of AD. In the brain, they can act as vehicles for the cell-to-cell transfer of the AD pathogenic proteins (Vella, Sharples et al. 2008, Asai, Ikezu et al. 2015, Baker, Polanco et al. 2016, Sardar Sinha, Ansell-Schultz et al. 2018, van Niel,

D'Angelo et al. 2018). Indeed, EVs-containing Tau, ptau and A β is a contributing factor in the spread of the disease across the brain (Asai, Ikezu et al. 2015, Guitart, Loers et al. 2016, Gibbons, Banks et al. 2018). Recently, it was found that a small amount of brain-derived EVs were able to cross the blood brain barrier (BBB) from brain-to-blood (Garcia-Romero, Carrion-Navarro et al. 2017) and may contain biomarkers of the disease (Shi, Liu et al. 2014, Mustapic, Eitan et al. 2017). Some brain cells-specific EVs enrichment approach has been assessed to find peripheral biomarkers for AD (Shi, Liu et al. 2014, Fiandaca, Kapogiannis et al. 2015).

Tau and A β are present in brain cells and in extracellular spaces like CSF (Rajendran, Honsho et al. 2006, Vingtdeux, Hamdane et al. 2007, Sharples, Vella et al. 2008, Perez-Gonzalez, Gauthier et al. 2012, Saman, Kim et al. 2012, Simon, Garcia-Garcia et al. 2012, Sardar Sinha, Ansell-Schultz et al. 2018) but but they are also present in peripheral cells (Slachevsky, Guzman-Martinez et al. 2017, Hanon, Vidal et al. 2018). As several peripheral factors could also contribute to the development and progression of AD, a close interaction between the brain and the periphery for A β and tau metabolism has been considered (Slachevsky, Guzman-Martinez et al. 2017, Hanon, Vidal et al. 2018). We have thus hypothesized that the levels of APP, A β , total tau and ptau in total plasma Evs (pEVs) could represent a good signature for the detection of MCI and throughout the continuum of AD pathophysiology.

In this study, we have isolated total plasma-based EVs (pEVs) including brain-derived EVs, established a signature of AD-related proteins content from MCI and during the progression of AD. We have also analyzed the possible association of these AD-related proteins from pEVs with cognitive performance, as assessed by two cognitive tests: the Mini-Mental State Examination (MMSE) and the Montreal Cognitive Assessment (MoCA) (Folstein, Folstein et al. 1975, Nasreddine, Phillips et al. 2005). Finally, the levels of these proteins in pEVs were compared to those from the human neuronal cell line SK-N-SH-derived EVs (called nEVs). In pEVs from MCI patients, we found a reduction of the level of tTau and APP. The increase in A β 42 and pTau-181 levels in pEVs was observed later in moderate stage of AD. Moreover, we highlighted a negative correlation between the cognitive performance and the APP and pTau-T181 levels in pEVs. As observed in the brain, there was no correlation between A β 42 in pEVs and cognitive

scores. Finally, our results demonstrated that the levels of AD related proteins were enriched in pEVs compared to the bloodstream but remain higher in neuronal compartment.

Materials and methods

Study participants and blood collection

Blood samples were obtained from 60 participants recruited from the Memory Clinic of Sherbrooke including control subjects, MCI and AD patients at different stages of the disease (mild, moderate and severe). Control elderly individuals were selected according to the SENIEUR protocol, a standard selection for immunogerontological studies (Ligthart, Corberand et al. 1984). The clinical diagnoses for MCI patients were made by applying clinical criteria of Petersen (Petersen, Smith et al. 1999). The selection of AD patients was based on criteria developed by the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) (Dubois, Feldman et al. 2007). For all participants, blood samples were collected. Global cognitive function was assessed by the MoCA and the MMSE scores (Folstein, Folstein et al. 1975, Nasreddine, Phillips et al. 2005) from all patients except for severe AD. Inclusion and exclusion criteria in the study are defined in Table 1. The protocol was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine and Health Sciences of the University of Sherbrooke and informed written consent was obtained from all participants and/or their representatives (protocol # 2010-21/Fülöp). The inclusion/exclusion criteria used in the study were indicated in Table 1.

Table 1. Inclusion and exclusion criteria used in the study and characteristics of patients and controls.

Criteria	Inclusion	Exclusion			
	<ul style="list-style-type: none"> • Age > 65 years old • Non-smoker • Without cognitive impairments • Or with mild cognitive impairments (MCI) MMSE \geq 26 • Or with Alzheimer <p>Mild (MMSE 25-22) Moderate (MMSE 21-14) Severe (MMSE < 14)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • History of psychiatric illness (depression, schizophrenia, ...) • Epilepsy • Parkinson or other neurodegenerative diseases • Stroke, inflammatory disease, prednisone, immunosuppressive and anti-inflammatory therapy • Diabetes • Dyslipidemia treated or not • Cholesterol > 6.5 • Alcohol-dependent or withdrawal 			
Parameters	Healthy	MCI	AD		
			Mild AD	Moderate AD	Severe AD
N	12	12	12	12	12
Male/Female ratio	3/9	1/11	1/11	4/8	2/10
Age (years)	68.8 \pm 1.5	75.33 \pm 1.19^a	75.60 \pm 1.3^b	79,1 \pm 1.1^c	83.00 \pm 1.60^c
MMSE scores (/30)	29.42 \pm 0.29	27.90 \pm 0.31	24.00 \pm 0.52^c	19.90 \pm 1.39^c	n.d.
MoCA scores (/30)	28.08 \pm 0.54	22.45 \pm 1.06^b	19.7 \pm 1.50^c	14 \pm 0.89^c	n.d.

Values are expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed using the one way ANOVA followed by Tukey post hoc tests (alpha = 0.05), b $p < 0.01$, c $p < 0.001$ compared to healthy controls. Abbreviations : MCI, mild cognitive impairment ; MMSE, mini-mental state examination ; MoCA, Montreal cognitive assessment ; n.d., not determined.

Isolation of blood-derived extracellular vesicles

Total pEVs were isolated from 200µl of pure plasma. Prior to extraction, plasma samples were diluted at 1:2 in Phosphate Saline Buffer (PBS) and clarified by centrifugation at 2000 × g for 20 minutes followed by a second centrifugation at 10,000 × g for 20 minutes. The supernatant containing the clarified plasma was used for EVs isolation. The pEVs were precipitated with the Total Exosome Isolation reagent (Invitrogen™ by Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA). pEVs pellets were re-suspended and purified by a series of filtrations and precipitations as previously described (Haddad, Perrotte et al. 2019). pEVs preparations were conserved at -80°C for later use. The pEVs proteins were extracted using Radio Immuno Precipitation Assay (RIPA) buffer (50mM Tris buffer, pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Igepal, 1% Na-DOC, 5 mM EDTA, 1% protease inhibitor cocktail) and were measured with the bicinchoninic acid (BCA) assay (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific, Inc).

Characterization of extracellular vesicles from plasma

Size and shape of pEVs were characterized using transmission electron microscopy (TEM). Briefly, isolated pEVs were fixed with 2% paraformaldehyde. A 10 µl drop of the suspension was incubated 5 minutes on a Formvar-carbon coated grid. The grid was contrasted in 2% uranyl acetate solution for 1 minute and dried. The EVs samples were observed under a HITACHI 7100 transmission electron microscope (75 kV) at 15000X-40000X magnification.

Western blots were performed to confirm the presence of EVs markers. pEVs protein was separated using 10% SDS-PAGE gel and transferred to PVDF membranes. The membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) before immunodetection. The following primary antibodies were incubated overnight at 4°C : Calnexin (Sc-, Santa Cruz, Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA); TSG101 (MBS7605273, MyBiosource, Inc, San Diego, CA, USA); GAPDH (Sc-365062, Santa Cruz, Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA); CD63 (Sc-5275, Santa Cruz, Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA); L1CAM (Sc-53386, Santa Cruz, Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA); GFAP (G9269, EMD Millipore Corp., Burlington, MA, USA). Then, membranes were washed with TBS-T and HRP-conjugated

secondary antibodies were incubated for 1h at room temperature (7076S, Anti-mouse IgG HRP-linked Antibody or 7074S, Anti-rabbit HRP-linked Antibody from Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA). Membrane blots were detected by chemiluminescence using ECL substrate (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) and the FluorChem HD2 system. Total EVs proteins on membranes were stained with Coomassie blue. .

The size distribution and the concentration of isolated pEVs were measured by the Nanoparticles Tracking Analysis (NTA) Nanosight NS300 system and the Nanosight NTA 3.2 Analytical Software (Malvern Instruments Company, Nanosight, and Malvern, United Kingdom). Recordings were performed for 60 seconds and the measurement was conducted three times for each sample. The zeta-potential of pEVs was measured by dynamic light scattering (DLS) using a Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, UK). For this, samples were diluted at 1:40 in water (2,5 % of PBS 1X) to obtain a conductivity of around 0,6 mS/cm and the data were analyzed using the instrument software, ZetaView Ver. 6.32.

Quantification of proteins involved in AD pathogenesis by multianalyte immunoassay

A panel including A β 40, A β 42, tTau and pTau-T181 (EMD Millipore Corp., Burlington, MA, USA) were analyzed by the Luminex technology and performed according to the manufacturer's guidebook. Assay sensitivities (minimum detectable concentrations in pg/ml) were 6.2, 1.3, 8.9, and 0.7 for A β 40, A β 42, tTau and p-Tau T181, respectively.

APP levels were also measured using Luminex assay from R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA) and the assay sensitivity was 349 pg/mL.

The kits were run with the Luminex 100/200 and data were analyzed using Xponent 4.2 software. V values were normalized with the total protein quantification in circulating EVs.

Cell culture and isolation of EVs from SK-N-SH cells

SK-N-SH, a human neuroblastoma cell line purchased from ATCC were cultured in T175 flasks with MEM, supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) from Wisent Inc., 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 1% sodium pyruvate (1

mM) at 37°C with 5% CO₂. At 80% confluence, cells were rinsed and starved for 24 hours. Cell culture medium was collected to isolate the EVs by successive centrifugations (300g for 10min, 2000g for 10min and 10000g for 30min). The final supernatant was concentrated and precipitated with the Total Exosome Isolation reagent (Invitrogen™ by Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA). The pellet containing EVs was resuspended in PBS and characterized with TEM, Western-Blot (TSG101 and GAPDH) and by NTA as described above.

Statistical analysis

After using the Shapiro-Wilk test to verify normal distribution, the one-way analysis of variance (ANOVA) was determined by the Tukey post-hoc test for comparison between groups. For non-normally distributed data including the pTauT-181/tTau and Aβ42/pTau-T181 ratios, we performed the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test to determine significant differences between groups. Correlation analyses were performed using the Pearson correlation coefficient. Receiver operating characteristics (ROC) curves were constructed and the area under the ROC curve (AUC) was calculated to determine the ability of a marker to discriminate between the diseased and control populations (Prism 7.04).

Results

Patient characteristics

The general characteristics of participants is reported in table 1. The number of patients was equal in each group with a greater female predominance in the study. As expected, scores of MMSE and MoCA tests were significantly lower in AD groups compared to control subjects. Unlike MMSE scores, MoCA scores decreased earlier in MCI because of their greater sensitivity for MCI detection (Trzepacz, Hochstetler et al. 2015). Age was significantly lower in controls than in other groups and these differences were considered in our analyses.

Characterization of blood extracellular vesicles

pEVs were isolated from the five groups of patients and were characterized (Fig. 1). TEM images indicated that pEVs exhibited a round morphology and uniform distribution in size (Fig.1.A.). The NTA showed that the size of pEVs ranged between 40 and 240 nm with 92% being between 40 and 140 nm and the major peak was around 60 nm (Fig.1.B.). The presence of EVs was strengthened by the detection of three EVs markers including TSG101, CD63 and GAPDH which were not different between the five groups (Fig.1.C). Interestingly, our pEVs samples include also brain-derived EVs which were evidenced by the labelling of neuronal and glial markers (L1CAM and GFAP, respectively). Glial-derived EVs in the bloodstream were higher in MCI and AD groups (Fig.1.C). Calnexin, a negative EV-marker was absent in EVs but was present in U87 cells. The pEVs have a negative charge with a zeta potential around $-19,15 \pm 1,75$ mV (mean \pm sem, n=2) at 25°C (Fig.1.D) as previously described (Deregibus, Figliolini et al. 2016, Helwa, Cai et al. 2017, Stremersch, Brans et al. 2018).

The NTA data indicated that the density of pEVs was higher in AD group and particularly in moderate group of AD (Fig.2A) and the mean size of pEVs was lower in MCI and all AD groups (Fig.2B). The disease progression does not affect the total protein components in pEVs (Fig.2C). Thus, the total protein concentration of pEVs could be used to normalize specific proteins or other components in pEVs.

Finally, we found that the protein amount per pEVs was reduced in AD patients compared to the control subjects (Fig.2. D).

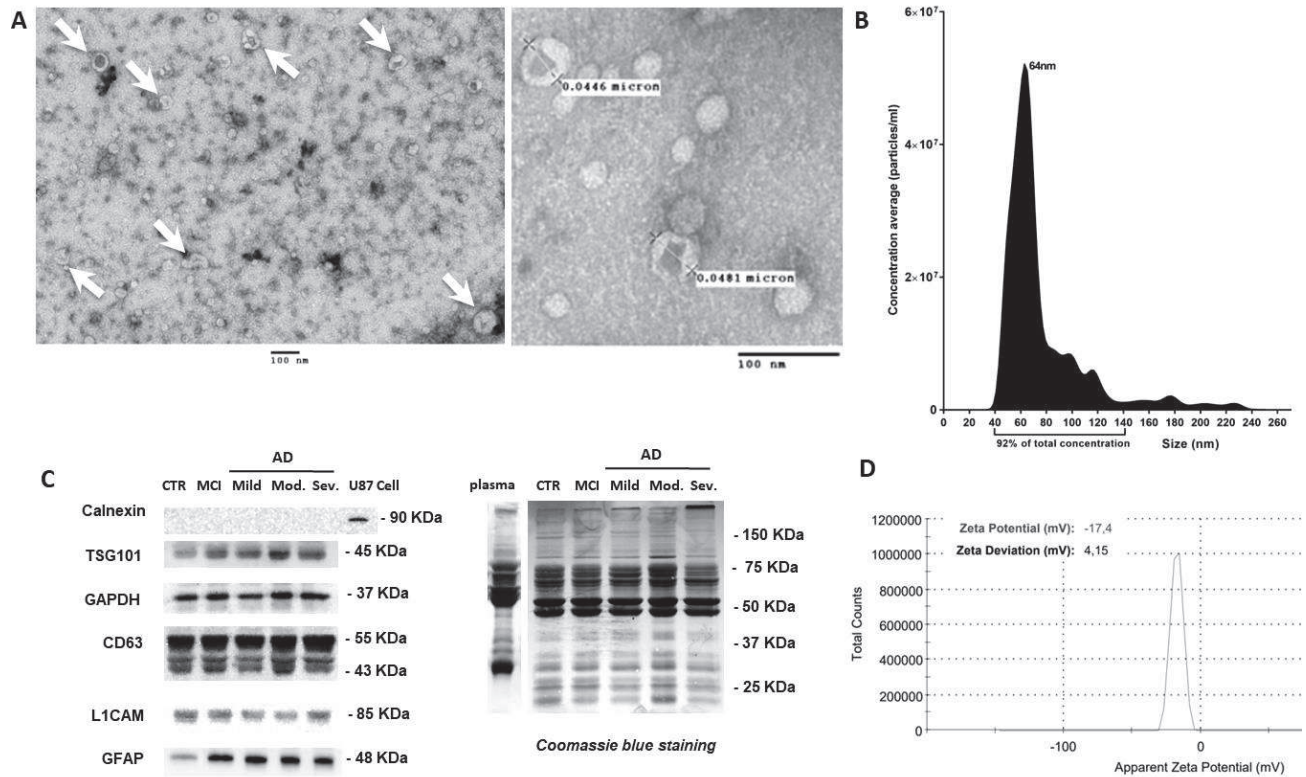


Fig. 1. Characterization of total plasma EVs isolated from controls subjects (CTR), MCI and AD patients at different stages (Mild, mild AD; Mod., moderate AD and Sev., severe AD). (A) Size and shape characterization were determined with transmission electron microscopy (TEM). (B) Size distribution and concentration of pEVs were analyzed by NTA using Nanosight NS300. (C) Western blot analysis of detection of proteins with Calnexin as negative control, EVs marker proteins (TSG101, GAPDH and CD63), L1CAM as a neuronal marker and GFAP as a glial cell marker. The membrane was stained with Coomassie blue to show the total protein content of pEVs. (D) Zeta potential of pEVs using Zetasizer Nano.

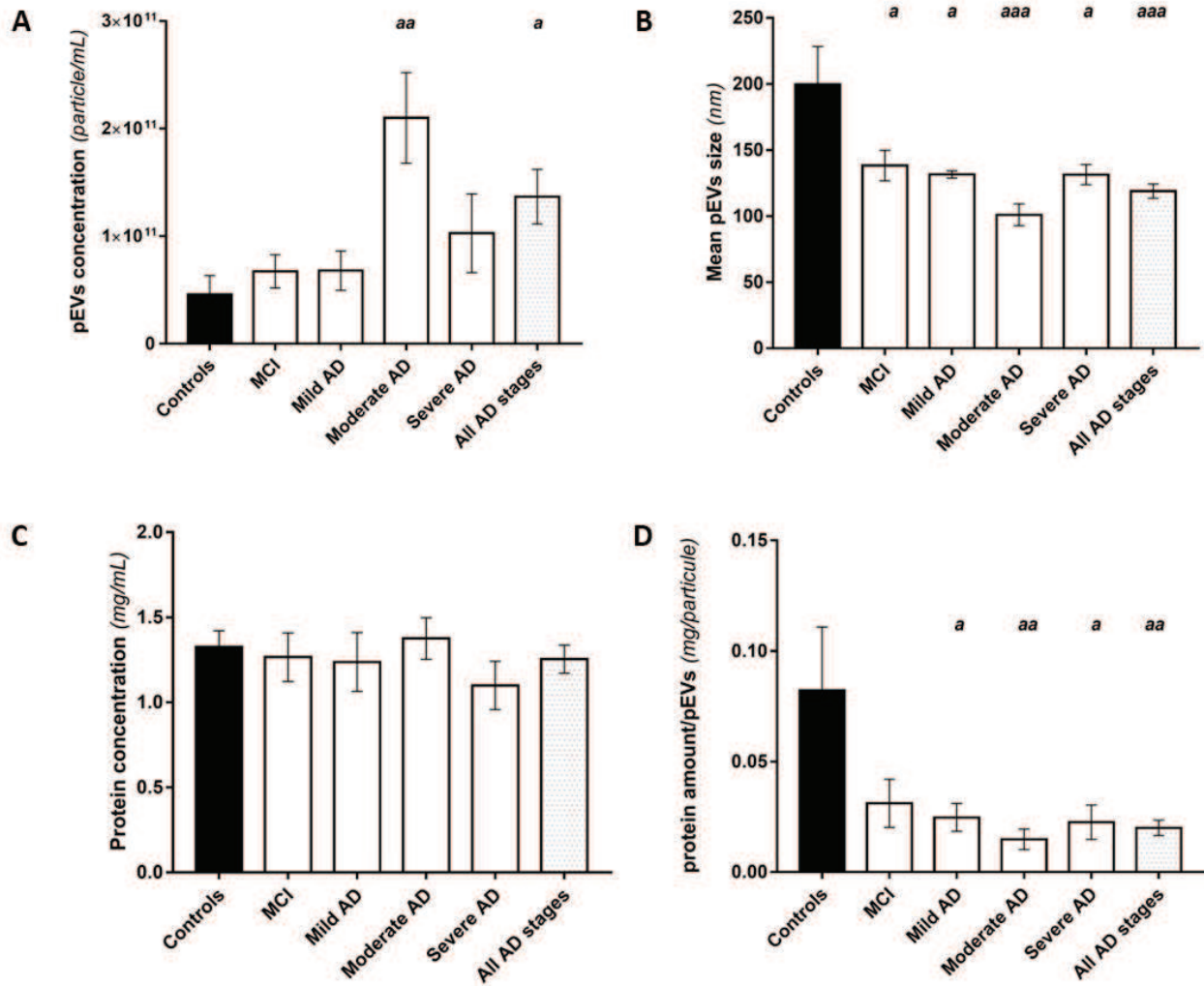


Fig. 2. (A) Density (B) mean size, (C) protein concentration of pEVs and (D) amount of total protein per pEVs isolated from control, MCI and AD subjects (mild, moderate and severe stage). Data are presented as means \pm SEM and statistical analysis was performed using the one-way ANOVA followed by Tukey post hoc tests ($\alpha = 0.05$), a $p < 0.05$, aa $p < 0.01$, aaa $p < 0.001$ compared to controls.

Levels of AD pathogenic proteins in circulating extracellular vesicles in controls, MCI and different groups of AD patients

Our results revealed a reduction of tTau levels in pEVs from MCI subjects, mild and moderate AD patients as compared to controls (Fig.3.A). The levels of APP in pEVs were also decreased in MCI and in mild AD but increased in severe AD patients compared to the controls (Fig.3.B). Concentrations of A β 42 and pTau-T181 in pEVs were higher in patients at the moderate stage of AD than in controls (Fig.3.C, D).

The ratio pTau-T181/tTau in pEVs increased early in MCI and in moderate AD patients (Fig.3.E) while the ratio tTau/A β 42 raised later in mild and moderate AD compared to the controls (Fig.3.F). The ratio of A β 42/pTau-T181 in pEVs was not different among groups (Fig.3.G). However, these pEVs-proteins content were not different between control and AD groups when AD subjects were not stratified according to the stage of the disease.. A β 40 was not detectable in pEVs. To note, the standard deviations of A β 42 and pTau-T181 levels were lower in control and MCI than AD groups which confirm the heterogeneity, the complexity of the stratification of the disease with potential overlapping between groups. By Pearson correlation analysis, we found that the pTau-T181 level was positively correlated with tTau level in pEVs (Fig.3.H).

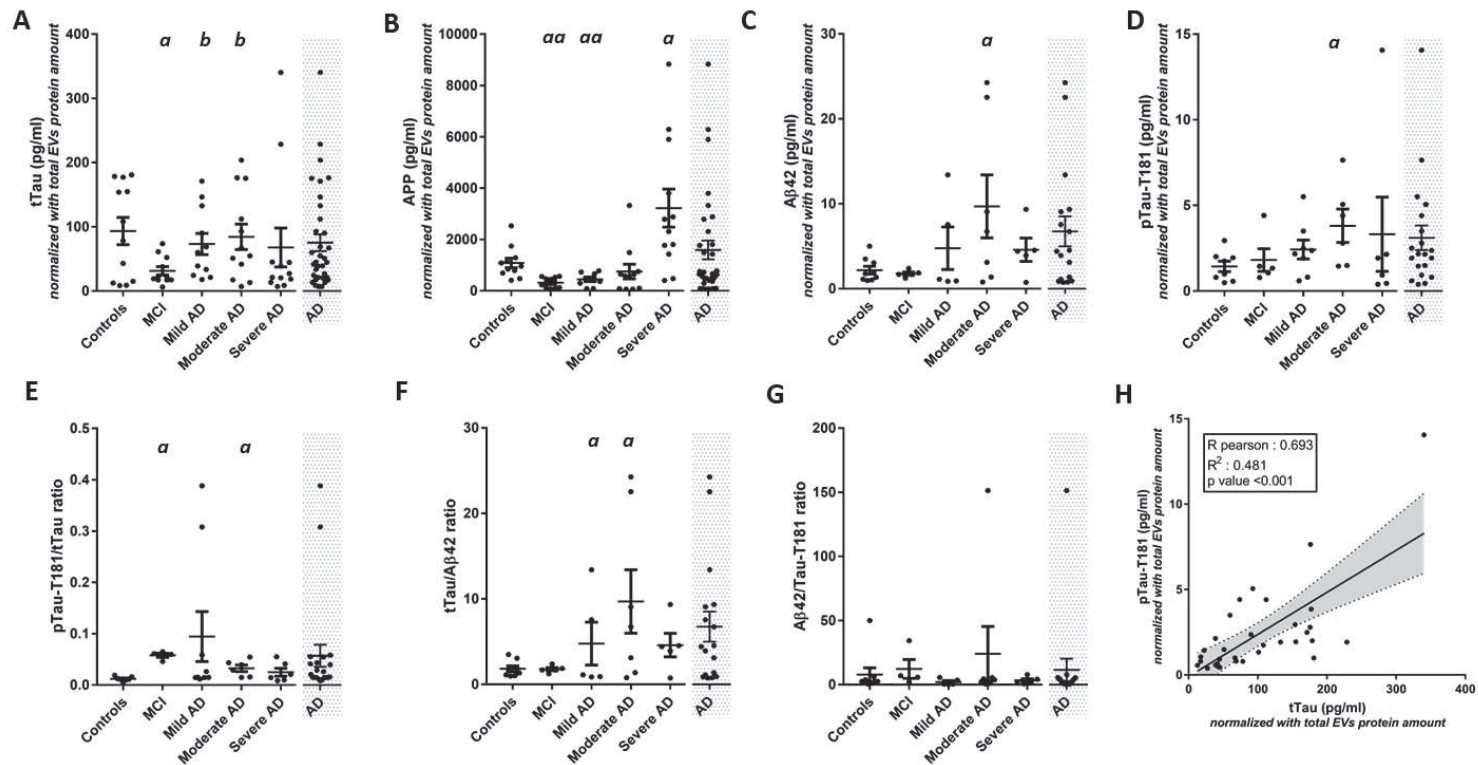


Fig. 3. Levels of proteins involved in AD pathogenesis in plasma EVs from different groups of patients. (A) Levels of tTau, (B) APP, (C) Aβ42 (N=31, including 9 control subjects, 5 MCI, 5 mild AD, 7 moderate AD and 5 severe AD) and (D) pTau-T181 (N=33, including 8 control subjects, 5 MCI, 8 mild AD, 6 moderate AD and 6 severe AD) expressed in pg/ml and normalized to total pEVs protein. Ratios of (E) pTau-T181/tTau, (F) tTau/Aβ42 and (G) Aβ42/pTau-T181 were calculated for each group. Data are presented as means ± SEM (horizontal line). Statistical analysis was performed using the one way ANOVA followed by Tukey post hoc tests (alpha = 0.05), a p < 0.05, aa p < 0.01 compared to controls and b p < 0.05 compared to MCI patients. For pTau-T181/tTau and Aβ42/pTau-T181 ratios, statistical analysis was performed by the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test (alpha = 0.05), a p < 0.05 compared to controls. (H) Scatter plots of pTau-T181 concentration in relation to tTau concentration in pEVs. Correlation coefficients (Pearson R and R²) and p values were determined using Pearson correlation. The confidence interval (CI) range was plotted in correlation plots (grey area).

Association of AD pathogenic proteins in pEVs to cognitive performance

The figure 4 shows the correlation between the levels of AD-related proteins in pEVs and cognitive performance, assessed by MoCA and MMSE tests.

We found that higher pEVs levels of pTau-T181 were associated with lower cognitive performance, particularly with the MMSE (Pearson R: -0.678, $p < 0.001$) than with the MoCA scores (Pearson R: -0.456, $p < 0.05$) (Fig.4.A-B). This negative correlation was also observed with APP levels in pEVs and the MMSE scores (Pearson R: -0.408, $p < 0.05$) but not with the MoCA test (Fig.4.C-D). However, no correlation was found between the levels of A β 42 or tTau in pEVs and cognitive outcomes (Fig.3.E-H).

To note, the levels of these proteins in pEVs were not age-related ($p = 0.570$, $p = 0.761$, $p = 0.600$, $p = 0.155$ for A β 42, pTau-T181, tTau, APP, respectively).

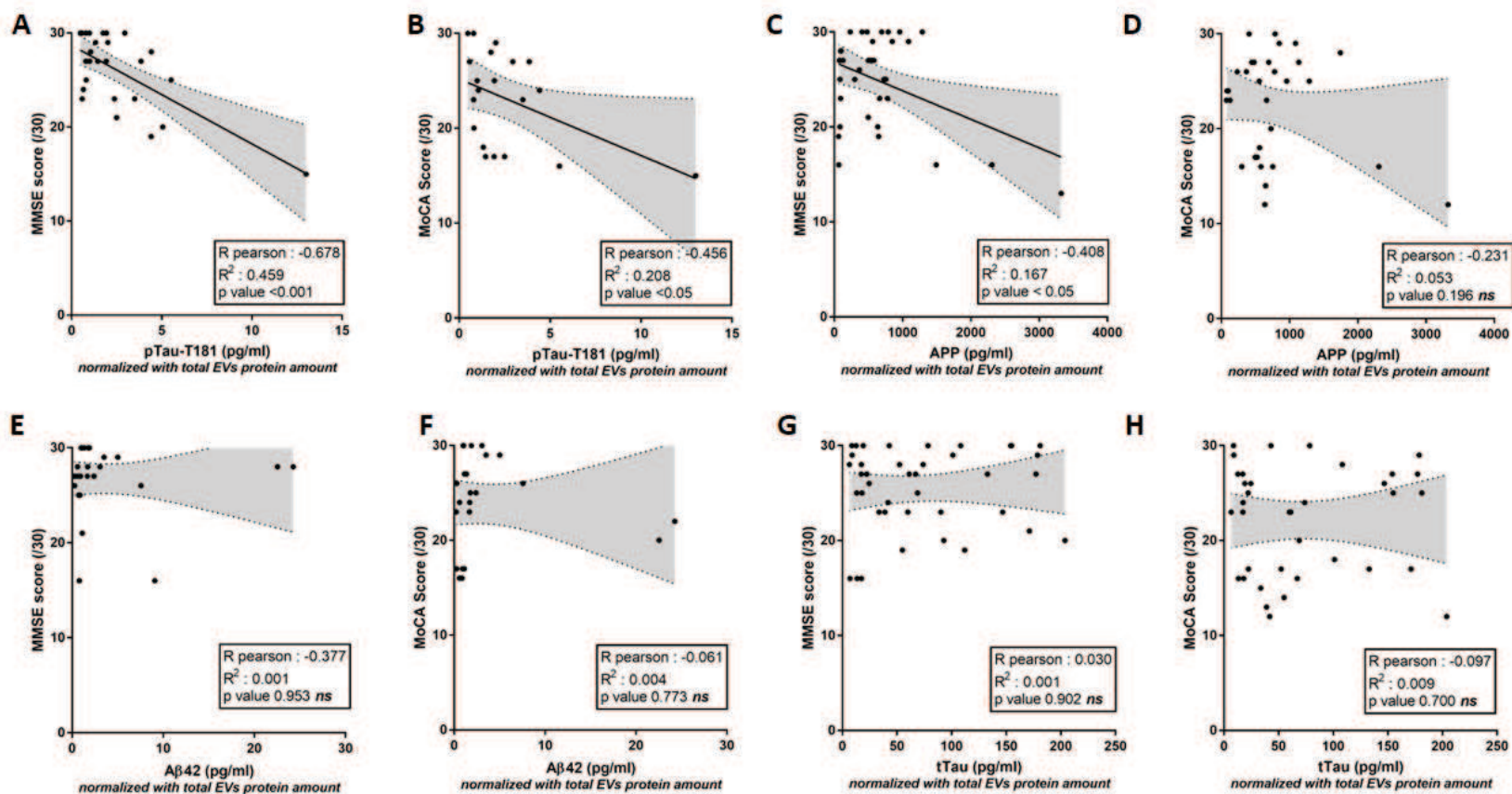


Fig. 4. Correlation between the cognitive performances and the levels of proteins involved in AD pathogenesis contained in plasma Evs (pEVs). Scatter plots of cognitive scores (MMSE and MoCA) in relation to (A, B) pTau-T181, (C, D) APP, (E, F) Aβ42 and (G, H) tTau concentrations in pEVs. Correlation coefficients (Pearson R and R²) and p values were determined using Pearson correlation. The confidence interval (CI) range was plotted in correlation plots (grey area).

Diagnostic accuracy evaluation

To further evaluate the diagnostic and discrimination power of these biomarkers to distinguish different groups of patients, receiver operating characteristic (ROC) analysis was performed. We used the area under the ROC curve (AUC) as a measure of diagnostic test accuracy. Interestingly, ROC analysis revealed that APP concentration and the ratio of pTau-T181/tTau in pEVs could distinguish controls from MCI patients with an excellent AUC of 0.923 ± 0.057 ($p<0.001$) and 1 , ($p<0.01$) for APP and pTau-T181/tTau, respectively (Fig.5.A,B). We also found that the ratio of pTau-T181/tTau was an excellent marker to discriminate control from AD with an AUC of 0.823 ± 0.091 ($p<0.05$) (Fig.5.C). To distinguish MCI from AD populations, the ratio pTau-T181/tTau and APP levels in pEVs were also excellent with AUC of 0.870 ± 0.073 ($p<0.05$) and 0.750 ± 0.073 ($p<0.05$) for T181/tTau and APP (Fig.5.D,E), respectively.

In contrast, the levels of A β 42, pTau-T181 and tTau in pEVs provided a poor differentiation power with AUC of 0.511 ± 0.157 , 0.550 ± 0.172 and 0.674 ± 0.126 , respectively, between controls subjects and MCI patients.

A weak differentiation was also found with A β 42, pTau-T181 and tTau levels in pEVs between MCI and AD groups (AUC of 0.659 ± 0.113 , 0.660 ± 0.132 and 0.673 ± 0.085 , respectively).

Between controls and AD patients, A β 42, pTau-T181, tTau and APP presented poor diagnostic accuracy with AUC of 0.654 ± 0.108 , 0.681 ± 0.103 , 0.557 ± 0.109 and 0.577 ± 0.086 , respectively.

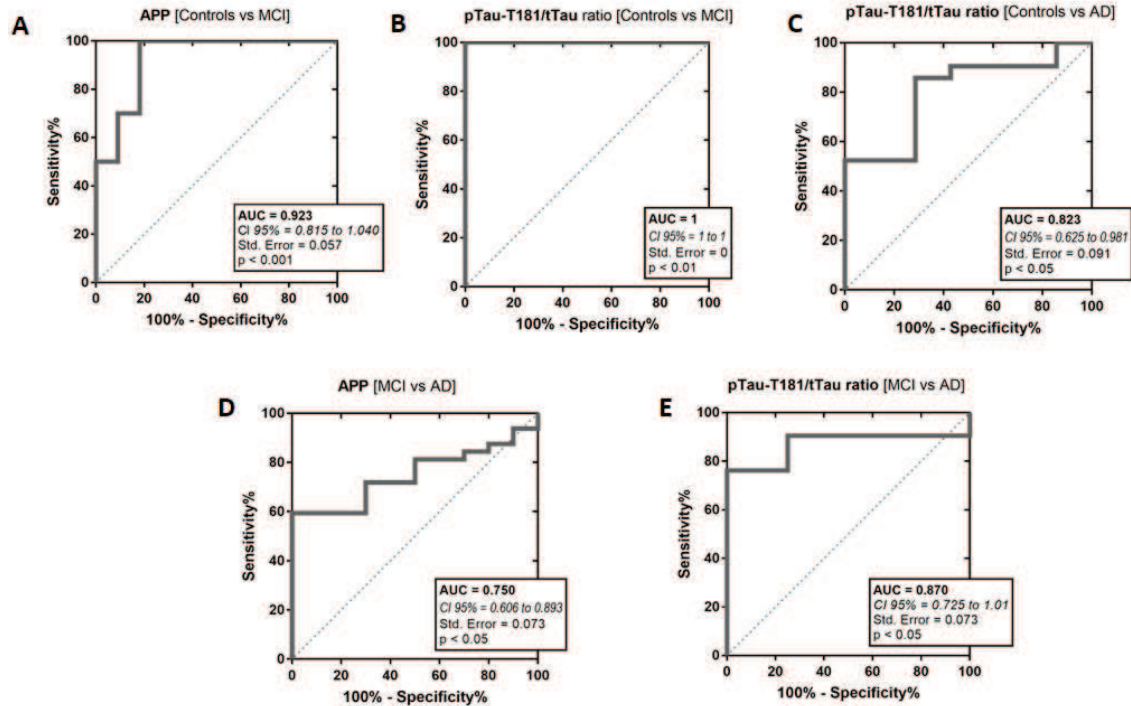


Fig. 5. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. The plot represents the performance of (A) APP concentration and (B) pTau-T181/tTau ratio in plasma EVs (pEVs) to differentiate control subjects from MCI patients. (C) pTau-T181/tTau ratio in pEVs could discriminate control populations from the AD group. The ROC curves indicate the accuracy of (D) APP levels and (E) pTau-T181/tTau ratio in pEVs to discriminate MCI subjects from AD patients. Area under the curve (AUC) values, standard errors, p values and 95% confidence intervals (CI) are indicated on the curve.

Comparison of the levels of AD proteins in the bloodstream, in extracellular vesicles from plasma, in neuronal cells and in extracellular vesicles from neuronal cell culture medium.

The levels of these proteins in plasma, pEVs, human neuronal cells SK-N-SH and their released EVs (nEVs) were compared (Fig.6). The nEVs had a round morphology with a size between 50-100 nm observed in TEM (Fig.6.A). The presence of EVs markers (TSG101 and GAPDH) in nEVs was confirmed by Western-Blot analysis. Again, Calnexin was not detected in our isolated nEVs (Fig.6.B).

AD proteins levels were normalized with the total amount of protein and expressed in percentage with the levels in pEVs being considered as 100%.

Very interestingly, all of these AD proteins were highly enriched in pEVs as compared to plasma levels and particularly A β 42. tTau and APP levels were also highly enriched in nEVs while A β 42 in nEVs was comparable to neuronal cell levels and pTau-T181 levels were lower in nEVs than in neuronal cells (Fig.6.C). As expected, these AD proteins were more abundant in neuronal cells and in nEVs than in pEVs or in plasma. It is interesting to note that A β 42 levels in pEVs was only four fold lower than in nEVs or in neuronal cells. However, pTau-T181, tTau and APP levels in pEVs were lower than in nEVs or in neuronal cells (Fig.6.C). A β 40 was weakly detected in neuronal cells, with trace amounts in plasma and was undetectable in nEVs and in pEVs (Fig.6.C).

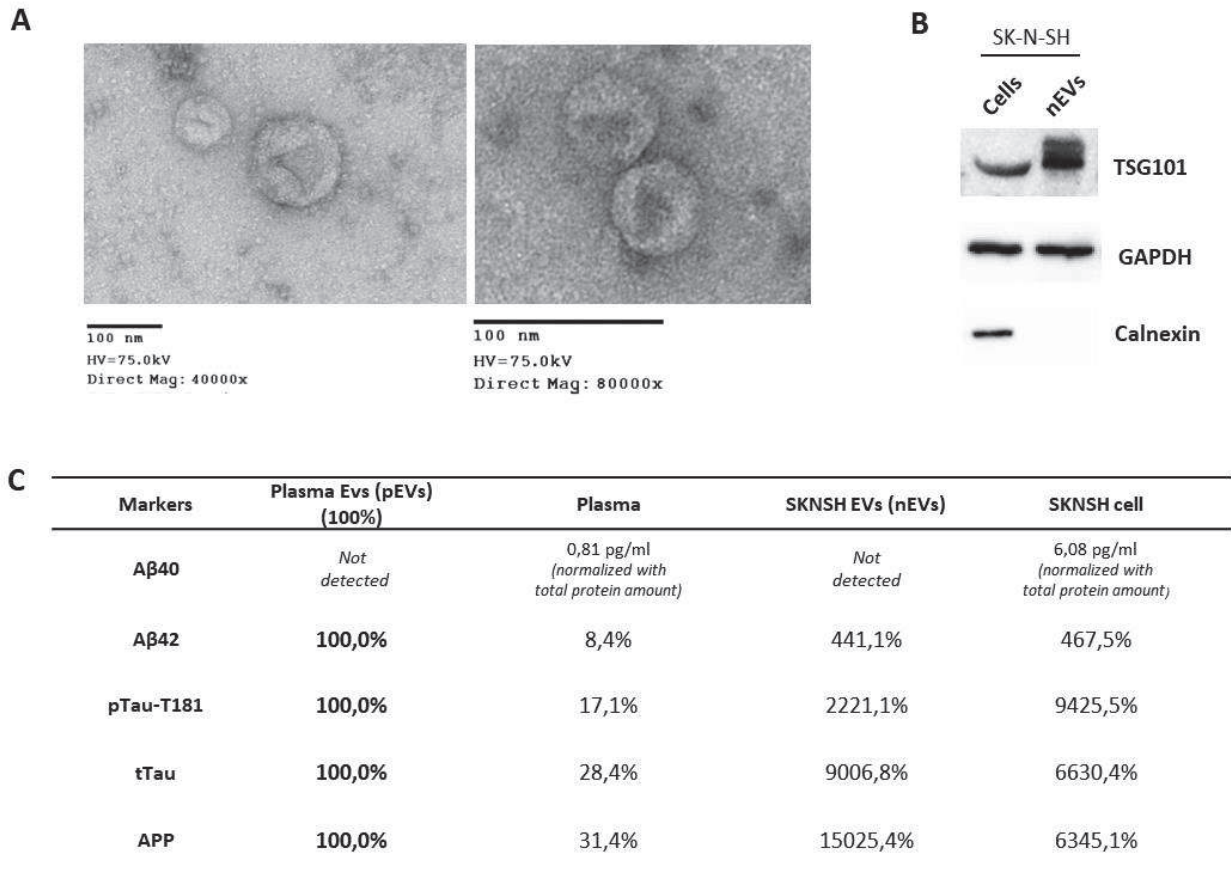
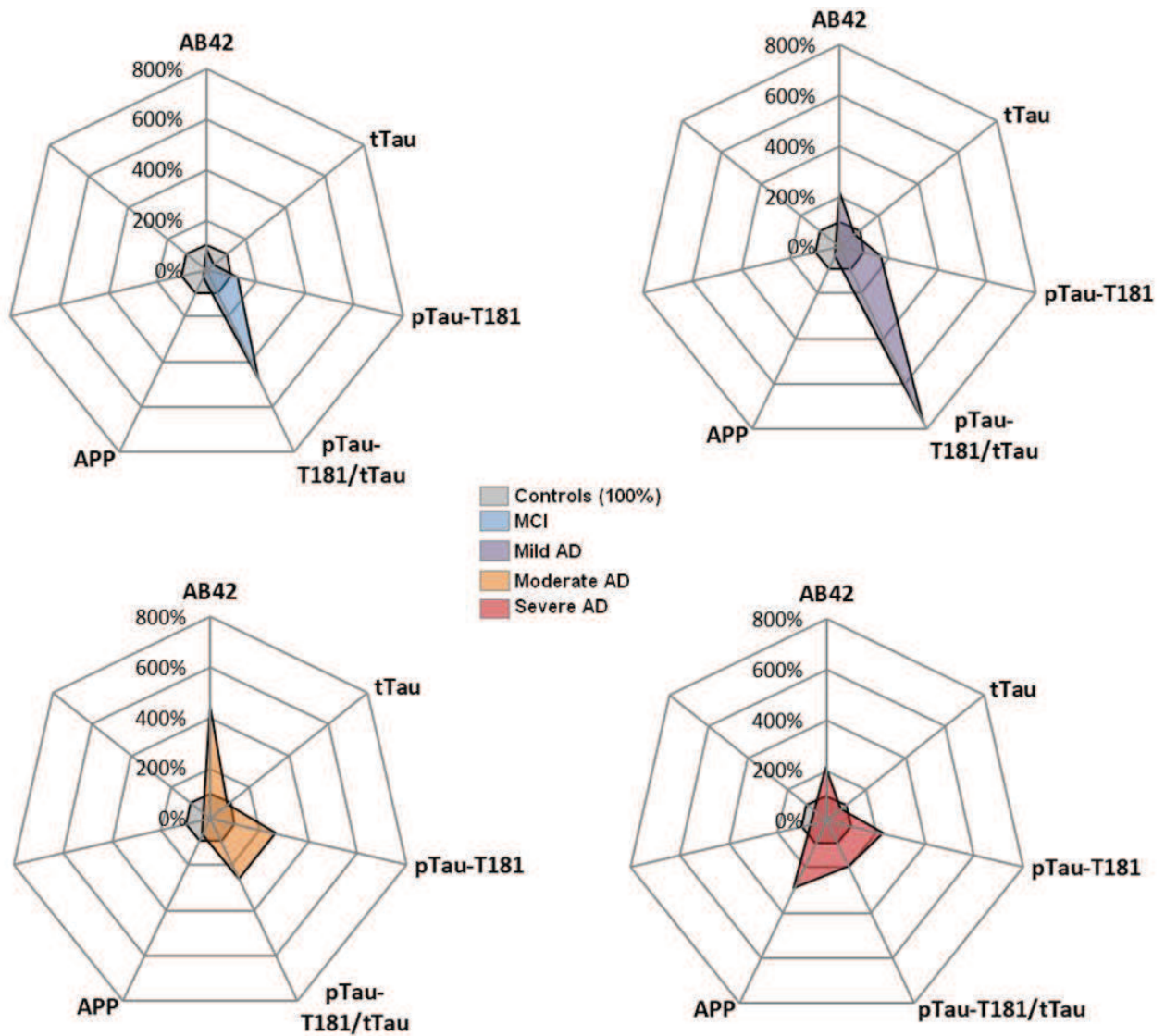


Fig. 6. Comparison of AD-pathogenic protein levels between plasma Evs (pEVs), plasma, SK-N-SH Evs (nEVs) and SK-N-SH cells. Size and shape characterization of nEVs were determined with transmission electron microscopy (TEM) (A), Western blot analysis at equal protein quantity (30ug). Shown are: EVs marker proteins (TSG101, GAPDH) and Calnexin as negative control (B). Levels of A β 40, A β 42, pTau-T181, tTau and APP in pEVs, plasma, nEVs and SK-N-SH cells are summarized in a table (C). Values are expressed in percentage and the pEVs levels were fixed at 100% except for A β 40. A β 40 levels were represented as a concentration normalized with total EVs protein amount because A β 40 levels were not detected in pEVs.



Supplementary figure. Spider charts used to represent the pattern of pEVs markers in each stage of AD (MCI, mild AD, moderate AD and severe AD). Levels of each marker were represented as a variation percentage normalized with its levels in control group (100%).

Discussion

The identification of blood-based biomarkers will allow early detection of AD, facilitate longitudinal studies that require multiple sampling. To date, a solid correlation between peripheral blood markers and brain pathology or cognitive decline remains a great challenge. This study highlights the pattern of some AD related-proteins in pEVs from MCI and AD patients, at different stages of the disease, and their relationship with the scores of two complementary cognitive tests.

In MCI, we found a reduction tTau, APP and an increase of the ratio pTau-T181/tTau in pEV as compared to controls. The ROC analysis revealed that the ratio pTau-T181/tTau in pEVs present a good diagnostic accuracy between controls and MCI or AD groups. In contrast, the ratio A β 42/pTau-T181 in pEVs was not a good indicator to discriminate MCI and AD. Our data also showed that during the mild phase of AD, the levels of tTau and APP decreased while the ratio tTau/A β 42 increased. In moderate phase of AD, the levels of tTau decreased while A β 42 and the ratio tTau/A β 42 raised. Interestingly, we found that pTau-T181 concentration and the ratio tTau/A β 42 in pEVs were negatively correlated to both cognitive scores.

Considering the early and important role of A β , the measure of circulating A β could lead to new advances in the research of biomarkers. A β 42 has been recently showed to be associated to circulating exosomes. We found that the levels of A β 42 in pEVs were not correlated to both cognitive scores. Our results strengthen previous studies indicating that little correlation has been established between plasma A β analysis with brain plaque deposition (Wang, Gu et al. 2017). We also demonstrated that the concentrations of APP in pEVs was biphasic with a decrease in MCI until the mild stage of AD and increased in severe AD patients. Thus, APP levels were negatively correlated with the MMSE scores which is more appropriate to discriminate moderate to severe stages of AD than MoCA (Trzepacz, Hochstetler et al. 2015). The ROC analysis also revealed that the levels of APP in pEVs present a good diagnostic accuracy to discriminate controls from MCI or AD groups. Another important finding was the demonstration of the enrichment of A β 42, tTau, pTau-T181 and APP in pEVs as compared to plasma levels likely because in EVs, these proteins are protected from

degradation. In contrast to the previous study (Lim, Zhang et al. 2019), we observed the differential size and total proteins content in pEVs between MCI and AD patients. Another important finding of our study is the stratification of AD patients because the profile of some markers in pEVs is dependent on the stage of the disease. Finally, we found that neuronal cells release and propagate high levels of APP and tTau through nEVs,

EVs represent a subtype of secreted membrane vesicles of endosomal origin that are released from most cell types. The functions of EVs is to remove and transport damaged or excess proteins and other cellular constituents. EVs are thought to contribute to the pathogenesis of AD because the upregulation and release of EVs could serve as an useful mechanism for decreasing the neuronal levels of A β and aberrant pTau (Rajendran, Honsho et al. 2006, Gibbons, Lee et al. 2019).

EVs have been suggested to move from the brain to the bloodstream by crossing the multiple layers of the BBB (Shi, Liu et al. 2014) (Folstein, Folstein et al. 1975, Shi, Liu et al. 2014, Winston, Goetzl et al. 2016, Mustapic, Eitan et al. 2017). This led to significant interest in their use as a source of readily accessible CNS biomarkers. However, targeting brain-derived EVs in the bloodstream are challenging because they represent a very small fraction of the circulating EVs. Recently, there is a great interest in the isolation and enriched neuronal-derived EVs in the bloodstream using L1-cell adhesion molecule (L1CAM) immunoreactivity (see review by (Shi, Sheng et al. 2019)). These EVs could serve as potential tools to analyze biomarkers to predict the early phase and the course of AD (Folstein, Folstein et al. 1975, Shi, Liu et al. 2014, Winston, Goetzl et al. 2016, Mustapic, Eitan et al. 2017). They found that some proteins such as neurotrophic factors, markers of brain insulin resistance, synaptic and lysosomal proteins are altered in neuronal-enriched EVs from the blood (Goetzl, Boxer et al. 2015, Goetzl, Kapogiannis et al. 2016, Mullins, Mustapic et al. 2017, Goetzl, Abner et al. 2018, Goetzl, Noguera-Ortiz et al. 2018). A β and Tau have also been analyzed in enriched neuronal-derived EVs in the bloodstream. It is interesting to note that in these neuronal-derived EVs, as in our pEVs, the levels of ptau181 were also significantly higher in AD compared to controls (Fiandaca, Kapogiannis et al. 2015, Goetzl, Mustapic et al. 2016,

Winston, Goetzl et al. 2016, Guix, Corbett et al. 2018). In these studies, the AD group was not stratified and most of them correspond to moderate AD with the MMSE score being around 22. Although these pioneering efforts lead to promising data, the brain specificity of these EVs remain to be validated. Indeed, the neuronal enrichment of EVs was based on the immunoreactivity of the protein surface marker L1CAM, which is highly expressed by neuronal cells but also by some peripheral cells from kidney and lungs which limit the neuronal specificity of circulating EVs (Debiec, Christensen et al. 1998, Allory, Audard et al. 2008, Pechriggl, Concini et al. 2017) (Kenrick, Watkins et al. 2000). Moreover, there are more and more evidence that AD may not be only a brain disorder, but also a systemic disease with widespread abnormalities beyond the brain. There is an increasing number of studies indicating that a series of systemic abnormalities can exacerbate the progression of AD. In turn, the downstream effects of processes in the AD brain can also drive these systemic disorders, forming feedback loops. For instance, metabolic disorders might underlie the effects of systemic abnormalities or alterations on A β metabolism (Wang, Gu et al. 2017). Finally, these close interactions between the brain and the periphery, in terms of A β and tau metabolism, provides novel insights into the pathogenesis of AD, and could lead to new approaches to the diagnosis and treatment of AD. Our objectives were thus to demonstrate that total pEVs from different cells origins, including from the brain, contains biomarkers which are relevant to monitor MCI and the progression of AD.

Although A β peptides are generated in the brain, a considerable amount of A β is also generated in peripheral systems. For instance, an increase expression of APP, altered APP processing and enhanced β -secretase activity were observed in platelets from patients with AD (Sun, Li et al. 2018), leading to an overproduction of A β in the periphery (Nakamura, Kaneko et al. 2018). However, considering the complexity of blood components, the accurate measurement of plasma levels of A β or tau is very challenging (Mattsson, Zetterberg et al. 2016). A β , APP, its metabolites (CTF and AICD) and its processing enzymes (BACE-1, γ -secretase) have been found in EVs (Goetzl et al., 2016b; Laulagnier et al., 2018; Perez-Gonzalez et al., 2012; Sharples et al., 2008). In addition, our data showed that the levels of these proteins were higher than in plasma. Therefore, pEVs represent more sensitive tools to identify biomarkers than

plasma. Considering the propagation property of pEVs, we hypothesize that the peripheral pool of A β and tau in pEVs is not simply associated with AD, but could be causally linked to this disease. We found that A β 42 levels in pEVs were higher only in moderate AD. This result is in line with the recent establishment that the exosome-bound A β measurement could better reflect PET imaging of brain amyloid plaques and differentiate various clinical groups (Lim, Zhang et al. 2019). Also, our data indicated an early alteration in APP trafficking because there is a reduction of APP in pEVs from MCI and early AD groups compared to control subjects and increased at the late stage of AD. It is interesting to note that although the neuronal-derived EVs in the blood are secreted by specific cells and transported into peripheral blood, the concentration of A β 42 (5-20 pg/mL) (Hamlett et al., 2017) (Fiandaca, Kapogiannis et al. 2015) and Tau-p181 (Goetzl, Mustapic et al. 2016) obtained were in the same range than those found from our total pEVs.

Also, our data on the negative association between the pEVs levels of pTau181 and the cognitive performance is strengthened by the recent study from the US community-based Framingham Heart Study and the Memento study. They demonstrated that greater plasma total tau level was associated with poorer performance across multiple cognitive domains, hippocampal atrophy, and decreased cortical glucose metabolism (Pase, Beiser et al. 2019).

Taken together, our findings highlight the modifications of some AD-related proteins in pEVs and propose that the levels of some of them could be correlated with cognitive decline. Moreover, their levels could discriminate controls from MCI or AD groups. This approach could be used to monitor the early development of AD. We also demonstrated that it is important to carefully consider the stage of the disease because our data clearly show that the signature of pTau-T181/tTau and of A β 42 was completely different during the continuum of AD (Supplementary figure), which is poorly considered.

Our results show that the pEVs should be considered as reservoir of potential biomarkers, because it can improve the sensibility of some markers which are diluted or rapidly degraded in plasma. All markers analyzed were concentrated in pEVs compared to the plasma. Finally, as pEVs are from all cell types of the body including the brain,

these systemic variations also suggested that pathological processes may co-exist in both brain and periphery (Morris, Honea et al. 2014). It is necessary to evaluate these markers in a large cohort study. Moreover, standardized isolation, characterization and normalization methods are essential to harness the diagnostic potential of modified protein levels as a measure to stage MCI and AD.

We envision that this study will pave the way to identify new biomarker subpopulations and develop valuable composite signatures. These advances will provide new opportunities to facilitate minimally-invasive detection and molecular stratification, all of which are important for the evaluation of disease-modifying therapies at different steps of clinical trials. These findings suggest that pEVs may be used as sensitive tools to identify biomarkers for MCI and AD and for in the dementia prevention trials.

Acknowledgments : This work was supported by the Chair Louise & André Charron on Alzheimer's disease (CR), CIHR grant (TF, EF).

References

Albert, M. S., 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, 270-9.

Allory, Y., et al., 2008. The L1 cell adhesion molecule is a potential biomarker of human distal nephron injury in acute tubular necrosis. *Kidney Int.* 73, 751-8.

Asai, H., et al., 2015. Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci.* 18, 1584-93.

Baker, S., et al., 2016. Extracellular Vesicles Containing P301L Mutant Tau Accelerate Pathological Tau Phosphorylation and Oligomer Formation but Do Not Seed Mature Neurofibrillary Tangles in ALZ17 Mice. *J Alzheimers Dis.* 54, 1207-1217.

Debiec, H., et al., 1998. The cell adhesion molecule L1 is developmentally regulated in the renal epithelium and is involved in kidney branching morphogenesis. *J Cell Biol.* 143, 2067-79.

Deregibus, M. C., et al., 2016. Charge-based precipitation of extracellular vesicles. *International journal of molecular medicine.* 38, 1359-1366.

Dubois, B., et al., 2007. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol.* 6, 734-46.

Fiandaca, M. S., et al., 2015. Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study. *Alzheimers Dement.* 11, 600-7 e1.

Folstein, M. F., et al., 1975. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 12, 189-98.

Garcia-Romero, N., et al., 2017. DNA sequences within glioma-derived extracellular vesicles can cross the intact blood-brain barrier and be detected in peripheral blood of patients. *Oncotarget.* 8, 1416-1428.

Gibbons, G. S., et al., 2018. Detection of Alzheimer Disease (AD)-Specific Tau Pathology in AD and NonAD Tauopathies by Immunohistochemistry With Novel Conformation-Selective Tau Antibodies. *J Neuropathol Exp Neurol.* 77, 216-228.

Gibbons, G. S., et al., 2019. Mechanisms of Cell-to-Cell Transmission of Pathological Tau: A Review. *JAMA Neurol.* 76, 101-108.

Goetzl, E. J., et al., 2018a. Declining levels of functionally specialized synaptic proteins in plasma neuronal exosomes with progression of Alzheimer's disease. *FASEB J.* 32, 888-893.

Goetzl, E. J., et al., 2015. Altered lysosomal proteins in neural-derived plasma exosomes in preclinical Alzheimer disease. *Neurology.* 85, 40-7.

Goetzl, E. J., et al., 2016a. Decreased synaptic proteins in neuronal exosomes of frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *FASEB J.* 30, 4141-4148.

Goetzl, E. J., et al., 2016b. Cargo proteins of plasma astrocyte-derived exosomes in Alzheimer's disease. *FASEB J.* 30, 3853-3859.

Goetzl, E. J., et al., 2018b. Deficient neurotrophic factors of CSPG4-type neural cell exosomes in Alzheimer disease. *FASEB J.* fj201801001.

Guitart, K., et al., 2016. Improvement of neuronal cell survival by astrocyte-derived exosomes under hypoxic and ischemic conditions depends on prion protein. *Glia.* 64, 896-910.

- Guix, F. X., et al., 2018. Detection of Aggregation-Competent Tau in Neuron-Derived Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci.* 19.
- Haddad, M., et al., 2019. Circulating and extracellular vesicles levels of N-(1-carboxymethyl)-L-lysine (CML) differentiate early to moderate Alzheimer's disease *J.Alz.dis.* In press.
- Hanon, O., et al., 2018. Plasma amyloid levels within the Alzheimer's process and correlations with central biomarkers. *Alzheimers Dement.* 14, 858-868.
- Helwa, I., et al., 2017. A Comparative Study of Serum Exosome Isolation Using Differential Ultracentrifugation and Three Commercial Reagents. *PLOS ONE.* 12, e0170628.
- Jack, C. R., Jr., et al., 2011. Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 7, 257-62.
- Kenwrick, S., et al., 2000. Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations. *Hum Mol Genet.* 9, 879-86.
- Ligthart, G. J., et al., 1984. Admission criteria for immunogerontological studies in man: the SENIEUR protocol. *Mech Ageing Dev.* 28, 47-55.
- Lim, C. Z. J., et al., 2019. Subtyping of circulating exosome-bound amyloid beta reflects brain plaque deposition. *Nat Commun.* 10, 1144.
- Mattsson, N., et al., 2016. Plasma tau in Alzheimer disease. *Neurology.* 87, 1827-1835.
- Morris, J. K., et al., 2014. Is Alzheimer's disease a systemic disease? *Biochim Biophys Acta.* 1842, 1340-9.
- Mullins, R. J., et al., 2017. Exosomal biomarkers of brain insulin resistance associated with regional atrophy in Alzheimer's disease. *Hum Brain Mapp.* 38, 1933-1940.
- Mustapic, M., et al., 2017. Plasma Extracellular Vesicles Enriched for Neuronal Origin: A Potential Window into Brain Pathologic Processes. *Front Neurosci.* 11, 278.
- Nakamura, A., et al., 2018. High performance plasma amyloid-beta biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature.* 554, 249-254.
- Nasreddine, Z. S., et al., 2005. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *J Am Geriatr Soc.* 53, 695-9.
- O'Bryant, S. E., et al., 2017. Blood-based biomarkers in Alzheimer disease: Current state of the science and a novel collaborative paradigm for advancing from discovery to clinic. *Alzheimers Dement.* 13, 45-58.

Parnetti, L., et al., 2012. Performance of abeta1-40, abeta1-42, total tau, and phosphorylated tau as predictors of dementia in a cohort of patients with mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis.* 29, 229-38.

Pase, M. P., et al., 2019. Assessment of Plasma Total Tau Level as a Predictive Biomarker for Dementia and Related Endophenotypes. *JAMA Neurol.*

Pechriggl, E. J., et al., 2017. L1CAM in the Early Enteric and Urogenital System. *J Histochem Cytochem.* 65, 21-32.

Perez-Gonzalez, R., et al., 2012. The exosome secretory pathway transports amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragments from the cell into the brain extracellular space. *J Biol Chem.* 287, 43108-15.

Petersen, R. C., et al., 2001. Current concepts in mild cognitive impairment. *Arch Neurol.* 58, 1985-92.

Petersen, R. C., et al., 1999. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol.* 56, 303-8.

Prince, M., et al., 2013. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement.* 9, 63-75 e2.

Rajendran, L., et al., 2006. Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 11172-7.

Saman, S., et al., 2012. Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 287, 3842-9.

Sardar Sinha, M., et al., 2018. Alzheimer's disease pathology propagation by exosomes containing toxic amyloid-beta oligomers. *Acta Neuropathol.* 136, 41-56.

Sharples, R. A., et al., 2008. Inhibition of gamma-secretase causes increased secretion of amyloid precursor protein C-terminal fragments in association with exosomes. *FASEB J.* 22, 1469-78.

Shi, M., et al., 2014. Plasma exosomal alpha-synuclein is likely CNS-derived and increased in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 128, 639-650.

Shi, M., et al., 2019. New windows into the brain: Central nervous system-derived extracellular vesicles in blood. *Prog Neurobiol.* 175, 96-106.

Simon, D., et al., 2012. Proteostasis of tau. Tau overexpression results in its secretion via membrane vesicles. *FEBS Lett.* 586, 47-54.

Slachevsky, A., et al., 2017. Tau Platelets Correlate with Regional Brain Atrophy in Patients with Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 55, 1595-1603.

Sperling, R. A., et al., 2011. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 7, 280-92.

Stremersch, S., et al., 2018. Nucleic acid loading and fluorescent labeling of isolated extracellular vesicles requires adequate purification. *Int J Pharm.* 548, 783-792.

Sun, H. L., et al., 2018. The Correlations of Plasma and Cerebrospinal Fluid Amyloid-Beta Levels with Platelet Count in Patients with Alzheimer's Disease. *Biomed Res Int.* 2018, 7302045.

Trzepacz, P. T., et al., 2015. Relationship between the Montreal Cognitive Assessment and Mini-mental State Examination for assessment of mild cognitive impairment in older adults. *BMC Geriatr.* 15, 107.

van Niel, G., et al., 2018. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 19, 213-228.

Vella, L. J., et al., 2008. The role of exosomes in the processing of proteins associated with neurodegenerative diseases. *Eur Biophys J.* 37, 323-32.

Vingtdeux, V., et al., 2007. Alkalizing drugs induce accumulation of amyloid precursor protein by-products in luminal vesicles of multivesicular bodies. *J Biol Chem.* 282, 18197-205.

Wang, J., et al., 2017. A systemic view of Alzheimer disease — insights from amyloid- β metabolism beyond the brain. *Nature Reviews Neurology.* 13, 612.

Winston, C. N., et al., 2016. Prediction of conversion from mild cognitive impairment to dementia with neuronally derived blood exosome protein profile. *Alzheimers Dement (Amst).* 3, 63-72.

Zetterberg, H., Blennow, K., 2006. Plasma A β in Alzheimer's disease--up or down? *Lancet Neurol.* 5, 638-9.

5. CHAPITRE IV

ARTICLE 3: CLASSIFICATION OF MILD COGNITIVE IMPAIRMENT AND EARLY STAGE OF ALZHEIMER'S DISEASE BASED ON PROFILE OF BRAIN PROTEINS DERIVED IN CIRCULATING EXTRACELLULAR VESICLES

Statut de l'article : Prêt pour une soumission dans le journal **FASEB**.

Auteurs de l'article : Morgane, Perrotte^{1,2,3} ; Mohamed, Haddad^{1,2} ; Aurélie, Le Page⁴ ; Eric H. Frost⁵ ; Tamas, Fulop⁴ ; Charles, Ramassamy^{1,2,3}

¹ INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada,

² Institut sur la Nutrition et les Aliments Fonctionnels, University of Laval, Québec, Canada

³ Quebec Network for Research on Aging, University of Montreal, Québec, Canada

⁴ Department of Medicine, Geriatric Division, Research Center on Aging, University of Sherbrooke, Qc, Canada

⁵ Department of Microbiology and Infectiology, and Centre de Recherches Cliniques de CHUS, University of Sherbrooke, Qc, Canada

5.1. Résumé et objectifs de l'article 3 :

Les vésicules extracellulaires plasmatiques (pEVs) et plus particulièrement leur contenu biologique représente un potentiel important dans le domaine du diagnostic des maladies neurodégénératives. Étant capables de traverser la barrière hémato-encéphalique du cerveau vers les deux sens, les pEVs peuvent contenir des protéines d'origine neuronale, altérées au niveau central durant la MA. Ainsi, le niveau de certaines protéines dérivées du cerveau dans les pEVs pourraient servir dans le diagnostic du stade MCI, prédire le développement de la MA ou encore évaluer la progression de la démence et des troubles cognitifs. C'est pourquoi, cette étude est consacrée à l'isolation, la caractérisation des pEVs et la mesure de protéines d'origine cérébrales altérées au niveau central dans la MA. Nos résultats montrent une diminution dans les pEVs du niveau de S100B, du facteur neurotrophique BDNF, de NSE impliqué dans le métabolisme cérébral, chez les sujets MCI et les patients atteints de la MA au stade léger par rapport aux participants contrôles. La Progranuline diminue uniquement dans les pEVs des patients MCI comparativement au pEVs des sujets témoins. Le ratio Progranulin/BDNF est significativement diminué (plus de 10 fois) dans les pEVs des patients MCI par rapport aux participants contrôles et ce marqueur permet de

différencier les personnes MCI des personnes cognitivement normal avec une sensibilité et une spécificité supérieur à 80%. Pris ensemble, ces résultats renforcent l'idée qu'un profil de protéines présent dans les pEV totales pourrait être considéré comme un outil non invasifs pour le diagnostic précoce des troubles MCI et du stade léger de la MA, mais pas pour surveiller l'évolution de la maladie.

5.2. Contribution de l'étudiant à l'article 3:

L'article sera soumis dans le journal **FASEB**. L'ensemble des expériences décrites dans cette publication ont été réalisées par moi-même. La mise au point de l'extraction des vésicules extracellulaires et des dosages Luminex ont été réalisé avec l'aide de Mohamed Haddad, étudiant au laboratoire du Pr Charles Ramassamy. Ce projet n'aurait pas pu voir le jour sans le don généreux des échantillons plasmatiques de l'étude clinique de l'institut gériatrique de Sherbrooke. Aurélie Le Page, sous la supervision du Professeur Tamas Fulop, a réalisé la collecte le recrutement des patients, la collecte et la préparation des échantillons sanguins. J'ai également réalisé les figures, l'analyse et la compilation des résultats. J'ai écrit l'article au complet qui sera ensuite corrigé par Mohamed Haddad et le Professeur Charles Ramassamy pour être ensuite soumis courant février.

5.3. Article 3

Abstract:

There is some evidence that alterations occurred in the brain of Alzheimer's disease (AD) patients or in subjects with mild cognitive impairment (MCI) could also appeared in peripheral. In an urgent context to find non-invasive biomarkers for early and accurate clinical diagnosis of AD, the protein cargo of circulating extracellular vesicles (EVs) may have potential as a readily accessible source of biomarkers related to AD disorders. To investigate this possibility, total plasma extracellular vesicles (pEVs) were isolated and characterized from plasma samples of MCI subjects, AD patients at different stages of the disease and controls for Luminex assay quantification of some proteins related to brain disorders in AD development. Lower levels of BDNF, Progranulin, NSE and S100B were found in pEVs during MCI phase and mild phase of AD compared to control group,

with no significant difference later in the course. The ratio of Progranulin/BDNF in pEVs demonstrated high accuracy to define MCI stage with a sensitivity and specificity superior to 80%. Overall, our results strengthen the notion that this proteins pattern in total pEVs could be considered as non-invasive blood-based biomarkers for an early MCI and AD diagnosis but not for monitoring the disease evolution.

Abbreviations:

AUC, Area under the curve; BDNF, Brain-derived neurotrophic factor; CSF, Cerebrospinal fluid; L1CAM, L1-cell adhesion molecule; MCI, Mild cognitive impairment; MMSE, Mini mental state examination; MoCA, Montreal cognitive assessment; NSE, Neuron-specific enolase ; pEVs, plasma extracellular vesicles; ROC, Receiver operating characteristic; S100B, S100 calcium-binding protein B; TEM, Transmission electron microscopy.

Key Words: Biomarkers, exosomes, microvesicles, plasma, dementia

Introduction

Alzheimer's disease (AD), a multifactorial disorder, is the most common type of dementia and is characterized clinically by progressive cognitive decline and neuropathologically by synaptic and neuronal loss and the presence of amyloid plaques. During the progression of the disease, some alterations occur in the brain like a deficiency of cellular survival factors, an inflammation and a metabolic disorder (1-4).

The development of AD pathogenesis is insidious and no clear event defines the onset of the disease (5). Hence, the detection of the disease at the early stages is a considerable challenge. The prodromal stage of dementia, mild cognitive impairment (MCI), provides an important opportunity for potential intervention to prevent the onset of dementia. However, the current standardized criteria for the diagnosis of MCI and AD including cognitive changes, abnormal cerebrospinal fluid (CSF) levels of pathogenic proteins, and MRI and PET bioimaging data, have some limits (6). The clinicopathologic heterogeneity, the high costs of imaging and the invasive nature of CSF collection limit their usefulness for routine clinical testing. Thus, there is a strong necessity to identify non-invasive blood biomarkers easily measurable that could facilitate early and accurate

diagnosis, as well as to evaluate the therapeutic efficacy of new treatment. Despite intense research in the field, there is no peripheral biomarker that has got beyond the discovery stage.

Recently, in the context of neurodegenerative diseases diagnosis, some studies brought to light the potential for the protein cargo of extracellular vesicles (EVs) in blood to serve as a readily accessible source of central nervous system (CNS) biomarkers. A growing number of researches indicate that EVs could contribute to the brain function and the pathogenesis of AD (7-10). EVs can be secreted by most cell types, including neurons, oligodendrocytes and astrocytes, and are detectable in different body fluids such plasma due to their transportation between the brain and bloodstream. The brain-derived EVs can be isolate from blood using L1-cell adhesion molecule (L1CAM) immunoreactivity and can be used to circumvent the problem of the biomarker identification that reflect the state of the CNS without requiring invasive collection techniques (11-13). Nevertheless, the CNS cell-specific EVs enrichment approach may introduce a bias to the results due to the not brain-specificity of L1CAM and the possible changes in the level of neural cell adhesion molecules during AD (14-17). The potential of brain derived protein in total circulating EVs for the detection of MCI or the evaluation of the disease progression remains to be determined.

In this study, we have isolated and characterized total plasma-based EVs (pEVs), established a specific profile of some brain derived proteins for the identification of the MCI phase and early AD stage. We have also highlighted a relation between levels of some brain derived proteins in pEVs and the cognitive performance, assessed by two cognitive tests: the Mini-Mental State Examination (MMSE) and the Montreal Cognitive Assessment (MoCA) (18, 19). In pEVs from MCI and mild AD patients, we found an important reduction of the Progranulin/BDNF ratio and the levels of BDNF, NSE and S100B, compared to control participants. Levels of Progranulin in pEVs were reduced in MCI phase only, in comparison with control group. With our diagnostic accuracy analysis, we found that the ratio of Progranulin/BDNF could be used to classify samples from MCI patients and control subjects with a sensitivity of 90.9% and a specificity of 83.3%. Finally, the present study provides evidence that some proteins related to AD brain disorders are associated with cognitive performance.

Materials and Methods

Selection of participants

Plasma samples were obtained from 60 participants recruited from the Memory Clinic of Sherbrooke including control subjects, MCI and AD patients at different stages (mild, moderate and severe). The table 1 lists characteristics of patients and controls. MCI subjects were clinically diagnosed with criteria of Petersen (20) and the different stages of AD were detected by applying clinical criteria of the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) (6). The control subjects were defined according to the SENIEUR protocol (from SENIor EUROpean), a standard selection protocol for immunogerontological studies (21). The inclusion and exclusion criteria of the study were listed in Figure 1. All subjects gave written informed consent and the protocol was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine and Health Sciences of the University of Sherbrooke (protocol # 2010-21/Fülöp).

Cognitive assessments and plasma collection

From all patients, blood was obtained after overnight fasting in heparin-containing vacuum tubes and immediately separated by low speed centrifugation at 260 x g for 15 minutes (22°C). The plasma was aliquoted and stored at -80°C until used to avoid freeze/thaw cycles. Global cognitive function was assessed by the MoCA and the MMSE scores from all patients except severe AD (18, 19). Prior to isolation of pEVs, plasma samples were diluted at 1:2 in filtered Phosphate Saline Buffer (PBS) and were centrifuged at 2000 × g for 20 minutes followed by a second centrifugation at 10,000 × g for 20 minutes to remove cells and cell debris.

Isolation of total extracellular vesicles from plasma

The clarified plasma were precipitated using the Total Exosome Isolation reagent (Invitrogen™ by Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA) during 30 min at 4 °C. After centrifugation at 10,000 × g for 5 minutes, pEVs pellets were re-suspended in filtered PBS and purified by three series of filtrations (100KDa)/precipitations. Final solutions of pEVs were re-suspended and conserved in filtered PBS at -80°C for further analysis.

Characterization of total extracellular vesicles from plasma: TEM, NTA and Western blot analysis

The method for isolation of total pEVs was validated by various approaches.

The shape and the size of pEVs isolated were visualized using transmission electron microscopy (TEM). Final solutions of pEVs were suspended in 2% paraformaldehyde and 10 μ L of the mixture were adsorbed for 5 minutes to a Formvar-carbon coated grid. Grids were negatively stained using 2% uranyl acetate solution for 1 minute. After excess uranyl formate was removed with filter paper and grids were examined using HITACHI 7100 transmission electron microscope (75 kV) at 15000X-40000X magnification.

Then, the size distribution and the concentration of isolated pEVs were measured by the Nanosight NS300 system and the Nanosight NTA 3.2 Analytical Software (Malvern Instruments Company, Nanosight, and Malvern, United Kingdom). Recordings were performed for 60 seconds and the measurement was conducted three times for each sample. Prior to injection in the chamber of the NanoSight using a sterile syringe, pEVs suspensions were diluted in filtered PBS at 1:2000.

Finally, the absence of a negative control (Calnexin) and the presence of some EVs markers (TSG101, GAPDH and CD63) and cerebral markers (L1CAM, GFAP) were confirmed by a Western blot analysis. The total proteins of pEVs were extracted using Radio Immuno Precipitation Assay (RIPA) buffer (50mM Tris buffer, pH 8, 150 mM sodium chloride, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1% Igepal, 1% sodium deoxycholate, 5 mM EDTA, 1% protease and phosphatase inhibitor cocktail) and their concentrations were quantified using bicinchoninic acid (BCA) assay (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific, Inc). The same pEVs protein amount (15 μ g) was separated using 10% SDS-PAGE gel and transferred to PVDF membranes. The membranes were blocked in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) and 5% nonfat dry milk before incubation (overnight at 4°C) with the following primary antibodies: TSG101, 1:2000 (MBS7605273, MyBiosource, Inc, San Diego, CA, USA); CD63, 1:500 (Sc-5275, Santa Cruz, Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA); Calnexin, 1:500 (Sc-, Santa Cruz,

Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA); L1CAM, 1:500 (Sc-53386, Santa Cruz, Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA); GFAP, 1:2000 (G9269, EMD Millipore Corp., Burlington, MA, USA). Then, membranes were washed with TBS-T and HRP-conjugated secondary antibodies were incubated at 1:2000 for 1h at room temperature (7076S, Anti-mouse IgG HRP-linked Antibody or 7074S, Anti-rabbit HRP-linked Antibody from Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA). The membrane blots were detected by chemiluminescence using ECL substrate (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) and the FluorChem HD2 system. The membranes were stained with Coomassie blue to detect the profile of EVs total proteins.

Quantification of brain derived proteins: multianalyte immunoassay

A Luminex assay was performed to measure the concentrations of BDNF, NSE, Progranulin and S100B in 50 μ L of extracted pEVs according to supplier's directions (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA). Assay sensitivities (minimum detectable concentrations in pg/ml) were 0.32, 140.00, 195.00 and 4.34 for BDNF, NSE, Progranulin and S100B, respectively. The assay was run with the Luminex 100/200 and data were analysed using Xponent 4.2 software. Marker values were normalized with the total protein quantification in pEVs.

Statistical analysis

After using the Shapiro-Wilk test to verify normal distribution, the statistical significance of differences between groups were determined by the one way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey post-hoc test. For not normally distributed data including Progranulin levels, we performed the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test to determine significant differences between groups. Correlation analyses were performed using the Pearson correlation coefficient. Receiver operating characteristics (ROC) curves were constructed and the area under the ROC curve (AUC) was calculated to determine the ability of a marker to discriminate between the diseased and control populations (22). The ROC analysis provided also the diagnostic sensitivity and specificity of each markers (Prism 7.04).

Results

Patient characteristics

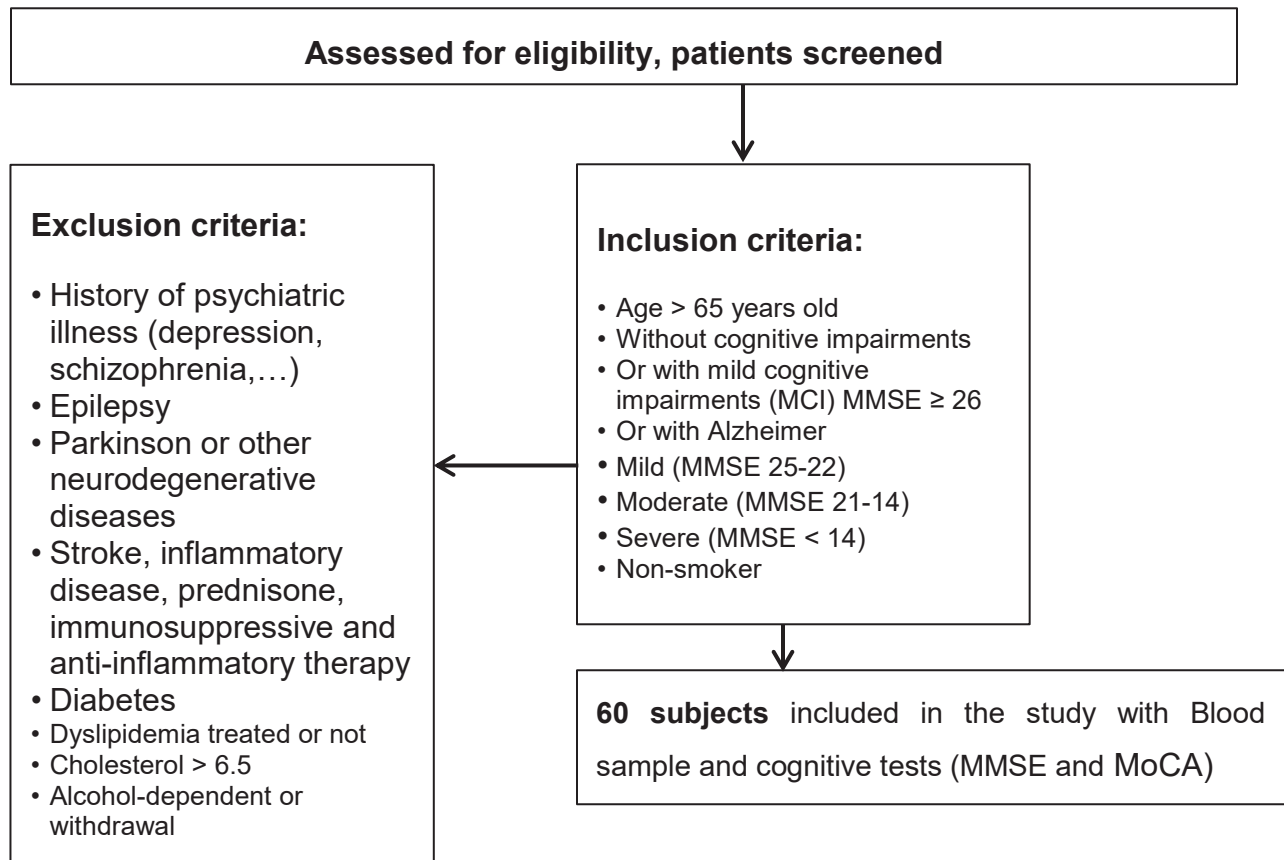
Descriptive statistics on age, gender, MMSE and MoCA scores are shown in Table 1. The number of participants was equal in each group with a higher female predominance. As expected, scores of MMSE and MoCA tests were significantly lower in AD groups compared to control subjects. Unlike MMSE scores, MoCA scores were reduced earlier in MCI group because of their greater sensitivity for MCI detection (23). Age was significantly lower in controls than in other groups but these differences were considered in our analyses.

Table 1: Characteristics of patients with MCI, AD and control participants

Diagnosis	<i>n</i>	Gender (male/female)	Age (years)	MMSE scores (/30 points)	MoCA scores (/30 points)
Controls	12	3/9	68.8 ± 1.5	29.4 ± 0.3	28.1 ± 0.5
MCI	12	1/11	75.3 ± 1.2 ^a	27.9 ± 0.3	22.4 ± 1.1 ^b
Mild AD	12	1/11	75.6 ± 1.3 ^b	24.0 ± 0.5 ^c	19.7 ± 1.5 ^c
Moderate AD	12	4/8	79.1 ± 1.1 ^c	19.9 ± 1.4 ^c	14.0 ± 0.9 ^c
Severe AD	12	2/10	83.0 ± 1.6 ^c	n.d.	n.d.

Values are expressed as means ± standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed using the one way ANOVA followed by Tukey post hoc tests (alpha = 0.05), a $p < 0.05$, b $p < 0.01$, c $p < 0.001$ compared to healthy controls. Abbreviations : MCI, mild cognitive impairment ; MMSE, mini-mental state examination ; MoCA, Montreal cognitive assessment ; n.d., not determined.

Figure 1: Inclusion and exclusion criteria of the study



Characterization of total extracellular vesicles isolated from plasma

We used different approaches to confirm the presence of pEVs. After isolation, the pEVs were morphologically characterized with TEM and the cup-shaped morphology, characteristic of EVs, could be observed (Figure 2. A).

In addition, the size distribution of the pEVs population was analyzed using Nanosight NS300. Thus, we confirmed that most of the pEVs had a size smaller than 200 nm and that the pEVs size was mainly ranged between 40 and 100 nm (Figure 2. B).

Then, lysates from isolated pEVs were separated by SDS/PAGE and analyzed by immunoblot to verify the presence of common EVs markers like TSG101 and CD63 (Figure 2. C). Using Western blot analysis, we also revealed the presence of brain-derived EVs in pEVs with the existence of neuronal and glial markers (L1CAM and GFAP, respectively), suggesting the presence of some CNS derived EVs in our pEVs samples. Finally, Calnexin, a negative EVs marker, was absent in EVs but was present in SK-N-SH cells. Interestingly, the levels of EVs and cerebral markers in pEVs did not vary significantly among group of patients.

The total protein content of pEVs was determined. We observed any significant difference between different subject's populations, suggesting that disease progression does not affect the total protein components in pEVs and that this parameter could be used as normalization method (Figure 2.D). In Figure 2.D, we also shown that the profile of the total protein was different between plasma and pEVs isolated.

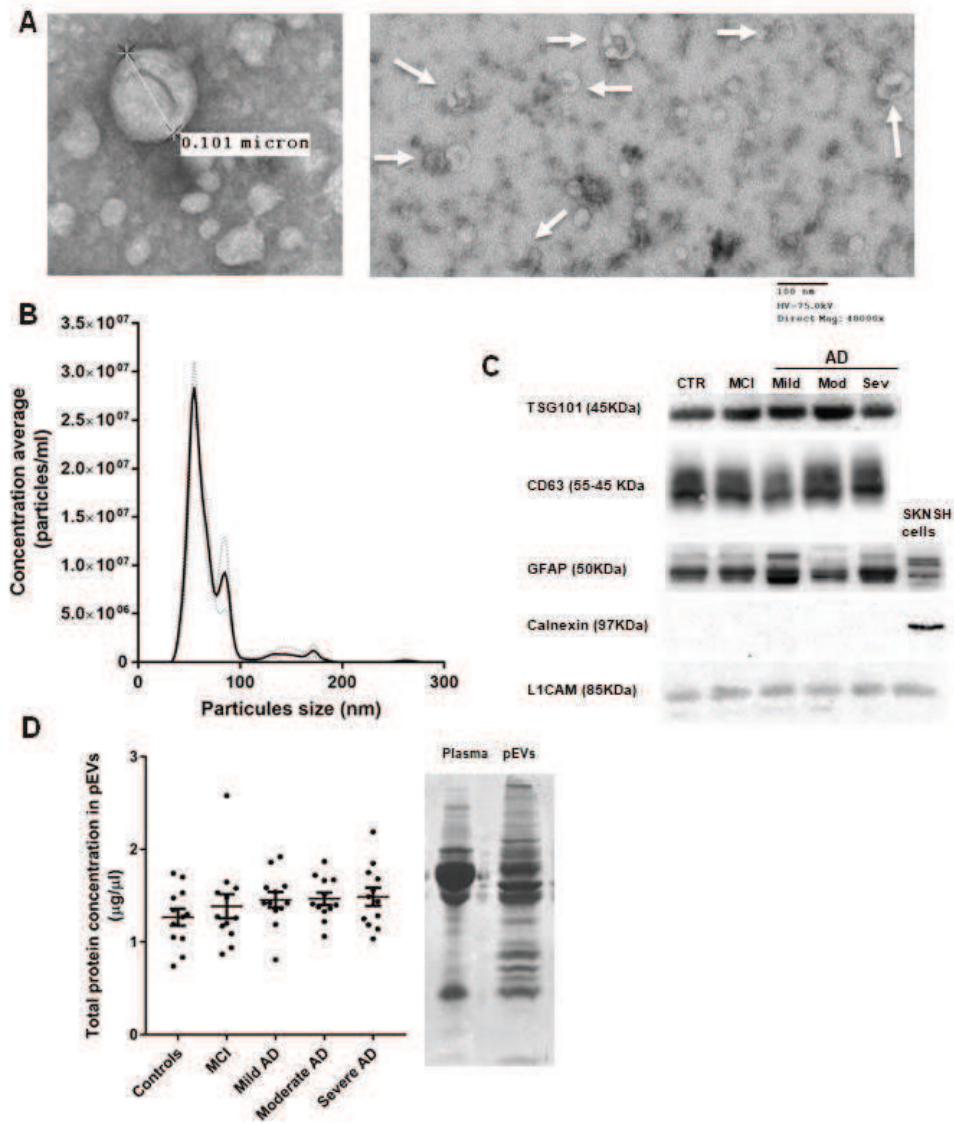


Figure 2. Characterization of total extracellular vesicles isolated from plasma (pEVs). Transmission electron microscopy images revealed the characteristic shape and size of pEVs from a control participant (**A**). Particles concentrations were analyzed by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) using Nanosight NS300 system and were expressed with means (particle number/ml, black line) \pm standard deviation (dotted line), $n=3$ (**B**). Western blot analysis of protein lysates from pEVs (15 μ g respectively) probed for exosomal markers (TSG101 and CD63), cerebral markers (GFAP and L1CAM) and negative control (Calnexin) (**C**). Total protein concentration of pEVs was measured with the bichinchoninic acid assay in each group. Total proteins were also stained with Coomassie blue to compare the pattern of total protein content in plasma and pEVs (**D**).

Brain derived proteins levels in total circulating extracellular vesicles

Compared with the control group, BDNF, NSE, Progranulin and S100B levels were significantly lower in pEVs of MCI subjects (figure 3.A-D). The decrease of BDNF, NSE and S100B levels was also observed in pEVs from mild AD patients but not for Progranulin levels. For BDNF levels in pEVs, we detected an increase in the terminal stage of AD. By contrast, for other markers, there was no difference in their pEVs levels from patients at the moderate and severe stages of AD compared to control participants. This suggests that these four proteins could be useful for the detection of MCI and mild AD patients but not for monitoring the AD progression.

As Progranulin and BDNF are co-transported together in vesicles in neurons and as their trafficking was alter in AD, we have calculated the Progranulin/BDNF ratio in pEVs from each group (24, 25). Compared with control subjects, this ratio was significantly reduced in pEVs from MCI participants (> 10 fold) and all AD patients, except moderate stage of disease (Figure 3.E). The correlation between levels in pEVs of Progranulin and BDNF strengthens their link (figure 3.F).

There was only a significantly difference in the Progranulin/BDNF ratio and S100B levels between the control group and the AD group when all stages of the disease were combined. By contrast, BDNF, NSE and Progranulin levels were not significantly different in pEVs from all AD patients compared to control subjects. These results emphasize the importance of disease stages in the identification of biomarkers.

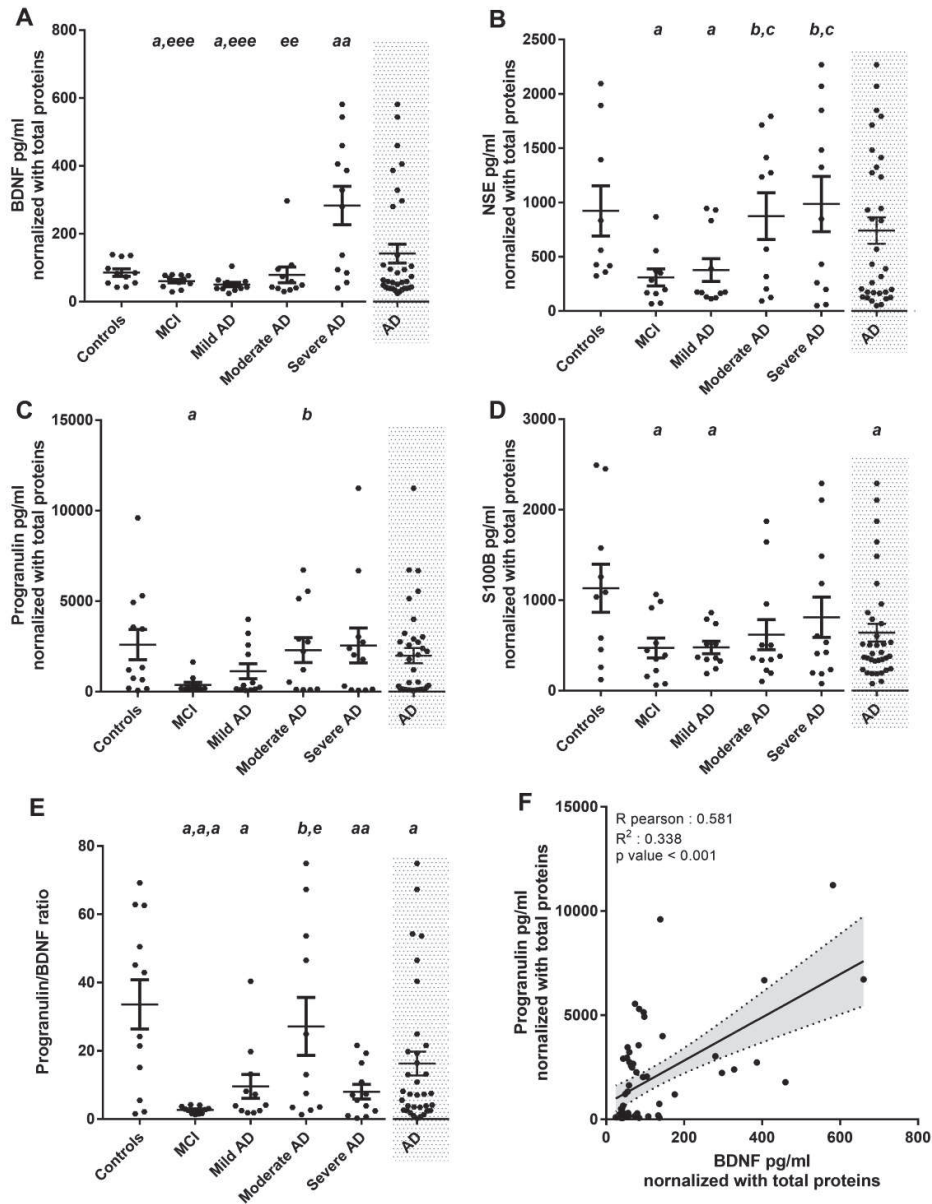


Figure 3. Levels of some brain derived proteins including BDNF, NSE, Progranulin and S100B (**A-D**) and the ratio of Progranulin/BDNF (**E**) in pEVs . Each point represents the value for one patient or control subject. The mean \pm SEM for each group is shown by a horizontal line and is expressed in pg/ml (normalized using total protein concentration). For concentrations of BDNF, NSE and S100B and ratio of Progranulin/BDNF, statistical analysis was performed using the one way ANOVA followed by Tukey post hoc test (alpha = 0.05) with ^a $p < 0.05$, ^{aa} $p < 0.01$ compared to healthy controls; ^b $p < 0.05$ compared to MCI subjects; ^c $p < 0.05$ compared to mild AD patients and ^e $p < 0.05$, ^{ee} $p < 0.01$, ^{eee} $p < 0.001$ compared to severe AD patients. For Progranulin concentrations, statistical analysis was performed by the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test (alpha = 0.05) with ^a $p < 0.05$ compared to healthy controls and ^b $p < 0.05$, compared to MCI subjects. Scatter plots of pEVs Progranulin concentrations in relation to pEVs BDNF concentrations (**F**). Correlation coefficients (Pearson R and R^2)

and p values were determined using Pearson correlation. The confidence interval (CI) range was plotted in correlation plots (grey area).

Diagnostic accuracy of some brain derived proteins levels in total circulating extracellular vesicles

The diagnostic accuracy of each biomarker has been investigated using receiver-operating characteristic curves (ROC). The area under the curve (AUC) provided the discriminatory ability of markers with 95% of confidence intervals. To distinguish the control group and MCI patients, AUC for the Progranulin/BDNF ratio and NSE levels in pEVs were superior to 0.80, indicating high classification accuracy (Figure 4.A-B). Progranulin and S100B levels offered a good discrimination between the MCI group and control participants with AUC of 0.783 and 0.782, respectively (Figure 4.C-D). In contrast, levels of BDNF in pEVs provided a poor differentiation power between MCI patients and control group with an AUC of 0.697 (Figure 4.E).

ROC analyses also provided the optimal cutoff and the diagnostic sensitivity and specificity corresponding, as summarized in Table 2. According to the criteria proposed by the National Institute on Aging (NIA), the ideal AD biomarker should have a diagnostic sensitivity and specificity greater than 80% (26). Our result indicated that the Progranulin/BDNF ratio in pEVs could be a strong MCI diagnosis biomarker with a sensitivity of 90.9% and a specificity of 83.3%. Levels of NSE and Progranulin in pEVs provided a diagnostic sensibility of 80% and a specificity superior to 75%. In contrast, levels of S100B and BDNF in pEVs offered a specificity and sensitivity inferior to 75% for the detection of MCI subjects.

We also found that levels of BDNF and NSE in pEVs could be considered as robust markers to distinguish control participants to mild AD patients with AUC of 0.818 and 0.808, respectively (Figure 5.A-B). The ratio of Progranulin/BDNF and levels of S100B were less efficient to discriminate patients with mild stage of AD to control subjects with a AUC of 0.780 and 0.745, respectively (Figure 5. C-D).

The table 3 reports the diagnostic sensitivity and specificity of each marker for the discrimination of control participants and mild AD patients. The ratio of Progranulin/BDNF in pEVs corresponded to the best marker with diagnostic sensitivity

and specificity of 81.8% and 75%, respectively. The Levels of NSE and S100B had lowest diagnostic efficiency with AUC inferior to 75%. In contrast, BDNF and Progranulin levels in pEVs presented a poor diagnostic accuracy to distinguish control group to mild AD patients.

However, the ratio of Progranulin/BDNF and levels of BDNF, NSE, Progranulin and S100B in pEVs provided a poor differentiation power (AUC of 0.682, 0.559, 0.639, 0.595 and 0.694, respectively), for the separation between control subjects and AD patients when all stages were pooled (Supplemental Figure 1). Levels of these proteins in pEVs could not be a good discriminant marker to separate MCI subjects from AD patients when all stages were combined (AUC of 0.700, 0.561, 0.653, 0.669 and 0.569, respectively) (Supplemental Figure 2).

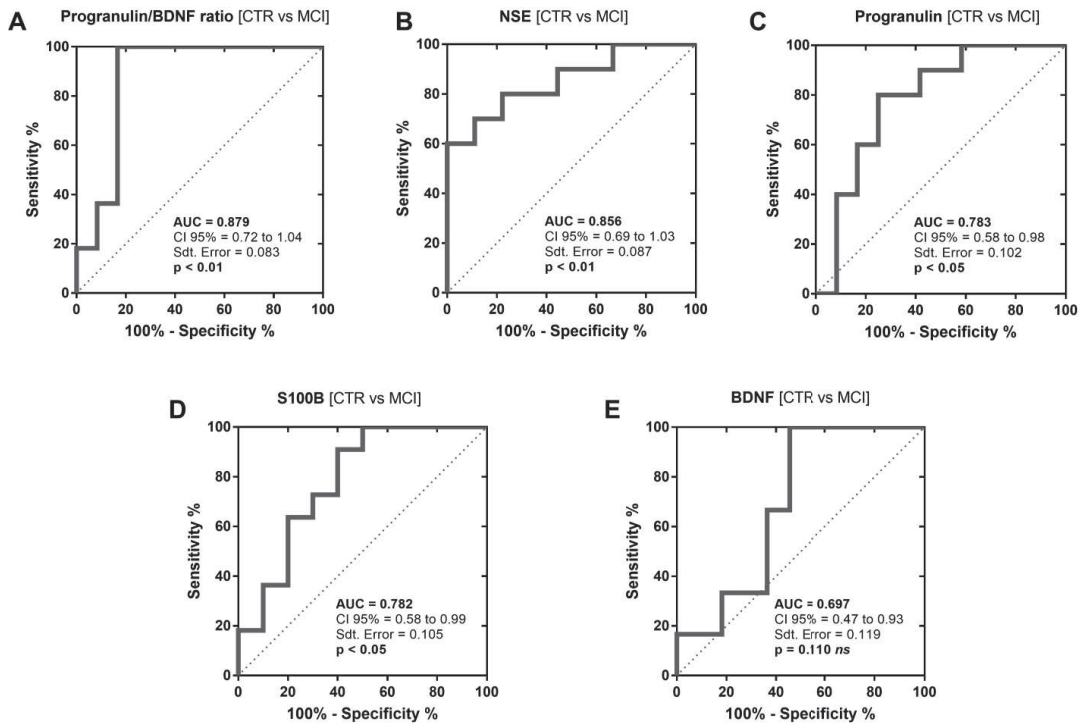


Figure 4. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. The plot represents the performance of the Progranulin/BDNF ratio (A) and the levels of NSE, Progranulin, S100B and BDNF in pEVs to differentiate control subjects to MCI subjects (B-E). Area under the curve (AUC) values, standard errors (Sdt. Error), p values and 95% confidence intervals (CI) are indicated on the curve. *ns*, not significant.

Table 2. Cutoff values to separate controls participants to MCI subjects

Biomarker (CTR vs MCI)	Cutoff (pg/mL)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Progranulin/BDNF ratio	< 4.1	90.9	83.3
NSE	< 394.0	80.0	77.8
Progranulin	< 475.0	80.0	75.0
S100B	< 554.0	72.7	70.0
BDNF	< 71.3	66.7	63.6

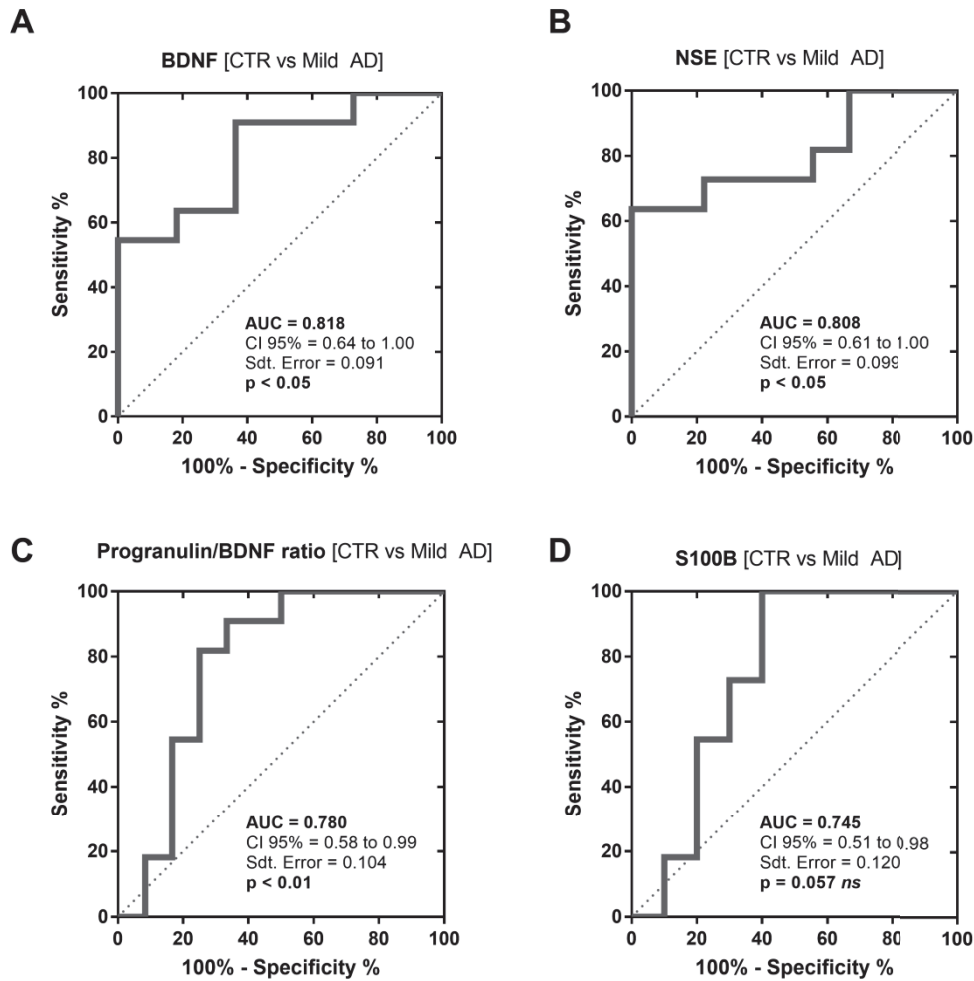


Figure 5. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. The plot represents the performance of levels of BDNF, NSE, the ratio of Progranulin/BDNF and levels of S100B in pEVs to differentiate control subjects to mild AD patients (**A-D**). Area under the curve (AUC) values, standard errors (Sdt. Error), p values and 95% confidence intervals (CI) are indicated on the curve. *ns*, not significant.

Table 3. Cutoff values to separate controls participants to mild AD patients

Biomarker (CTR vs MCI)	Cutoff (pg/mL)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Progranulin/BDNF ratio	< 14.2	81.8	75
NSE	< 403.0	72.7	77.8
Progranulin	<i>ns</i>	-	-
S100B	< 549.0	72.7	70.0
BDNF	< 58.1	72.7	63.6

Relationship of brain derived proteins levels to cognitive performance

According to the criteria proposed by the Alzheimer's disease neuroimaging initiative (ADNI), the relationship between the ideal prognostic biomarker and a disease parameter meaningful to the patient, as cognitive function, should be clearly established (27). Therefore, we examined the relationship between scores of two cognitive tests (MMSE and MoCa) and levels of brain derived proteins in pEVs.

We found a strong and positive correlation between cognitive performance assessed by MoCA and the ratio of Progranulin/BDNF in pEVs (Figure 6.A). There was also a relationship (negative correlation) between the cognitive function (evaluated by MMSE test) and levels of BDNF and Progranulin, individually (Figure 6.B-C). A positive correlation was observed between S100B concentrations in pEVs and MoCA scores (Figure 6.D).

To note, the levels of these proteins in pEVs were not age-related ($p=0.274$, $p=0.057$, $p=0.750$, $p=0.241$ for Progranulin/BDNF ratio, BDNF, Progranulin and S100B, respectively).

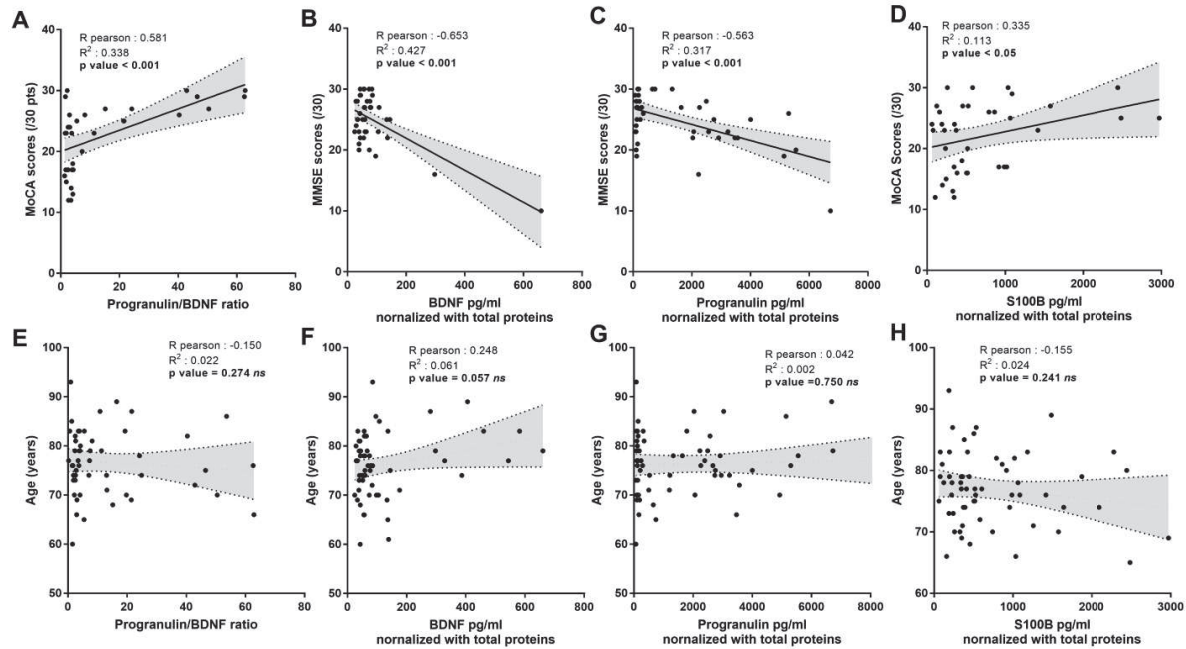


Figure 6. Correlation analysis with cognitive performances and age. Scatter plots of pEVs Progranulin/BDNF ratio in relation to MoCA scores (A) or age (E), pEVs BDNF levels in relation to MMSE scores (B) or age (F), pEVs Progranulin levels in relation to MMSE scores (C) or age (G) and pEVs S100B levels in relation to MoCA scores (D) or age (H). Correlation coefficients (Pearson R and R²) and p values were determined using Pearson correlation. The confidence interval (CI) range was plotted in correlation plots (grey area).

Discussion:

Our present findings highlight the potential clinical utility of some brain derived proteins contained in total pEVs for the MCI and early AD stage detection. We have identified some proteins related to AD disorders in pEVs and revealed their association with cognitive scores. The ratio of Progranulin/BDNF was significantly lower in pEVs from MCI subjects (> 10 fold) and mild AD patients (> 3 fold) than in pEVs from control group. This pEVs ratio was able to classify the MCI group from control population with a diagnostic sensibility and specificity superior to 80%. We also found a significant reduction of BDNF, NSE, Progranulin and S100B levels in pEVs from MCI subjects compared to control participants. In pEVs from AD patients at the mild stage, we observed a decrease of BDNF, NSE and S100B in comparison with control group. This panel of brain derived proteins in pEVs was useful for the detection of early stage of the disease but not for the evaluation of the disease progression.

Pending the availability of more specific and robust methods to isolate CNS-derived EVs, we proposed to use the protein cargo of total pEVs for the diagnosis of MCI and the evaluation of AD progression. In fact, there is no evidence showing that L1CAM-positive EVs originate from kidney, brain and other peripheral cell types (16, 17). Moreover, a characteristic changes in bloodstream could reflect the pathological processes leading to AD because the brain controls many body functions via the release of signaling proteins and because central and peripheral inflammatory mechanisms are increasingly implicated in AD. Indeed, different proteomic approaches highlighted a dysregulation of some proteins levels related to metabolic, neurotrophic and inflammatory pathways in periphery (28-30). Herein, our results strengthen the clinical utility of peripheral biomarkers to support MCI and AD diagnosis.

More specifically the content of pEVs like some proteins including BDNF, Progranulin, NSE and S100B, can reflect central and peripheral disorders in AD. These proteins are predominantly brain origins but are also expressed in other non-neural cell types. Our results indicate a deficiency of these proteins in pEVs during the MCI phase and the early AD stage. In neuron cells, BDNF and Progranulin are co-transported in vesicles for regulating neuronal growth and survival, as well as synapse formation and function (25,

31-33). The reduction of these neuroprotective proteins observed in pEVs from MCI and mild AD patients and their association with cognitive performance may explain the neuronal impairment and the decreased neuronal resistance to the toxicity of AD pathogenic proteins. In combination, the ratio of Progranulin/BDNF in pEVs is very sensitive and specific for MCI determination. During AD development, there is a central and peripheral inflammation and the S100B overexpression by reactive astrocytes can be considered as a marker for brain damage (34-36). In pEVs, S100B levels are lower in MCI phase and at the beginning of AD and associated with cognitive performance, according to another study that measure serum S100B levels (37). Finally, NSE, a major glycolytic pathway enzyme found in all neurons, is another index of neuronal damage and brain glucose hypometabolism. In the present study, pEVs NSE levels were reduced in MCI and mild AD patients as previously observed in serum and CSF (37, 38). Taken together, our study highlights for the first time some modifications of proteins related to AD brain disorders in total pEVs during the development of AD and their association with cognitive performance. This approach could distinguish controls from MCI or AD patients at early stage but could not monitor the disease progression.

Further investigations will be required to validate our initial findings. First, future works is underway to validate the acquired preliminary results in larger independent cohorts. On the other hand, standardized isolation, characterization and normalization methods are required to use pEVs in the field of diagnosis.

Acknowledgements:

This work was supported by Chaire Louise & André Charron sur la Maladie d'Alzheimer.

Author Contributions:

M. Perrotte and C. Ramassamy designed research; M. Perrotte and M. Haddad performed research; M. Perrotte analyzed data; M. Perrotte and C. Ramassamy wrote the paper; A. LePage, and T. Fulop and E. H. Frost contributed new reagents or analytic tools.

References:

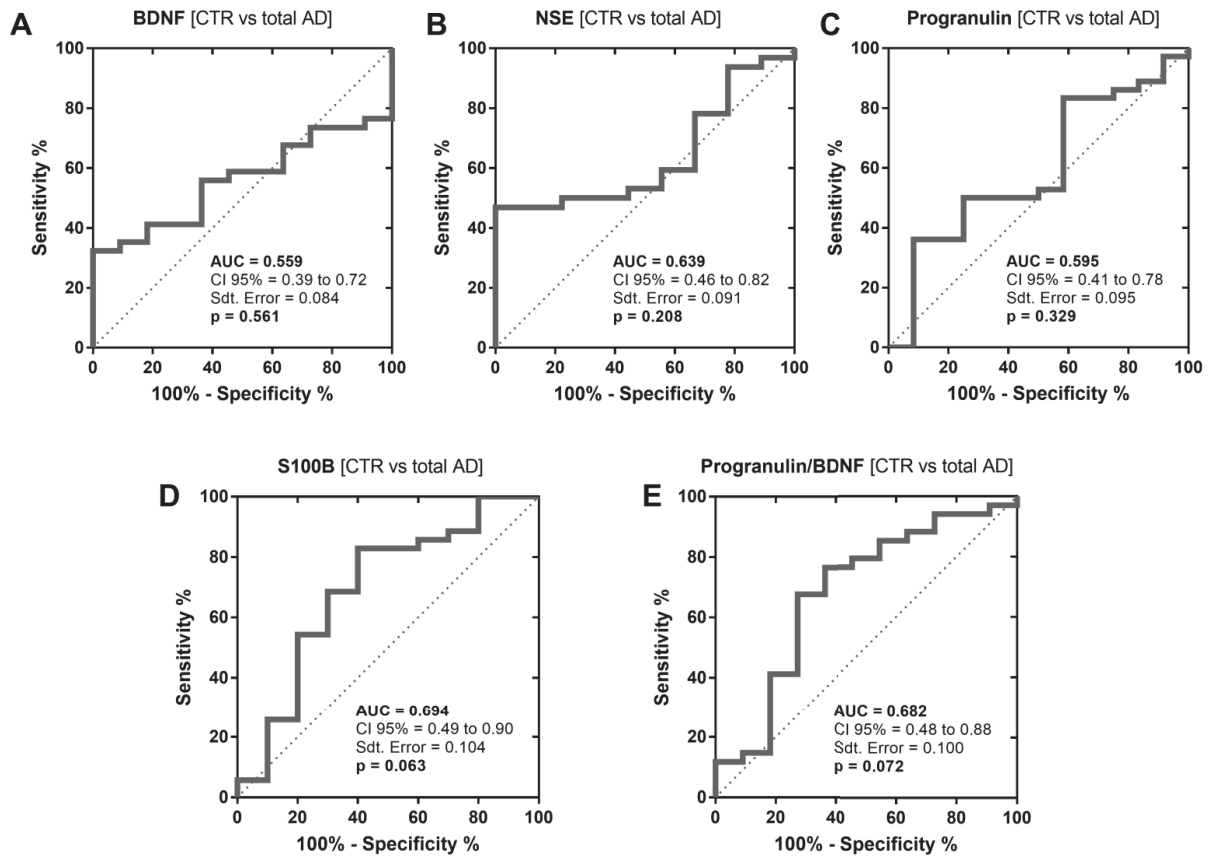
1. Holsinger RM, Schnarr J, Henry P, Castelo VT, Fahnstock M. Quantitation of BDNF mRNA in human parietal cortex by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: decreased levels in Alzheimer's disease. *Brain research Molecular brain research*. 2000;76(2):347-54.
2. Chitramuthu BP, Bennett HPJ, Bateman A. Progranulin: a new avenue towards the understanding and treatment of neurodegenerative disease. *Brain : a journal of neurology*. 2017;140(12):3081-104.
3. Van Eldik LJ, Griffin WS. S100 beta expression in Alzheimer's disease: relation to neuropathology in brain regions. *Biochimica et biophysica acta*. 1994;1223(3):398-403.
4. Baig S, Palmer LE, Owen MJ, Williams J, Kehoe PG, Love S. Clusterin mRNA and protein in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2012;28(2):337-44.
5. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*. 2011;7(3):280-92.
6. 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. *The Lancet Neurology*. 2007;6(8):734-46.
7. Coleman BM, Hill AF. Extracellular vesicles--Their role in the packaging and spread of misfolded proteins associated with neurodegenerative diseases. *Seminars in cell & developmental biology*. 2015;40:89-96.
8. Rajendran L, Honscho M, Zahn TR, Keller P, Geiger KD, Verkade P, et al. Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(30):11172-7.

9. Dinkins MB, Dasgupta S, Wang G, Zhu G, Bieberich E. Exosome reduction in vivo is associated with lower amyloid plaque load in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 2014;35(8):1792-800.
10. Polanco JC, Scicluna BJ, Hill AF, Gotz J. Extracellular Vesicles Isolated from the Brains of rTg4510 Mice Seed Tau Protein Aggregation in a Threshold-dependent Manner. *The Journal of biological chemistry*. 2016;291(24):12445-66.
11. Mustapic M, Eitan E, Werner JK, Jr., Berkowitz ST, Lazaropoulos MP, Tran J, et al. Plasma Extracellular Vesicles Enriched for Neuronal Origin: A Potential Window into Brain Pathologic Processes. *Frontiers in neuroscience*. 2017;11:278.
12. Shi M, Liu C, Cook TJ, Bullock KM, Zhao Y, Ghingina C, et al. Plasma exosomal alpha-synuclein is likely CNS-derived and increased in Parkinson's disease. *Acta neuropathologica*. 2014;128(5):639-50.
13. Fiandaca MS, Kapogiannis D, Mapstone M, Boxer A, Eitan E, Schwartz JB, et al. Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*. 2015;11(6):600-7 e1.
14. Yew DT, Li WP, Webb SE, Lai HW, Zhang L. Neurotransmitters, peptides, and neural cell adhesion molecules in the cortices of normal elderly humans and Alzheimer patients: a comparison. *Experimental gerontology*. 1999;34(1):117-33.
15. Gillian AM, Brion JP, Breen KC. Expression of the neural cell adhesion molecule (NCAM) in Alzheimer's disease. *Neurodegeneration : a journal for neurodegenerative disorders, neuroprotection, and neuroregeneration*. 1994;3(4):283-91.
16. Smogeli E, Davidson B, Cvancarova M, Holth A, Katz B, Risberg B, et al. L1CAM as a prognostic marker in stage I endometrial cancer: a validation study. *BMC cancer*. 2016;16:596.
17. Markovic-Lipkovski J, Zivotic M, Muller CA, Tampe B, Cirovic S, Vjestica J, et al. Variable Expression of Neural Cell Adhesion Molecule Isoforms in Renal Tissue: Possible Role in Incipient Renal Fibrosis. *PloS one*. 2015;10(9):e0137028.

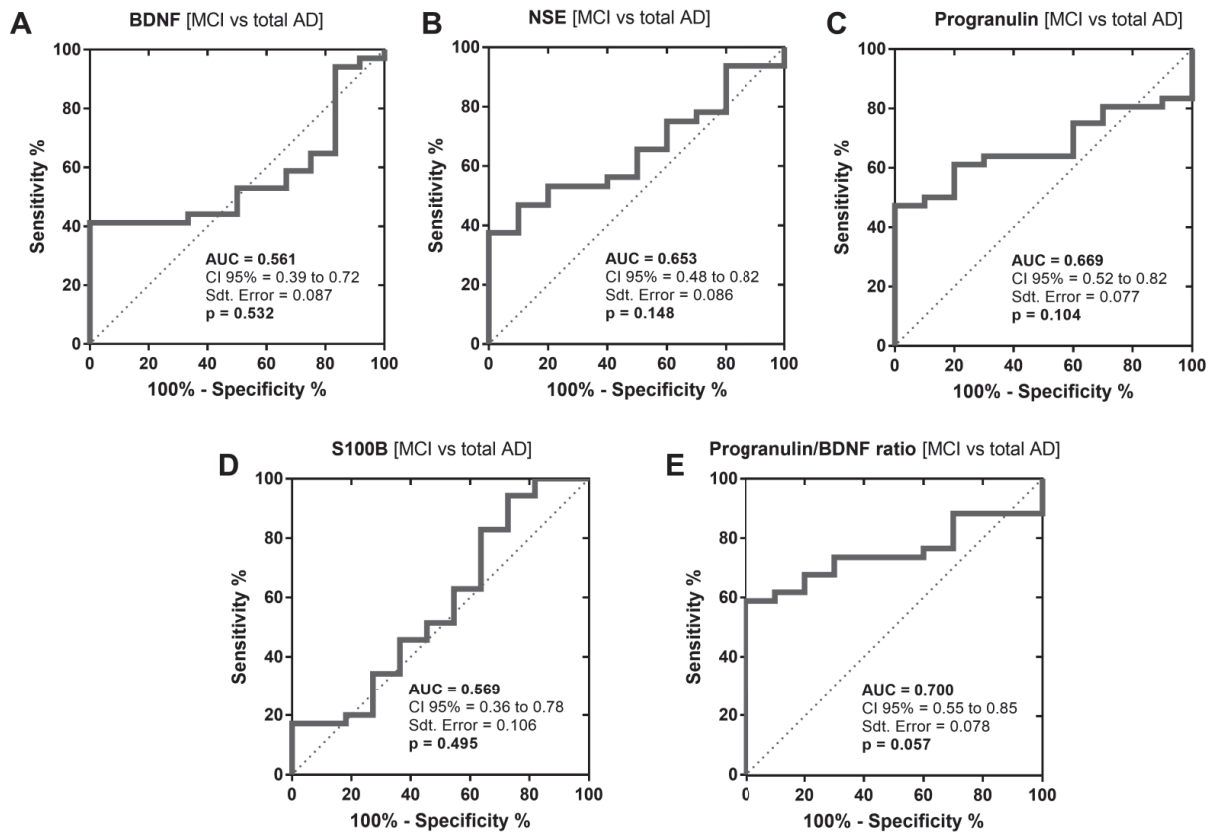
18. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of psychiatric research*. 1975;12(3):189-98.
19. Nasreddine ZS, Phillips NA, Bedirian V, Charbonneau S, Whitehead V, Collin I, et al. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2005;53(4):695-9.
20. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Archives of neurology*. 1999;56(3):303-8.
21. Ligthart GJ, Corberand JX, Fournier C, Galanaud P, Hijmans W, Kennes B, et al. Admission criteria for immunogerontological studies in man: the SENIEUR protocol. *Mechanisms of ageing and development*. 1984;28(1):47-55.
22. Soreide K. Receiver-operating characteristic curve analysis in diagnostic, prognostic and predictive biomarker research. *Journal of clinical pathology*. 2009;62(1):1-5.
23. Trzepacz PT, Hochstetler H, Wang S, Walker B, Saykin AJ. Relationship between the Montreal Cognitive Assessment and Mini-mental State Examination for assessment of mild cognitive impairment in older adults. *BMC geriatrics*. 2015;15:107.
24. Poon WW, Blurton-Jones M, Tu CH, Feinberg LM, Chabrier MA, Harris JW, et al. beta-Amyloid impairs axonal BDNF retrograde trafficking. *Neurobiology of aging*. 2011;32(5):821-33.
25. Petoukhov E, Fernando S, Mills F, Shivji F, Hunter D, Krieger C, et al. Activity-dependent secretion of progranulin from synapses. *Journal of cell science*. 2013;126(Pt 23):5412-21.
26. Consensus report of the Working Group on: "Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease". The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group. *Neurobiology of aging*. 1998;19(2):109-16.

27. Mueller SG, Weiner MW, Thal LJ, Petersen RC, Jack CR, Jagust W, et al. Ways toward an early diagnosis in Alzheimer's disease: the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI). *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*. 2005;1(1):55-66.
28. Ray S, Britschgi M, Herbert C, Takeda-Uchimura Y, Boxer A, Blennow K, et al. Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nature medicine*. 2007;13(11):1359-62.
29. O'Bryant SE, Xiao G, Barber R, Reisch J, Doody R, Fairchild T, et al. A serum protein-based algorithm for the detection of Alzheimer disease. *Archives of neurology*. 2010;67(9):1077-81.
30. Zhang R, Barker L, Pinchev D, Marshall J, Rasamoeliso M, Smith C, et al. Mining biomarkers in human sera using proteomic tools. *Proteomics*. 2004;4(1):244-56.
31. Van Damme P, Van Hoecke A, Lambrechts D, Vanacker P, Bogaert E, van Swieten J, et al. Progranulin functions as a neurotrophic factor to regulate neurite outgrowth and enhance neuronal survival. *The Journal of cell biology*. 2008;181(1):37-41.
32. Matsuda N, Lu H, Fukata Y, Noritake J, Gao H, Mukherjee S, et al. Differential activity-dependent secretion of brain-derived neurotrophic factor from axon and dendrite. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(45):14185-98.
33. Tapia L, Milnerwood A, Guo A, Mills F, Yoshida E, Vasuta C, et al. Progranulin deficiency decreases gross neural connectivity but enhances transmission at individual synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(31):11126-32.
34. Sheng JG, Mrak RE, Rovnaghi CR, Kozłowska E, Van Eldik LJ, Griffin WS. Human brain S100 beta and S100 beta mRNA expression increases with age: pathogenic implications for Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 1996;17(3):359-63.

35. Marshak DR, Pesce SA, Stanley LC, Griffin WS. Increased S100 beta neurotrophic activity in Alzheimer's disease temporal lobe. *Neurobiology of aging*. 1992;13(1):1-7.
36. Mrak RE, Sheng JG, Griffin WS. Correlation of astrocytic S100 beta expression with dystrophic neurites in amyloid plaques of Alzheimer's disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 1996;55(3):273-9.
37. Chaves ML, Camozzato AL, Ferreira ED, Piazenski I, Kochhann R, Dall'Igna O, et al. Serum levels of S100B and NSE proteins in Alzheimer's disease patients. *Journal of neuroinflammation*. 2010;7:6.
38. Cutler NR, Kay AD, Marangos PJ, Burg C. Cerebrospinal fluid neuron-specific enolase is reduced in Alzheimer's disease. *Archives of neurology*. 1986;43(2):153-4.



Supplemental Figure 1. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. The plot represents the performance of the levels of BDNF, NSE, Progranulin and S100B (**A-D**) and the ratio of Progranulin/BDNF (**E**) in pEVs to differentiate control participants to AD patients (all stages combined). Area under the curve (AUC) values, standard errors (Sdt. Error), p values and 95% confidence intervals (CI) are indicated on the curve.



Supplemental Figure 2. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. The plot represents the performance of the levels of BDNF, NSE, Progranulin and S100B (**A-D**) and the ratio of Progranulin/BDNF (**E**) in pEVs to differentiate MCI subjects to AD patients (all stages combined). Area under the curve (AUC) values, standard errors (Sdt. Error), p values and 95% confidence intervals (CI) are indicated on the curve.

6. CHAPITRE V

DISCUSSION GENERALE

La MA est une maladie neurodégénérative complexe liée à l'âge et à de nombreux facteurs de risque. Différents mécanismes sont suspectés d'être la cause du développement de la pathogénèse de la MA (la cascade amyloïde, l'hyperphosphorylation de la protéine Tau, le stress oxydatif, l'inflammation, ...). Cependant, aucun d'entre eux ne s'est révélé être une cible efficace dans le traitement de la maladie et ceci révèle plusieurs problèmes dans la recherche sur cette maladie (Cummings, Morstorf et al. 2014). Premièrement, ces différents mécanismes pourraient agir simultanément ou dans un intervalle de temps très rapproché. Néanmoins peu d'essais cliniques prennent en compte ce paramètre et le plus souvent les molécules développées vont cibler un mécanisme particulier. En 2018, sur les 90 molécules en cours d'évaluation clinique (en phase II et III), 60% ciblent l'A β et 21% la protéine Tau (annexe VII) (Cummings, Lee et al. 2018). Deuxièmement, la plupart des essais d'efficacité ont été conduits chez des personnes atteintes de démence. En 2018, seulement 8% des molécules en cours d'essais clinique sont évaluées chez les patients au stade préclinique et 35% chez les sujets MCI (Cummings, Lee et al. 2018). Le reste des agents (57%) est testé sur des patients au stade léger, modéré et sévère de la démence (annexe VII). Il est pourtant bien établi que le traitement doit intervenir le plus rapidement possible avant l'apparition irréversible des altérations neuronales. Enfin, ces échecs thérapeutiques rendent compte de la complexité de la MA et en particulierité de l'hétérogénéité des cas cliniques. Cette hétérogénéité crée ainsi des différences interindividuelles importantes face à l'efficacité des traitements et une difficulté dans le diagnostic précoce et certain de la maladie.

Les moyens actuels pour sa détection présentent de nombreuses limites. Le diagnostic du vivant des patients de la MA est probabiliste. Jusqu'en 2011, les critères cliniques utilisés étaient ceux du NINCDS-ADRDA, datant de 1984. Ils ne s'appliquaient qu'au stade de démence et conduisaient au diagnostic dit « probable » ou « possible ». Ainsi, ils engendraient un taux d'erreur diagnostique de 20 à 30 % en pratique courante. Depuis 2011, les critères ont été mis à jour pour redéfinir la MA comme un

« continuum » débutant par des phases pré déméntielles comme les stades précliniques et MCI. Ces nouveaux critères introduisent également l'utilisation des biomarqueurs mais ceux-ci n'ont pas été actualisés depuis 2014. À l'heure actuelle, l'utilisation des biomarqueurs validés par les critères de Dubois (imagerie et dosage du LCR) est restreinte en routine car les techniques sont invasives, coûteuses et leur accès est limité. De plus, ceux-ci ne sont pas encore totalement spécifiques de la maladie ou des phases pré déméntielles. Ils n'ont leur place que dans certaines situations pour conforter ou infirmer le diagnostic. Par conséquent, il est urgent d'identifier des biomarqueurs périphériques précoces, peu coûteux et non-invasifs, adaptés à des mesures répétées tout au long de l'évolution de la maladie.

6.1. Le développement du biomarqueur périphérique idéal : du laboratoire à leur utilisation clinique

À l'instar de l'avancée des connaissances et des nouvelles techniques, d'intensives investigations sont en cours pour l'identification de biomarqueurs périphériques dans les maladies neurodégénératives comme la MA. Les biomarqueurs sont utiles pour plusieurs applications. Ils peuvent aider dans le diagnostic certain de la maladie ou dans les diagnostics différentiels. Les biomarqueurs peuvent également évaluer le pronostic d'évolution de la maladie. Ils peuvent être utiles pour détecter les facteurs de risque et ainsi développer des moyens de prévention efficaces. Enfin, les biomarqueurs peuvent mesurer l'efficacité des futurs traitements qui modifieraient le cours évolutif de la maladie. Actuellement aucun biomarqueur sanguin n'a dépassé le stade de « candidat » dans le diagnostic de la MA.

Le biomarqueur idéal et l'avancement des technologies dans leur découverte

Selon le groupe de travail de l'APMI (Alzheimer's Precision Medicine Initiative), le biomarqueur sanguin idéal devrait fournir un outil d'évaluation capable de détecter la MA tôt dans son évolution et de distinguer les patients à risque de développer la MA. Il devrait également être utilisé pour exclure d'autres maladies neurodégénératives présentant des symptômes ressemblant à ceux de la MA. Le NIH-NIA (National Institute on Aging) et le groupe de travail ADNI (*The Alzheimer's Disease Neuroimaging*

Initiative), indiquent que le biomarqueur doit indiquer une sensibilité et une spécificité supérieure à 80%, alors que les valeurs prédictives doivent être $\geq 80\%$ (Growdon 1998, Mueller, Weiner et al. 2005). De plus, il devrait détecter une caractéristique fondamentale reflétant un processus physiopathologique actif dans la MA et la relation entre le biomarqueur et un paramètre clinique, comme la fonction cognitive, doit être clairement établie. Depuis la mise à jour des critères de diagnostic en 2014, son efficacité doit être évaluée et comparée aux critères IWG-2 actuels (imagerie structurale/fonctionnelle et biomarqueurs du LCR) et non plus aux lésions *post-mortem* suivant les critères de 1984 (Hampel, O'Bryant et al. 2018).

En termes de technologie, le groupe APMI indique une préférence pour l'utilisation d'un panel de biomarqueurs, une combinaison de marqueurs développés ensemble ou individuellement. Chaque cas pathologique aurait ainsi une signature protéique ou moléculaire unique. Il est essentiel de mettre en avant l'association de différents biomarqueurs individuels et de surmonter l'approche dépassée de l'examen d'un seul biomarqueur candidat à la fois (Gupta, Sundaram et al. 2013). Cette nouvelle approche augmente la sensibilité et la spécificité. Ceci a été démontré dans de nombreuses études. Un bel exemple est le dosage de l'A β 42, l'A β 40 et les différentes formes de la protéine Tau dans le sang. Pris individuellement, les résultats sont contradictoires et présentent une forte variabilité. Le fait de les combiner (ratio de tTau/ A β 42, pTau/ A β 42 ou encore A β 42/A β 40) augmente fortement le pouvoir de diagnostic (Olsson, Lautner et al. 2016). Ray et son équipe ont analysé 120 protéines plasmatiques et ont trouvé qu'un panel de 18 protéines permettait de distinguer avec précision (89%) les patients atteints de MA des témoins et d'identifier (à 81%) les sujets MCI qui ont évolué vers la MA au cours d'une période de suivi de 2 à 6 ans (Ray, Britschgi et al. 2007). Récemment, Hampel et son équipe ont également révélé le potentiel de l'association de six protéines dans le LCR (Hampel, Toschi et al. 2018).

L'utilisation de nouvelles techniques de dosage immunologique ultrasensible et leur standardisation pourraient permettre la détection et la quantification de biomarqueurs présents à de faibles concentrations. Ces techniques permettraient à la fois d'augmenter la sensibilité des tests actuels. En effet, les concentrations plasmatiques et sériques des espèces A β et de la protéine tau sont bien inférieures à celles du LCR. La

composition du plasma est également très complexe par rapport au LCR ce qui complexifie le dosage et amène de nombreux biais (Vanderstichele, Stoops et al. 2012). Différentes études sorties dans les dernières années révèlent le potentiel de l'utilisation des techniques IMR (*immunomagnetic reduction*) et SIMOA (*single molecule array*) pour améliorer les techniques classiques comme l'ELISA (Chiu, Yang et al. 2012, Randall, Mortberg et al. 2013, Savage, Kalinina et al. 2014, Lue, Guerra et al. 2017, Verberk, Slot et al. 2018). L'IMR mesure, via un magnétomètre, le champ magnétique créé par l'association de la molécule d'intérêt à des nanobilles paramagnétiques recouvertes d'anticorps spécifiques. Les limites de détection de l'IMR sont de 0.002 pg/ml, 7.53 pg/ml et 4.91 pg/ml pour la protéine Tau, l'A β 42 et l'A β 40, respectivement (contre > 34pg/ml pour l'ELISA de pTau). La technique SIMOA est basée sur l'isolement des complexes immuns individuels sur des billes paramagnétiques en utilisant des réactifs de l'ELISA standard. La principale différence entre l'ELISA classique et le SIMOA réside dans la capacité à piéger les molécules seules permettant une lecture «numérique» de chaque bille individuelle afin de déterminer si elle est liée à l'analyte cible ou non (Chang, Rissin et al. 2012). Les limites de détection sont de l'ordre du femtogramme (Rissin, Kan et al. 2010). Pour la protéine Tau, l'A β 42 et l'A β 40, les limites de détection sont de 19 fg/ml, 44 fg/ml et 522 fg/ml, respectivement (Lue, Guerra et al. 2017). Enfin, la technique de l'immunoprécipitation suivie d'une analyse en spectrophotométrie de masse indiquerait de meilleurs résultats pour le dosage de l'amyloïde (Nakamura, Kaneko et al. 2018). Ces nouvelles techniques ultrasensibles peuvent être un précieux outil pour découvrir de nouveaux biomarqueurs jusqu'à lors inaccessibles par les techniques actuelles.

Le processus de validation et l'importance des étapes pré-analytiques

Tout comme les médicaments, les biomarqueurs doivent démontrer leur efficacité et être validés avant d'intégrer les critères de diagnostic. Ce processus est long et nécessite différentes étapes de validation sur différentes cohortes et sur une plateforme répondant aux besoins d'extensibilité et des laboratoires d'analyses. Ce transfert technologique sur une plate-forme « universelle » est obligatoire car les méthodes de découverte ne répondent pas toujours aux exigences réglementaires pour les tests de diagnostic définis par le *Cinical Laboratory and Standards Institute*. Ce processus

nécessite également des tests robustes de reproductibilité inter et extra-laboratoire. Seulement après ce processus réglementaire, un biomarqueur ou un panel de biomarqueurs pourra être inclus dans les critères de diagnostic (Hampel, O'Bryant et al. 2018).

Il faut noter l'importance des cohortes utilisées dans les étapes de validation. En effet, dans un contexte de maladie multifactorielle, il est essentiel d'avoir les informations sur les appartenances ethniques, les antécédents médicaux, la prise de médicaments, le génotype de l'ApoE, le niveau d'éducation, l'âge, le sexe, ... afin de les prendre en compte lors des analyses. Enfin, les facteurs pré-analytiques sont à définir rigoureusement pour l'utilisation des biomarqueurs en routine et pour leur validation réglementaire (Watt, Perez et al. 2012, O'Bryant, Gupta et al. 2015). Ces facteurs pré-analytiques correspondent aux facteurs liés aux patients et aux traitements des échantillons sanguins (de la collecte au stockage). Certains facteurs sont maîtrisables d'autres sont incontrôlables. La diète, la prise de médicaments de drogues ou d'alcool, l'activité sportive ou encore les données démographiques du patient peuvent influencer les résultats de dosage. Lors de la collecte du sang, il est important de standardiser l'heure de la collecte, l'anticoagulant utilisé, le site de prélèvement et la composition de l'aiguille. Ensuite les étapes de préparation du sang sont également importantes à prendre en compte comme le temps de centrifugation, le temps entre la collecte et le traitement de l'échantillon ou encore l'utilisation du sérum ou du plasma. Enfin, le temps et la température de stockage peuvent influencer la mesure des biomarqueurs ainsi que le nombre de cycles congélation/décongélation.

Le choix de la cohorte et des facteurs pré-analytiques sont importants car ils peuvent changer le résultat des analyses (Watt, Perez et al. 2012, Galasko and Golde 2013, Rembach, Ryan et al. 2013). Prenons l'exemple de l'étude prometteuse de Ray et al. en 2007 qui montrait que l'utilisation d'un panel de 18 protéines plasmatiques pouvait discriminer les patients atteints de la MA des contrôles avec une précision de 89% (n=259 participants). En 2009, cette étude a été testée sur une plate-forme indépendante avec une cohorte différente (n=1250 participants) et les résultats ont été décevants (Soares, Chen et al. 2009). En effet, Soares et son équipe ont trouvé que le panel des 18 protéines de Ray et al. présentait une précision de diagnostic globale de

61% pour discriminer les sujets témoins des patients atteints de la MA. Différentes études sur différentes cohortes ont révélé des panels potentiels de protéines sanguines pour le diagnostic de la MA (Ray, Britschgi et al. 2007, Soares, Chen et al. 2009). Cependant, quand on étudie de plus près la liste de chaque panel prometteur, il y a peu de marqueurs en commun (

Tableau 12). Une analyse plus approfondie révèle ce problème (Kiddle, Sattlecker et al. 2014).

Tableau 12 : Comparaison de la liste des protéines inclus dans les panels prometteurs pour le diagnostic de la MA (*en gras sont indiqués les protéines en commun).

Ray et al. 2007	O'Bryant et al. 2011	Doecke et al. 2012
Plasma archivé (pas de précision sur la cohorte utilisée) (n=259)	Cohorte du Texas Alzheimer's Research Consortium (n=400)	Cohorte AIBL (Australian Imaging Biomarker and Lifestyle study) (n=961) et cohorte ADNI (Alzheimer Disease Neuroimaging Initiative) (n=170)
<ul style="list-style-type: none"> • Chemokine (C-C motif) ligand 18-pulmonary and activation-regulated- (CCL18/PARC) • Angiopoietin-2 • Insulin-like growth factor binding protein 6 • Interleukin 8 • Intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor • Interleukin 11 • Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10 • Chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5/RANTES) • Chemokine (C-C motif) ligand 7 (CCL7/MCP-3) • Epidermal growth factor (beta-urogastrone) • Chemokine (C-C motif) ligand15 (CCL15/MIP-1d) • Glial cell derived neurotrophic factor • Colony stimulating factor 3 (granulocyte) • Colony stimulating factor 1 (macrophage) • <u>Tumor necrosis factor-alpha*</u> • Interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple) • Interleukin 1, alpha • Platelet-derived growth factor beta polypeptide (PDGF-BB) 	<ul style="list-style-type: none"> • Thrombopoietin • Microphage inflammatory protein 1α • Eotaxin 3 • <u>Tumor necrosis factor-α*</u> • Tenascin C • FAS • Fibrinogen • <u>Interleukin-10*</u> • Interleukin-7 • Cancer antigen 19.9 • Prostatic acid phosphatase • Apolipoprotein CIII • FAS ligand • C-reactive protein • <u>Tissue inhibitor of metalloproteinases 1*</u> • Angiopoietin 2 • Stem cell factor • Interleukin-5 • Lipoprotein(a) • α2-Macroglobulin • ACE CD143 angiotensin-converting enzyme • Monocyte chemotactic protein 1 • Ferritin • Pulmonary and activation-regulated chemokine • Cancer antigen 125 • Von Willebrand factor • Carcinoembryonic antigen • Macrophage migration inhibitory factor • Creatine kinase MB • <u>Pancreatic polypeptide*</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • Insulinlike growth factor binding protein 2 • <u>Pancreatic polypeptide*</u> • Carcinoembryonic antigen • Cortisol • Tumor necrosis factor receptor like 2 • Homocysteine • Angiopoietin 2 • Matrix metalloproteinase 9 • Vascular cell adhesion molecule 1 • <u>Tissue inhibitor of metalloproteinases 1*</u> • Superoxide dismutase • Alpha 1 antitrypsin • <u>Interleukin 10*</u> • Albumin • Hemoglobin • Calcium • Interleukin 17 • β2 microglobulin • CD40 • Matrix metalloproteinase 2 • Macrophage inflammatory protein α • Apolipoprotein E • Epidermal growth factor receptor

Dans ce contexte nos travaux confirment l'utilisation d'un panel de biomarqueurs plutôt que l'utilisation d'un biomarqueur seul.

6.2. Positionnement, originalité et limites de l'étude dans le contexte des biomarqueurs pour la maladie d'Alzheimer

Nos travaux démontrent l'utilité de certains marqueurs à différencier les sujets MCI et les patients atteints de la MA à différents stades des sujets contrôles. Dans la majorité

des études actuelles sur le sujet, les analyses se font sur les patients MCI et sur les patients atteints de la MA (tous stades confondus). La force de cette étude est d'avoir pris en compte les différents stades de la démence. Ainsi, nous avons pu démontrer qu'il est essentiel de combiner les biomarqueurs et indispensable de prendre en compte l'évolution de la maladie.

Nous avons démontré que certains marqueurs étaient plus efficaces que d'autres pour différencier différents stades (Tableau 13).

Tableau 13 : Résumé des biomarqueurs capables de différencier les différentes populations.

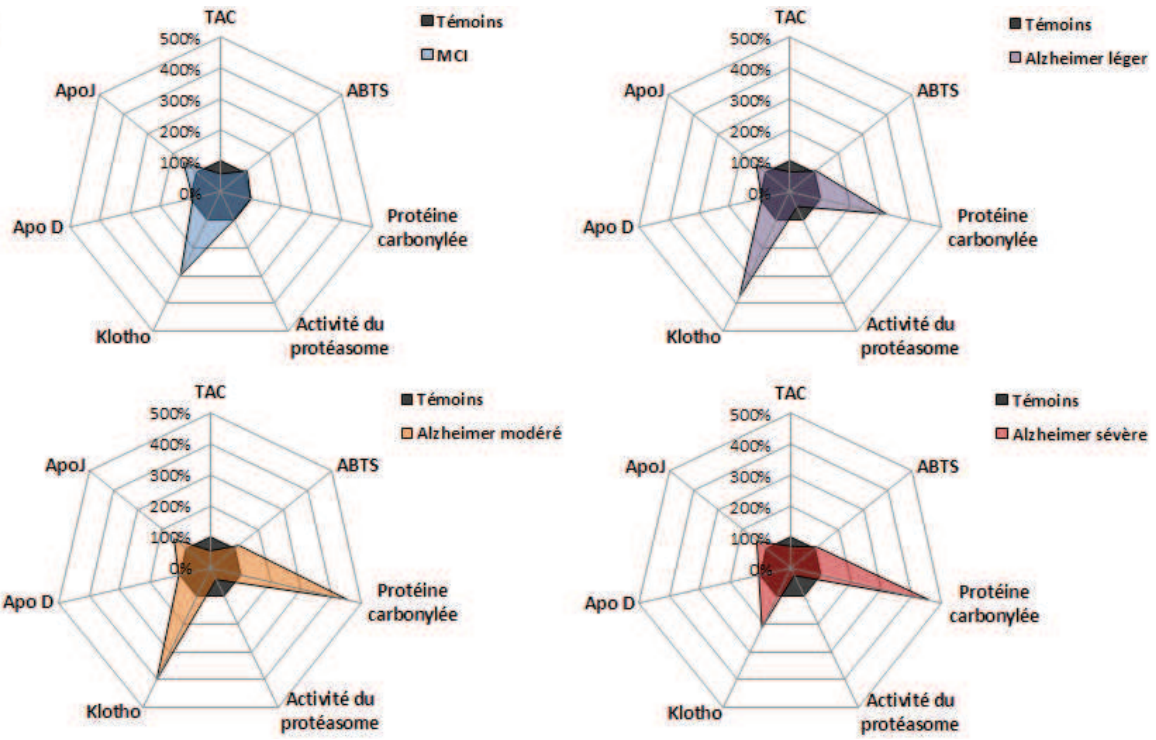
	MCI Versus CTR	MCI Versus AD	MA versus CTR
Article 1 - plasma	Concentrations de l'ApoJ et de Klotho	Activité du protéasome et niveau des protéines carbonylées	Concentrations de l'ApoJ et de Klotho, Activité du protéasome et niveau des protéines carbonylées
Article 2 - pEVs totales	Concentrations de l'APP et ratio de tTau/pTau-T181	Concentrations de l'APP et ratio de tTau/pTau-T181	ratio de tTau/pTau-T181
Article 3 - pEVs totales	Concentrations de NSE, Progranulin et S100B Ratio Progranulin/BDNF	Pas de résultats significatifs	Concentrations de NSE, BDNF et S100B * Ratio Progranulin/BDNF * <i>différencient les CTR des patients atteints de la MA au stade léger seulement</i>

Cette différence de profil de marqueurs suivant l'évolution de la MA peut également être illustrée sur les graphiques ci-dessous (Figure 32).

Ainsi, nous indiquons qu'il faut utiliser un panel de biomarqueurs différent entre chaque stade pour augmenter la puissance de diagnostic.

De plus, l'analyse des protéines du tableau 12, révèle que les protéines perturbées dans le sang des patients atteints de la MA sont des protéines impliquées dans de nombreux processus biologiques comme l'inflammation et le métabolisme. Peu de ces protéines sont d'origine neuronale et peu d'entre elles reflètent une altération du SNC. Peu d'étude s'intéressent aux désordres périphériques et leur lien avec les données cliniques comme les tests cognitifs. Ainsi, nos travaux viennent conforter l'idée que les biomarqueurs périphériques reflétant un désordre périphérique peuvent être utilisés dans le diagnostic de la MA et peuvent être associés au déclin cognitif.

A)



B)

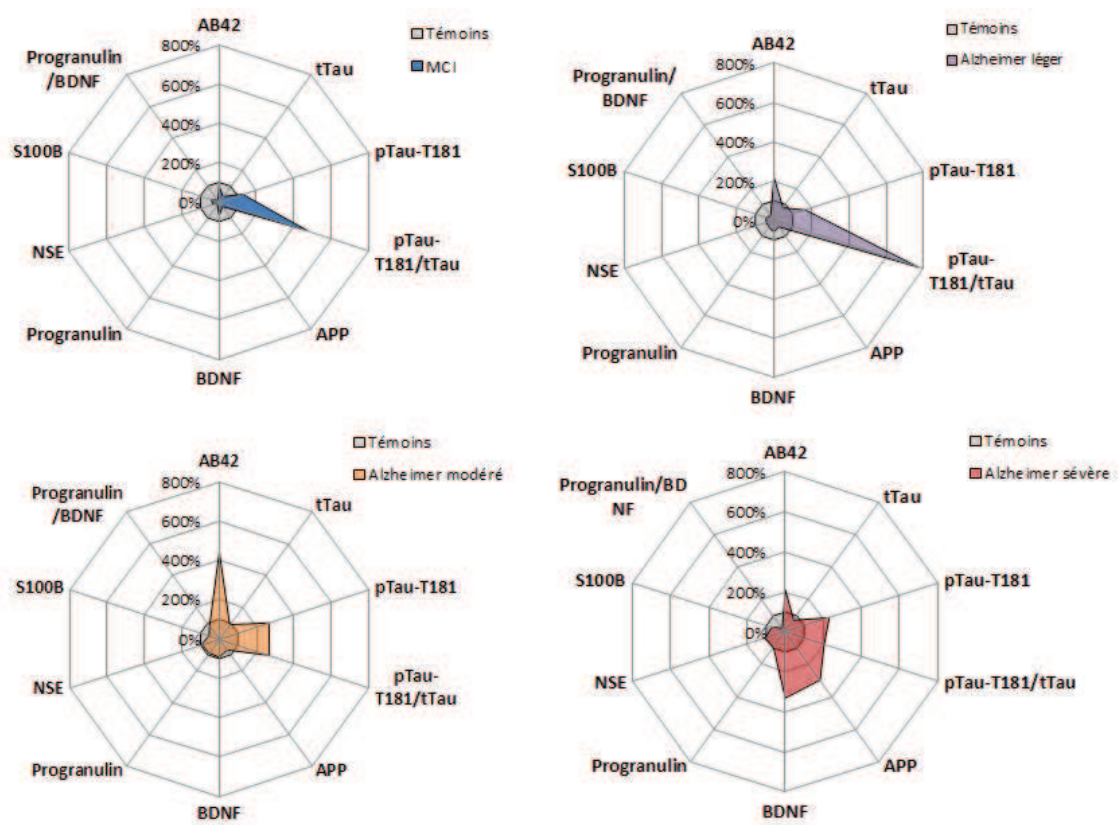


Figure 32 : Illustration en toile d'araignée des variations du niveau des marqueurs étudiés dans cette étude (A-objectif 1, marqueurs reliés au stress oxydatif et B-objectif 2 et 3, marqueurs mesurés dans les pEVs). Le niveau des marqueurs pour chaque groupe de patients est exprimé en pourcentage par rapport aux sujets contrôles (fixé à 100%).

Les limites de l'étude résident essentiellement dans le nombre d'échantillons. Nous avons effectivement peu de patients par groupes : 24 sujets contrôles et 71 patients classés dans 4 stades différents pour l'objectif 1 ; 12 sujets contrôles et 48 patients aux différents stades pour l'objectif 2 et 3. Le nombre d'échantillons a été pris en compte dans les analyses statistiques mais d'autres études sont nécessaires pour confirmer ces résultats. L'autre limite réside dans la phase pré analytique. Nous étions dépendant de l'étude clinique de Sherbrooke et nous n'avons pas pu fixer certains paramètres de façon optimale pour nos études. L'utilisation d'un mélange de metaphosphoric acid, butylhydroxy-toluene (BHT) and N-ethylmaleimide aurait pu prévenir l'oxydation spontanée de l'échantillon pour l'étude du stress oxydatif. De plus, pour les études sur les pEVs, le temps de stockage au -80°C pourrait également influencer l'intégrité des EVs et l'utilisation de l'héparine peu rendre plus difficile l'isolation de ceux-ci. C'est pourquoi les études nécessite d'être reproduite sur des cohortes plus importantes dans des conditions optimales pour chaque objectif.

6.3. Le statut redox périphérique comme biomarqueurs et comme cible de prévention ou de traitement?

Dans le contexte de diagnostic, un des défis actuels est de trouver des biomarqueurs périphériques reflétant une altération pathologique au niveau central. Pour se faire les recherches en cours évaluent les marqueurs de certains mécanismes impliqués dans la MA comme nouveaux biomarqueurs. Les recherches récentes s'intéressent aux marqueurs plasmatiques qui indiquent une neuroinflammation, des lésions neuronales ou encore de la plasticité synaptique.

Le stress oxydatif plasmatique comme biomarqueur de la MA ou des démences ?

Cette étude a mis en évidence la présence du stress oxydatif périphérique de différentes façon dans le plasma de sujets MCI et de patients atteints de la MA à

différents stades. Nous avons mis en évidence une faiblesse antioxydante plasmatique face à l' H_2O_2 chez les patients MCI. Ceci entraîne plus tard, au stade de démence, l'accumulation de produits d'oxydation comme les protéines carbonylées et la réponse de protéines chaperonnes ou protectrices (ApoJ et Klotho). Cette étude est la première à montrer que l'activité du protéasome circulant 20S, responsable de la dégradation des protéines oxydées, est diminuée en parallèle de l'augmentation des protéines carbonylées. Enfin, les résultats démontrent une association entre les marqueurs de stress oxydatif et les résultats aux deux tests cognitifs (MMSE et MoCA). Ces corrélations renforcent le lien entre le stress oxydatif et la MA. Cependant il faut rester prudent quant à l'utilisation seule des biomarqueurs du stress oxydatif pour distinguer les patients MCI et les patients atteints de la MA. En effet, la présence du stress oxydatif périphérique pourrait correspondre à un état pathologique relié à différents désordres métaboliques et pourrait également être présents dans d'autres maladies. De plus, d'autres études ont révélé la présence du stress oxydatif périphérique dans d'autres maladies comme les démences ou les maladies métaboliques (Tableau 14). C'est le cas de la maladie de Parkinson et de la démence vasculaire. Serra et son équipe montre que malgré la présence du stress oxydatif dans les trois types de démences (MA, maladie de Parkinson et démence vasculaire), celui-ci pourrait différer en termes d'ERO, d'ERN et de mécanismes oxydatifs impliqués. Ces mécanismes pourraient représenter une caractéristique de chaque maladie et pourraient ainsi différencier les différentes démences (Serra, Dominguez et al. 2001, Dildar, Sinem et al. 2010). Dans les études sur la démence vasculaire ou sur la maladie de Parkinson, peu d'études s'intéressent au lien entre les marqueurs systémiques du stress oxydatif et les données cliniques. Le peu d'études d'association concernent l'analyse de corrélation entre les marqueurs et la sévérité de la maladie mais celles-ci restent controversées.

Tableau 14 : Analyse du statut oxydatif plasmatique d'autres démences

Les maladies	Les marqueurs du stress oxydatif plasmatique ou sérique	références
La maladie de Parkinson	↑ Activité de la SOD ou ↓ activité de la SOD ou pas de différences (résultats controversés) ≈ activité de la CAT mais ↓ au stade sévère de la maladie ≈ du niveau de glutathion total mais ↓ glutathion oxydé ↑ Lipides peroxydés (TBARS et MDA) ≈ F2-Isoprostanes ≈ Capacité antioxydante périphérique ou certaine étude ↓ de la capacité antioxydante ↑ acide nitrique (NO)	(Kilinc, Yalcin et al. 1988, Kalra, Rajput et al. 1992, Molina, Jimenez-Jimenez et al. 1992, Foy, Passmore et al. 1999, Ihara, Chuda et al. 1999, Ilic, Jovanovic et al. 1999, Kocaturk, Akbostanci et al. 2000, Serra, Dominguez et al. 2001, Sofic, Rustembegovic et al. 2002, Sudha, Rao et al. 2003, Forte, Alimonti et al. 2005, Agil, Duran et al. 2006, Irizarry, Yao et al. 2007, Younes-Mhenni, Frih-Ayed et al. 2007, Yuan, Tong et al. 2016)
La démence vasculaire	↑ Activité de la SOD ↓ activité de la CAT ou ≈ ↑ Glutathion ≈ GPX ↓ Capacité antioxydante plasmatique	(de Lustig, Serra et al. 1993, Famulari, Marschoff et al. 1996, Serra, Dominguez et al. 2001, Serra, Marschoff et al. 2004, Serra, Dominguez et al. 2009)
La démence frontotemporal	Reste à déterminer	Pas d'études à l'heure actuelle

Finalement, les marqueurs du stress oxydatif pourront différencier les sujets MCI et les patients atteints de la MA des autres démences à condition d'être combinés avec d'autres marqueurs et d'être associés aux données cliniques et à condition de prendre en compte la cinétique du stress oxydatif. En effet, les biomarqueurs utiles au début de la maladie ne le sont plus dans les phases tardives (Tableau 13).

Le stress oxydatif périphérique comme cible de prévention du déclin cognitif et du développement des démences ?

La présence du stress oxydatif au niveau central et au niveau périphérique au cours du développement de la MA indique qu'il pourrait représenter une cible potentielle pour la prévention du développement de la maladie. Dans ce domaine, quelques études se sont intéressées à l'effet de la diète et plus particulièrement de l'utilisation de suppléments antioxydants sur le niveau du stress oxydatif plasmatique (Prior, Gu et al. 2007). Différentes stratégies sont capables d'augmenter la capacité antioxydante plasmatique. La consommation importante de fruits et légumes augmente la capacité antioxydante totale plasmatique dans différentes études (Serafini, Bellocco et al. 2002, Harasym and Oledzki 2014). L'augmentation de la capacité antioxydante totale s'expliquerait par l'élévation du niveau plasmatique des polyphénols, de l' α -tocophérol et d'autres caroténoïdes comme la lutéine, l' α -carotène, la β -carotène après la consommation de fruits et légumes (Yeum, Booth et al. 1996, Cao, Booth et al. 1998, Harasym and Oledzki 2014). Récemment, Duthie et al révèlent qu'un apport important de fruits et légumes (8 portions) pendant 12 semaines augmentent de manière significative le taux plasmatique de vitamine C (35%), d'acide folique (15%) et de différents caroténoïdes comme l' α -carotène (50%), la β -carotène (70%) et la lutéine (70%) (Duthie, Duthie et al. 2018). La consommation d'aliments riches en antioxydants ou l'utilisation de suppléments antioxydants engendre également une augmentation du statut antioxydant périphérique selon différentes équipes (Chao, Yuan et al. 2002, Mazza, Kay et al. 2002, Tabet, Mantle et al. 2002, Jacob, Spinozzi et al. 2003, Koren, Kohen et al. 2010). De ce fait, des recherches ont investigué l'effet de la consommation d'une alimentation riche en antioxydants sur les fonctions cognitives. La consommation d'aliments riches en antioxydants et l'utilisation de suppléments antioxydants seraient corrélées à des meilleurs scores aux tests cognitifs (Morris, Evans et al. 2002, Kang, Ascherio et al. 2005, Morris, Evans et al. 2006, Franzke, Schober-Halper et al. 2018). D'autres études ne révèlent pas d'association entre la performance cognitives et la concentration d'antioxydants plasmatiques (Engelhart, Ruitenbergh et al. 2005, Devore, Kang et al. 2010). Pourtant, il est maintenant bien établi que la diète méditerranéenne, riche en polyphénols, peut prévenir le déclin cognitif et diminuer le risque de développer une

démence (Singh, Parsaik et al. 2014, Pelletier, Barul et al. 2015, Petersson and Philippou 2016). L'augmentation du statut antioxydant plasmatique peut également diminuer les facteurs de risque de la MA comme le diabète, le syndrome métabolique et les maladies cardiovasculaires et ainsi contribuer à la prévention de la MA (Puchau, Zulet et al. 2010, Hermsdorff, Puchau et al. 2011, Rautiainen, Larsson et al. 2012, Rautiainen, Levitan et al. 2012, Okubo, Syddall et al. 2014, Mancini, Affret et al. 2018).

Le stress oxydatif périphérique comme cible thérapeutique de la MA?

Les précédentes études révèlent le potentiel du statut antioxydant dans la prévention du déclin cognitif et amène à se demander si le stress oxydatif pourrait représenter une cible thérapeutique pour la MA. Fait intéressant, les traitements actuels, permettant d'atténuer les symptômes, comme la mémantine et les inhibiteurs de l'acétylcholine estérase engendrent une diminution du stress oxydatif plasmatique (Sinem, Dildar et al. 2010). Cette observation a été confirmée par Klugman et ses collègues (Klugman, Naughton et al. 2012). Notre laboratoire a démontré avec plusieurs études *in vitro* que l'utilisation de polyphénols comme la curcumine ou une formulation à base de quatre anthocyanines engendrait une neuroprotection vis-à-vis de l'acroléine, capable de reproduire les altérations retrouvés dans la MA (Doggui, Sahni et al. 2012, Doggui, Belkacemi et al. 2013, Huang, Jin et al. 2013, Belkacemi and Ramassamy 2016). De plus le mélange d'anthocyanines pouvait prévenir la toxicité induite par l'A β via leurs propriétés antioxydantes, l'inhibition de l'agrégation de l'A β et de l'hyperphosphorylation de la protéine Tau et l'induction du facteur de transcription Nrf2 (Belkacemi and Ramassamy 2015). Enfin ils ont également démontré l'effet neuroprotecteur de polyphénols de l'huile d'olive, face à la toxicité de l'A β via la voie de signalisation de NF κ B (St-Laurent-Thibault, Arseneault et al. 2011). Avec toutes ses propriétés *in vivo* et *in vitro*, les antioxydants constituent un agent prometteur quant à une future application préventive ou dans le but de ralentir la progression de la MA. Cependant durant ces dernières années les essais cliniques utilisant cette approche ont également échoué. La supplémentation en vitamines (E, C), en Coenzyme Q10 ou encore en sélénium n'a pas montré d'amélioration dans les fonctions cognitives (Tolonen, Halme et al. 1985, Arlt, Muller-Thomsen et al. 2012, Farina, Isaac et al. 2012, Galasko, Peskind et al. 2012, Kryscio, Abner et al. 2013). Certains polyphénols ont également fait l'objet d'essai

clinique mais leur efficacité n'a pas été mise en évidence. La supplémentation de 1g ou 4g de curcumine pendant 6 mois n'a pas révélé de différences au niveau du score au MMSE, du niveau sérique d'A β 40 ou de la concentration d'isoprostanes dans le plasma des sujets avec ou sans supplémentation (Baum, Lam et al. 2008). Une autre plus longue étude confirme ces résultats en mesurant les biomarqueurs classiques du LCR (Ringman, Frautschy et al. 2012). Les explications de ces échecs sont nombreuses et certaines sont les mêmes que pour les échecs concernant les autres molécules visant Tau ou l'A β . Le traitement intervient trop tard dans le *continuum* de la MA. De plus, peu de ces essais cliniques ont pris en considération le passage des molécules antioxydantes testées à travers la BBB. En effet, dans le cadre des maladies neurodégénératives, les molécules doivent avoir la capacité de passer la BBB en concentration suffisante pour agir au niveau du SNC (Spector and Johanson 2007, Yang, Lin et al. 2007). Le statut antioxydant de la personne n'est également pas pris en compte lors des essais. L'efficacité du traitement pourrait agir moins efficacement chez les personnes présentant un bon statut redox et ainsi masquer l'efficacité de l'approche antioxydante. Ce problème révèle l'importance d'avoir des biomarqueurs fiables pour la mesure du stress oxydatif périphérique en clinique.

Dans ce contexte, nos résultats confirment l'utilité de la mesure de la capacité antioxydante plasmatique. En effet, il pourrait représenter un biomarqueur pour mesurer rapidement le statut antioxydant de la personne afin de définir l'utilité des moyens de prévention et de traitements via les antioxydants.

6.1. L'avenir des vésicules extracellulaires dans le domaine du diagnostic des maladies neuronales

L'intérêt de leur utilisation : protection des biomarqueurs en circulation

L'autre défi majeur dans l'identification de nouveaux biomarqueurs plasmatiques est la complexité de la matrice plasmatique. Les marqueurs potentiels peuvent se trouver dilués (par rapport au LCR ou au cerveau), dégradés par des protéases ou encore être éliminés par le foie ou la filtration rénale. Ces processus physiologiques compliquent la recherche de nouveaux biomarqueurs et font peut-être passer à côté de certains

composés intéressants. Dans ce contexte, l'utilisation des pEVs pourraient représenter une alternative intéressante. En effet, nos résultats mettent en évidence que les molécules d'intérêt étaient retrouvées en plus forte concentration dans les pEVs par rapport au plasma (article 2 Fig.5.). Ceci suggère que l'utilisation des pEVs permettrait d'amplifier la détection des biomarqueurs jusqu'à lors inaccessible dans le plasma ou d'augmenter la sensibilité de détection. Les pEVs représentent une sorte de protection pour les biomarqueurs face à la dégradation plasmatique des protéases et du rein. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour évaluer le catabolisme des EV que ce soit dans les tissus ou dans la circulation sanguine.

Dans les travaux de cette thèse, nous avons mis en évidence la variation de certains marqueurs pathologiques et certains marqueurs d'altération neuronale rencontrés au cours de la MA dans les pEVs des sujets MCI et des patients atteints de la MA. Ces résultats suggèrent que le contenu des pEVs représente un potentiel important dans le diagnostic de la MA et du stade MCI. Le dosage de molécules d'origine neuronale dans les pEVs permet de faire un lien avec les altérations retrouvées au niveau central.

Étude du stress oxydatif dans les EVs

Il y a encore peu d'études qui se sont intéressées aux marqueurs du stress oxydatif dans les EVs (Szabó-Taylor, Ryan et al. 2015). Par contre il est clairement démontré *in vitro* que l'exposition de cellules à des conditions pro-inflammatoires ou pro-oxydantes augmente la libération des EVs et modifie leur composition (Larson, Hillery et al. 2014, Ayers, Nieuwland et al. 2015, Carver and Yang 2016). D'autres études sont nécessaires pour savoir si c'est un mécanisme de protection pour la cellule ou un mécanisme pathologique. Eldh et al. ont mis en évidence que les EVs libérées par des cellules exposées au stress oxydatif peuvent transmettre des ARNm aux autres cellules afin de les rendre plus résistantes aux processus oxydatifs (Eldh, Ekström et al. 2010). Récemment l'équipe de Sanchez a également révélé des résultats qui vont dans ce sens. En effet, ils révèlent que les EVs libérées par les astrocytes peuvent aider les cellules neuronales à résister à un stress oxydatif induit par du paraquat (Pascua-Maestro, González et al. 2019). Les EVs pourraient donc contenir des ARNm ou des protéines spécifiques pour lutter contre un stress oxydant. Pascua-Maestro et son

équipe démontrent que l'ApoD, présente en grande quantité dans les EVs des astrocytes, favorise la protection des neurones face au paraquat. En effet, les EVs dépourvues d'ApoD protègent partiellement les neurones d'un stress oxydatif.

Au vu de ces études, il serait également intéressant d'investiguer le contenu des EVs face à un stress oxydatif. Dans notre cas, il serait intéressant d'analyser le niveau des marqueurs de stress oxydatif dans les pEVs des patients MCI et atteints de la MA. C'est pourquoi, nous avons commencé à doser les protéines carbonylées et l'ApoD dans les pEVs des différents groupes. Ces résultats sont des résultats préliminaires (n=6/groupe) et seront complétés par la suite (Figure 33).

Nos résultats préliminaires indiquent une augmentation du niveau des protéines carbonylées dans les pEVs des patients atteints de la MA au stade modéré et sévère par rapport aux sujets contrôles. Pour rappel, dans le plasma, nous avons démontré que le niveau des protéines carbonylées étaient augmenté à partir du stade léger de la MA. Le contenu des pEVs en protéines oxydées serait donc affecté plus tardivement dans la MA par rapport au plasma. Le niveau d'ApoD dans les différents stades de la maladie diffère également entre le plasma et les EVs plasmatiques. En effet, nos résultats préliminaires démontrent que le niveau d'ApoD augmente significativement dans les EVs du plasma des sujets MCI par rapport aux sujets contrôles mais pas au stade de démence. Dans le plasma, nous n'avons pas trouvé de différences significatives dans le niveau d'apoD entre les différents groupes. Ces résultats sont en cohérence avec les travaux de Pascua-Maestro et al. et indique que l'ApoD contenu dans les EVs pourrait avoir un rôle de protection au début de la maladie lorsque le stress oxydatif s'installe progressivement. Des études approfondies sur le rôle du contenu des EVs et de l'ApoD lors d'un stress oxydatif ou lors de la MA (*in vivo*) sont à envisager.

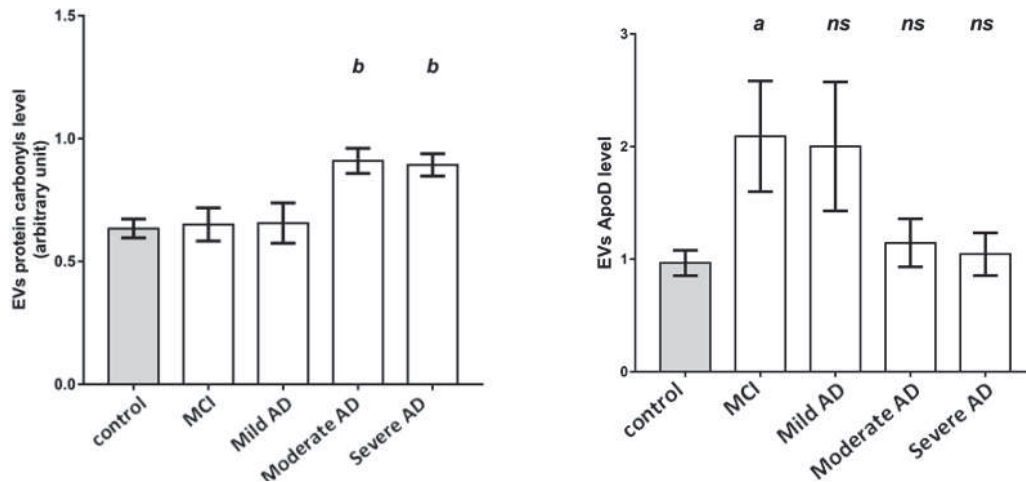


Figure 33 : Mesure du niveau des protéines carbonylées (à gauche) et de l'ApoD (à droite) dans les pEVs des sujets contrôles, MCI et des patients atteints de la MA aux différents stades (n=6/groupe).

Les études actuelles : l'utilisation des pEVs d'origine neuronale et ses limites

Depuis 2014, plusieurs équipes ont réalisé des travaux dans ce domaine. L'équipe de Goetzl est très impliquée dans la recherche de nouveaux biomarqueurs depuis la mise en place d'une technique immunologique qui capture les pEVS provenant du cerveau (Shi, Liu et al. 2014, Fiandaca, Kapogiannis et al. 2015, Goetzl, Mustapic et al. 2016). Cette technique est basée sur une précipitation des pEVs suivie d'une immunocapture à l'aide d'anticorps dirigés contre L1CAM (Neural cell adhesion molecule L1) ou GLAST (Glutamate aspartate transporter) pour récupérer des pEVs d'origine neuronale et astrocytaire, respectivement (Mustapic, Eitan et al. 2017).

Les travaux effectués dans le domaine des vésicules extracellulaires pour le diagnostic des maladies neurodégénératives ont été répertoriés dans le Tableau 15. Toutes les études sans exception se sont intéressées au contenu des pEVs d'origine cérébrale. Nous sommes les premiers à s'intéresser aux pEVs totales. Ces études ont été réalisées sur le plasma de sujets précliniques ou MCI et chez des patients atteints du syndrome de Down, de la MA, de la démence frontotemporale (DFT) ou encore la maladie de Parkinson. Les études ont révélé des variations de certaines protéines pathogéniques (A β , Tau et l' α -synucléine), de certains facteurs inflammatoires et métaboliques ou encore certaines protéines impliquées dans le maintien des fonctions neuronales (facteurs neurotrophiques, protéines synaptiques, protéines lysosomales,

...). Ces résultats révèlent l'utilité des pEVs dans le domaine des maladies neurodégénératives. Cependant il faut être prudent avec la technique mise en place. Selon Goetzl, leur technique permettrait d'isoler 9% de pEVs d'origine neuronales à partir des pEVs totales (Mustapic, Eitan et al. 2017). Pourtant, les quantités de certaines protéines (A β , tTau et pTau-T181) retrouvées dans les pEVs d'origine neuronale sont plus élevées que leurs quantités retrouvées dans les pEVs totales (article 2 et 3). Guix et son équipe ont utilisé la technique SIMOA pour doser la protéine Tau car les techniques d'ELISA classique ne permettaient pas de la détecter dans les pEV neuronales (Guix, Corbett et al. 2018). Ceci pourrait révéler la contamination de l'isolation de Goetzl et al. De plus, l'utilisation de L1CAM peut être remis en cause car celui-ci n'est pas spécifique des cellules neuronales. En effet, on peut le retrouver dans les cellules de la peau, dans les tissus épithéliaux du rein ou dans certains cancers (Allory, Audard et al. 2008, Weledji and Assob 2014, Markovic-Lipkovski, Zivotic et al. 2015, Gschwandtner, Paulitschke et al. 2017, Corrado, Laquintana et al. 2018). L'utilisation de cette technique peut donc entraîner des biais dans l'isolation et dans l'interprétation des résultats. Enfin, la plupart de ces études utilise la normalisation vis-à-vis du marqueur vésiculaire CD81. Or, ce marqueur n'est pas présent dans toutes les sous-populations d'EVs (Tkach, Kowal et al. 2018) et entraîne un second biais analytique.

L'avantage de notre technique d'isolation des pEVs totales est qu'elle n'engendre pas de biais vis-à-vis d'une population particulière d'EVs ou d'un tissu en particulier (normalisation avec les protéines totales).

Par contre, il en convient que pour profiter du potentiel des pEVs dans le domaine du diagnostic il est nécessaire de trouver des technique d'isolation, de comptage (TEM, nanosight ou mini-cytomètre) et de normalisation universelle (Vestad, Llorente et al. 2017). Au même titre que les biomarqueurs plasmatiques, les facteurs pré-analytiques sont également à prendre en compte.

Le passage des EVs à travers la barrière hémato encéphalique

Différentes équipes ont indiqué le passage des EVs à travers la BHE dans les deux sens (Lakhal and Wood 2011, Grapp, Wrede et al. 2013, Takahashi, Nishikawa et al.

2013, Morishita, Takahashi et al. 2015, Choi and Lee 2016, Matsumoto, Stewart et al. 2017). Ces études sont à confirmer et le mécanisme de passage reste à être élucidé. Des études sur des modèles mimant la BHE sont nécessaires.

Ce passage à travers la BHE indique que les EVs pourraient avoir un rôle à jouer dans la communication entre la périphérie et le cerveau. Elles pourraient également être impliquées dans le développement de la pathologie ou dans la propagation de la pathologie du cerveau vers la périphérie et inversement.

Nos travaux révèlent l'utilité de l'utilisation de EVs pour le diagnostic de la MA et plus particulièrement pour la détection du stade MCI. En effet, nous avons montré que le ratio de tTau/pTau-T181 et les concentrations de l'APP, de la NSE, de la progranuline et du S100B dans les pEVs totales permettent de distinguer les participants témoins des sujets MCI. Par contre nous montrons que le dosage de l'A β 40 ou A β 42 dans les pEVs totales n'apporte d'intérêt particulier dans le diagnostic de la MA ou du stade MCI.

Tableau 15 : Résumé des travaux effectués dans le domaine des vésicules extracellulaires pour le diagnostic des maladies neurodégénératives.

Références	Technique utilisée et normalisation	Participants	résultats
(Shi, Liu et al. 2014)	pEV « d'origine neuronale » Immunocapture CD63 puis immunocapture L1CAM Dosage au Luminex	MP (n=267) CTR (n=215)	↑ α-synuclein (MP vs CTR)
(Fiandaca, Kapogiannis et al. 2015)	pEV « d'origine neuronale » Précipitation (<i>ExoQuick exosome precipitation solution</i>) + Immunoprécipitation (anti-L1CAM) Dosage ELISA Normalisation avec CD81	MA (n=57) vs CTR (n=57) DFT (n = 16) vs CTR (n=16) Préclinique MA (pré-MA) (n=24)	↑ tTau ,pTau-T181, pTau-S396 et Aβ42 (MA vs CTR) ↑pTau-T181 et Aβ42 (FTD vs MA) ↑pTau-T181, pTau-S396 et Aβ42 (pré-MA versus CTR)
(Goetzl, Mustapic et al. 2016)	pEV « d'origine neuronale et astrocytaire» Précipitation (<i>ExoQuick exosome precipitation solution</i>) + Immunoprécipitations (anti-L1CAM ; neurones) et (anti-GLAST : astrocytes) Dosage ELISA Normalisation avec CD81	MCI+MA(n=12) vs CTR (n=10) DFT (n=14) vs CTR (n=10)	Exosomes d'origine neuronale : ↑ sAPPβ et sAPPα (AD vs CTR) ↑ pTau-T181, pTau-S396 et Aβ42 (AD vs CTR) Exosomes d'origine astrocytaire : ↑ BACE-1 et sAPPβ (AD vs CTR) ↓ Aβ42 (AD vs CTR) ↓ GDNF et septin-8 (AD vs CTR) ↓ sAPPα (DFT vs CTR)
(Hamlett, Goetzl et al. 2017)	pEV « d'origine neuronale » Précipitation (<i>ExoQuick exosome precipitation solution</i>) + Immunoprécipitation (anti-L1CAM) Dosage ELISA Normalisation avec CD81	Syndrome de Down jeunes (n=14) Syndrome de Down adulte (n=33) CTR jeunes (n=9) CTR adultes (n=28)	↑ tTau ,pTau-T181, pTau-S396 et Aβ42 (Syndrome de Down vs CTR) Pas d'effet d'âge ni de sexe
(Shi, Kovac et al. 2016)	pEV « d'origine neuronale » Précipitation (<i>ExoQuick exosome precipitation solution</i>) + Immunoprécipitation (anti-L1CAM) Dosage SIMOA Normalisation ?? pas mentionnée	MA (n=106) MP (=91) CTR (n=106)	↑ tTau (MP vs MA) ≈ tTau (MA vs CTR)

(Guix, Corbett et al. 2018)	<p>pEV « d'origine neuronale » Précipitation (<i>ExoQuick exosome precipitation solution</i>) + Immunoprécipitation (anti-L1CAM) ELISA (tTau et pTau-T181) et SIMOA (tTau) Normalisation avec CD81 et d'autres méthodes (non montrées)</p>	<p>MCI (n=10) MA (n=20) CTR (=10)</p>	<p>≈ tTau (MA vs CTR et MCI vs CTR) ≈ pTau-T181 (MA vs CTR et MCI vs CTR)</p>
(Goetzl, Kapogiannis et al. 2016)	<p>pEV « d'origine neuronale » Précipitation (<i>ExoQuick exosome precipitation solution</i>) + Immunoprécipitation (anti-L1CAM) Dosage ELISA Normalisation avec CD81</p>	<p>MA (n= 12) CTR (n=12) DFT (n= 16) CTR (n= 16)</p> <p>+ Précliniques : Pré-AD t1 (n=9) AD t2 (n=9) +CTR Pré-DF t1 (n=10) DFT t2 (n=10) +CTR <i>t1=cognition intacte ou MCI</i> <i>t2 = diagnostic de démence (1-10 ans)</i></p>	<p>↓ synaptotagmin, synaptopodin et phospho synapsin 1-S9 (MA et DFT vs CTR) ↓ synaptophysin et neurogranin (MA et DFT vs CTR) + forte diminution chez les MA ↓GAP43 et Synapsin 1 (MA vs CTR) Préclinique : ↓ Synaptotagmin, synaptopodin, synaptophysin et neurogranin (pré-AD t1 vs AD t2) ↓ synaptopodin et GAP43 (pré-DFT t1 vs DFT t2) Corrélation entre synaptopodin, Synaptotagmin et synaptophysin avec les scores MMSE et ADAS-cog</p>
(Kapogiannis, Boxer et al. 2015)	<p>pEV « d'origine neuronale » Précipitation (<i>ExoQuick exosome precipitation solution</i>) + Immunoprécipitation (anti-L1CAM) Dosage ELISA Normalisation avec CD81</p>	<p>MA (n= 26, mélange de 16MCI et 10MA) CTR (n=26) DFT (n= 16) CTR (n= 16)</p> <p>+ Précliniques : Pré-AD t1 (n=9) AD t2 (n=9) +CTR <i>t1=cognition intacte ou MCI</i> <i>t2 = diagnostic de démence (1-10 ans)</i></p>	<p>≈ total insulin receptor substrate (IRS)-1 (toutes les populations) ↓phospho-pan-tyrosine-IRS-1 (MA vs CTR) ↑phospho-serine 312-IRS-1 (MA et DFT vs CTR) ↑ index de résistance à l'insuline (MA vs CTR) Préclinique : ↓phospho-pan-tyrosine-IRS-1 , ↑ phospho-serine 312-IRS-1 et ↑ index de résistance à l'insuline (pré-AD t1 vs AD t2)</p>
(Goetzl, Boxer et al. 2015)	<p>pEV « d'origine neuronale » Précipitation (<i>ExoQuick exosome precipitation solution</i>) + Immunoprécipitation (anti-L1CAM) Dosage ELISA Normalisation avec CD81</p>	<p>MA (n= 26, mélange de 18MCI et 8MA) CTR (n=26) DFT (n= 16) CTR (n= 16) Pré-AD t1 (n=20) AD t2 (n=20) +CTR <i>t1=cognition intacte ou MCI</i> <i>t2 = diagnostic de démence (1-10 ans)</i></p>	<p>↑ cathepsin D (MA et DFT vs CTR) ↑ LAMP1 et Ubiquitin (MA vs CTR) ↓ HSP70 (MA et DFT vs CTR) ↓ Ubiquitin (MA vs MCI) Préclinique : aucunes différences</p>

(Goetzl, Abner et al. 2018)	<p>pEV « d'origine neuronale » Précipitation (<i>ExoQuick exosome precipitation solution</i>) + Immunoprécipitation (anti-L1CAM)</p> <p>Dosage ELISA Normalisation avec CD81</p>	<p>MA (n= 28, mélange MCI+MA) CTR (n=28) Pré-ADt1 (n=18) ADt2 (n=18) + CTR (n=18) <i>t1=cognition intact ou MCI</i> <i>t2 = diagnostic de démence (1-10 ans)</i></p>	<p>↓ AMPA4 (glutamate receptor, ionotropic) (MA vs CTR) ↓ NPTX2 (pentraxin-2), NLGN1 (Neurologin-1) et ↓ NRXN2α (α-neurexin II) (MA vs CTR)</p> <p>Préclinique : ↓ AMPA4, NPTX2, NLGN1 et NRXN2α (pré-AD t1 vs AD t2)</p>
(Goetzl, Schwartz et al. 2018)	<p>pEV « d'origine astrocytaire» Précipitation (<i>ExoQuick exosome precipitation solution</i>) + Immunoprécipitations anti- GLAST</p> <p>Dosage ELISA Normalisation avec CD81</p>	<p>MA (n= 28, mélange MCI+MA) CTR (n=28) Pré-AD t1 (n=16) AD t2 (n=16) +CTR <i>t1=cognition intacte ou MCI</i> <i>t2 = diagnostic de démence (5-12 ans)</i></p>	<p>↑ des éléments du complément C1q, C4b, C3d, factor B, factor D, Bb, C3b etC5b-C9 (MA vs CTR) ↑ interleukin (IL)-6, TNF-α et IL-1β (MA vs CTR)</p> <p>↓ des protéines de régulation du complément (MA vs CTR)</p> <p>Préclinique : ↑ des éléments du complément C4b, C3d et b, Factor B et Bb, C5b-C9, ↓ des protéines de régulation du complément CD59, DAF (pré-AD t1 vs AD t2)</p>

Légende : DFT (démence frontotemporale)et MP (maladie de Parkinson)

6.2. La maladie d'Alzheimer : une maladie centrale ou périphérique ?

Pendant plusieurs années, la MA a été considérée comme une maladie limitée au cerveau. Cependant, les résultats de cette thèse renforcent les études montrant une perturbation métabolique au niveau de la circulation sanguine. De plus en plus d'études révèlent la présence du stress oxydatif, de désordres métaboliques et de l'inflammation systémique chez les MCI et au cours de la progression de la MA (Larbi, Pawelec et al. 2009, Leuner, Schulz et al. 2012, Le Page, Bourgade et al. 2015, Le Page, Dupuis et al. 2018), suggérant que des processus pathologiques peuvent coexister dans les tissus cérébraux et non cérébraux. Ceci amène à se demander si ces perturbations systémiques sont la conséquence d'une altération au niveau central ou si ces dommages périphériques peuvent affecter le SNC. Il est encore difficile d'y répondre car il subsiste une incertitude quant à la relation de cause à effet entre ces deux compartiments biologiques mais cette possibilité est à prendre en compte. Les désordres systémiques qui sont observés au cours de la MA sont répertoriés dans la Figure 34.

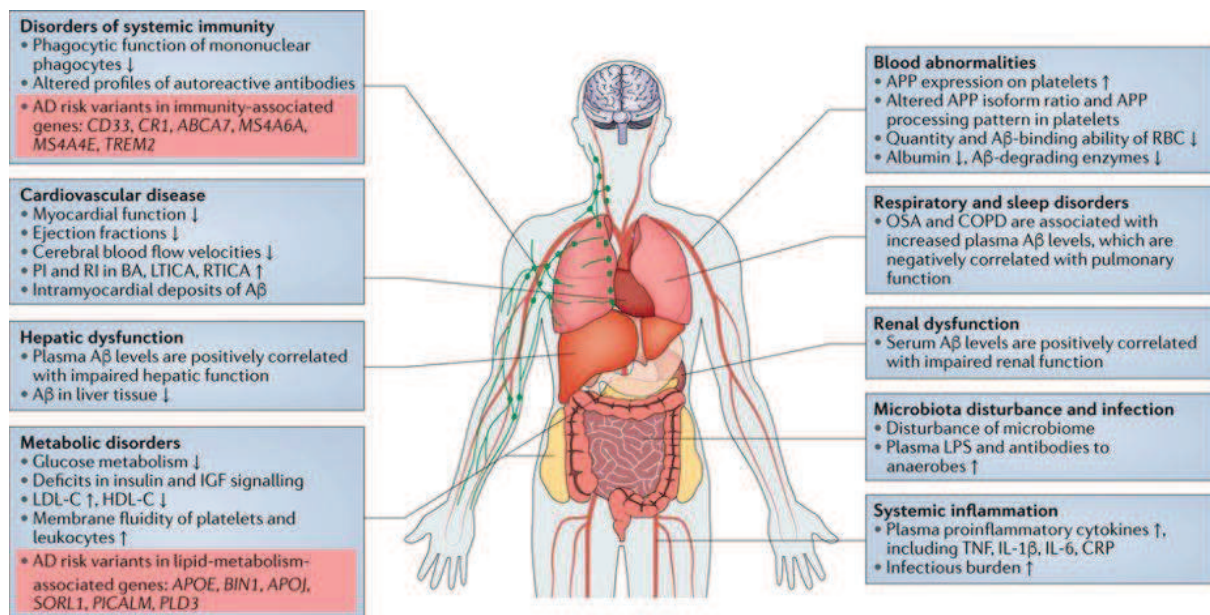


Figure 34 : Différentes anomalies systémiques observées chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Wang, Gu et al. 2017).

Un grand nombre de facteurs de risque et de protection de la MA sont des facteurs indépendants de l'état du SNC comme le diabète, les maladies cardiovasculaires ou encore l'adhésion à la diète méditerranéenne (Scarmeas, Luchsinger et al. 2009, Morris, Vidoni et al. 2014). En d'autres termes, il est possible que ces facteurs de risque puissent contribuer à l'initiation ou à l'exacerbation de la MA. Les processus inflammatoires périphériques pourraient également contribuer à l'atteinte du SNC par la production du TNF- α , des cytokines comme l'IL-1 β ou encore la protéine C-réactive (Tan, Beiser et al. 2007, Holmes, Cunningham et al. 2009, Hu, Holtzman et al. 2012). Cependant, encore une fois, il existe actuellement peu de preuves cliniques indiquant que l'inflammation systémique est une cible efficace pour la prévention ou le traitement de la MA. D'autres facteurs sont impliqués dans les processus centraux et périphériques comme l'ApoE E4 et la dérégulation du transport lipidique, l'agrégation de l'A β ou encore les déficits mitochondriaux de la MA. Ces effets ne sont pas isolés aux neurones, mais se produisent de manière systémique (Joachim, Mori et al. 1989, Parker, Filley et al. 1990, Fukui, Diaz et al. 2007). L'implication des exosomes dans ce domaine n'a pas encore été explorée mais celui-ci devrait également amener des réponses intéressantes quant à la communication entre le cerveau et les tissus périphériques. Pour terminer, des études récentes ont également démontré des liens entre le microbiome intestinal et la maladie d'Alzheimer (Fung, Olson et al. 2017, Vogt, Kerby et al. 2017). En prenant en compte les études sur le sujet, il est encore difficile de répondre à cette question car il subsiste encore une incertitude quant à la relation de cause à effet entre ces deux compartiments biologiques (périphérie/cerveau).

Ainsi, ces preuves élargissent actuellement la vision de la maladie. Nos travaux appuient cette notion de « maladie périphérique » et mettent en avant l'utilisation de biomarqueurs périphériques représentant une altération survenant dans le développement de la MA que ce soit au niveau central ou périphérique. Les techniques pour pouvoir doser des protéines d'origine neuronale dans le plasma manquent de sensibilité et les méthodes d'isolation des pEVs d'origine neuronales entraînent des coûts et un biais technique important. Ainsi, ces résultats révèlent que les biomarqueurs reflétant un désordre métabolique, oxydatif ou inflammatoire ont tout à fait leur place dans le diagnostic de la MA.

6.3. Le futur des biomarqueurs et leur place dans les essais cliniques et la médecine personnalisée

Les biomarqueurs sont indispensables pour le diagnostic des patients au stade précoce de la MA mais ils sont également essentiels dans les essais cliniques. Malgré les nombreux échecs thérapeutiques dans le cas de la MA et un taux d'échec frôlant les 100% (Cummings, Morstorf et al. 2014), l'espoir de pouvoir stopper la maladie à temps ou de prévenir sa formation subsiste et motive de nombreuses équipes de recherche. En effet, en 2018, 112 molécules sont en cours de développement (26 agents dans 35 essais en phase III, 63 agents dans 75 essais en phase II et 23 agents dans 25 essais en phase I) (Cummings, Lee et al. 2018). Les essais en cours sont résumés en annexe VII. L'utilisation des biomarqueurs dans le contexte des essais cliniques présentent de nombreux avantages. Le coût des phases de développement nécessaire à la mise sur le marché de nouveaux traitements ne cessent d'augmenter et les biomarqueurs pourraient réduire la durée et les coûts associés. Les biomarqueurs pourraient permettre de distinguer plus rapidement les composés n'apportant probablement pas d'effet thérapeutique favorable et d'arrêter leur développement afin d'éviter ainsi une perte de temps d'argent. De plus, l'utilisation de biomarqueurs fiables lors des essais cliniques constituerait un moyen d'évaluation supplémentaire pour évaluer la toxicité et l'efficacité des molécules candidates en plus des critères d'évaluations cliniques. Dans le cas des maladies chroniques et progressives comme la MA, ils pourraient également représenter des critères de substitution aux critères d'évaluation clinique actuels nécessitant un long suivi et des coûts importants. Ainsi l'introduction de biomarqueurs valides et fiables au cours des phases cliniques est un des moyens d'améliorer la compréhension du mécanisme d'action des molécules candidates et de distinguer les patients les plus susceptibles d'en bénéficier.

Nos résultats démontrent que certains marqueurs sont intéressants pour différencier les patients MCI des sujets contrôles comme le niveau plasmatique d'ApoJ et Klotho et les

ratios pTau-T181/tTau et BDNF/Progranulin. Ceux-ci pourraient servir pour l'analyse de l'efficacité des essais cliniques chez les sujets MCI. Pour les essais cliniques chez les personnes démentes (stade léger), le niveau des protéines carbonylées et l'activité du protéasome pourront être intéressants à condition d'être combinés à d'autres critères cliniques.

Considérant l'hétérogénéité de la MA, les biomarqueurs pourraient également aider grandement au développement de la médecine personnalisée. Il est maintenant bien établi que les traitements ne réagissent pas avec la même efficacité chez différents patients atteints de la même pathologie. De plus, au vu de l'hétérogénéité des signes cliniques des sujets touchés par la MA, il semble essentiel de trouver des traitements adaptés à chaque sous-population de patients. La médecine personnalisée repose sur des thérapies ciblées et l'utilisation des biomarqueurs est indispensable pour y parvenir. Ainsi, ceci devrait conduire à une meilleure efficacité et/ou à la réduction des effets indésirables. C'est pourquoi la définition des sous-populations de la MA et l'identification d'un panel de biomarqueurs suivant les différents cas cliniques représentent un nouveau défi dans le domaine de la recherche sur la MA. Cette nouvelle approche couplée à un diagnostic précoce permettra d'augmenter le taux d'efficacité des traitements et de limiter le développement de la MA. Certaines études révèlent des différences entre certains groupes de patients mais il y a encore peu d'études sur le sujet (Schneider, Arvanitakis et al. 2007, Qiang, Yau et al. 2017).

Une étude récente confirme la forte hétérogénéité chez les patients atteints de la MA en prenant en compte la structure des fibrilles amyloïdes (Qiang, Yau et al. 2017). Selon Qiang et son équipe, les variations de structures amyloïdes seraient corrélées aux variabilités des caractéristiques cliniques et pathologiques de la MA.

Récemment, l'étude de Boyle parue dans le journal *Annals of Neurology* révèle qu'il est urgent de changer la vision actuelle des maladies neurodégénératives et que la MA serait le résultat d'une maladie mixte. Ces deux visions sont illustrées schématiquement dans la Figure 35. Dans cette étude, ils ont analysé 1000 personnes âgées pendant 22 ans et ont récupéré les données cliniques, les résultats aux tests cognitifs et le cerveau pour des analyses histologiques aux décès des patients afin d'évaluer neuf

neuropathologies liées à l'âge (Boyle, Yu et al. 2018). Cette large étude indique plusieurs résultats intéressants. D'une part, ils ont constaté que la neuropathologie était omniprésente. En effet, presque tous les participants avaient au moins une (94%), au moins deux (78%), au moins trois (58%) ou au moins quatre (35%) neuropathologies liées à l'âge. La MA restait la plus présente au sein des participants (65%) mais elle était rarement isolée (9%). Ils ont mis en évidence plus de 230 combinaisons neuropathologiques différentes et chacune d'elles représentait moins de 6% dans cette population. D'autre part, ils ont également pointé les failles du diagnostic actuel. Sur 35% des personnes qui ne répondaient pas aux critères de la MA pathologique, 21% avaient une démence clinique de type MA au niveau histopathologique et sur 44% des cas de démence de type MA, 17% ne répondaient pas aux critères pathologiques de la MA.

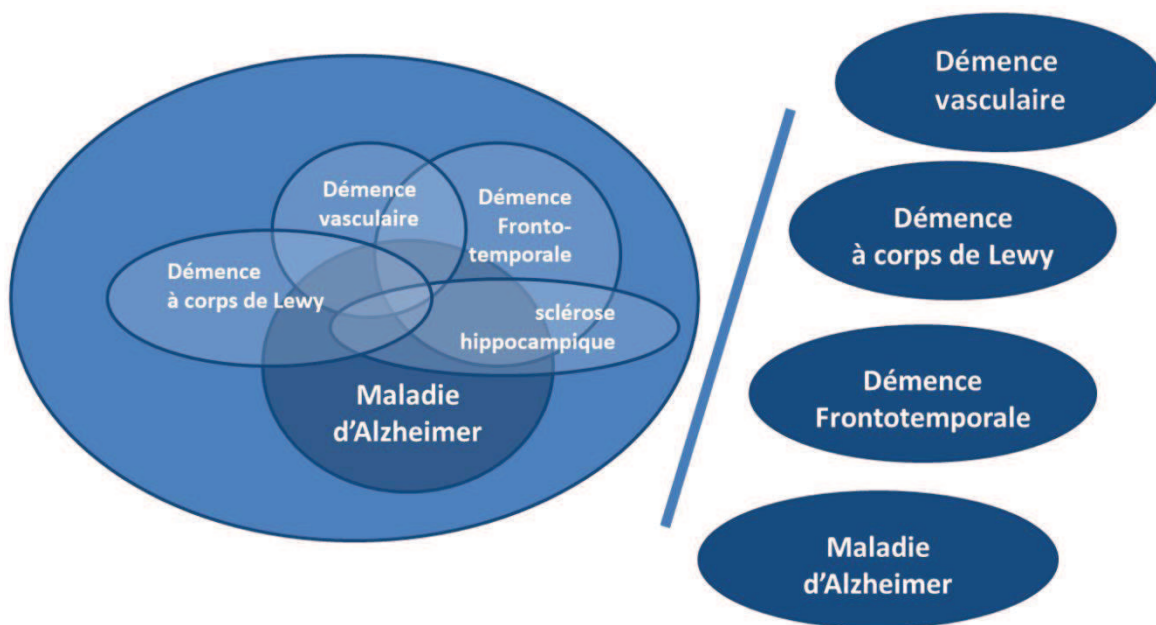


Figure 35 : Représentation de la complexité des maladies neurologiques liées à l'âge et leur coexistence chez un même individu. À gauche la vision de coexistence, à droite la vision des maladies séparées.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'augmentation du taux de réussite des traitements de la MA dépend d'un meilleur développement thérapeutique en prenant en compte la complexité de la maladie. Mais cette réussite thérapeutique est également dépendante de l'utilisation de biomarqueurs fiables et certains pour diagnostiquer les patients aux stades pré-démenciels (précliniques et MCI) et évaluer l'efficacité des essais cliniques.

Dans ce contexte, ce projet s'est intéressé à l'identification de nouveaux biomarqueurs périphériques potentiels pour la détection du stade MCI et l'évaluation de la progression de la maladie à différents stades de la MA.

La première partie de ce travail souligne l'importance et la présence du stress oxydatif périphérique dans le développement et la progression de la MA. Ces altérations de l'homéostasie redox peuvent survenir dès le stade MCI. Le stress oxydatif périphérique chez les patients MCI et chez les sujets atteints de la MA se manifeste selon différentes manières et dans un ordre bien déterminé. Dans un premier temps, le plasma révèle une faiblesse dans sa capacité antioxydante qui résulte par la suite d'une accumulation de protéines oxydées, de protéines chaperonnes et de protéines réponse au stress. Cette étude démontre pour la première fois qu'en parallèle de l'augmentation des protéines oxydées plasmatiques, l'activité du système de dégradation de celles-ci est affaiblie. En effet, l'activité du protéasome 20S circulant a pour la première fois été investiguée dans le domaine de la MA. De plus, nous avons pu mettre en évidence la corrélation entre ces phénomènes périphériques et la performance aux tests d'évaluation de la fonction cognitive globale (MMSE et MoCA). Ce projet ouvre de nombreuses perspectives pour la suite des recherches dans le domaine du stress oxydatif et de la MA que ce soit au niveau des mécanismes pathologiques de la MA ou sur l'approfondissement de l'étude clinique à l'aide de cohortes supplémentaires. La découverte d'une variation de l'activité du protéasome 20S circulant entraîne des réflexions sur son rôle dans la circulation. Ainsi, l'étude de ses cibles, de son origine ou encore de son fonctionnement périphérique mérite d'être élucidée. D'un autre côté, ce travail doit être approfondi à l'aide de cohortes complémentaires. Il serait intéressant d'évaluer le potentiel de diagnostic différentiel de ce panel sur différentes démences

telles que la démence vasculaire, la démence frontotemporale, la démence à corps de Lewy ou encore la maladie de Parkinson qui peuvent parfois être confondues lors du diagnostic. De plus, l'utilisation de plus grandes cohortes pourrait permettre de confirmer nos résultats et de réaliser une étude sur les facteurs de risque en prenant en compte un nombre plus important de paramètres comme le sexe, le génotype de l'ApoE, les antécédents médicaux ou encore la notion de diète et de nutrition. En effet, dans le contexte de l'étude du stress oxydatif, il serait essentiel d'avoir des informations sur la nutrition des participants et leur consommation d'antioxydants. Pour ce faire il est judicieux d'utiliser un questionnaire sur la diète des sujets comme un questionnaire de fréquence de consommation alimentaire et plus particulièrement un questionnaire qui évalue la fréquence de consommation d'aliments antioxydants (Shatenstein, Payette et al. 2003). Enfin, la nécessité d'un diagnostic précoce amène à approfondir l'analyse de ce panel sur une étude longitudinale comprenant des patients précliniques, des sujets MCI stables ou des sujets MCI à risque qui ont évolués vers la démence telles que les cohortes CIMA-Q ou *Canadian Study of Health and Aging*. Cette analyse peut nous donner des informations sur certaines populations à risque de développer la maladie et essayer d'établir une échelle de temps du profil oxydatif périphérique.

La deuxième partie de cette thèse met en évidence le potentiel d'un nouvel outil dans le diagnostic du stade MCI et de la progression de la MA : les pEVs. En effet, il est possible de doser le contenu des pEVs qui peut révéler des désordres reliés à la pathologie. Dans ce contexte, ce travail met en évidence une variation du niveau des protéines pathogéniques impliquées dans la MA à savoir l'A β 42, son précurseur l'APP et les différentes formes de la protéine Tau dans les pEVs. Le niveau de l'APP et le ratio de pTau-T181/tTau dans les pEVs seraient capables de différencier les sujets contrôles des patients MCI et de séparer les sujets MCI des patients atteints de la MA. Les concentrations de ces deux biomarqueurs potentiels corrèlent avec les résultats des tests cognitifs (MMSE et MoCA). La suite des investigations a également mis en lumière la possibilité d'utiliser le dosage de protéines perturbées au niveau cérébrale au cours de la MA dans les pEVs chez les patients MCI. Certains facteurs neurotrophiques, certains marqueurs de l'inflammation et des lésions neuronales sont retrouvés dans les pEVs et constituent des marqueurs potentiels pour différencier les participants témoins

des sujets MCI et des patients atteints de la MA au stade léger. Ces résultats ouvrent la perspective pour de nombreux projets. Tout d'abord ceux-ci doivent être confirmés sur une étude à plus grande échelle. Mais avant d'entreprendre des études cliniques plus poussées, il est essentiel de mettre au point un guide de standardisation pour la technique d'isolation des pEVs et les méthodes de normalisation. De plus, l'étude et la confirmation du passage des EVs cérébrales par la BHE est indispensable pour comprendre et justifier la présence de protéines neuronales dans le pEVs. Cette étude pourrait être réalisée sur des modèles *in vitro* mimant la barrière. Après avoir éclaircie ces points, il serait intéressant d'approfondir l'analyse de leur potentiel en tant que biomarqueurs. En effet, une étude intéressante serait une analyse poussée du protéome des pEVs de chaque population de patients. L'idéal serait d'utiliser une étude longitudinale avec des sujets précliniques, des patients MCI stables ou convertis vers la démence ainsi que des participants atteints de la MA à différents stades. Cette étude protéomique permettrait d'identifier de nouveaux candidats potentiels qui pourront être analysés et confirmés sur différentes cohortes par la suite. L'utilisation de nouvelles techniques de dosage ultrasensible comme le SIMOA serait particulièrement adaptée pour doser les protéines faiblement présentes dans les pEVs. L'analyse protéomique pourrait également identifier des profils protéomiques différents au sein du même groupe de patients et ainsi ouvrir la perspective de la médecine personnalisée dans les maladies neurodégénératives. La médecine personnalisée et l'utilisation de biomarqueurs spécifiques de différentes sous-populations de patients atteints de la MA pourra à long terme mener à de nouveaux moyens de prévention efficaces et pourra dans le futur augmenter le taux de réussite des traitements.

ANNEXES

Annexe I : Questionnaire du MMSE 1/2

EXAMEN DE FOLSTEIN SUR L'ÉTAT MENTAL



DT9088

Nom de l'établissement _____

A) Orientation		COTE MAXIMALE	COTE DU SUJET																														
Demander au sujet :																																	
1- Quel est	<table border="0"> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>D</td> <td>L</td> <td>M</td> <td>Me</td> <td>J</td> <td>V</td> <td>S</td> </tr> <tr> <td>l'année</td> <td>le mois</td> <td>le jour</td> <td colspan="7">le jour de la semaine</td> </tr> <tr> <td colspan="10">La saison : printemps <input type="checkbox"/> été <input type="checkbox"/> automne <input type="checkbox"/> hiver <input type="checkbox"/></td> </tr> </table>	_____	_____	_____	D	L	M	Me	J	V	S	l'année	le mois	le jour	le jour de la semaine							La saison : printemps <input type="checkbox"/> été <input type="checkbox"/> automne <input type="checkbox"/> hiver <input type="checkbox"/>										5	()
_____	_____	_____	D	L	M	Me	J	V	S																								
l'année	le mois	le jour	le jour de la semaine																														
La saison : printemps <input type="checkbox"/> été <input type="checkbox"/> automne <input type="checkbox"/> hiver <input type="checkbox"/>																																	
2- Où sommes-nous	<table border="0"> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>Province</td> <td>Pays</td> </tr> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>Ville, village</td> <td>Lieu (hôpital, cabinet, maison, etc.)</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Étage</td> </tr> </table>	_____	_____	Province	Pays	_____	_____	Ville, village	Lieu (hôpital, cabinet, maison, etc.)		Étage	5	()																				
_____	_____																																
Province	Pays																																
_____	_____																																
Ville, village	Lieu (hôpital, cabinet, maison, etc.)																																
	Étage																																
B) Enregistrement																																	
3- Mentionner un des groupes de 3 mots suivants; prendre une seconde pour prononcer chaque mot :																																	
	chemise, bleu, honnêteté ()	} 3	()																														
	ou																																
	chaussure, brun, modestie ()																																
	ou																																
	chandail, blanc, charité ()																																
Par la suite, demander au sujet de répéter les 3 mots choisis. Donner 1 point pour chaque bonne réponse au 1 ^{er} essai. Répéter l'exercice jusqu'à ce que le sujet retienne les 3 mots. Compter le nombre d'essais et le noter. Pour information seulement.																																	
Nombre d'essais : _____																																	
C) Attention et calcul (cocher l'un ou l'autre test)																																	
4- <input type="checkbox"/>	Demander au sujet de faire la soustraction par intervalles de 7 à partir de 100 :		} 5 ()																														
	100 - 7 = () 93 - 7 = () 86 - 7 = () 79 - 7 = () 72 - 7 = () 65.																																
OU	Donner 1 point pour chaque bonne réponse.																																
<input type="checkbox"/>	Demander au sujet d'épeler le mot « MONDE » à l'envers. (EDNOM) : _____ (écrire les lettres)																																
D) Rétention mnésique																																	
5- Demander au sujet de répéter les 3 mots déjà mentionnés :	chemise, bleu, honnêteté ()	} 3	()																														
	ou																																
	chaussure, brun, modestie ()																																
	ou																																
	chandail, blanc, charité ()																																
E) Langage																																	
6- Montrer au sujet un crayon () une montre () et lui demander de nommer l'objet.		2	()																														
7- Demander au sujet de répéter la phrase suivante : « Pas de si ni de mais ».		1	()																														
8- Demander au sujet d'obéir à un ordre en 3 temps : « Prenez ce papier de la main droite ou gauche, pliez-le en deux et redonnez-le moi ».		3	()																														
<i>N.B. : Demander au sujet droitier de prendre de la main gauche et vice versa. Prendre garde de tendre la main; éviter les indices non-verbaux.</i>																																	

Traduction et adaptation française non validées du « Mini-Mental State » de Folstein, M.F., Folstein, S.E., Mc Hugh, P.R. : « Mini-Mental State : A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician », J. Psychiatr Res, 12 : 189-198, 1975, à partir des travaux du centre de gériatrie Hôpital d'Youville Sherbrooke de Québec.

Annexe I : Questionnaire du MMSE 2/2

Nom de l'usager	N° de dossier
-----------------	---------------

E) Langage (suite)

9- Demander au sujet de lire et de suivre l'instruction suivante :

« FERMEZ VOS YEUX »

COTE MAXIMALE

1

COTE DU SUJET

()

10- Demander au sujet d'écrire une phrase :

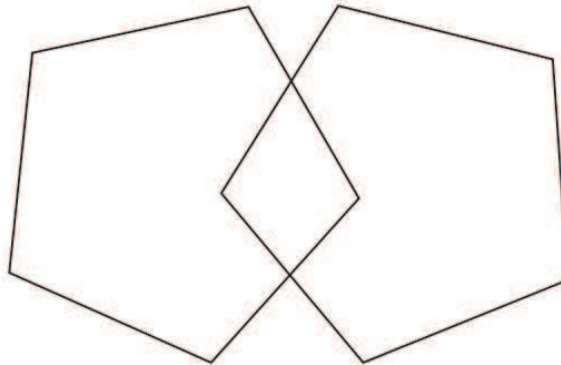
1

()

(sujet, verbe, sans égard aux fautes)

F) Praxie de construction

11- Demander au sujet de copier le dessin suivant :



1

()

COTE MAXIMALE : 30

COTE DU SUJET : _____

Interprétation des scores :

Un score de moins de 24 points à l'examen de Folstein sur l'état mental détermine une altération des fonctions cognitives. Ce test ne permet cependant pas de faire un diagnostic étiologique.

Nombre d'années de scolarité du sujet : _____ Évaluer le niveau de conscience du sujet : vigilant somnolent

En cas d'incapacité du sujet à être évalué, spécifier : _____

Indiquer les conditions ayant pu influencer l'évaluation _____

Date | | | | |
Année Mois Jour

Signature _____

Annexe II : Questionnaire du MoCa

MONTREAL COGNITIVE ASSESSMENT (MOCA)
Version 7.1 **FRANÇAIS**

NOM :
Scolarité :
Sexe :

Date de naissance :
DATE :

VISUOSPATIAL / EXÉCUTIF		Copier le cube		Dessiner HORLOGE (11 h 10 min) (3 points)		POINTS ___/5			
				<input type="checkbox"/> Contour <input type="checkbox"/> Chiffres <input type="checkbox"/> Aiguilles					
DÉNOMINATION									
						___/3			
MÉMOIRE		Lire la liste de mots, le patient doit répéter. Faire 2 essais même si le 1er essai est réussi. Faire un rappel 5 min après.		VISAGE	VELOURS	ÉGLISE	MARGUERITE	ROUGE	Pas de point
				1 ^{er} essai					
				2 ^{ème} essai					
ATTENTION		Lire la série de chiffres (1 chiffre/ sec.).		Le patient doit la répéter. [] 2 1 8 5 4		Le patient doit la répéter à l'envers. [] 7 4 2		___/2	
Lire la série de lettres. Le patient doit taper de la main à chaque lettre A. Pas de point si 2 erreurs		[] FBACMNAAJKLBAFAKDEAAAJAMOFAB		___/1					
Soustraire série de 7 à partir de 100.		[] 93	[] 86	[] 79	[] 72	[] 65	___/3		
4 ou 5 soustractions correctes : 3 pts, 2 ou 3 correctes : 2 pts, 1 correcte : 1 pt, 0 correcte : 0 pt									
LANGAGE		Répéter : Le colibri a déposé ses œufs sur le sable. [] L'argument de l'avocat les a convaincus. []		___/2					
Fluidité de langage. Nommer un maximum de mots commençant par la lettre «F» en 1 min		[] _____ (N ≥ 11 mots)		___/1					
ABSTRACTION		Similitude entre ex : banane - orange = fruit [] train - bicyclette [] montre - règle		___/2					
RAPPEL		Doit se souvenir des mots SANS INDICES		VISAGE	VELOURS	ÉGLISE	MARGUERITE	ROUGE	Points pour rappel SANS INDICES seulement
				[]	[]	[]	[]	[]	
Optionnel		Indice de catégorie							
		Indice choix multiples							
ORIENTATION		[] Date	[] Mois	[] Année	[] Jour	[] Endroit	[] Ville	___/6	
© Z.Nasreddine MD		www.mocatest.org		Normal ≥ 26 / 30		TOTAL		___/30	
Administré par : _____						Ajouter 1 point si scolarité ≤ 12 ans			

Annexe III : Critères de diagnostic de la maladie d'Alzheimer d'après le DSM-IV.

Critères de diagnostic de la maladie d'Alzheimer d'après le DSM-IV (American Psychiatric Association)

A-Apparition de déficits cognitifs multiples, comme en témoignent à la fois :

(1) Une altération de la mémoire (altération de la capacité à apprendre des informations nouvelles ou à se rappeler les informations apprises antérieurement)

(2) Une ou plusieurs des perturbations cognitives suivantes :

Aphasie (perturbation du langage)

Apraxie (altération de la capacité à réaliser une activité motrice malgré des fonctions motrices intactes)

Agnosie (impossibilité de reconnaître ou d'identifier des objets malgré des fonctions sensorielles correctes)

Perturbation des fonctions exécutives (faire des projets, organiser, ordonner dans les temps, avoir une pensée abstraite)

B-Les déficits cognitifs des critères A1 et A2 sont tous les deux à l'origine d'une altération significative du fonctionnement social ou professionnel et représentent un déclin significatif par rapport au niveau de fonctionnement antérieur

C-L'évolution est caractérisée par un début progressif et un déclin cognitif continu

D-Les déficits cognitifs des critères A1 et A2 ne sont pas dus :

(1) À d'autres affections du système nerveux central qui peuvent entraîner des déficits progressifs de la mémoire et du fonctionnement cognitif (ex : maladie cérébro-vasculaire, maladie de Parkinson, maladie de Huntington, hématome sous-dural, hydrocéphalie à pression normale, tumeur cérébrale)

(2) À des affections générales pouvant entraîner une démence (ex : hypothyroïdie, carence en vitamine B12 ou en folates, pellagre, hypercalcémie, neurosyphilis, infection par le VIH)

(3) À des affections induites par une substance

E-Les déficits ne surviennent pas de façon exclusive au cours de l'évolution d'un delirium

F-La perturbation n'est pas mieux expliquée par un trouble de l'axe I (par exemple, trouble dépressif majeur, schizophrénie)

Annexe IV : Critères de diagnostic de la maladie d'Alzheimer d'après le NINCDS-ADRDA (McKhann, 1984).

1-Critères de maladie d'Alzheimer probable :

Syndrome démentiel établi sur des bases cliniques et documenté par le *Mini-Mental State Examination* (Folstein, 1975), le *Blessed Dementia Scale* (Blessed, 1968), ou tout autre test équivalent et confirmé par des épreuves neuropsychologiques

Déficits d'au moins deux fonctions cognitives

Altérations progressives de la mémoire et des autres fonctions cognitives

Absence de trouble de conscience

Survenue entre 40 et 90 ans le plus souvent au-delà de 65 ans

En l'absence de désordres systémiques ou d'une autre maladie cérébrale pouvant rendre compte, par eux-mêmes, des déficits mnésiques et cognitifs progressifs

2-Ce diagnostic de maladie d'Alzheimer probable est renforcé par :

La détérioration progressive des fonctions telles que le langage (aphasie), les habiletés motrices (apraxie), et perceptives (agnosie)

La perturbation des activités de vie quotidienne et la présence de troubles du comportement

Une histoire familiale de troubles similaires surtout si confirmés histologiquement

Le résultat aux examens standards suivants :

Normalité du liquide céphalo-rachidien

EEG normal ou siège de perturbations non-spécifiques comme la présence d'ondes lentes

Présence d'atrophie cérébrale d'aggravation progressive

3-Autres caractéristiques cliniques compatibles avec le diagnostic de maladie d'Alzheimer probable après exclusion d'autres causes :

Périodes de plateaux au cours de l'évolution

Présence de symptômes tels que dépression, insomnie, incontinence, idées délirantes, illusions, hallucinations, réactions de catastrophes, désordres sexuels et perte de poids. Des anomalies neurologiques sont possibles surtout aux stades évolués de la maladie, notamment des signes moteurs tels qu'une hypertonie, des myoclonies ou des troubles de la marche.

Crises comitiales aux stades tardifs

Scanner cérébral normal pour l'âge

4-Signes rendant le diagnostic de maladie d'Alzheimer probable incertain ou improbable :

Début brutal

Déficit neurologique focal tel que hémiparésie, hypoesthésie, déficit du champ visuel, incoordination motrice à un stade précoce

Crises convulsives ou troubles de la marche en tout début de maladie

5-Le diagnostic clinique de maladie d'Alzheimer possible :

Peut être porté sur la base du syndrome démentiel, en l'absence d'autre désordre neurologique, psychiatrique ou systémique susceptible de causer une démence, et en présence de variante dans la survenue, la présentation ou le cours de la maladie

Peut être porté en présence d'une seconde maladie systémique ou cérébrale susceptible de produire un syndrome démentiel mais qui n'est pas considéré comme la cause de cette démence

Et pourrait être utilisé en recherche clinique quand un déficit cognitif sévère progressif est identifié en l'absence d'autre cause identifiable.

6-Les critères pour le diagnostic de maladie d'Alzheimer certaine sont :

Les critères cliniques de maladie d'Alzheimer probable

Et la preuve histologique apportée par la biopsie ou l'autopsie

Annexe V : Les critères de Dubois et al., 2007

Proposition de nouveaux critères diagnostiques de la maladie d'Alzheimer probable (d'après Dubois et coll., 2007)

Maladie d'Alzheimer probable (Critère A + l'un ou plusieurs des critères secondaires B, C, D ou E)

Critère majeur

A. Un trouble de mémoire épisodique initial, constitué par :

Des troubles de mémoire fonctionnels progressifs rapportés par le patient ou l'entourage depuis au moins six mois

La mise en évidence d'un trouble de mémoire épisodique significatif dans les tests avec un déficit de rappel non significativement amélioré ou non normalisé en situation d'indigence ou de reconnaissance, alors que l'encodage initial de l'information a été contrôlé

Les troubles de la mémoire épisodique peuvent être isolés ou associés à d'autres troubles cognitifs

Critères secondaires

B. Une atrophie des structures temporales internes :

Atrophie hippocampique, entorhinale ou amygdalienne

Mise en évidence en IRM par échelle visuelle qualitative ou par volumétrie quantitative, en référence à des sujets témoins de même âge

C. Une modification du taux de biomarqueurs dans le LCR :

Diminution des taux d'A β 1-42 et/ou augmentation de la concentration totale de protéine Tau ou de phospho-Tau

Modification de tout autre marqueur validé dans le futur

D. Un profil spécifique à la TEMP ou à la TEP :

Diminution du métabolisme du glucose dans les régions temporo-pariétales bilatérales

Toute autre anomalie de distribution de ligand validé dans l'avenir

E. Une mutation autosomale dominante dans la famille directe

Critères d'exclusion

Ils peuvent être liés :

Au mode d'installation :

- Début brutal
- Survenue précoce de troubles de la marche, de crises comitiales, de troubles comportementaux

À la présentation clinique :

- Déficit neurologique focal : hémiparésie, troubles sensoriels, déficit du champ visuel
- Signes extrapyramidaux précoces

À l'existence de conditions médicales pouvant rendre compte, à elles seules, des troubles de mémoire ou cognitifs :

- Démences non Alzheimer
- Dépression majeure
- Pathologie cérébrovasculaire
- Troubles métaboliques ou toxiques
- Anomalies IRM en FLAIRr ou en T2 dans la région temporale interne, évoquant une atteinte infectieuse ou vasculaire

Critères pour la maladie d'Alzheimer définie

La maladie d'Alzheimer est considérée comme définie si les deux critères suivants sont présents :

Le critère majeur A

L'existence d'une preuve histologique (biopsie corticale ou autopsie) ou génétique (mutation génique sur le chromosome 1, 14 ou 21) de maladie d'Alzheimer

Annexe VI : Critères de diagnostic de la maladie d'Alzheimer probable. D'après (McKhann et al., 2011)

La démence probable de type Alzheimer est diagnostiquée quand le patient remplit les critères généraux de démence et présente en plus les caractéristiques suivantes :

1) Début insidieux. Les symptômes ont une apparition graduelle s'étalant sur des mois ou années, et non pas rapide sur des heures ou des jours

2) Aggravation cognitive nette dans le temps d'après rapport ou observation

3) Les déficits cognitifs initiaux les plus marqués sont attestés à partir des antécédents et de l'évaluation faite dans une des catégories suivantes :

a. Présentation amnésique : présentation syndromique de MA la plus courante. Les déficits doivent inclure un trouble de l'apprentissage et du rappel de l'information récemment apprise. Il doit aussi y avoir un dysfonctionnement cognitif dans au moins un autre domaine cognitif.

b. Présentation non-amnésique :

- Présentation phasique : Les déficits les plus marqués concernent l'accès au mot, mais des déficits dans d'autres domaines doivent être présents.
- Présentation visuo-spatiale : Les déficits les plus marqués concernent la cognition spatiale, incluant l'agnosie d'objets, l'altération de la reconnaissance de visages, la simultanagnosie, et l'alexie. Des déficits dans d'autres domaines doivent être présents.
- Dysfonctionnements exécutifs : Les déficits les plus marqués concernent le raisonnement, le jugement, et la résolution de problèmes. Des déficits dans d'autres domaines doivent être présents.

4) Le diagnostic de démence probable d'Alzheimer ne doit pas être appliqué en cas de :

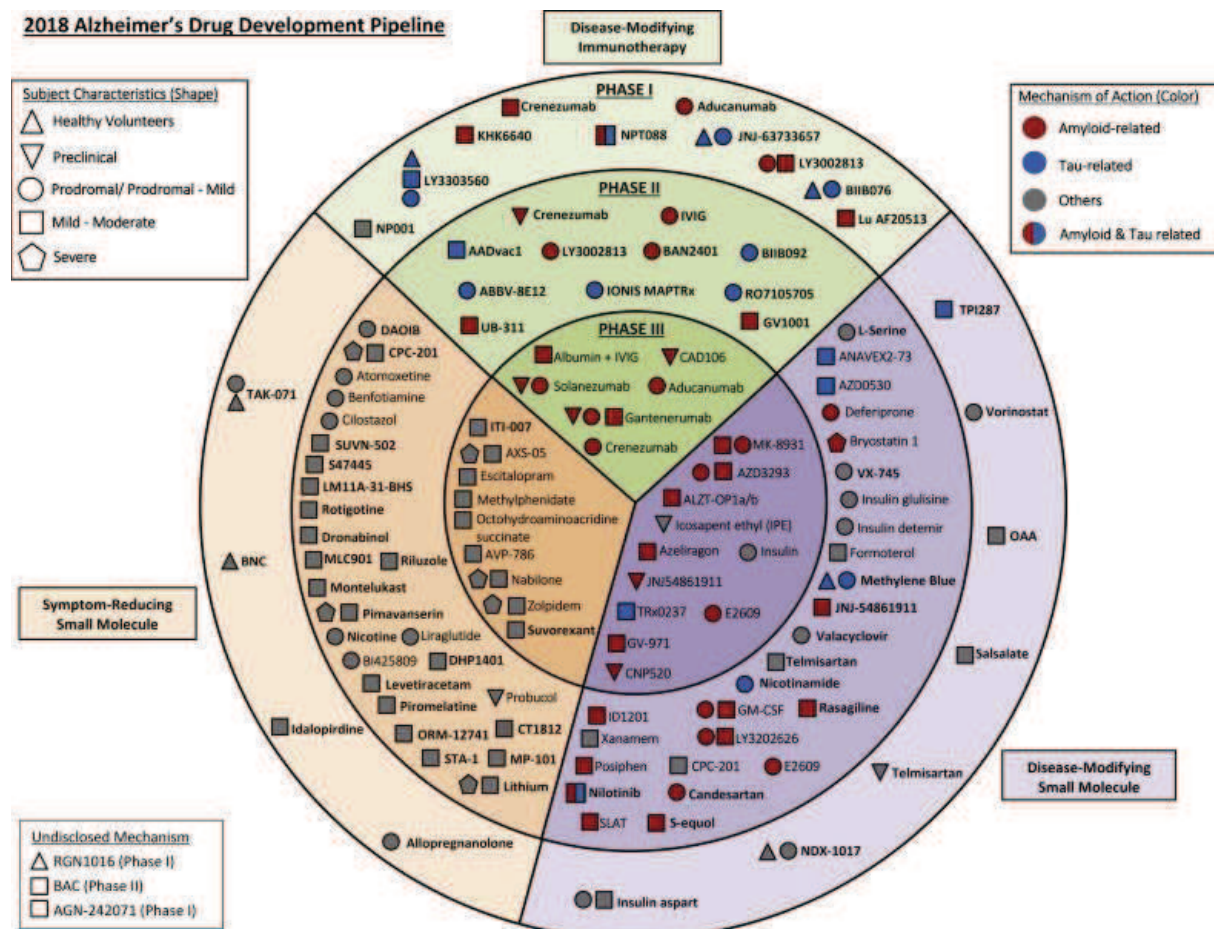
a. atteinte cérébrovasculaire concomitante importante, définie par un antécédent d'accident vasculaire cérébral temporellement lié au début d'aggravation des troubles cognitifs ; ou la présence d'infarctus multiples ou étendus, ou de nombreuses hyperintensités dans la substance blanche

b. caractéristiques de démence à corps de Lewy autres que celles de la simple démence

c. caractéristiques notables de variantes comportementales de démence frontotemporale

d. caractéristiques notables d'aphasie primaire progressive à variante sémantique ou variante non-fluent/agrammatique. **e.** preuves d'une autre maladie neurologique active concurrente, ou d'une comorbidité médicale non neurologique ou l'utilisation de médicaments pouvant avoir des conséquences sur la cognition.

Annexe VII : Molécules engagés dans les études cliniques pour traiter la maladie d'Alzheimer ou réduire ses symptômes en 2018. D'après (Cummings, Lee et al. 2018).



Annexe VIII : Article en deuxième auteur (collaboration pour le projet de Mohamed Haddad)

Article accepté sous conditions au Journal of Alzheimer's Disease (Manuscript 18-1272) : “manuscript is acceptable for publication in the Journal of Alzheimer's Disease pending minor revision”

Circulating and extracellular vesicles levels of N-(1-carboxymethyl)-L-lysine (CML) differentiate early to moderate Alzheimer’s disease

Mohamed Haddad ^{1,2}; Morgane Perrotte ^{1,2}; Sarra Landri^{1,2}; Aurelie Lepage ³ ; Tamas, Fulop ³; Charles, Ramassamy ^{1,2}

¹ : INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Qc, Canada,

² : Institut sur la Nutrition et les Aliments Fonctionnels, Laval University, Qc, Canada

³: Department of Medicine, Geriatric Division, Research Center on Aging, Sherbrooke University, Qc, Canada

Abstract

Background: Advanced glycation end products (AGEs) are involved in the pathophysiology of Alzheimer’s disease (AD). Among them, N-(1-carboxymethyl)-L-lysine (CML) and pentosidine were found in AD brain to be associated with the neuropathological hallmarks of AD. Both AGEs are present in the circulation but their levels remain controversial in AD patients. Moreover, their levels in peripheral extracellular vesicles and their association with AD remain to be determined. Finally, the release of these AGEs via neuronal extracellular vesicles remains to be established. Objective: The aim of this study was to elucidate the association between levels of circulating CML and pentosidine with the progression of AD. Moreover, we determined their levels in peripheral extracellular vesicles (EVs) in controls, early cognitive impairment and AD patients. Finally, the association between their circulating levels and their content in EVs with the clinical cognitive scores were analyzed. We also evaluated the presence of AGEs in EVs released by neuronal cells. Methods: CML and pentosidine levels were measured in total proteins with and without albumin and in peripheral EVs by ELISA. Neuronal EVs from SK-N-SH neuronal cells were isolated and CML levels were determined by ELISA. Results: We demonstrated that the levels of

serum CML in albumin-free total proteins was higher in the early stage of AD while the level of pentosidine remained unchanged. In contrast, the level of CML in the EVs was lower in moderate stage of AD. Interestingly, the levels of CML in serum were negatively correlated with the clinical cognitive scores. For the first time, we were able to detect CML in EVs released from neuronal cell in culture. Conclusion: Circulating and EVs levels of CML can differentiate early to moderate AD. In the brain, CML can propagate from cells-to-cells via EVs.

Keywords: Alzheimer disease, carboxymethyl lysine (CML), pentosidine, extracellular vesicles, MMSE, MoCA,

1. Introduction

Alzheimer disease (AD) is the most common neurodegenerative disease. It is estimated that more than 50 million people lived with dementia worldwide, and its prevalence rises to 152 million in 2050, in the absence of prevention strategies and effective treatments [1]. The amyloid β ($A\beta$)-containing plaques and the phosphorylated tau-containing neurofibrillary tangles (NTFs) represent both neuropathological hallmarks of AD. Clinically, AD can be divided into a presymptomatic phase in which subjects are cognitively normal but have AD pathology, a prodromal phase known as mild cognitively impairment (MCI) and a third phase when patients develop progressively dementia with cognitive impairments [2]. Currently, the probable AD diagnosis is based on a combination of cognitive tests, neuroimaging and the p-tau/ $A\beta$ 42 ratio in CSF. However, amyloid plaques and neurofibrillary tangles are necessary but not sufficient to lead to the development of AD. Moreover, the current diagnosis described a late and irreversible stage of the disease and early biomarkers, particularly circulating AD signature, able to predict early AD and their progression in AD remain to be identified [3].

Many reports have suggested the implication of advanced glycation end products (AGEs) in the pathophysiology of AD. AGEs are implicated in diabetic, metabolic syndromes, in aging and cardiovascular complications which are also well-known risk factors for AD development [4-8]. Accordingly, in AD brain, AGEs were found in pyramidal neurons of human hippocampus and accumulate in endosomes and lysosomes [9, 10]. The interaction between AGEs and their receptors RAGE induces the

generation of intracellular oxidative stress, release of pro-inflammatory cytokines as IL6 and TNF-alpha and increases A β production and tau hyperphosphorylation [11]. In animal model, an intracerebroventricular injection of glycated A β caused memory deficit in rats [12].

AGEs are heterogeneous class of molecules formed nonenzymatically through a series of Maillard reactions, between glucose, or other reducing sugars, and free amino groups such as lysine and arginine residues of proteins [13]. Alternatively, these compounds can be formed via the interaction between arginine, lysine, cysteine, and tryptophan residues of different proteins and dicarbonyl compounds such as methylglyoxal and glyoxal [14]. The reaction of MG with arginine leads to the formation of cyclic imidazolone adducts [15] and other related structural isomers. Its reaction with lysine residues generates the N-(1-carboxyethyl)-L-lysine (CEL) and N-(1-carboxymethyl)-L-lysine (CML) adducts and the lysine dimer 1,3-di(N-lysino)-4-methyl-imidazolium (MOLD) [16]. Pentosidine, an another AGE, is mainly formed in reactions of pentoses with lysine and arginine. Both CML and pentosidine are generated by an oxidation-dependent mechanism.

In human brain, CML was found in the cytoplasm of neurons with higher expression in hippocampus than in frontal and temporal cortex. In AD, CML and pentosidine are co-localized with microglia and positive GFAP (glial fibrillary acidic protein) astrocytes [17]. Interestingly, in AD the expression of CML was inversely correlated with Braak staging [18, 19]. CML was identified in the neuronal perikarya in neuritic plaques but not in the core of amyloid plaques. while pentosidine was present in the core of senile plaque and in the fiber-like structure within the neuropil [20]. Interestingly, neurons which display diffuse cytosolic AGEs and particularly CML immunoreactivity also contain hyperphosphorylated Tau, suggesting a link between AGEs accumulation with the formation of early neurofibrillary tangles [21]. CML was found to be increased significantly with age in four regions of the brain, the cerebral cortex, midbrain, striatum, and hippocampus [22]. In AD, the accumulation of CML and pentosidine in the CA1 region of the hippocampus, is higher than in controls [23-25]. Altogether, these specific AGEs formed under oxidative conditions [26, 27] seem to be a major contributor to the initiation and development of age-related AD. Taken together, AGEs and particularly

CML and pentosidine could be considered as important factors in the development of AD.

Previous studies have evaluated the total pentosidine and CML levels in serum and CSF from AD patients. However, the results in CSF studies were controversial and the quantification of serum pentosidine and CML levels was determined in total proteins [28-31]. While albumin is considered the most abundant proteins in serum, this circulating protein may be exposed to increased glycooxidation which may lead to the formation of various types of AGEs. Thus, we hypothesize that the quantification of total AGEs in serum total protein may not be specific for AD diagnosis. Furthermore, the levels of circulating specific AGEs not related to glycated albumin would be associated to the cognitive decline.

Extracellular vesicles (EVs) such as exosomes play a crucial role in the secretion and transport of multilevel information, including signalling factors, misfolding proteins, nucleic acid, and regulatory molecules. EVs are small vesicles secreted by most cell types including neurons, astrocytes and microglia [32-34]. Several studies have suggested the implication of EVs in the propagation of pathogenic proteins in AD. Other studies have demonstrated the presence of AD hallmarks (A β peptide and phosphorylated tau protein) in peripheral EVs in AD patients [35-38]. However, the presence of AGEs in peripheral EVs and their association with AD remains to be determined. Moreover, the propagation of AGEs and particularly CML and pentosidine, in the brain by neuronal cells-derived EVs remains to be demonstrated.

The aim of present study was designed to analyze the circulating levels of pentosidine and CML in total proteins, in circulating proteins without albumin, in controls, MCI and AD patients during the development of the pathology. Then, the association between these peripheral levels of AGEs with two clinical scores, the Mini-Mental State Examination (MMSE) and the Montreal Cognitive Assessment (MoCA) were analyzed. Furthermore, we aimed to demonstrate the release of CML in EVs by neuronal cells in culture.

2. Materials and Methods

2.1. Study design and participants

Serum samples from controls subjects, MCI and AD patients were generously given by the Memory Clinic of the Sherbrooke. The main characteristics of the population enrolled in this study are summarized in Table 1. The healthy control subjects were defined according to the SENIEUR protocol [39]. Selection of MCI subjects was based on cognitive test scores and Pertersen criteria [40]. The AD patients were selected depending on criteria developed by the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS_ADRDA) and the fourth edition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) published by the American Psychiatric Association in 1994 [41]. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the University of Sherbrooke and informed written consent was obtained from all participants and/or their representatives (protocol #2010-21/Fülöp). All selected subjects underwent clinical and neuropsychological evaluation included the MoCA and MMSE [42, 43]. blood was obtained after overnight fasting in heparin-containing vacuum tubes.

Blood samples obtained from selected subjects were centrifuged at 3000 rpm for 10 min at 4°C. Blood glucose, albumin, total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol and triglyceride were measured. Serum were collected and stored at -80 °C until analysis.

2.2. Isolation and characterisation of extracellular vesicles from serum samples

Serum EVs were isolated by precipitation method using the Total Exosome Isolation reagent (Invitrogen™ by Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA). For this, serum samples from all groups were clarified by centrifugation at 10,000 × g for 20 minutes to remove debris. 1/5 volume of exosome isolation reagent was added to supernatant and samples were refrigerated at 4 °C for 30 minutes. After centrifugation at 10,000 × g for 5 minutes, EVs pellets were re-suspended in PBS and purified by a series of filtrations and precipitations. Final EVs preparations were re-suspended in PBS, divided in aliquots and conserved at -80°C for further analysis. EVs proteins were extracted using Radio Immuno Precipitation Assay (RIPA) buffer (50mM Tris buffer, pH 8, 150 mM sodium chloride, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1% Igepal, 1% sodium deoxycholate, 5 mM EDTA, 1% protease and phosphatase inhibitor cocktail). The total protein

concentration was measured using bicinchoninic acid (BCA) assay (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific, Inc).

2.1.1. Transmission electron microscopy (TEM)

Transmission electron microscopy was used for morphological examination of isolated EVs. EVs preparations were suspended in 2% paraformaldehyde. Ten microliters of mixture were loaded on Formvar-carbon coated grid for 5 minutes. Grids were negatively stained using 2% uranyl acetate solution for 1 minute. The excess fluid was gently removed and grids were observed using HITACHI 7100 transmission electron microscope (75 kV) at 15000X-40000X magnification.

2.2.2. Nanoparticle tracking analysis

Sizes and concentrations of EVs preparations were analysed using a Nanosight NS300 instrument and the Nanosight NTA 3.2 Analytical Software (Malvern Instruments Company, Nanosight, and Malvern, United Kingdom). Diluted EVs suspensions were illuminated by laser light. The light scattered by the particles was captured using a digital camera. The motion of each particle is tracked from frame to frame by the Nanosight NTA 3.2 Analytical Software.

2.2.3. Immunoblot analysis

Twenty micrograms of total EVs proteins were loaded in 10% polyacrylamide gel for electrophoresis. After the separation of proteins according their molecular weight, gel was transferred onto PVDF membranes using a Trans-Blot Turbo System (Bio-Rad). Membranes were blocked for 60 minutes in TBS (Tris-buffered saline) containing 0.1% Tween 20 with 5% skim milk and incubated with primary antibodies: TSG101 (MyBiosource; 1/2500) or calnexin (Santa Cruz; 1/500) overnight at 4°C. Then, membranes were washed with TBS-Tween 0.1% and incubated with the secondary antibody HRP-conjugated anti rabbit (1/5000) and anti-mousse (1/1000) for 60 minutes. Detection was realized with ECL substrate (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) and bands were analysed using luminescent imaging system FluorChem.

2.3. Cell Culture, isolation and characterisation of extracellular vesicles in culture media

Human neuroblastoma cell line SK-N-SH from ATCC (Manassas, VA, USA) was used to isolate EVs. Cells were cultivated in Eagle's minimal essential medium (EMEM) supplemented with 10% (v/v) Foetal Bovine Serum (FBS), 1% sodium pyruvate (1mM) and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin) in 37 °C with 5% CO₂. Cells were grown to 80% of confluence, washed with PBS and incubated in FBS free media for 24 hours. Next day, cell culture supernatant was collected for EVs isolation and cellular total protein was extracted with RIPA buffer containing a cocktail of protease and phosphatase inhibitors. Total Proteins concentrations were measured using BCA assay.

Dead cells and cell debris were removed from medium by successive centrifugations (300g for 10min, 2000g for 10min and 10000g for 30min). The final supernatant was concentrated and precipitated with the Total Exosome Isolation reagent (Invitrogen™ by Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA) to collect the pellet that contains EVs. The EVs pellet was resuspended in PBS and characterized with TEM and Western-Blot analysis as described above. Total proteins from SK-N-SH cells and EVs cells were extracted with RIPA buffer containing a cocktail of protease inhibitors and were measured using BCA assay.

2.4. Enzyme – Linked Immunosorbent assay (ELISA)

Levels of pentosidine and CML in serum were determined by competitive ELISA provided by MyBioSource, Inc., according to the manufacturer's instructions. The detection range of pentosidine and CML kits was 6.2 – 400 ng/ml and 15.6 – 1000 ng/ml, respectively. To detect and measure CML levels in EVs from all study groups and from SK-N-SH cells, sandwich ELISA provided by Cusabio Biothech Co., Ltd., was used according to the manufacturer's instructions. Detection range of CML kit was 62.5 – 4000 pg/ml.

2.5. Statistical analysis

Data were expressed as mean ± SEM using the SPSS program. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA analysis followed by LSD test and Student t-test. The statistical correlation was determined by a linear regression analysis using the

correspondent Pearson coefficient of correlation. p value less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Main characteristics of patients and control participants.

The main general characteristics of the five groups of participants are reported in the Table 1. MCI and AD participants are older than controls. Mean and standard error of MMSE and MoCA scores were significantly lower in MCI and AD groups compared to control subjects.

Although blood glucose levels were in the physiological range with higher levels in MCI and in moderate AD participants compared to controls. To note, albumin levels in severe AD participants were lower than in controls but remain in the physiological range of circulating levels. The BMI value, the HDL, LDL, TG and total cholesterol levels were not different between groups.

3.2. Determination of Pentosidine and CML levels in serum

Serum proteins are divided in two groups, high and low abundance circulating proteins with albumin being among the most abundant protein. This circulating protein may be exposed to increased glycoxidation stress leading to the formation of various types of AGEs. Therefore, we have measured and compared pentosidine and CML levels in the total serum and in the low abundance circulating proteins without the albumin fraction (S-Ab).

CML levels in the total serum proteins were not different among five groups (Fig.1.A). However, CML levels in the S-Ab fraction were significantly higher in AD group (101.6 ± 19.19 ng/mL) and specifically in early AD group (92.6 ± 9.94 ng/mg protein) as compared to the control group (56.95 ± 6.55 ng/mg) (Fig.1.B). Pentosidine levels in the total serum proteins and in S-Ab fraction were not different between the five groups (Fig.2).

Interestingly, CML levels in S-Ab were negatively correlated with the MMSE and MoCA scores (Fig.3.A and B) while pentosidine levels were not (data not shown). Pentosidine levels in S-Ab were age-dependent (Fig.3.C) but not CML (data not shown).

3.3. CML levels in EVs from total serum

Circulating EVs were isolated from control subjects, MCI and AD patients. The characterization of EVs was based on the analysis of the morphology by TEM, their sizes distribution by the Nanosight system and the presence of exosomal markers TSG101 by Western Blot (Fig.4). TEM images showed that vesicles were surrounded by a lipid layer with a cup-shaped morphology and a size being between 80 to 100 nm diameter (Fig.4.A). The NTA analysis showed that the density of the most abundant particles have a diameter ranging between 50 and 150 nm (Fig.4.B). Our exosomal fraction contained protein TSG101 while calnexin, a negative marker of EVs was absent. SK-N-SH neuronal cells lysate was used as a positive control for the calnexin expression (Fig.4.C).

The presence of CML in EVs is unknown. Our results showed that circulating EVs contained CML. Moreover, CML EVs levels were lower in moderate AD as compared to control subjects with 38.52 ± 5.69 pg/mL and 67.31 ± 8.99 pg/mL, respectively (Fig.5). To note, levels of CML were 1000-fold higher in serum as compared to EVs-levels.

3.4. Isolation and characterisation of neuronal derived-EVs and CML detection

In order to demonstrate that neuronal cells are able to release CML in EVs, we isolated these vesicles from the human SK-N-SH neuronal cells culture supernatant. As in serum-derived EVs, TEM images revealed that these vesicles are surrounded with a lipid layer producing a cup-shaped morphology (Fig.6.A). The expression of exosomal marker TSG101 was also confirmed by the presence of TSG101 and calnexin was not detected (Fig.6.B). The size distribution of these extracellular vesicles was similar to those from serum (Fig.6.C). Interestingly, our results demonstrated that neuronal cells can release CML in EVs with CML levels in vesicles being ~2.5 fold lower than in cell lysates (Fig.6.D).

4. Discussion

To date, the absence of peripheral blood-based biomarkers easily accessible limit the early detection, the staging of AD and the development of efficient pharmacotherapy. The actual challenge is to link peripheral biomarkers to brain pathology and cognitive decline. In the present study, we showed that serum levels of CML in S-Ab were higher in AD patients and particularly in early AD. We found that peripheral CML levels were

negatively correlated with both cognitive scores MMSE and MoCA. For the first time, we identified that CML are released in circulating EVs. Moreover, we demonstrated that CML is also present in neuronal cells-derived EVs. In contrast to CML, circulating levels of pentosidine were not different between controls and AD patients and were thus not related to the decline of cognitive scores.

There is an abundant literature suggesting that AGEs play a pivotal role in the development of AD. For instance, in AD brain, the amyloid β ($A\beta$) peptide and tau proteins could be the target of glycation leading to their resistance towards hydrolysis by proteases. $A\beta$ -AGEs are found both in vitro and in vivo [12] and the nucleation-dependent polymerization of $A\beta$ is significantly accelerated by crosslinking with AGEs [44]. The intrahippocampal injection of AGEs, obtained from BSA-glucose, induced tau hyperphosphorylation, memory deterioration, decline of synaptic proteins, and impairment of long-term potentiation (LTP) through RAGE-mediated glycogen synthase kinase-3 (GSK3 β) activity [45].

AGEs are heterogeneous class of molecules. The challenge is to determine if some specific AGEs could propagate from cell-to cell and if specific circulating AGEs is elevated in MCI or during the progression of the disease. Among different AGEs, we have focused on CML and pentosidine because both were detected in AD hallmarks [23-25, 46]. For instance, CML was shown to be intense in NFTs [23] likely because Tau is a lysine-rich protein. CML is also abundant and elevated in CSF from AD patients. while pentosidine levels were decreased or remains unchanged [29, 30]. Finally, CML represents the dominant AGEs in human [47]. Our data showed that circulating CML levels do not differentiate MCI to control patients, but it was increased in AD patients. Our results contrast with the previous study from Bar et al., (2003) likely due to the number of AD patients (15 versus 35 in our study) and to the composition of the AD group. In the previous study [29], AD group included mainly moderate and severe AD and the average MMSE scores was 16.3 ± 6.4 while in the present study the elevation of CML was observed only in early AD with the MMSE score being between 23 ± 0.9 . Hence, our results showed that peripheral levels of CML could differentiate AD from controls and particularly early AD but their levels in circulating EVs was lower specifically in moderate AD.

In serum from AD patients, pentosidine levels remain controversial. They were not different between controls and AD or increased in converted MCI subjects to AD patients and remain elevated in AD [28, 30, 31]. Although these analyses were performed in total serum proteins, our results in S-Ab fraction confirm that pentosidine levels were not different between control, MCI and AD groups.

It is well-known that high circulating levels of AGEs represents an overall change physiological functions and an increase susceptibility to various chronic diseases such as inflammation, diabetes, metabolic syndrome, insulin resistance, endothelial dysfunction, cardiovascular complication [4, 48-50] or aging [51-53] and is not specifically related to AD. However, these chronic diseases represent the risk factor for the development of AD. As these chronic diseases were not included in our study, our results indicate that the elevation of peripheral CML in early AD and in AD group could be specifically associated to AD which is reinforced with the negative correlation with the cognitive scores.

The presence of peripheral AGEs depends on several factors, including the metabolic rate, the redox state, the small fraction of dietary absorbed AGEs and the turnover rate of the targeted proteins or cells excretion. The abundance of CML could be explained by the multiple pathways leading to its formation such as the reaction between glucose, other sugars or glyoxal with amino groups of lysine, or by-product of lipids peroxidation and oxidized proteins [54]. The elevation of CML in early AD observed in this study could be related to the alteration of the antioxidant/oxidant homeostasis and to oxidative damage recently observed in the same group of patients, with an early decrease of the total antioxidant capacity in MCI and an increase of the protein carbonyls observed in early AD [55]. Similarly, several previous studies have also demonstrated that oxidative-induced damages increased early in AD [56-62]. In addition, CML is also a RAGE receptor ligand. The interaction of CML with RAGE causes the generation of intracellular oxidative stress, release of proinflammatory factors as IL6 and TNF alpha and increase A β production and tau hyperphosphorylation [63, 64]. Hence, the increase of circulating CML could be the consequence of the modification of the redox environment which could, in turn, induce oxidative stress.

Albumin is the major circulating proteins and most of AGEs are composed of glycosylated albumin protein. Therefore, we have determined the levels of CML and pentosidine in the total serum proteins and compared with their levels in the low abundance circulating proteins without albumin fraction. Interestingly, our data showed that they are higher in S-Ab. Moreover, when CML levels were determined in the low abundance proteins in serum, they are elevated in early AD and is negatively associated to cognitive decline. Hence, the levels of CML in S-Ab is a better representation of the cognitive status than the total circulating CML.

In AD brain, A β peptides and tau protein can be glycosylated and formed CML. This complex A β -CML or Tau-CML can also efflux through the (blood brain barrier) BBB to the circulation [65]. When AD progress, brain glycosylated proteins and peptides accumulate and form aggregates that cannot cross the BBB. This property can explain the elevation of circulating CML levels only in early AD and not with the progression of the disease. Recently, it has been cited that EVs released by brain cells are able to cross the BBB and can be detected in blood [66]. As we have demonstrated that the EVs-derived human neuronal cell-line SK-N-SH contained CML, thus we cannot exclude the possibility that a fraction of the CML-containing EVs in the circulation were from the brain. These results are of great interest because more and more studies suggest that the EVs are responsible of the propagation of pathological proteins such as phosphorylated tau, A β peptide or α -synuclein oligomer in neurodegenerative diseases. They can also play a role in communication across the BBB between the brain and periphery [37, 67-69]. These results strengthen the notion that peripheral EVs might serve as relevant material for developing biomarkers for central nervous system diseases.

5. Conclusion

In conclusion, the present study demonstrated that the association between the serum/S-Ab CML levels and cognitive scores. It can be an useful diagnostic markers for early stage of AD. In the brain, some CML can propagate from cells to cells by EVs and further studies are required to better understand the roles of specific AGEs in EVs.

6. Acknowledgements

This work was supported by the Chaire Louise & André on Alzheimer's disease, Fondation Armand-Frappier (CR) and CIHR grant (TF).

Figures and tables

Table 1: Characteristics of patients and controls participants.

Parameters	Controls subjects (n=13)	MCI patients (n=14)	AD patients		
			ES (AD) (n=17)	MS (AD) (n= 9)	LS (AD) (n=12)
Sex (M/F)	2/11	4/10	3/14	2/7	3/9
Age (years)	69.68 ± 1.15	73.29 ± 1.4 ^a	79.41 ± 1.3 ^c	80.78 ± 1.3 ^c	81.58 ± 1.6 ^c
MMSE scores (/30)	29.62 ± 0.2	27.07 ± 0.52 ^a	23.65 ± 0.9 ^c	21.11 ± 1.3 ^c	ND
MoCA scores (/30)	27.62 ± 0.6	22.71 ± 0.9 ^b	16.8 ± 0.9 ^c	11.11 ± 1.6 ^c	ND
BMI (kg/m ²)	29.06 ± 0.9	26.69 ± 1.1	31.23 ± 2.2	28.77 ± 2.4	26.25 ± 1.59
Glucose (mmol/l)	4.56 ± 0.17	5.07 ± 0.18 ^a	4.87 ± 0.14	5.52 ± 0.3 ^c	4.45 ± 0.13
LDL (mmol/l)	2.88 ± 0.19	3.17 ± 0.31	2.68 ± 0.24	2.54 ± 0.31	2.83 ± 0.3
HDL (mmol/l)	1.53 ± 0.31	1.47 ± 0.12	1.48 ± 0.1	1.37 ± 0.12	1.24 ± 0.07
Triglycerides (mmol/l)	1.64 ± 0.31	1.47 ± 0.15	1.56 ± 0.2	1.87 ± 0.36	1.61 ± 0.24
Total cholesterol (mmol/l)	4.92 ± 0.34	5.32 ± 0.41	4.68 ± 0.29	4.96 ± 0.4	4.61 ± 0.41
Albumin (g/L)	44.26 ± 0.48	43.71 ± 0.77	43.96 ± 0.52	42.9 ± 1.49	38.08 ± 0.82 ^c

Values are mean ± standard error of the mean (SEM). Abbreviations: AD: Alzheimer disease; ES: early stage of Alzheimer disease; MS: Moderate-stage of Alzheimer disease; LS: late-stage of Alzheimer disease; MMSE. mini-mental state examination; MoCA. Montreal cognitive assessment; BMI: body mass index; HDL: high density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein; ND: not detected.

Statistical analysis was performed using the one way ANOVA followed by LSD test with ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.001$ versus controls subjects.

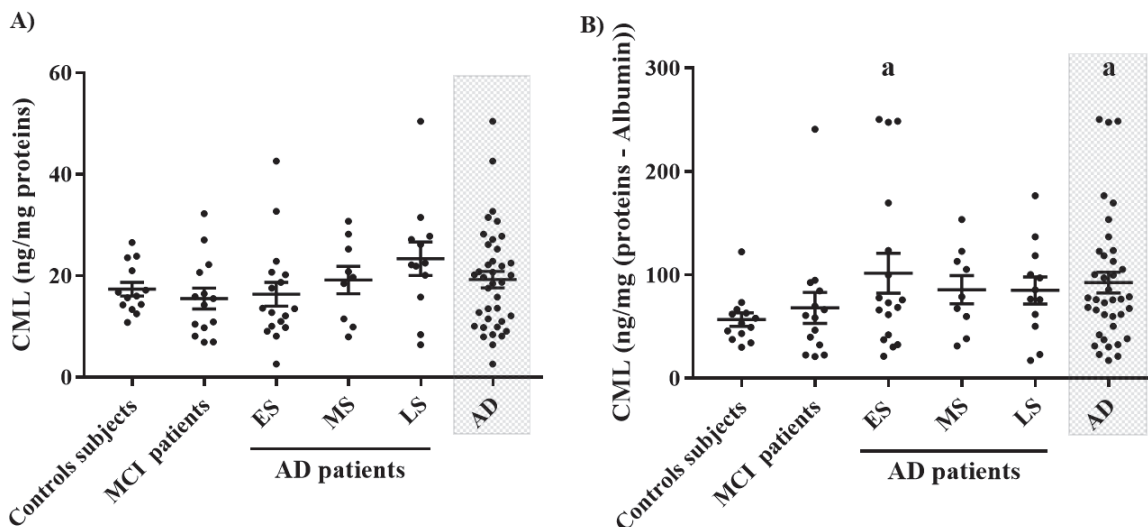
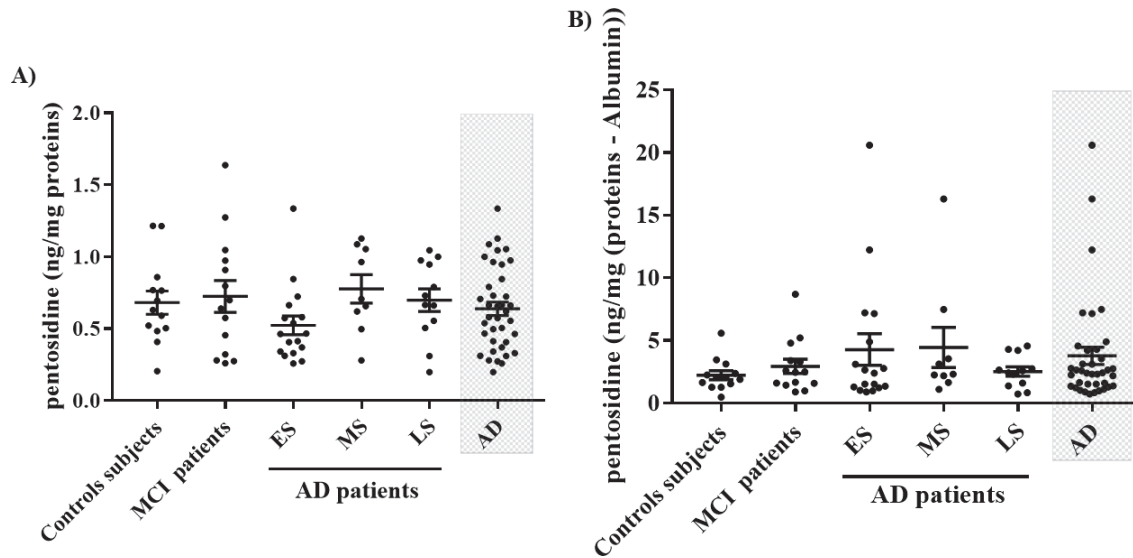
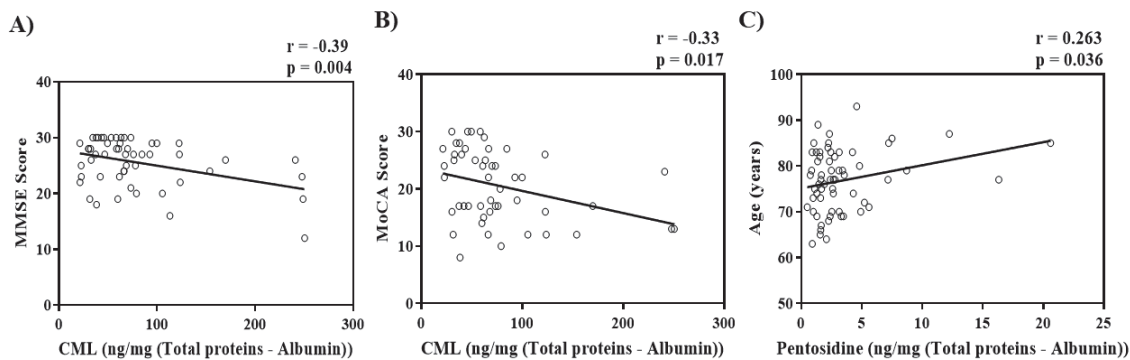


Figure 1. Serum CML levels in control, MCI and different groups of AD patients. A: CML levels in total serum proteins. B: CML levels expressed in total serum proteins without albumin (S-Ab). Difference between groups were analyzed with one-way ANOVA followed by the LSD post hoc test. Values are mean \pm S.E.M with a $p < 0.05$ versus Controls subjects.



Figure

2. Serum pentosidine levels in controls subjects, MCI and AD patients. A: Pentosidine levels in total serum proteins. B: Pentosidine levels expressed in total serum proteins without albumin (S-Ab). Data groups were compared with analysis of variance one-way ANOVA followed by LSD post hoc test. Values are mean \pm standard error of the mean.



Figure

3. Statistical correlation between CML and pentosidine levels expressed in total serum proteins without albumin (S-Ab) and cognitive scores (MMSE and MoCA) and age (years): Pearson correlation.

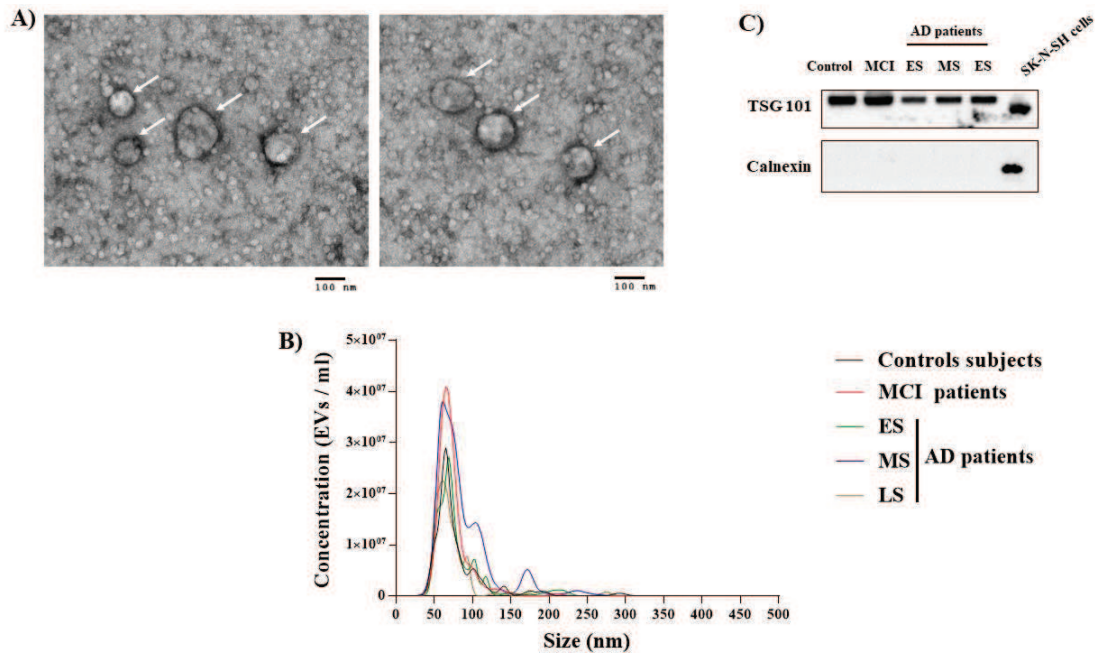


Figure 4. Characterization of EVs isolated from the serum. A: The TEM image depicts the spherical morphology of the isolated particles, bar = 100 nm. B: Determination of concentration and size of isolated EVs in the study population by Nanosight C: Representative blot of extracellular vesicles TSG 101 and calnexin in controls subjects, MCI and AD patients and in SK-N-SH cells lysate.

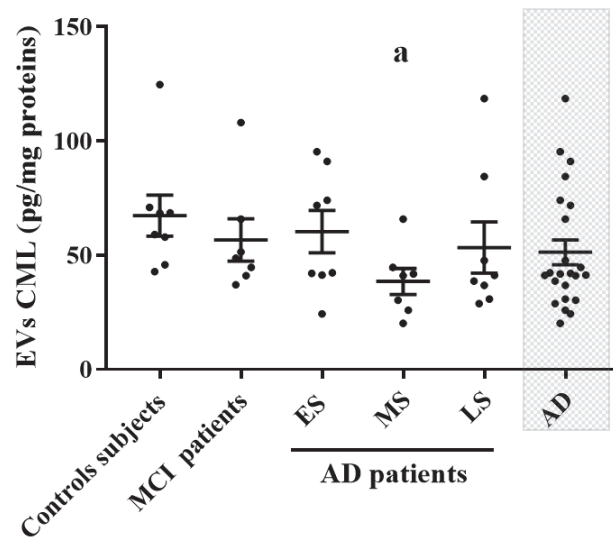
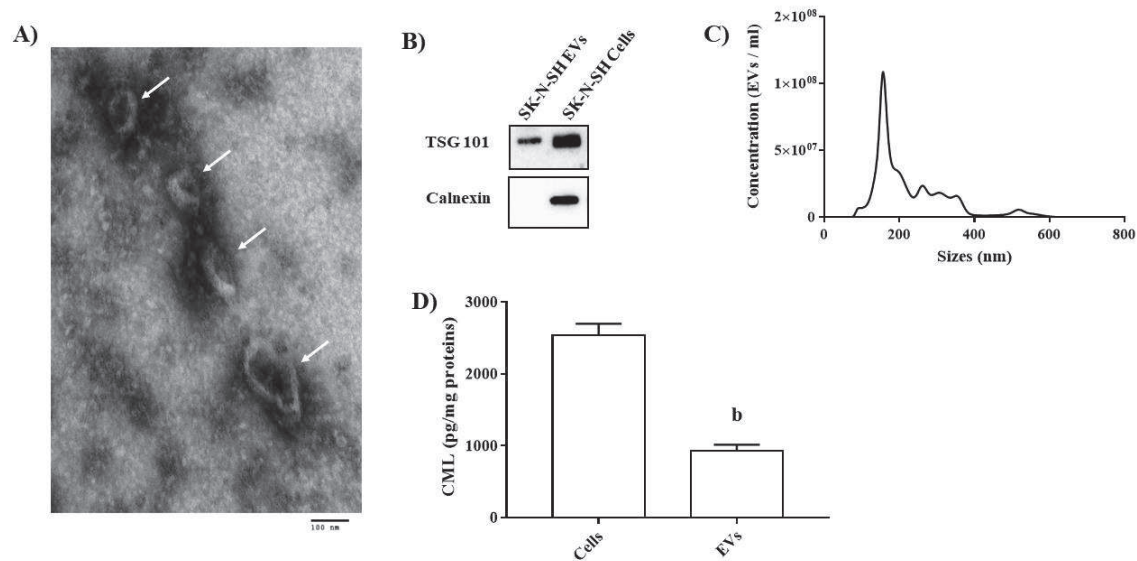


Figure 5. EVs CML levels in controls subjects ($n = 8$), MCI ($n = 7$) and AD patients (ES, $n = 8$; MS, $n = 7$; LS, $n = 8$). Data groups were compared with analysis of variance one-way ANOVA followed by LSD post hoc test. Values are mean \pm standard error of the mean. ^a $p < 0.05$ versus Control subjects.



Figure

6. Characterization of cells EVs and CML determination in cells lysate and EVs. A: The TEM image showed the spherical morphology of the isolated particles, bar = 100 nm. B: Representative blot of TSG 101 and calnexin in EVs from SK-N-SH and cells lysate. C: Concentration and size of isolated EVs by Nanosight D: CML levels in EVs from SK-N-SH and cells lysate. Data groups were compared with Student *t*-test. ^b $p < 0.01$.

7. References

- [1] World Alzheimer Report 2018 The state of the art of dementia research:New frontiers, www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2018.pdf,
- [2] Budson AE, Solomon PR (2012) New criteria for Alzheimer disease and mild cognitive impairment: implications for the practicing clinician. *Neurologist* 18, 356-363.
- [3] Molinuevo JL, Ayton S, Batrla R, Bednar MM, Bittner T, Cummings J, Fagan AM, Hampel H, Mielke MM, Mikulskis A, O'Bryant S, Scheltens P, Sevigny J, Shaw LM, Soares HD, Tong G, Trojanowski JQ, Zetterberg H, Blennow K (2018) Current state of Alzheimer's fluid biomarkers. *Acta Neuropathologica* 136, 821-853.
- [4] Haddad M, Knani I, Bouzidi H, Berriche O, Hammami M, Kerkeni M (2016) Plasma Levels of Pentosidine, Carboxymethyl-Lysine, Soluble Receptor for Advanced

Glycation End Products, and Metabolic Syndrome: The Metformin Effect. *Disease Markers* 2016, 6248264.

[5] Simm A, Müller B, Nass N, Hofmann B, Bushnaq H, Silber R-E, Bartling B (2015) Protein glycation — Between tissue aging and protection. *Experimental Gerontology* 68, 71-75.

[6] Simm A (2013) Protein glycation during aging and in cardiovascular disease. *J Proteomics* 92, 248-259.

[7] Kerkeni M, Saidi A, Bouzidi H, Letaief A, Ben Yahia S, Hammami M (2013) Pentosidine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients. *Diab Vasc Dis Res* 10, 239-245.

[8] Takeuchi M, Yamagishi S (2009) Involvement of toxic AGEs (TAGE) in the pathogenesis of diabetic vascular complications and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 16, 845-858.

[9] Takedo A, Yasuda T, Miyata T, Mizuno K, Li M, Yoneyama S, Horie K, Maeda K, Sobue G (1996) Immunohistochemical study of advanced glycation end products in aging and Alzheimer's disease brain. *Neurosci Lett* 221, 17-20.

[10] Li JJ, Surini M, Catsicas S, Kawashima E, Bouras C (1995) Age-dependent accumulation of advanced glycosylation end products in human neurons. *Neurobiol Aging* 16, 69-76.

[11] Cai Z, Liu N, Wang C, Qin B, Zhou Y, Xiao M, Chang L, Yan LJ, Zhao B (2016) Role of RAGE in Alzheimer's Disease. *Cell Mol Neurobiol* 36, 483-495.

[12] Chen C, Li XH, Tu Y, Sun HT, Liang HQ, Cheng SX, Zhang S (2014) Abeta-AGE aggravates cognitive deficit in rats via RAGE pathway. *Neuroscience* 257, 1-10.

[13] Maillard LC, Acad CR (1912) *Sci. Ser.* 2 154, 66.

[14] Yang K, Qiang D, Delaney S, Mehta R, Bruce WR, O'Brien PJ (2011) Differences in glyoxal and methylglyoxal metabolism determine cellular susceptibility to protein carbonylation and cytotoxicity. *Chem Biol Interact* 191, 322-329.

- [15] Thornalley PJ, Battah S, Ahmed N, Karachalias N, Agalou S, Babaei-Jadidi R, Dawnay A (2003) Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem J* 375, 581-592.
- [16] Lo TW, Westwood ME, McLellan AC, Selwood T, Thornalley PJ (1994) Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N alpha-acetylarginine, N alpha-acetylcysteine, and N alpha-acetyllysine, and bovine serum albumin. *J Biol Chem* 269, 32299-32305.
- [17] Takeda A, Yasuda T, Miyata T, Goto Y, Wakai M, Watanabe M, Yasuda Y, Horie K, Inagaki T, Doyu M, Maeda K, Sobue G (1998) Advanced glycation end products co-localized with astrocytes and microglial cells in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol* 95, 555-558.
- [18] Luth HJ, Ogunlade V, Kuhla B, Kientsch-Engel R, Stahl P, Webster J, Arendt T, Munch G (2005) Age- and stage-dependent accumulation of advanced glycation end products in intracellular deposits in normal and Alzheimer's disease brains. *Cereb Cortex* 15, 211-220.
- [19] Girones X, Guimera A, Cruz-Sanchez CZ, Ortega A, Sasaki N, Makita Z, Lafuente JV, Kalaria R, Cruz-Sanchez FF (2004) N epsilon-carboxymethyllysine in brain aging, diabetes mellitus, and Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 36, 1241-1247.
- [20] Horie K, Miyata T, Yasuda T, Takeda A, Yasuda Y, Maeda K, Sobue G, Kurokawa K (1997) Immunohistochemical localization of advanced glycation end products, pentosidine, and carboxymethyllysine in lipofuscin pigments of Alzheimer's disease and aged neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 236, 327-332.
- [21] Ko LW, Ko EC, Nacharaju P, Liu WK, Chang E, Kenessey A, Yen SH (1999) An immunochemical study on tau glycation in paired helical filaments. *Brain Res* 830, 301-313.
- [22] Thangthaeng N, Sumien N, Forster MJ (2008) Dissociation of functional status from accrual of CML and RAGE in the aged mouse brain. *Exp Gerontol* 43, 1077-1085.
- [23] Castellani RJ, Harris PL, Sayre LM, Fujii J, Taniguchi N, Vitek MP, Founds H, Atwood CS, Perry G, Smith MA (2001) Active glycation in neurofibrillary pathology of

Alzheimer disease: N(epsilon)-(carboxymethyl) lysine and hexitol-lysine. *Free Radic Biol Med* 31, 175-180.

[24] Jono T, Kimura T, Takamatsu J, Nagai R, Miyazaki K, Yuzuriha T, Kitamura T, Horiuchi S (2002) Accumulation of imidazolone, pentosidine and Nε-(carboxymethyl)lysine in hippocampal CA4 pyramidal neurons of aged human brain. *Pathology International* 52, 563-571.

[25] Kimura T, Takamatsu J, Miyata T, Miyakawa T, Horiuchi S (1998) Localization of identified advanced glycation end-product structures, N epsilon(carboxymethyl)lysine and pentosidine, in age-related inclusions in human brains. *Pathol Int* 48, 575-579.

[26] Rofina JE, Singh K, Skoumalova-Vesela A, van Ederen AM, van Asten AJ, Wilhelm J, Gruys E (2004) Histochemical accumulation of oxidative damage products is associated with Alzheimer-like pathology in the canine. *Amyloid* 11, 90-100.

[27] Kosenko EA, Solomadin IN, Tikhonova LA, Reddy VP, Aliev G, Kaminsky YG (2014) Pathogenesis of Alzheimer disease: role of oxidative stress, amyloid-beta peptides, systemic ammonia and erythrocyte energy metabolism. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 13, 112-119.

[28] Meli M, Perier C, Ferron C, Parssegny F, Denis C, Gonthier R, Laurent B, Reynaud E, Frey J, Chamson A (2002) Serum pentosidine as an indicator of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 4, 93-96.

[29] Bar KJ, Franke S, Wenda B, Muller S, Kientsch-Engel R, Stein G, Sauer H (2003) Pentosidine and N(epsilon)-(carboxymethyl)-lysine in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurobiol Aging* 24, 333-338.

[30] Monacelli F, Borghi R, Pacini D, Serrati C, Traverso N, Odetti P (2014) Pentosidine determination in CSF: a potential biomarker of Alzheimer's disease? *Clin Chem Lab Med* 52, 117-120.

[31] Monacelli F, Borghi R, Cammarata S, Nencioni A, Piccini A, Tabaton M, Odetti P (2015) Amnestic mild cognitive impairment and conversion to Alzheimer's disease: insulin resistance and glycoxidation as early biomarker clusters. *J Alzheimers Dis* 45, 89-95.

- [32] Yuyama K, Igarashi Y (2016) Physiological and pathological roles of exosomes in the nervous system. *Biomol Concepts* 7, 53-68.
- [33] Quek C, Hill AF (2017) The role of extracellular vesicles in neurodegenerative diseases. *Biochem Biophys Res Commun* 483, 1178-1186.
- [34] Zhang G, Yang P (2018) A novel cell-cell communication mechanism in the nervous system: exosomes. *J Neurosci Res* 96, 45-52.
- [35] Pluta R, Ułamek-Kozioł M, Januszewski S, Czuczwar SJ (2018) Exosomes as possible spread factor and potential biomarkers in Alzheimer's disease: current concepts. *Biomarkers in Medicine* 12, 1025-1033.
- [36] Malm T, Loppi S, Kanninen KM (2016) Exosomes in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International* 97, 193-199.
- [37] Yuyama K, Igarashi Y (2017) Exosomes as Carriers of Alzheimer's Amyloid- β . *Frontiers in Neuroscience* 11.
- [38] Fiandaca MS, Kapogiannis D, Mapstone M, Boxer A, Eitan E, Schwartz JB, Abner EL, Petersen RC, Federoff HJ, Miller BL, Goetzl EJ (2015) Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study. *Alzheimer's & Dementia* 11, 600-607.e601.
- [39] Pawelec G, Ferguson FG, Wikby A (2001) The SENIEUR protocol after 16 years. *Mech Ageing Dev* 122, 132-134.
- [40] Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E (1999) Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* 56, 303-308.
- [41] McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (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 34, 939-939.

- [42] Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR (1975) "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12, 189-198.
- [43] Nasreddine ZS, Phillips NA, Bedirian V, Charbonneau S, Whitehead V, Collin I, Cummings JL, Chertkow H (2005) The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *J Am Geriatr Soc* 53, 695-699.
- [44] Loske C, Gerdemann A, Schepl W, Wycislo M, Schinzel R, Palm D, Riederer P, Munch G (2000) Transition metal-mediated glycooxidation accelerates cross-linking of beta-amyloid peptide. *Eur J Biochem* 267, 4171-4178.
- [45] Li XH, Lv BL, Xie JZ, Liu J, Zhou XW, Wang JZ (2012) AGEs induce Alzheimer-like tau pathology and memory deficit via RAGE-mediated GSK-3 activation. *Neurobiol Aging* 33, 1400-1410.
- [46] Smith MA, Taneda S, Richey PL, Miyata S, Yan SD, Stern D, Sayre LM, Monnier VM, Perry G (1994) Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5710-5714.
- [47] Dunn JA, McCance DR, Thorpe SR, Lyons TJ, Baynes JW (1991) Age-dependent accumulation of N epsilon-(carboxymethyl)lysine and N epsilon-(carboxymethyl)hydroxylysine in human skin collagen. *Biochemistry* 30, 1205-1210.
- [48] Tan KC, Shiu SW, Wong Y, Tam X (2011) Serum advanced glycation end products (AGEs) are associated with insulin resistance. *Diabetes Metab Res Rev* 27, 488-492.
- [49] Tahara N, Yamagishi S, Matsui T, Takeuchi M, Nitta Y, Kodama N, Mizoguchi M, Imaizumi T (2012) Serum levels of advanced glycation end products (AGEs) are independent correlates of insulin resistance in nondiabetic subjects. *Cardiovasc Ther* 30, 42-48.
- [50] Nowotny K, Jung T, Hohn A, Weber D, Grune T (2015) Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules* 5, 194-222.

- [51] Van Puyvelde K, Mets T, Njemini R, Beyer I, Bautmans I (2014) Effect of advanced glycation end product intake on inflammation and aging: a systematic review. *Nutr Rev* 72, 638-650.
- [52] Uribarri J, Cai W, Peppas M, Goodman S, Ferrucci L, Striker G, Vlassara H (2007) Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62, 427-433.
- [53] Fournet M, Bonte F, Desmouliere A (2018) Glycation Damage: A Possible Hub for Major Pathophysiological Disorders and Aging. *Aging Dis* 9, 880-900.
- [54] Vistoli G, De Maddis D, Cipak A, Zarkovic N, Carini M, Aldini G (2013) Advanced glycooxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radic Res* 47 Suppl 1, 3-27.
- [55] Perrotte M, Le Page A, Fournet M, Le Sayec M, Rassart E, Fulop T, Ramassamy C (2018) Blood-based redox-signature and their association to the cognitive scores in MCI and Alzheimer's disease patients. *Free Radic Biol Med* 130, 499-511.
- [56] Greilberger J, Koidl C, Greilberger M, Lamprecht M, Schroecksnadel K, Leblhuber F, Fuchs D, Oettl K (2008) Malondialdehyde, carbonyl proteins and albumin-disulphide as useful oxidative markers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Free Radic Res* 42, 633-638.
- [57] Puertas MC, Martinez-Martos JM, Cobo MP, Carrera MP, Mayas MD, Ramirez-Exposito MJ (2012) Plasma oxidative stress parameters in men and women with early stage Alzheimer type dementia. *Exp Gerontol* 47, 625-630.
- [58] Ramassamy C, Averill D, Beffert U, Bastianetto S, Theroux L, Lussier-Cacan S, Cohn JS, Christen Y, Davignon J, Quirion R, Poirier J (1999) Oxidative damage and protection by antioxidants in the frontal cortex of Alzheimer's disease is related to the apolipoprotein E genotype. *Free Radic Biol Med* 27, 544-553.
- [59] Barnham KJ, Masters CL, Bush AI (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* 3, 205-214.

- [60] Di Domenico F, Coccia R, Butterfield DA, Perluigi M (2011) Circulating biomarkers of protein oxidation for Alzheimer disease: expectations within limits. *Biochim Biophys Acta* 1814, 1785-1795.
- [61] Zhao Y, Zhao B (2013) Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev* 2013, 316523.
- [62] Di Domenico F, Pupo G, Giraldo E, Badia MC, Monllor P, Lloret A, Schinina ME, Giorgi A, Cini C, Tramutola A, Butterfield DA, Vina J, Perluigi M (2016) Oxidative signature of cerebrospinal fluid from mild cognitive impairment and Alzheimer disease patients. *Free Radic Biol Med* 91, 1-9.
- [63] Barlovic DP, Soro-Paavonen A, Jandeleit-Dahm KA (2011) RAGE biology, atherosclerosis and diabetes. *Clin Sci (Lond)* 121, 43-55.
- [64] Choudhuri S, Dutta D, Sen A, Chowdhury IH, Mitra B, Mondal LK, Saha A, Bhadhuri G, Bhattacharya B (2013) Role of N-epsilon- carboxy methyl lysine, advanced glycation end products and reactive oxygen species for the development of nonproliferative and proliferative retinopathy in type 2 diabetes mellitus. *Mol Vis* 19, 100-113.
- [65] Irazuzta JE, de Courten-Myers G, Zemlan FP, Bekkedal MY, Rossi J, 3rd (2001) Serum cleaved Tau protein and neurobehavioral battery of tests as markers of brain injury in experimental bacterial meningitis. *Brain Res* 913, 95-105.
- [66] Kanninen KM, Bister N, Koistinaho J, Malm T (2016) Exosomes as new diagnostic tools in CNS diseases. *Biochim Biophys Acta* 1862, 403-410.
- [67] Danzer KM, Kranich LR, Ruf WP, Cagsal-Getkin O, Winslow AR, Zhu L, Vanderburg CR, McLean PJ (2012) Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers. *Mol Neurodegener* 7, 42.
- [68] Saman S, Kim W, Raya M, Visnick Y, Miro S, Saman S, Jackson B, McKee AC, Alvarez VE, Lee NC, Hall GF (2012) Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *J Biol Chem* 287, 3842-3849.

[69] Asai H, Ikezu S, Tsunoda S, Medalla M, Luebke J, Haydar T, Wolozin B, Butovsky O, Kugler S, Ikezu T (2015) Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci* 18, 1584-1593.

Redox Based-Peripheral Biomarkers in Alzheimer's Disease: Challenges, Limits and Prospects

Morgane Perrotte, Joel Pincemail, Mohammed Haddad,
and Charles Ramassamy

1 Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia in the elderly. The World Health Organization currently estimates that more than 35 million people are afflicted by AD worldwide and this number is expected to dramatically triple by 2050 [1]. In the United States, approximately 7 million people older than 65 years are known to suffer from AD. According to the 2013 Alzheimer's Association (AA) report [1], the number of deaths related to AD has increased by 68 % during the 2000–2010 period [2]. The social and psychological burden associated with caring AD patients remains difficult to quantify but in the United States, but in the United States it was estimated to surpass \$170 billion in 2010 and projected to exceed \$1 trillion by 2050 [3]. A hypothetical intervention that could delay the onset of AD dementia by 5 years would result in a 57 % reduction in the number of patients with AD dementia, and reduce consequently the projected Medicare costs of AD from \$627 to \$344 billion dollars [4].

AD is characterized by a progressive neurodegeneration and loss of cognitive functions. AD is often difficult to differentiate from other forms of dementia, especially in the early clinical stages. Although the pathogenesis of AD is not yet fully

M. Perrotte • M. Haddad • C. Ramassamy (✉)
National Institute of Scientific Research- Armand Frappier Institute, Laval, QC, Canada
Institute of Nutrition and Functional Foods, Laval University, Laval, QC, Canada
e-mail: charles.ramassamy@iaf.inrs.ca

J. Pincemail
Liège CHU Department of Cardiovascular Surgery and Antioxidant Nutrition and Health
Platform, Sart Tilman, Liège 4000, Belgium

© Springer International Publishing Switzerland 2016
S.C. Bondy, A. Campbell (eds.), *Inflammation, Aging, and Oxidative Stress*,
Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice,
DOI 10.1007/978-3-319-33486-8_19

377

known, it is clear that the disease is caused by a combination of genetic and risk factors with complex etiology. The pathophysiological hallmarks of AD are extracellular fibrillary amyloid- β deposition and intraneuronal hyperphosphorylated tau (p-tau) protein aggregation particularly in the hippocampus, amygdala and frontal cortex. In AD, cognitive decline closely correlates to neurofibrillary tangles (NFTs), synapse loss, and neurodegeneration.

Clinically, AD can be divided into different phases: (1) a preclinical phase in which subjects are cognitively normal but have mild AD pathology, (2) a prodromal phase known as mild cognitive impairment (MCI), and (3) a phase when patients display dementia with impairments in multiple domains and loss of function in activities of daily living [5].

Thus, MCI can be considered the intermediate phase between normal aging and the early form of AD [6]. Persons with amnesic MCI show objective cognitive problems, involving memory, with no or low functional impairment in activities of daily living and very often evolves to AD [7]. Consequently MCI may be a useful AD's or prodromal phase of AD in which to analyze biomarkers for early and accurate disease detection.

In 2011, the National Institute on Aging (NIA) and the AA recognized the new guideline on the preclinical stages of AD [4] i.e. the pathophysiology of AD begins years to decades before the apparent clinical picture. The new guideline recognizes that the asymptomatic (preclinical) state consists of three distinct stages: stage 1 is characterized by asymptomatic amyloidosis in the brain evidenced by increased positron emission tomography (PET) A β ligand binding that may begin as early as young adulthood and evolves slowly through midlife into old age. This amyloidosis is associated to low CSF A β 42 levels. In addition to amyloidosis, the stage 2 includes early neurodegeneration as evidenced by (1) neuronal dysfunction based on neuroimaging with PET or MRI analysis, (2) cellular indicators of neurodegeneration, including high CSF tau or p-tau concentrations, or (3) structural brain changes based on MRI with cortical thinning and hippocampal atrophy. Finally, the stage 3 corresponds to amyloidosis, neurodegeneration, and subtle cognitive decline. The cognitive deficits in stage 3 do not significantly affect functional capacities and activities of daily living. Thus, the three preclinical stages are without the cognitive impairment that defines MCI and the cognitive and functional impairments that determines AD. This recognition of a preclinical state represents a major advancement because this stage represents a window of opportunity for the determination of valid and reliable biomarkers to define the disease stage and to monitor the progression of the underlying pathophysiology. Moreover, this or this slot is a timely disease-modifying or preventive therapies.

The aim of this chapter is to review the current state of knowledge on peripheral oxidative biomarkers for AD or MCI patients, their limits and prospects as well as the challenges for their standardisation and validation. This review will determine whether biomarkers related to oxidative stress can play an important role for early diagnosis and prognosis.

2 Current Clinical Biomarkers for AD and Their Limits

Currently, a definite diagnosis of AD can be made only by *post-mortem* neuropathological examination. Neuroimaging, genetic testing and chemical analysis from fluids, CSF, represent the current diagnostic markers used.

Valid biomarkers should be paralleled with the hypothetical pathophysiological sequence of AD and should be relevant to track the preclinical stages of AD. The biomarkers model proposed by Jack et al. [8], expands the preclinical phase with the following features: (1) A β accumulation become abnormal first and a substantial A β load accumulates before the appearance of clinical symptoms. The lag phase between A β accumulation and clinical symptoms may be for more than a decade. Brain A β accumulation is necessary but not sufficient to produce the clinical symptoms of MCI and dementia; (2) biomarkers of synaptic dysfunction, including functional MRI (fMRI), may demonstrate abnormalities very early, particularly in APOE gene $\epsilon 4$ allele carriers, who may manifest functional abnormalities before detectable A β deposition. The severity and change over time in these synaptic markers correlate with clinical symptoms during MCI and AD dementia, (3) structural MRI is thought to become abnormal a bit later, as a marker of neuronal loss, and MRI retains a close relationship with cognitive performance through the clinical phases of MCI and dementia, (4) none of the biomarkers are static and rates of change over time follow a nonlinear time course, which is hypothesized to be in sigmoid shape, and (5) anatomic information from imaging biomarkers provides useful disease staging information with disease progression. Several multicenter biomarker initiatives, including the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI); the Australian Imaging, Biomarkers and Lifestyle Flagship Study of Aging; as well as major biomarker studies in preclinical populations at several academic centers, are ongoing. These studies have already provided preliminary evidence that biomarker variations are consistent with AD pathophysiological process and are detectable before the emergence of clinical symptomatology and are predictive of subsequent cognitive decline.

The diagnostic markers currently used include increase in total tau and p-tau, and decrease in A β 42 level and A β 42/A β 40 ratio in CSF from AD patients and from MCI subjects. The variations of these four biomarkers have been confirmed with large prospective studies, including the ADNI project [9] and are considered as reliable biomarkers of AD [10]. Therefore, a decline in A β 42 levels in combination with levels of the p-tau in the CSF has been advocated for use in the diagnosis of AD [11].

Neuroimaging is currently gaining high interest for the possibility to test several promising markers, as suggested by the ADNI project through the use of MRI or PET to analyze hippocampal volumetry, brain flow, decrease [18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake (FDG) or increased binding of amyloid-targeting PET trace in the living human brain [9, 12–14]. However, these diagnostic methods are limited

by the cost and availability of the equipments, limiting the routinely use of these technique for the diagnosis of the asymptomatic early stages of AD. In addition, amyloid imaging and A β measurements in CSF are associated with a significant number of false-positive and false negative findings, with as many as 30% of cognitively normal elderly showing signs of A β accumulation, and a substantial number of AD patients who present no signs of A β accumulation in CSF [15]. Moreover, there are some reports with inconsistent normal CSF biomarkers pattern but pathological amyloid-targeting PET or vice versa [16, 17]. Recently, in a study with 40 AD cases, the number of biomarkers was consistent in only 32.5% [18]. Thus the accumulation of A β is necessary but not sufficient to produce the clinical symptoms of MCI and dementia.

Despite major advances in clinical chemistry, brain imaging, and genomic analysis, the lack of highly specific diagnostic tools for early diagnosis in AD research represented a challenge. There is an urgent need for the identification of accurate biosignatures for preclinical AD, which will differentiate subjects at risk for developing prodromal or AD from those without risk of progression to dementia.

3 Peripheral Antioxidant Levels-Based Biomarkers

Although CSF represents the most suitable biological fluid to study neurodegenerative diseases since it can reflect the biochemical changes occurring in brain, its analysis is not always easily feasible for a large scale screening, because the procedures are invasive, uncomfortable and that can be followed by several side effects including headache, back pain, nausea and vomiting and still carry a small risk of infection and damage to the spinal cord. Compared with CSF, blood or serum-based biomarkers are minimally invasive, could increase diagnostic accuracy, and could be useful for prognosis and in monitoring therapeutic interventions, especially for large scale studies and for repeated measures. One of the earliest blood-based biomarker studies were conducted by Ray et al. [19] with the identification of 18 plasma proteins among the 120 known signaling proteins. Overall, these studies suggest consistent alteration of the blood proteome in AD patients. There is a growing body of evidence, however, that preclinical AD may have a biosignature that can be deduced from peripheral blood [19–26].

Although the amyloid cascade hypothesis represents the underlying pathogenesis for the familial form of AD, increasing evidence indicates that oxidative stress plays a key role in the pathophysiology of AD [27, 28]. Strong evidence supports the role of oxidative damage in MCI and AD [29] and recent studies extensively demonstrated the specific oxidative modification of selected macromolecules in the brain of AD patients, in the CSF and blood stream [30, 31] and how their dysfunction possibly correlates with the pathology. These observations strengthen the notion that oxidative stress can precede the development of the neuropathological hallmarks of AD [32]. Therefore, oxidative stress markers have been studied in several matrices, in brain tissue, CSF and in blood compartment (for a review see [33–35]).

However, the *in vivo* evaluation of oxidative stress always remains a great challenge. Indeed, it is very difficult to detect reactive oxygen species (ROS) since their short-living time renders them not amenable for direct assay. Therefore, most assays to identify *in vivo* oxidative stress are based on indirect methods. They can be divided in four categories: analysis of small molecular weight non enzymatic and enzymatic antioxidants, determination of trace elements (selenium, copper, zinc) and evidence of oxidative damage to lipids, DNA and proteins and identification of sources producing ROS.

Although the determination of antioxidants levels and oxidative markers in the brain reflects the direct redox status and the oxidative metabolism in different cell types within the brain, they cannot be used as biomarkers. As described above, blood analysis is more accurate than CSF for population-based disease screening.

The major contributors to antioxidant capacity of serum are uric acid, plasma proteins (particularly albumin, transferrin and ceruloplasmin), and vitamins C, E, vitamin A/carotenoids and polyphenols but their peripheral levels are controversial.

Several studies have found a reduction (25 %) in uric acid and (53 %) in ascorbic acid in serum/plasma from AD [36–42] while others do not observe this difference [43, 44]. High plasma urate was also related to a slower rate of cognitive decline [45]. Vitamin E represents an important lipophilic antioxidant and has been investigated in relation to cognitive impairment. Most of studies have reported a decrease in plasma and serum vitamin E in AD [30, 39, 46–51]. More recently, plasma levels of tocopherols and tocotrienols together with automated MRI measures can help to differentiate AD and MCI patients from control subjects, and to prospectively predict MCI conversion into AD [52]. The AddNeuroMed-Project with in 168 AD cases, 166 MCI, and 187 cognitively normal people shows that plasma tocopherols, tocotrienols, α -tocopherylquinone, and 5-nitro- γ -tocopherol in AD and MCI had lower levels of total tocopherols, total tocotrienols, and total vitamin E [53]. The measurement of plasma levels of vitamin E (alpha-, beta-, gamma, and delta-tocopherol; alpha-, beta-, gamma-, and delta-tocotrienol) from 232 subjects aged 80 years and over, from the Kungsholmen Project, with a follow-up of 6 years indicates that high plasma levels of vitamin E are associated with a reduced risk of AD in advanced age [54]. However, vitamin E supplementation alone does not seem to improve the course of AD [55, 56] likely because the contribution of vitamin E to serum antioxidant capacity is quite small, accounting for less than 10 % [57, 58]. However, dietary intakes of the three antioxidants (vitamin E, vitamin C, and β -carotene) can lower the risk of AD, with vitamin E exhibiting the most pronounced protective effects [59, 60]. The CAIDE (Cardiovascular Risk Factors, Aging, and Dementia) study showed lower risk of cognitive impairment in subjects with higher levels of γ -tocopherol, β -tocotrienol, and total tocotrienols [61].

Vitamin C concentration in plasma or serum is also decreased in plasma or serum from AD [36, 37, 39, 49, 62] with lower level being observed especially in moderate and severe AD [62]. Plasma vitamin C was positively associated with MMSE score [63]. In the critical review of the role of vitamin C on the prevention of cognitive decline and AD, the authors conclude that maintaining healthy vitamin C levels can have a protective function against age-related cognitive decline and AD

and avoiding vitamin C deficiency is likely to be more beneficial than taking supplements [64]. The analysis of the level of vitamin A on serum and plasma indicate a controversial effect with significant reduction in AD [37, 39, 47, 51] while five studies reported no difference [49, 65]. For reduced GSH, some studies shown no difference between AD and controls [44, 66, 67] while others found lower levels of reduced GSH with a balance towards GSSG in AD [30, 68–70].

Plasma thiols represent a measure of the exposure of the plasma to oxidative stress causing oxidation of the –SH groups to –S–S– disulphide linkages or to species such as sulphuric acids (–SO₃–). Only proteins containing reactive –SH groups will be exposed to this particular process protein sulphhydryl groups (–SH) also are indicative of altered redox status as well as altered capacity to maintain correct structures of the proteins during stress condition. Plasma thiol levels were not different between the AD group and the normal control group and no correlation was found between plasma thiol level and overall cognitive function. However, a very significant negative correlation was found between age and plasma thiol concentrations [71].

With respect to non enzymatic antioxidants, their concentration can, however, be largely modulated by the diet. Therefore, the AD patients have to be imperatively fasted during at least 6–12 h before the blood collection. Moreover, it is very important to use a food frequency questionnaire (FFQ) to check if the antioxidant decrease cannot be attributed to possible malnutrition in AD patients. As an example, we have demonstrated that a daily intake of less than two fruits was associated with low plasma levels in vitamin C and β-carotene [72]. Unfortunately in most of clinical studies poor information is given about their nutritional status.

Large discrepancies have been reported for antioxidant enzymes involving superoxide dismutase enzyme (SOD) and glutathione peroxidase. SOD activity has been described in both plasma/serum and erythrocytes. In these cells, SOD is primarily SOD1 while in plasma/serum the main isoform is SOD3 or eSOD which uses Cu/Zn as a cofactor. In plasma, SOD3 level in AD is controversial with no difference between controls and MCI [73] or AD groups [40, 48, 74–76]. Lustig et al. were the first to demonstrate elevated levels of Cu, Zn SOD in erythrocytes of patients with AD [77, 78] but when considering overall studies there is no significant difference between AD and controls [30, 39, 66, 79–84]. In plasma/serum, most of studies found no significant difference [28, 39, 66, 85, 86]. These controversial findings may be due to the difference in sample size or different inclusion criteria. The activity of eSOD was measured in plasma and was found to be correlated with glucose metabolism in a large area of the left temporal lobe including the superior, middle and inferior temporal gyrus and the fusiform gyrus [87]. Overall, in plasma/serum, there was no significant association of SOD activity with AD across different studies.

The activity of glutathione peroxidase was also determined in plasma, serum and erythrocytes from control and AD patients and data remain controversial [30, 39, 44, 48, 66, 70, 79, 82, 88–92]. Glutathione peroxidase activity was higher in AD compared to MCI and healthy control patients while no difference was observed between controls and MCI [89]. Recently, low baseline glutathione peroxidase activity was associated with an average loss of 1.19 MMSE points per 6 months [93].

Oxidized GSH (GSSG) is reduced back to GSH by glutathione reductase (GR). In erythrocytes, its activity was lower in AD and in MCI as compared to control patients but it is not different between MCI and AD [89]. In blood compartment, GR activity was decreased in AD as compared to control healthy patients [91].

Regarding catalase enzyme, its activity was conducted in erythrocytes in seven studies and overall, no significant variation was observed [30, 79, 89, 94, 95].

Some studies have also investigated the total antioxidant capacity (TAC) of blood from AD. The most popular of them being the Oxygen Radical Antioxidant Capacity (ORAC assay) and the Total Antioxidant Status (TAS assay) as the reflect of the balance between antioxidants and oxidants or the redox status [96, 97]. The principle is to generate *in vitro* an artificial source of oxidants and to evaluate the ability of a plasma sample to quench oxidative reactions using suitable colorimetric or fluorimetric probes. Decrease of TAS has been regularly described in peripheral fluids from AD patients [33, 34]. According to Wayner et al. [57], the contribution of plasma antioxidants to total ORAC value is, in decreasing order, protein, uric acid, vitamin C, vitamin E, bilirubin, and carotenoids. Moreover, the proteins, and more particularly albumin, account for 80–95% of the antioxidant capacity of plasma. Because of this high contribution of proteins, results of the whole plasma are hard to interpret due to the many variables such as nutrition status (very variable in older persons), osmotic pressure, metabolism, catabolism and extracellular body fluid status. Moreover, it is well known that the ORAC value is strongly correlated with the plasma concentration of uric acid [57, 88], the value of which can be modulated by some diseases such as gout or renal dysfunction. At least, the ORAC value can also be influenced by some drugs known that have antioxidant capacity. For all these reasons, the determination of plasma ORAC value or TAS assay should also be considered with great caution in order to evidence the presence of an *in vivo* oxidative stress in pathologies such as AD [98].

4 Peripheral Oxidized Macromolecules-Based Biomarkers

As lipids (polyunsaturated fatty acids or PUFA's), proteins and DNA are the primary targets for ROS, the detection of oxidized biological material in plasma or urine is another tool for evidencing *in vivo* oxidative stress. Common markers of protein oxidation are indexed by protein carbonyls, 3-nitrotyrosine and protein glutathionylation [99], lipid peroxidation indexed by thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), free fatty acid release, iso- and neuro-prostane formation, 2-propen-1-al (acrolein), and 4-hydroxy-2-trans-nonenal (HNE) [100] and DNA oxidation by 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) [37].

For nucleic acids, 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) is one of the most commonly used markers of oxidative nucleic acid damage and can be measured in lymphocytes, leukocytes, and the brain.

Most studies found higher levels of 8-OHdG in AD [37, 101]. Protein carbonyl groups are generated by direct oxidation of several amino acid side chains (i.e., Lys, Arg, Pro, Thr, His and others). His, Lys, and Cys residues could also react by

Michael addition reactions by hydrogen atom abstraction at alpha carbons with products of lipid peroxidation [102]. Protein carbonyls are also produced by glycation/glycoxidation of Lys or arginine amino groups, forming advanced glycation end products (AGEs) [103].

Protein carbonyls are chemically stable compared with the other products of oxidative stress, they are generally used as markers to determine the extent of oxidative modification both *in vivo* and *in vitro* conditions. The most common way to measure carbonylated proteins is the DNPH-based detection method, where samples are derivatized with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), and are immunochemically detected with an antibody against the resulting protein hydrazone adduct; however spectrophotometric and HPLC quantitation of the DNPH adduct also could be used. Cysteine, methionine, phenylalanine, and tyrosine residues of proteins are particularly susceptible to reactive nitrogen species (RNS). Thus, protein nitration is another widely recognized marker of protein oxidation and numerous studies support the idea that nitrosative stress contributes to neurodegeneration in AD [104]. Several methods of analysis are available to measure levels of protein nitration including chemical analysis using HPLC and GC coupled to a mass spectrometer, the immunochemical detection of 3-nitrotyrosine. From a technical point of view, the procedure is time analysis with a great risk of auto-oxidation of proteins in the biological sample.

Protein carbonyls and nitrated protein can be measured in plasma, serum, CSF, and brain tissue. Conrad et al. were the first to measure the levels of oxidized proteins in plasma from AD patients compared to controls. They found that a significant increase of total carbonyl groups in plasma proteins with specific oxidation of a 78 kDa protein in subject with AD [105]. Several studies have described higher serum/plasma protein carbonyls level in AD despite varying patient selection criteria [28, 30, 31, 69, 105–107] while a few showed no significant difference between AD and controls [106, 108]. However, oxidation of low density lipoproteins is considerably increased (increased by 55 % compared to controls across five studies), reflecting the pro-oxidative environment in the lipid fraction rather than a pattern of protein-targeted oxidation [108, 109].

Protein glutathionylation is the formation of a mixed disulfide between protein cysteinyl residues and a small-molecular-weight thiol [110]. Glutathionylation can protect cysteine thiols against irreversible oxidation but can also modify the activity of proteins. Glutathionylation could represent an important redox signaling mechanism, allowing cells to sense and signal harmful stress conditions and activate appropriate responses [111]. Peripheral levels of S-glutathionylated protein in MCI and AD remain to be determined.

Non-enzymatic glycosylation is a common post translational modification of proteins *in vivo*, resulting from reactions between reducing sugar and amino groups on proteins; this process is called the “Maillard reaction” and results in the formation of AGEs. Measurement of AGEs can be performed by ELISA or by quantitative fluorescence spectroscopy [112]. In AD brain, AGEs have been shown to be colocalized with neurofibrillary tangles, senile plaques, microglia, and astrocytes but have been also measured in plasma.

In plasma, the A β peptide can reenter the CNS *via* the receptor for advanced glycation end products (RAGE) [113]. The soluble isoform of RAGE, sRAGE, lacks the transmembrane domain, and is present in plasma, binds A β in plasma and prevent the neurotoxic or proinflammatory responses of RAGE–A β interaction [114] or intracellular oxidative stress [115]. Levels of sRAGE were not different between AD and non-AD neurodegenerative dementia [116].

Advanced oxidation protein products are defined as dityrosine-containing cross-linked protein products, and are also considered as reliable markers to estimate the degree of oxidant-mediated protein damage [117]. They are formed during oxidative stress by the action of chlorinated oxidants, mainly hypochlorous acid and chloramines (produced by myeloperoxidase in activated neutrophils). They are supposed to be structurally similar to AGE-proteins and to exert similar biological activities as AGEs. The levels of AOPP (advanced oxidation protein products) were found to be significantly higher in plasma from AD patients than in the control group [118]. High AOPP levels are indicative of oxidative stress.

The reaction of PUFA's with ROS leads to the formation of lipoperoxides (lipid peroxidation) which can break down in a variety of secondary products that are aldehydes (malondialdehydes, MDA) usually expressed as TBARS, conjugated diene hydroperoxides, F2, F4-isoprostanes, 4-hydroxynonenal and acrolein [100]. It causes changes in the fluidity and permeability of cell membranes, impairs the activity of membrane-bound enzymes and modified the activity of neuronal survival and redox pathways [119, 120]. Results of TBARS on serum, plasma or blood cells from MCI [89, 90] and AD [28, 30, 38, 48, 66–68, 75, 76, 79, 86, 89, 90, 108, 121] are controversial and the link between the TBARS levels and the MMSE score is lacking.

The detection of MDA with the thiobarbituric test (TBAR's assay) was incontestably the favorite assay for most lipid peroxidation studies in AD patients [35]. However, the TBAR test is a great matter of controversy due to its low specificity and sensibility. Indeed, a large number of substances not related to lipid peroxidation such as glucose or hemoglobin strongly interfere with TBAR leading to the overestimation in addition to an extreme wide variation of the MDA levels [122]. Actually, most investigators recognized that it is scientifically unsound to equate increased plasma or serum TBARS levels (as often observed in AD patients) with the occurrence of a free radical disease. Instead of the TBAR's assay, it has been proposed to evaluate in plasma the “free” MDA by using high pressure liquid chromatography (HPLC). Even if it is more specific, we have to keep in mind that MDA is just a by-product of lipid peroxides and that it only reflects less than 1% of the lipid peroxidation phenomenon. For all these reasons, the determination of MDA should be discouraged as a marker of oxidative stress in AD patients.

Since a few years, the measurement of isoprostanes has clearly emerged as “*gold standard*” reliable marker of *in vivo* lipid peroxidation [123]. Numerous studies demonstrated that isoprostane levels are elevated in plasma or urine AD patients and in animal models of the disease [124]. In a very nice work, Pratico et al. [125] found higher isoprostane levels in cerebrospinal fluid (CSF), plasma and urine of subjects with mild cognitive impairment (MCI) compared with cognitively normal elderly subjects.

Interestingly, isoprostane levels were more elevated in AD patients than in subjects having MCI. As AD is preceded by a prodromal phase characterized by MCI, these authors assume that the measurement of isoprostanes could be, therefore, a possible predictor for AD. Of great interest is also this recent observation showing that mice receiving isoprostane showed significant memory deficits, increase in tau phosphorylation, activation of the cyclin kinase 5 pathway and neuroinflammation [126]. Actually, the method of choice for measuring isoprostanes in biological fluid is the gas or liquid chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS and LC-MS).

4-hydroxynonenal (4-HNE), another marker of lipid peroxidation in serum was found to be markedly elevated in AD compared to controls [127, 128]. However, its application in a routine way is not easy because that requires a long purification procedure of the sample (chromatographic steps, extraction) that is critical and time-consuming with substantial loss of target compounds. To limit these inconveniences, several authors have proposed to evaluate isoprostanes in exhaled breath condensate (EBC) samples but such an interesting technology is far to be validated [129]. Some companies have also developed immunoassay methods for routinely use but they are still lacking in specificity [130]. 4-HNE can react with lysine, histidine, and cysteine residues in proteins to form Michael adducts and Schiff base products.

Acrolein is an α,β -unsaturated aldehyde with two functional groups that can participate in chemical reactions: the aldehyde group and the carbon-carbon double bond. Acrolein is the strongest electrophile among the unsaturated aldehydes and therefore displays strong reactivity with nucleophilic compounds and can form adducts with amino acids residues such as lysine, histidine and cysteine (see review by [131]). Several studies have demonstrated that acrolein levels are elevated in brain tissue such as in hippocampus from AD or MCI patients (see review by [100]). We have demonstrated that acrolein can also induced the depletion of glutathion, the generation of 4-HNE and protein carbonylation [119, 120]. Recently, we have demonstrated that the administration of acrolein could induce AD-like pathologies *in vitro* and *in vivo* [132].

5 Peripheral Biomarkers: Limits and Prospects

Currently, there are no fully validated blood-based biomarkers of AD. The development of a blood-based biomarker for AD represents a great challenge because blood profile represents an accumulation of the alterations in all tissues, and for non brain-specific markers, there is a substantial contribution that is not related to brain pathology. Also, blood comprises a liquid component (serum or plasma) and different types of cells, including the mononuclear leukocytes, which contain the deoxyribonucleic acid (DNA) and ribonucleic acid (RNA), erythrocytes, and platelets. Each blood component has its advantages for delineation of different biomarker species. Therefore, blood-based biomarkers are less specific to the brain activity compared to CSF biosignatures.

For instance, increase in tau and A β ratio in CSF from AD patients and from MCI subjects are considered as reliable biomarkers of AD [10]. However, the determination of peripheral A β and tau levels should be interpreted with caution when used for diagnosis because peripheral A β is from nonneuronal tissues and, more importantly, A β is bound to a variety of proteins in blood [133]. In serum/plasma, using classic systems, tau is virtually undetectable in MCI and/or AD but plasma tau levels are elevated in a series of pathologies, such as ischemic stroke, Creutzfeldt-Jacobs disease [134, 135], and traumatic brain injury [136]. Consequently, to have strong impact, the identification of blood-based biomarker profiles should be combined with clinical informations.

Another challenge is the extent of the loss of BBB integrity remains unknown because in addition to reducing entry into the brain, the BBB also reduces exit of molecules from the brain [137]. However, in AD, there is some degree of loss of integrity of the BBB, potentially allowing the crossing of additional molecules into the blood [138].

The progression of the disease with different preclinical and clinical stages is another challenge to identify biomarker. This means that an optimal biosignature for one stage of preclinical disease may not be best for other stages. A single biomarker may not be sensitive to the underlying pathology at multiple stages of the preclinical disease.

Another challenging factor for studies biomarkers in AD as for other diseases is the validation of healthy control subjects for comparison with AD patients who, by their advancing age, are also at risk for AD and may have underlying pathology without clinical signs. The variation of antioxidants or oxidative markers in reference group consisted of *healthy* populations could be an issue [139] due to non-standardized criteria (medication, diet, physical activity...).

6 Importance of the Pre-analytical Procedure and Standardisation of Methods

The most important issues are the adoption of standardized protocols during sample collection and other pre-analytical processes, method validation including establishing prospective quality control protocols. Up to now, the determination for reliable biomarkers for AD in peripheral blood is very challenging due to difficulties of the standardization of the methods of analysis. To validate plasma or serum biomarkers, assays should be run using validated and standardized protocols because the determination of all oxidative stress biomarkers requires a rigorous pre-analytical procedure in order to avoid artefacts. The blood sample must be drawn very carefully in order to avoid haemolysis which can interfere in some assay (e.g. determination of oxidized LDL). Once drawn, the blood has to be immediately centrifuged at 3000 rpm during 15 min if possible at 4 °C. Indeed, the concentration of some antioxidants such as vitamin C, β -carotene and reduced glutathione may rapidly

decrease within 30 min if the whole blood is kept at room temperature before centrifugation. For both vitamin C, isoprostanes and oxidized glutathione, it is also necessary to mix the plasma respectively with metaphosphoric acid, butylhydroxytoluene (BHT) and N-ethylmaleimide in order to prevent spontaneous oxidation of the markers in the tube. At least, plasma or serum must be immediately frozen on dry ice and then kept at -80°C until analysis which must be performed as soon as possible. Lack of standardization of procedures for blood collection, processing, and storage (time in storage, number of subsequent freeze-thaw cycles) leads to preanalytical variability (incubation times before separating plasma (or serum) from cells, type of blood collection tubes, temperature for collection and storage) causing inconsistencies in downstream analysis and results [140, 141].

In 2014, the international working group of the Standards for Alzheimer's Research in Blood biomarkers (STAR-B) and Blood-Based Biomarker Interest Group (BBBIG) have published the first set of guidelines in order to standardize preanalytical variables for blood-based biomarker studies [142, 143]. The principle of the guidelines for preanalytical methods for blood-based AD biomarker by BBBIG/STAR-B working group follows the regulatory good laboratory practice as defined by Clinical Laboratory Improvement Amendment in United States or international standards of Clinical Laboratory Standards Initiative. For the progress of blood-based biomarker studies in AD, the adoption of guidelines to standardize preanalytical methods across cohorts and laboratories is required. Therefore, the BBBIG/STAR-B guidelines are a good starting point toward standardized methods that will be essential to move putative blood-based biomarkers forward in future studies.

The downstream analytical methods should be validated on the same matrix (e.g., serum, plasma, urine...). Analytical validation should include calibration curves, intra- and interprecision and accuracy. Serum and plasma contain high amounts of albumin and immunoglobulins, successful protein biomarker discovery requires enrichment techniques for low abundance proteins and sensitive technological platforms to facilitate detection and quantification of protein biomarkers. Sample size for controls and AD groups should be large enough. The identification of new biomarkers should be validated, replicated and compared with existing gold standards and validated in larger studies and validated in different groups. Demographic information (age, gender, education...), APOE status should be included. Further complications in the interpretation of plasma profiles then arise from the use of different types of medication for patients with AD. For instance, a study with limited number of patients (10 controls and 21 AD) showed that the medication including Rivastigmine and Donepezil-Memantin could modify the pattern of oxidative markers [144]. Patients with AD have impaired systemic availability of several nutrients which could impact on peripheral antioxidant levels. Finally, the potential issue is the variability in results depending on the statistical or computational methods used to identify these biomarkers.

7 Conclusion

AD pathology could begin approximately 10–15 years before the appearance of cognitive impairment, thus, the identification of biomarkers that can detect AD pathology in its early stages would be valuable for monitoring the efficacy of disease interventions during clinical trials. In this regards, there is an intensive search for novel biomarker candidates using a plethora of approaches. Current CSF biomarkers and neuroimaging data are accurate for disease detection. However, for large scale studies and for repeated measures, peripheral biomarkers present more advantages. Thus, there is a concerted research effort toward the development of biomarker panels using blood as matrix.

Alterations of peripheral antioxidants balance and elevation of by-product of oxidation were evidenced in numerous studies with controversial results in AD and in mild cognitive patients (MCI) in both the brain and the blood stream.

More longitudinal and cross-validation studies with larger and more diverse ethnic cohorts are required to validate biomarker panels that could be used clinically.

Finally, the criteria used for the selection of controls, the standardisation of the pre-analytical procedure, and of the downstream of the analytical methods are necessary.

Support: Chaire Louise & André Charron Fondation universitaire sur la maladie d'Alzheimer,

INRS-Armand-Frappier, INAF, Univ.Laval

References

1. Thies W, Bleiler L. 2013 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2013; 9:208–45.
2. Fiandaca MS, Mapstone ME, Cheema AK, Federoff HJ. The critical need for defining pre-clinical biomarkers in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2014;10:S196–212.
3. Stefanacci RG. The costs of Alzheimer's disease and the value of effective therapies. *Am J Manag Care.* 2011;17 Suppl 13:S356–62.
4. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, Iwatsubo T, Jack Jr CR, Kaye J, Montine TJ, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2011;7:280–92.
5. Savva GM, Wharton SB, Ince PG, Forster G, Matthews FE, Brayne C. Age, neuropathology, and dementia. *N Engl J Med.* 2009;360:2302–9.
6. Morris JC, Cummings J. Mild cognitive impairment (MCI) represents early-stage Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2005;7:235–9. discussion 255–262.
7. Storandt M, Grant EA, Miller JP, Morris JC. Rates of progression in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Neurology.* 2002;59:1034–41.

8. Jack Jr CR, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, Petersen RC, Trojanowski JQ. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol.* 2010;9:119–28.
9. Petersen RC, Aisen PS, Beckett LA, Donohue MC, Gamst AC, Harvey DJ, Jack Jr CR, Jagust WJ, Shaw LM, Toga AW, et al. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI): clinical characterization. *Neurology.* 2010;74:201–9.
10. Andreasen N, Hesse C, Davidsson P, Minthon L, Wallin A, Winblad B, Vanderstichele H, Vanmechelen E, Blennow K. Cerebrospinal fluid beta-amyloid(1-42) in Alzheimer disease: differences between early- and late-onset alzheimer disease and stability during the course of disease. *Arch Neurol.* 1999;56:673–80.
11. Roe CM, Fagan AM, Williams MM, Ghoshal N, Aeschleman M, Grant EA, Marcus DS, Mintun MA, Holtzman DM, Morris JC. Improving CSF biomarker accuracy in predicting prevalent and incident Alzheimer disease. *Neurology.* 2011;76:501–10.
12. Apostolova LG, Hwang KS, Andrawis JP, Green AE, Babakchanian S, Morra JH, Cummings JL, Toga AW, Trojanowski JQ, Shaw LM, et al. 3D PIB and CSF biomarker associations with hippocampal atrophy in ADNI subjects. *Neurobiol Aging.* 2010;31:1284–303.
13. Kim S, Swaminathan S, Shen L, Risacher SL, Nho K, Foroud T, Shaw LM, Trojanowski JQ, Potkin SG, Huentelman MJ, et al. Genome-wide association study of CSF biomarkers Abeta1-42, t-tau, and p-tau181p in the ADNI cohort. *Neurology.* 2011;76:69–79.
14. Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, Gamst A, Holtzman DM, Jagust WJ, Petersen RC, et al. 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.* 2011;7:270–9.
15. Yang L, Rieves D, Ganley C. Brain amyloid imaging—FDA approval of florbetapir F18 injection. *N Engl J Med.* 2012;367:885–7.
16. Landau SM, Lu M, Joshi AD, Pontecorvo M, Mintun MA, Trojanowski JQ, Shaw LM, Jagust WJ. Comparing positron emission tomography imaging and cerebrospinal fluid measurements of beta-amyloid. *Ann Neurol.* 2013;74:826–36.
17. Hellwig S, Hull M, Meyer PT. Negative amyloid PET imaging in a patient with probable Alzheimer's disease. *Clin Nucl Med.* 2011;36:1120–1.
18. Weise D, Tiepolte S, Awissusa C, Hoffmann K-T, Lobsiend D, Kaisere T, Barthelc H, Sabric O, Gertza HJ. Critical comparison of different biomarkers for Alzheimer's disease in a clinical setting. *J Alzheimers Dis.* 2015;48:425–32.
19. Ray S, Britschgi M, Herbert C, Takeda-Uchimura Y, Boxer A, Blennow K, Friedman LF, Galasko DR, Jutel M, Karydas A, et al. Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat Med.* 2007;13:1359–62.
20. Thambisetty M, Simmons A, Velayudhan L, Hye A, Campbell J, Zhang Y, Wahlund LO, Westman E, Kinsey A, Guntert A, et al. Association of plasma clusterin concentration with severity, pathology, and progression in Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry.* 2010;67:739–48.
21. O'Bryant SE, Xiao G, Barber R, Reisch J, Doody R, Fairchild T, Adams P, Waring S, Diaz-Arrastia R. A serum protein-based algorithm for the detection of Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2010;67:1077–81.
22. Fehlbaum-Beurdeley P, Sol O, Desire L, Touchon J, Dantoine T, Verclletto M, Gabelle A, Jarrige AC, Haddad R, Lemarie JC, et al. Validation of AclarusDx, a blood-based transcriptomic signature for the diagnosis of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2012;32:169–81.
23. Sato Y, Suzuki I, Nakamura T, Bernier F, Aoshima K, Oda Y. Identification of a new plasma biomarker of Alzheimer's disease using metabolomics technology. *J Lipid Res.* 2012;53:567–76.
24. Kiddle SJ, Sattlecker M, Proitsi P, Simmons A, Westman E, Bazenet C, Nelson SK, Williams S, Hodges A, Johnston C, et al. Candidate blood proteome markers of Alzheimer's disease onset and progression: a systematic review and replication study. *J Alzheimers Dis.* 2014;38:515–31.

25. Tan L, Yu JT, Liu QY, Tan MS, Zhang W, Hu N, Wang YL, Sun L, Jiang T. Circulating miR-125b as a biomarker of Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 2014;336:52–6.
26. Leidinger P, Backes C, Deutscher S, Schmitt K, Mueller SC, Frese K, Haas J, Ruprecht K, Paul F, Stahler C, et al. A blood based 12-miRNA signature of Alzheimer disease patients. *Genome Biol.* 2013;14:R78.
27. Guidi I, Galimberti D, Lonati S, Novembrino C, Bamonti F, Tiriticco M, Fenoglio C, Venturelli E, Baron P, Bresolin N, et al. Oxidative imbalance in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2006;27:262–9.
28. Puertas MC, Martinez-Martos JM, Cobo MP, Carrera MP, Mayas MD, Ramirez-Exposito MJ. Plasma oxidative stress parameters in men and women with early stage Alzheimer type dementia. *Exp Gerontol.* 2012;47:625–30.
29. Sultana R, Butterfield DA. Role of oxidative stress in the progression of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2010;19:341–53.
30. Cristalli DO, Arnal N, Marra FA, de Alaniz MJ, Marra CA. Peripheral markers in neurodegenerative patients and their first-degree relatives. *J Neurol Sci.* 2012;314:48–56.
31. Korolainen MA, Pirttila T. Cerebrospinal fluid, serum and plasma protein oxidation in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand.* 2009;119:32–8.
32. Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, et al. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001;60:759–67.
33. Skoumalova A, Hort J. Blood markers of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med.* 2012;16:2291–300.
34. Chang YT, Chang WN, Tsai NW, Huang CC, Kung CT, Su YJ, Lin WC, Cheng BC, Su CM, Chiang YF, et al. The roles of biomarkers of oxidative stress and antioxidant in Alzheimer's disease: a systematic review. *Biomed Res Int.* 2014;2014:182303.
35. Schrag M, Mueller C, Zabel M, Crofton A, Kirsch WM, Ghribi O, Squitti R, Perry G. Oxidative stress in blood in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a meta-analysis. *Neurobiol Dis.* 2013;59:100–10.
36. Glaso M, Nordbo G, Diep L, Bohmer T. Reduced concentrations of several vitamins in normal weight patients with late-onset dementia of the Alzheimer type without vascular disease. *J Nutr Health Aging.* 2004;8:407–13.
37. Mecocci P, Polidori MC, Cherubini A, Ingegneri T, Mattioli P, Catani M, Rinaldi P, Cecchetti R, Stahl W, Senin U, et al. Lymphocyte oxidative DNA damage and plasma antioxidants in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2002;59:794–8.
38. Polidori MC, Mattioli P, Aldred S, Cecchetti R, Stahl W, Griffiths H, Senin U, Sies H, Mecocci P. Plasma antioxidant status, immunoglobulin g oxidation and lipid peroxidation in demented patients: relevance to Alzheimer disease and vascular dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2004;18:265–70.
39. Rinaldi P, Polidori MC, Metastasio A, Mariani E, Mattioli P, Cherubini A, Catani M, Cecchetti R, Senin U, Mecocci P. Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2003;24:915–9.
40. Zafrilla P, Mulero J, Xandri JM, Santo E, Caravaca G, Morillas JM. Oxidative stress in Alzheimer patients in different stages of the disease. *Curr Med Chem.* 2006;13:1075–83.
41. Kim TS, Pae CU, Yoon SJ, Jang WY, Lee NJ, Kim JJ, Lee SJ, Lee C, Paik IH, Lee CU. Decreased plasma antioxidants in patients with Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2006;21:344–8.
42. Maesaka JK, Wolf-Klein G, Piccione JM, Ma CM. Hypouricemia, abnormal renal tubular urate transport, and plasma natriuretic factor(s) in patients with Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc.* 1993;41:501–6.
43. Ruggiero C, Cherubini A, Lauretani F, Bandinelli S, Maggio M, Di Iorio A, Zuliani G, Dragonas C, Senin U, Ferrucci L. Uric acid and dementia in community-dwelling older persons. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2009;27:382–9.
44. Fernandes MA, Proenca MT, Nogueira AJ, Grazina MM, Oliveira LM, Fernandes AI, Santiago B, Santana I, Oliveira CR. Influence of apolipoprotein E genotype on blood redox status of Alzheimer's disease patients. *Int J Mol Med.* 1999;4:179–86.

45. Irizarry MC, Raman R, Schwarzschild MA, Becerra LM, Thomas RG, Peterson RC, Ascherio A, Aisen PS. Plasma urate and progression of mild cognitive impairment. *Neurodegener Dis.* 2009;6:23–8.
46. Sinclair AJ, Bayer AJ, Johnston J, Warner C, Maxwell SR. Altered plasma antioxidant status in subjects with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Int J Geriatr Psychiatry.* 1998;13:840–5.
47. Foy CJ, Passmore AP, Vahidassr MD, Young IS, Lawson JT. Plasma chain-breaking antioxidants in Alzheimer's disease, vascular dementia and Parkinson's disease. *QJM.* 1999;92:39–45.
48. Bourdel-Marchasson I, Delmas-Beauvieux MC, Peuchant E, Richard-Harston S, Decamps A, Reignier B, Emeriau JP, Rainfray M. Antioxidant defences and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients. *Age Ageing.* 2001;30:235–41.
49. Polidori MC, Mecocci P. Plasma susceptibility to free radical-induced antioxidant consumption and lipid peroxidation is increased in very old subjects with Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis.* 2002;4:517–22.
50. Iuliano L, Monticolo R, Straface G, Spoletini I, Gianni W, Caltagirone C, Bossu P, Spalletta G. Vitamin E and enzymatic/oxidative stress-driven oxysterols in amnesic mild cognitive impairment subtypes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2010;21:1383–92.
51. Zaman Z, Roche S, Fielden P, Frost PG, Niriella DC, Cayley AC. Plasma concentrations of vitamins A and E and carotenoids in Alzheimer's disease. *Age Ageing.* 1992;21:91–4.
52. Mangialasche F, Westman E, Kivipelto M, Muehlboeck JS, Cecchetti R, Baglioni M, Tarducci R, Gobbi G, Floridi P, Soininen H, et al. Classification and prediction of clinical diagnosis of Alzheimer's disease based on MRI and plasma measures of alpha-/gamma-tocotrienols and gamma-tocopherol. *J Intern Med.* 2013;273:602–21.
53. Mangialasche F, Xu W, Kivipelto M, Costanzi E, Ercolani S, Pigliautile M, Cecchetti R, Baglioni M, Simmons A, Soininen H, et al. Tocopherols and tocotrienols plasma levels are associated with cognitive impairment. *Neurobiol Aging.* 2012;33:2282–90.
54. Mangialasche F, Kivipelto M, Mecocci P, Rizzuto D, Palmer K, Winblad B, Fratiglioni L. High plasma levels of vitamin E forms and reduced Alzheimer's disease risk in advanced age. *J Alzheimers Dis.* 2010;20:1029–37.
55. Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grundman M, Woodbury P, Growdon J, Cotman CW, Pfeiffer E, et al. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *N Engl J Med.* 1997;336:1216–22.
56. Arlt S, Muller-Thomsen T, Beisiegel U, Kontush A. Effect of one-year vitamin C- and E-supplementation on cerebrospinal fluid oxidation parameters and clinical course in Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* 2012;37:2706–14.
57. Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Locke S. Quantitative measurement of the total, peroxyl radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. *FEBS Lett.* 1985;187:33–7.
58. Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Barclay LR, Locke SJ. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta.* 1987;924:408–19.
59. Li FJ, Shen L, Ji HF. Dietary intakes of vitamin E, vitamin C, and beta-carotene and risk of Alzheimer's disease: a meta-analysis. *J Alzheimers Dis.* 2012;31:253–8.
60. Devore EE, Kang JH, Stampfer MJ, Grodstein F. Total antioxidant capacity of diet in relation to cognitive function and decline. *Am J Clin Nutr.* 2010;92:1157–64.
61. Mangialasche F, Solomon A, Kareholt I, Hooshmand B, Cecchetti R, Fratiglioni L, Soininen H, Laatikainen T, Mecocci P, Kivipelto M. Serum levels of vitamin E forms and risk of cognitive impairment in a Finnish cohort of older adults. *Exp Gerontol.* 2013;48:1428–35.
62. Riviere S, Birlouez-Aragon I, Nourhashemi F, Vellas B. Low plasma vitamin C in Alzheimer patients despite an adequate diet. *Int J Geriatr Psychiatry.* 1998;13:749–54.

63. Charlton KE, Rabinowitz TL, Geffen LN, Dhansay MA. Lowered plasma vitamin C, but not vitamin E, concentrations in dementia patients. *J Nutr Health Aging*. 2004;8:99–107.
64. Harrison FE. A critical review of vitamin C for the prevention of age-related cognitive decline and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2012;29:711–26.
65. Engelhart MJ, Ruitenberga A, Meijer J, Kiliaan A, van Swieten JC, Hofman A, Witteman JC, Breteler MM. Plasma levels of antioxidants are not associated with Alzheimer's disease or cognitive decline. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2005;19:134–9.
66. Serra JA, Dominguez RO, Marschoff ER, Guareschi EM, Famulari AL, Boveris A. Systemic oxidative stress associated with the neurological diseases of aging. *Neurochem Res*. 2009;34:2122–32.
67. Aybek H, Ercan F, Aslan D, Sahiner T. Determination of malondialdehyde, reduced glutathione levels and APOE4 allele frequency in late-onset Alzheimer's disease in Denizli, Turkey. *Clin Biochem*. 2007;40:172–6.
68. Gironi M, Bianchi A, Russo A, Alberoni M, Ceresa L, Angelini A, Cursano C, Mariani E, Nemni R, Kullmann C, et al. Oxidative imbalance in different neurodegenerative diseases with memory impairment. *Neurodegener Dis*. 2011;8:129–37.
69. Bermejo P, Martin-Aragon S, Benedi J, Susin C, Felici E, Gil P, Ribera JM, Villar AM. Peripheral levels of glutathione and protein oxidation as markers in the development of Alzheimer's disease from Mild Cognitive Impairment. *Free Radic Res*. 2008;42:162–70.
70. Baldeiras I, Santana I, Proenca MT, Garrucho MH, Pascoal R, Rodrigues A, Duro D, Oliveira CR. Peripheral oxidative damage in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2008;15:117–28.
71. Welsh SW, Corrigan FM, Smith WE, Horrobin DF. Plasma thiols, cognitive function and ageing. *Clin Chim Acta*. 1996;249:183–7.
72. Pincemail J, Degruene F, Voussure S, Malherbe C, Paquot N, Defraigne JO. Effect of a diet rich in fruits and vegetables on the plasmatic antioxidant rates and of the markers of the oxidative damage. *Nutrition Clinique Et Metabolisme*. 2007;21:66–75.
73. Chico L, Simoncini C, Lo Gerfo A, Rocchi A, Petrozzi L, Carlesi C, Volpi L, Tognoni G, Siciliano G, Bonuccelli U. Oxidative stress and APO E polymorphisms in Alzheimer's disease and in mild cognitive impairment. *Free Radic Res*. 2013;47:569–76.
74. Tabet N, Mantle D, Walker Z, Orrell M. Vitamins, trace elements, and antioxidant status in dementia disorders. *Int Psychogeriatr*. 2001;13:265–75.
75. Fernandes MA, Oliveira CR, Oliveira LM, Nogueira AJ, Santiago B, Santana I. Apolipoprotein E epsilon 4 allele is a risk factor for Alzheimer's disease: the central region of Portugal (Coimbra) as a case study. *Eur Neurol*. 1999;42:183–4.
76. Ceballos-Picot I, Merad-Boudia M, Nicole A, Thevenin M, Hellier G, Legrain S, Berr C. Peripheral antioxidant enzyme activities and selenium in elderly subjects and in dementia. *Free Radic Biol Med*. 1996;20:579–87.
77. de Lustig ES, Serra JA, Kohan S, Canziani GA, Famulari AL, Dominguez RO. Copper-zinc superoxide dismutase activity in red blood cells and serum in demented patients and in aging. *J Neurol Sci*. 1993;115:18–25.
78. de Lustig ES, Kohan S, Famulari AL, Dominguez RO, Serra JA. Peripheral markers and diagnostic criteria in Alzheimer's disease: critical evaluations. *Rev Neurosci*. 1994;5:213–25.
79. Casado A, Encarnacion Lopez-Fernandez M, Concepcion Casado Mde La Torre R. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in vascular and Alzheimer dementias. *Neurochem Res*. 2008;33:450–8.
80. Snaedal J, Kristinsson J, Gunnarsdottir S, Olafsdottir, Baldvinsson M, Johannesson T. Copper, ceruloplasmin and superoxide dismutase in patients with Alzheimer's disease. A case-control study. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 1998; 9: 239–42.
81. Kharrazi H, Vaisi-Raygani A, Rahimi Z, Tavilani H, Aminian M, Pourmotabbed T. Association between enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense mechanism with apolipoprotein E genotypes in Alzheimer disease. *Clin Biochem*. 2008;41:932–6.

82. Ozcankaya R, Delibas N. Malondialdehyde, superoxide dismutase, melatonin, iron, copper, and zinc blood concentrations in patients with Alzheimer disease: cross-sectional study. *Croat Med J.* 2002;43:28–32.
83. Rossi L, Squitti R, Pasqualetti P, Marchese E, Cassetta E, Forastiere E, Rotilio G, Rossini PM, Finazzi-Agro A. Red blood cell copper, zinc superoxide dismutase activity is higher in Alzheimer's disease and is decreased by D-penicillamine. *Neurosci Lett.* 2002;329:137–40.
84. De Leo ME, Borrello S, Passantino M, Palazzotti B, Mordente A, Daniele A, Filippini V, Galeotti T, Masullo C. Oxidative stress and overexpression of manganese superoxide dismutase in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 1998;250:173–6.
85. Ihara Y, Hayabara T, Sasaki K, Fujisawa Y, Kawada R, Yamamoto T, Nakashima Y, Yoshimune S, Kawai M, Kibata M, et al. Free radicals and superoxide dismutase in blood of patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Neurol Sci.* 1997;153:76–81.
86. Padurariu M, Ciobica A, Hritcu L, Stoica B, Bild W, Stefanescu C. Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2010;469:6–10.
87. Picco A, Polidori MC, Ferrara M, Cecchetti R, Arnaldi D, Baglioni M, Morbelli S, Bastiani P, Bossert I, Fiorucci G, et al. Plasma antioxidants and brain glucose metabolism in elderly subjects with cognitive complaints. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2014;41:764–75.
88. Pincemail J, Cillard J, Neve J, Defraigne JO. [Determination of the plasma global antioxidant capacity: a critical review]. *Ann Biol Clin (Paris).* 2014;72:413–21.
89. Torres LL, Quaglio NB, de Souza GT, Garcia RT, Dati LM, Moreira WL, Loureiro AP, de Souza-Talarico JN, Smid J, Porto CS, et al. Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2011;26:59–68.
90. Martin-Aragon S, Bermejo-Bescos P, Benedi J, Felici E, Gil P, Ribera JM, Villar AM. Metalloproteinase's activity and oxidative stress in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* 2009;34:373–8.
91. Krishnan S, Rani P. Evaluation of selenium, redox status and their association with plasma amyloid/tau in Alzheimer's disease. *Biol Trace Elem Res.* 2014;158:158–65.
92. Bermejo P, Gomez-Serranillos P, Santos J, Pastor E, Gil P, Martin-Aragon S. Determination of malonaldehyde in Alzheimer's disease: a comparative study of high-performance liquid chromatography and thiobarbituric acid test. *Gerontology.* 1997;43:218–22.
93. Revel F, Gilbert T, Roche S, Drai J, Blond E, Ecochard R, Bonnefoy M. Influence of oxidative stress biomarkers on cognitive decline. *J Alzheimers Dis.* 2015;45:553–60.
94. Famulari AL, Marschoff ER, Llesuy SF, Kohan S, Serra JA, Dominguez RO, Repetto M, Reides C, Sacerdote de Lustig E. The antioxidant enzymatic blood profile in Alzheimer's and vascular diseases. Their association and a possible assay to differentiate demented subjects and controls. *J Neurol Sci.* 1996;141:69–78.
95. Vural H, Demirin H, Kara Y, Eren I, Delibas N. Alterations of plasma magnesium, copper, zinc, iron and selenium concentrations and some related erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with Alzheimer's disease. *J Trace Elem Med Biol.* 2010;24:169–73.
96. Cao G, Prior RL. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods Enzymol.* 1999;299:50–62.
97. Rice-Evans C, Miller NJ. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol.* 1994;234:279–93.
98. Sies H. Total antioxidant capacity: appraisal of a concept. *J Nutr.* 2007;137:1493–5.
99. Butterfield DA, Perluigi M, Sultana R. Oxidative stress in Alzheimer's disease brain: new insights from redox proteomics. *Eur J Pharmacol.* 2006;545:39–50.
100. Singh M, Nam DT, Arseneault M, Ramassamy C. Role of by-products of lipid oxidation in Alzheimer's disease brain: a focus on acrolein. *J Alzheimers Dis.* 2010;21(3):741–56.
101. Migliore L, Fontana I, Trippi F, Colognato R, Coppede F, Tognoni G, Nucciarone B, Siciliano G. Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AD patients. *Neurobiol Aging.* 2005;26:567–73.
102. Stadtman ER, Berlett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol.* 1997;10:485–94.

103. Vitek MP, Bhattacharya K, Glendening JM, Stopa E, Vlassara H, Bucala R, Manogue K, Cerami A. Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:4766–70.
104. Sultana R, Poon HF, Cai J, Pierce WM, Merchant M, Klein JB, Markesbery WR, Butterfield DA. Identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain using a redox proteomics approach. *Neurobiol Dis*. 2006;22:76–87.
105. Conrad CC, Marshall PL, Talent JM, Malakowsky CA, Choi J, Gracy RW. Oxidized proteins in Alzheimer's plasma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;275:678–81.
106. Aldred S, Bennett S, Mecocci P. Increased low-density lipoprotein oxidation, but not total plasma protein oxidation, in Alzheimer's disease. *Clin Biochem*. 2010;43:267–71.
107. Korolainen MA, Nyman TA, Nyyssonen P, Hartikainen ES, Pirttila T. Multiplexed proteomic analysis of oxidation and concentrations of cerebrospinal fluid proteins in Alzheimer disease. *Clin Chem*. 2007;53:657–65.
108. Sinem F, Dildar K, Gokhan E, Melda B, Orhan Y, Filiz M. The serum protein and lipid oxidation marker levels in Alzheimer's disease and effects of cholinesterase inhibitors and antipsychotic drugs therapy. *Curr Alzheimer Res*. 2010;7:463–9.
109. Laske C, Leyhe T, Stransky E, Hoffmann N, Fallgatter AJ, Dietzsch J. Identification of a blood-based biomarker panel for classification of Alzheimer's disease. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2011;14:1147–55.
110. Gilbert HF. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1990;63:69–172.
111. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Colombo R, Milzani A. S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radic Biol Med*. 2007;43:883–98.
112. Munch G, Keis R, Wessels A, Riederer P, Bahner U, Heidland A, Niwa T, Lemke HD, Schinzel R. Determination of advanced glycation end products in serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1997;35:669–77.
113. Tanzi RE, Moir RD, Wagner SL. Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: the many roads to perdition. *Neuron*. 2004;43:605–8.
114. Raucci A, Cugusi S, Antonelli A, Barabino SM, Monti L, Bierhaus A, Reiss K, Saftig P, Bianchi ME. A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J*. 2008;22:3716–27.
115. Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol*. 2014;2:411–29.
116. Liang F, Jia J, Wang S, Qin W, Liu G. Decreased plasma levels of soluble low density lipoprotein receptor-related protein-1 (sLRP) and the soluble form of the receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in the clinical diagnosis of Alzheimer's disease. *J Clin Neurosci*. 2013;20:357–61.
117. Korkmaz GG, Altinoglu E, Civelek S, Sozer V, Erdenen F, Tabak O, Uzun H. The association of oxidative stress markers with conventional risk factors in the metabolic syndrome. *Metabolism*. 2013;62:828–35.
118. Uzun D, Yanar K, Atukeren P, Cebe T, Mengi M, Ozan T, Kunbaz A, Kuruc AI, Cakatay U, Aydin S. Age-related changes in rat prostate tissue; perspective of protein oxidation. *Aging Male*. 2015;18:54–9.
119. Dang TN, Arseneault M, Zarkovic N, Waeg G, Ramassamy C. Molecular regulations induced by acrolein in neuroblastoma SK-N-SH cells: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2010;21:1197–216.
120. Nam DT, Arseneault M, Ramassamy C. Regulation of redox-sensitive signaling pathways in rat primary astrocytes following acrolein exposure. *J Alzheimers Dis*. 2011;25:263–77.
121. Galbusera C, Facheris M, Magni F, Galimberti G, Sala G, Tremolada L, Isella V, Guerini FR, Appollonio I, Galli-Kienle M, et al. Increased susceptibility to plasma lipid peroxidation in Alzheimer disease patients. *Curr Alzheimer Res*. 2004;1:103–9.
122. Pincemail J. Contribution à l'étude du rôle de l'oxygène et des radicaux libres chez l'homme et l'animal. Thèse Doctorat en Sciences Biomédicales Expérimentales, Université 1990.

123. Yin H. New techniques to detect oxidative stress markers: mass spectrometry-based methods to detect isoprostanes as the gold standard for oxidative stress in vivo. *Biofactors*. 2008; 34:109–24.
124. Miller E, Morel A, Saso L, Saluk J. Isoprostanes and neuroprostanes as biomarkers of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:572491.
125. Pratico D, Clark CM, Liun F, Rokach J, Lee VY, Trojanowski JQ. Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment: a possible predictor of Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2002;59:972–6.
126. Lauretti E, Di Meco A, Chu J, Pratico D. Modulation of AD neuropathology and memory impairments by the isoprostane F2alpha is mediated by the thromboxane receptor. *Neurobiol Aging*. 2015;36:812–20.
127. McGrath LT, McGleenon BM, Brennan S, McColl D, McILroy S, Passmore AP. Increased oxidative stress in Alzheimer's disease as assessed with 4-hydroxynonenal but not malondialdehyde. *QJM*. 2001;94:485–90.
128. Selley ML, Close DR, Stern SE. The effect of increased concentrations of homocysteine on the concentration of (E)-4-hydroxy-2-nonenal in the plasma and cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2002;23:383–8.
129. Klawitter J, Haschke M, Shokati T, Christians U. Quantification of 15-F2t-isoprostane in human plasma and urine: results from enzyme-linked immunoassay and liquid chromatography/tandem mass spectrometry cannot be compared. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2011; 25:463–8.
130. Janicka M, Kot-Wasik A, Kot J, Namiesnik J. Isoprostanes-biomarkers of lipid peroxidation: their utility in evaluating oxidative stress and analysis. *Int J Mol Sci*. 2010;11:4631–59.
131. Nam DT, Arseneault M, Murthy V, Ramassamy C. Potential role of acrolein in neurodegeneration and in Alzheimer's disease. *Curr Mol Pharmacol*. 2010;3:66–78.
132. Huang YJ, Jin MH, Pi RB, Zhang JJ, Ouyang Y, Chao XJ, Chen MH, Liu PQ, Yu JC, Ramassamy C, et al. Acrolein induces Alzheimer's disease-like pathologies in vitro and in vivo. *Toxicol Lett*. 2013;217:184–91.
133. Marcello A, Wirths O, Schneider-Axmann T, Degerman-Gunnarsson M, Lannfelt L, Bayer TA. Circulating immune complexes of Aβeta and IgM in plasma of patients with Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 2009;116:913–20.
134. Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, Nozaki I, Sakai K, Yamada M. Serum tau protein as a marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol*. 2011;258:1464–8.
135. Bielewicz J, Kurzepa J, Czekańska-Chehab E, Stelmasiak Z, Bartosik-Psujek H. Does serum Tau protein predict the outcome of patients with ischemic stroke? *J Mol Neurosci*. 2011;43:241–5.
136. Liliang PC, Liang CL, Weng HC, Lu K, Wang KW, Chen HJ, Chuang JH. Tau proteins in serum predict outcome after severe traumatic brain injury. *J Surg Res*. 2010;160:302–7.
137. Chalbot S, Zetterberg H, Blennow K, Fladby T, Andreasen N, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Blood-cerebrospinal fluid barrier permeability in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2011;25:505–15.
138. Zipser BD, Johanson CE, Gonzalez L, Berzin TM, Tavares R, Hulette CM, Vitek MP, Hovanessian V, Stopa EG. Microvascular injury and blood-brain barrier leakage in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2007;28:977–86.
139. Pincemail J. Oxidative stress or not in healthy older subjects ? In: Oxygen club of California world congress, Valencia, Spain 24–26 June 2015; 2015.
140. Tammen H, Hess R. Collection and handling of blood specimens for peptidomics. *Methods Mol Biol*. 2013;1023:161–8.
141. Lista S, Faltraco F, Hampel H. Biological and methodical challenges of blood-based proteomics in the field of neurological research. *Prog Neurobiol*. 2013;101–102:18–34.
142. Henriksen K, O'Bryant SE, Hampel H, Trojanowski JQ, Montine TJ, Jeromin A, Blennow K, Lonneborg A, Wyss-Coray T, Soares H, et al. The future of blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2014;10:115–31.

143. O'Bryant SE, Gupta V, Henriksen K, Edwards M, Jeromin A, Lista S, Bazenet C, Soares H, Lovestone S, Hampel H, et al. Guidelines for the standardization of preanalytic variables for blood-based biomarker studies in Alzheimer's disease research. *Alzheimers Dement*. 2015; 11:549–60.
144. Gubandru M, Margina D, Tsitsimpikou C, Goutzourelas N, Tsarouhas K, Ilie M, Tsatsakis AM, Kouretas D. Alzheimer's disease treated patients showed different patterns for oxidative stress and inflammation markers. *Food Chem Toxicol*. 2013;61:209–14.

RÉFÉRENCES

(2018). "2018 Alzheimer's disease facts and figures." Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association **14**(3): 367-429.

Adlam, A. L., S. Bozeat, R. Arnold, P. Watson and J. R. Hodges (2006). "Semantic knowledge in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease." Cortex **42**(5): 675-684.

Agil, A., R. Duran, F. Barrero, B. Morales, M. Arauzo, F. Alba, M. T. Miranda, I. Prieto, M. Ramirez and F. Vives (2006). "Plasma lipid peroxidation in sporadic Parkinson's disease. Role of the L-dopa." J Neurol Sci **240**(1-2): 31-36.

Ahmed, R. R., C. J. Holler, R. L. Webb, F. Li, T. L. Beckett and M. P. Murphy (2010). "BACE1 and BACE2 enzymatic activities in Alzheimer's disease." J Neurochem **112**(4): 1045-1053.

Aizenstein, H. J., R. D. Nebes, J. A. Saxton, J. C. Price, C. A. Mathis, N. D. Tsopelas, S. K. Ziolkowski, J. A. James, B. E. Snitz, P. R. Houck, W. Bi, A. D. Cohen, B. J. Lopresti, S. T. DeKosky, E. M. Halligan and W. E. Klunk (2008). "Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly." Arch Neurol **65**(11): 1509-1517.

Albert, M. S., S. T. DeKosky, D. Dickson, B. Dubois, H. H. Feldman, N. C. Fox, A. Gamst, D. M. Holtzman, W. J. Jagust, R. C. Petersen, P. J. Snyder, M. C. Carrillo, B. Thies and C. H. Phelps (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**(3): 270-279.

Aldred, S., S. Bennett and P. Mecocci (2010). "Increased low-density lipoprotein oxidation, but not total plasma protein oxidation, in Alzheimer's disease." Clin Biochem **43**(3): 267-271.

Allory, Y., V. Audard, P. Fontanges, P. Ronco and H. Debiec (2008). "The L1 cell adhesion molecule is a potential biomarker of human distal nephron injury in acute tubular necrosis." Kidney International **73**(6): 751-758.

Aluise, C. D., R. A. Robinson, J. Cai, W. M. Pierce, W. R. Markesbery and D. A. Butterfield (2011). "Redox proteomics analysis of brains from subjects with amnesic mild cognitive impairment compared to brains from subjects with preclinical Alzheimer's disease: insights into memory loss in MCI." J Alzheimers Dis **23**(2): 257-269.

Alvarez-Erviti, L., Y. Seow, H. Yin, C. Betts, S. Lakhani and M. J. Wood (2011). "Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes." Nat Biotechnol **29**(4): 341-345.

Arce-Varas, N., G. Abate, C. Prandelli, C. Martinez, F. Cueto, M. Menendez, M. Marziano, D. Cabrera-Garcia, M. T. Fernandez-Sanchez, A. Novelli, M. Memo and D. Uberti (2017). "Comparison of Extracellular and Intracellular Blood Compartments

Highlights Redox Alterations in Alzheimer's and Mild Cognitive Impairment Patients." Curr Alzheimer Res **14**(1): 112-122.

Arlt, S., T. Muller-Thomsen, U. Beisiegel and A. Kontush (2012). "Effect of one-year vitamin C- and E-supplementation on cerebrospinal fluid oxidation parameters and clinical course in Alzheimer's disease." Neurochem Res **37**(12): 2706-2714.

Armstrong, R. A. and N. J. Cairns (2009). "Size frequency distribution of the beta-amyloid (abeta) deposits in dementia with Lewy bodies with associated Alzheimer's disease pathology." Neurol Sci **30**(6): 471-477.

Arneric, S. P., R. Batrla-Utermann, L. Beckett, T. Bittner, K. Blennow, L. Carter, R. Dean, S. Engelborghs, J. Genius, M. F. Gordon, J. Hitchcock, J. Kaplow, J. Luthman, R. Meibach, D. Raunig, K. Romero, M. N. Samtani, M. Savage, L. Shaw, D. Stephenson, R. M. Umek, H. Vanderstichele, B. Willis and S. Yule (2017). "Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Alzheimer's Disease: A View of the Regulatory Science Qualification Landscape from the Coalition Against Major Diseases CSF Biomarker Team." J Alzheimers Dis **55**(1): 19-35.

Arriagada, P. V., J. H. Growdon, E. T. Hedley-Whyte and B. T. Hyman (1992). "Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease." Neurology **42**(3 Pt 1): 631-639.

Asai, H., S. Ikezu, S. Tsunoda, M. Medalla, J. Luebke, T. Haydar, B. Wolozin, O. Butovsky, S. Kugler and T. Ikezu (2015). "Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation." Nat Neurosci **18**(11): 1584-1593.

Atwood, C. S., R. N. Martins, M. A. Smith and G. Perry (2002). "Senile plaque composition and posttranslational modification of amyloid-beta peptide and associated proteins." Peptides **23**(7): 1343-1350.

Ayala, A., M. F. Munoz and S. Arguelles (2014). "Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal." Oxid Med Cell Longev **2014**: 360438.

Ayers, L., R. Nieuwland, M. Kohler, N. Kraenkel, B. Ferry and P. Leeson (2015). "Dynamic microvesicle release and clearance within the cardiovascular system: triggers and mechanisms." Clin Sci (Lond) **129**(11): 915-931.

Baddeley, A. (1996). "The fractionation of working memory." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 13468-13472.

Bahrini, I., J. H. Song, D. Diez and R. Hanayama (2015). "Neuronal exosomes facilitate synaptic pruning by up-regulating complement factors in microglia." Sci Rep **5**: 7989.

Baietti, M. F., Z. Zhang, E. Mortier, A. Melchior, G. Degeest, A. Geeraerts, Y. Ivarsson, F. Depoortere, C. Coomans, E. Vermeiren, P. Zimmermann and G. David (2012). "Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes." Nat Cell Biol **14**(7): 677-685.

Baig, S., L. E. Palmer, M. J. Owen, J. Williams, P. G. Kehoe and S. Love (2012). "Clusterin mRNA and protein in Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **28**(2): 337-344.

- Baldeiras, I., I. Santana, M. T. Proenca, M. H. Garrucho, R. Pascoal, A. Rodrigues, D. Duro and C. R. Oliveira (2008). "Peripheral oxidative damage in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **15**(1): 117-128.
- Balin, B. J., C. S. Little, C. J. Hammond, D. M. Appelt, J. A. Whittum-Hudson, H. C. Gerard and A. P. Hudson (2008). "Chlamydophila pneumoniae and the etiology of late-onset Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **13**(4): 371-380.
- Ball, M. J., E. Lewis and A. T. Haase (1987). "Detection of herpes virus genome in Alzheimer's disease by in situ hybridization: a preliminary study." J Neural Transm Suppl **24**: 219-225.
- Ballesteros, S. and J. M. Reales (2004). "Intact haptic priming in normal aging and Alzheimer's disease: evidence for dissociable memory systems." Neuropsychologia **42**(8): 1063-1070.
- Barzilai, A. and K.-I. Yamamoto (2004). "DNA damage responses to oxidative stress." DNA Repair **3**(8): 1109-1115.
- Battino, M., S. Bompadre, L. Leone, E. Devecchi, A. Degiuli, F. D'Agostino, G. Cambie, M. D'Agostino, L. Faggi, G. Colturani, A. Gorini and R. F. Villa (2003). "Coenzyme Q, Vitamin E and Apo-E alleles in Alzheimer Disease." Biofactors **18**(1-4): 277-281.
- Baum, L., C. W. Lam, S. K. Cheung, T. Kwok, V. Lui, J. Tsoh, L. Lam, V. Leung, E. Hui, C. Ng, J. Woo, H. F. Chiu, W. B. Goggins, B. C. Zee, K. F. Cheng, C. Y. Fong, A. Wong, H. Mok, M. S. Chow, P. C. Ho, S. P. Ip, C. S. Ho, X. W. Yu, C. Y. Lai, M. H. Chan, S. Szeto, I. H. Chan and V. Mok (2008). "Six-month randomized, placebo-controlled, double-blind, pilot clinical trial of curcumin in patients with Alzheimer disease." J Clin Psychopharmacol **28**(1): 110-113.
- Baumgart, M., H. M. Snyder, M. C. Carrillo, S. Fazio, H. Kim and H. Johns (2015). "Summary of the evidence on modifiable risk factors for cognitive decline and dementia: A population-based perspective." Alzheimers Dement **11**(6): 718-726.
- Behl, C., J. B. Davis, R. Lesley and D. Schubert (1994). "Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity." Cell **77**(6): 817-827.
- Bejanin, A., D. R. Schonhaut, R. La Joie, J. H. Kramer, S. L. Baker, N. Sosa, N. Ayakta, A. Cantwell, M. Janabi, M. Lauriola, J. P. O'Neil, M. L. Gorno-Tempini, Z. A. Miller, H. J. Rosen, B. L. Miller, W. J. Jagust and G. D. Rabinovici (2017). "Tau pathology and neurodegeneration contribute to cognitive impairment in Alzheimer's disease." Brain **140**(12): 3286-3300.
- Bekris, L. M., S. P. Millard, N. M. Galloway, S. Vuletic, J. J. Albers, G. Li, D. R. Galasko, C. DeCarli, M. R. Farlow, C. M. Clark, J. F. Quinn, J. A. Kaye, G. D. Schellenberg, D. Tsuang, E. R. Peskind and C. E. Yu (2008). "Multiple SNPs within and surrounding the apolipoprotein E gene influence cerebrospinal fluid apolipoprotein E protein levels." J Alzheimers Dis **13**(3): 255-266.
- Bekris, L. M., C. E. Yu, T. D. Bird and D. W. Tsuang (2010). "Genetics of Alzheimer disease." J Geriatr Psychiatry Neurol **23**(4): 213-227.

Belkacemi, A. and C. Ramassamy (2012). "Time sequence of oxidative stress in the brain from transgenic mouse models of Alzheimer's disease related to the amyloid-beta cascade." Free Radic Biol Med **52**(3): 593-600.

Belkacemi, A. and C. Ramassamy (2015). "Innovative Anthocyanin/Anthocyanidin Formulation Protects SK-N-SH Cells Against the Amyloid-beta Peptide-Induced Toxicity: Relevance to Alzheimer's Disease." Cent Nerv Syst Agents Med Chem **16**(1): 37-49.

Belkacemi, A. and C. Ramassamy (2016). "Anthocyanins Protect SK-N-SH Cells Against Acrolein-Induced Toxicity by Preserving the Cellular Redox State." J Alzheimers Dis **50**(4): 981-998.

Bell, R. D., A. P. Sagare, A. E. Friedman, G. S. Bedi, D. M. Holtzman, R. Deane and B. V. Zlokovic (2007). "Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system." J Cereb Blood Flow Metab **27**(5): 909-918.

Belleville, S., H. Chertkow and S. Gauthier (2007). "Working memory and control of attention in persons with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment." Neuropsychology **21**(4): 458-469.

Belleville, S., N. Rouleau, M. Van der Linden and F. Collette (2003). "Effect of manipulation and irrelevant noise on working memory capacity of patients with Alzheimer's dementia." Neuropsychology **17**(1): 69-81.

Belleville, S., S. Sylvain-Roy, C. de Boysson and M. C. Menard (2008). "Characterizing the memory changes in persons with mild cognitive impairment." Prog Brain Res **169**: 365-375.

Bellingham, S. A., B. B. Guo, B. M. Coleman and A. F. Hill (2012). "Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases?" Front Physiol **3**: 124.

Belloir, B., E. Kovari, M. Surini-Demiri and A. Savioz (2001). "Altered apolipoprotein D expression in the brain of patients with Alzheimer disease." J Neurosci Res **64**(1): 61-69.

Benzi, G. and A. Moretti (1995). "Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system." Free Radic Biol Med **19**(1): 77-101.

Berlett, B. S. and E. R. Stadtman (1997). "Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress." J Biol Chem **272**(33): 20313-20316.

Bermejo, P., S. Martin-Aragon, J. Benedi, C. Susin, E. Felici, P. Gil, J. M. Ribera and A. M. Villar (2008). "Peripheral levels of glutathione and protein oxidation as markers in the development of Alzheimer's disease from Mild Cognitive Impairment." Free Radic Res **42**(2): 162-170.

Binder, J. R. and R. H. Desai (2011). "The neurobiology of semantic memory." Trends Cogn Sci **15**(11): 527-536.

Binder, J. R., R. H. Desai, W. W. Graves and L. L. Conant (2009). "Where is the semantic system? A critical review and meta-analysis of 120 functional neuroimaging studies." Cereb Cortex **19**(12): 2767-2796.

- Bird, T. D. (2008). "Genetic aspects of Alzheimer disease." Genet Med **10**(4): 231-239.
- Blennow, K. (2004). "Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease." NeuroRx **1**(2): 213-225.
- Blennow, K., A. Wallin and R. Ekman (1994). "Neuron specific enolase in cerebrospinal fluid: a biochemical marker for neuronal degeneration in dementia disorders?" J Neural Transm Park Dis Dement Sect **8**(3): 183-191.
- Bobinski, M., M. J. de Leon, J. Wegiel, S. Desanti, A. Convit, L. A. Saint Louis, H. Rusinek and H. M. Wisniewski (2000). "The histological validation of post mortem magnetic resonance imaging-determined hippocampal volume in Alzheimer's disease." Neuroscience **95**(3): 721-725.
- Bonneh-Barkay, D., G. Wang, A. Starkey, R. L. Hamilton and C. A. Wiley (2010). "In vivo CHI3L1 (YKL-40) expression in astrocytes in acute and chronic neurological diseases." J Neuroinflammation **7**: 34.
- Borghi, R., S. Patriarca, N. Traverso, A. Piccini, D. Storace, A. Garuti, G. Cirmena, P. Odetti and M. Tabaton (2007). "The increased activity of BACE1 correlates with oxidative stress in Alzheimer's disease." Neurobiology of Aging **28**(7): 1009-1014.
- Boveris, A., E. Cadenas, R. Reiter, M. Filipkowski, Y. Nakase and B. Chance (1980). "Organ chemiluminescence: noninvasive assay for oxidative radical reactions." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(1): 347-351.
- Bowen, D. M., C. B. Smith, P. White and A. N. Davison (1976). "Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies." Brain **99**(3): 459-496.
- Boyle, P. A., L. Yu, R. S. Wilson, S. E. Leurgans, J. A. Schneider and D. A. Bennett (2018). "Person-specific contribution of neuropathologies to cognitive loss in old age." Ann Neurol **83**(1): 74-83.
- Braak, H. and E. Braak (1991). "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes." Acta Neuropathol **82**(4): 239-259.
- Brosseron, F., A. Traschutz, C. N. Widmann, M. P. Kummer, P. Tacik, F. Santarelli, F. Jessen and M. T. Heneka (2018). "Characterization and clinical use of inflammatory cerebrospinal fluid protein markers in Alzheimer's disease." Alzheimers Res Ther **10**(1): 25.
- Brousseau, T., S. Legrain, C. Berr, V. Gourlet, O. Vidal and P. Amouyel (1994). "Confirmation of the epsilon 4 allele of the apolipoprotein E gene as a risk factor for late-onset Alzheimer's disease." Neurology **44**(2): 342-344.
- Brouwers, N., K. Sleegers and C. Van Broeckhoven (2008). "Molecular genetics of Alzheimer's disease: an update." Ann Med **40**(8): 562-583.
- Buchheit, T. E. and M. Tytell (1992). "Transfer of molecules from glia to axon in the squid may be mediated by glial vesicles." J Neurobiol **23**(3): 217-230.
- Buerger, K., M. Ewers, T. Pirttila, R. Zinkowski, I. Alafuzoff, S. J. Teipel, J. DeBernardis, D. Kerkman, C. McCulloch, H. Soininen and H. Hampel (2006). "CSF phosphorylated

tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease." Brain **129**(Pt 11): 3035-3041.

Buerger, K., S. J. Teipel, R. Zinkowski, K. Blennow, H. Arai, R. Engel, K. Hofmann-Kiefer, C. McCulloch, U. Ptok, R. Heun, N. Andreasen, J. DeBernardis, D. Kerkman, H. Moeller, P. Davies and H. Hampel (2002). "CSF tau protein phosphorylated at threonine 231 correlates with cognitive decline in MCI subjects." Neurology **59**(4): 627-629.

Buerger, K., R. Zinkowski, S. J. Teipel, T. Tapiola, H. Arai, K. Blennow, N. Andreasen, K. Hofmann-Kiefer, J. DeBernardis, D. Kerkman, C. McCulloch, R. Kohnken, F. Padberg, T. Pirttila, M. B. Schapiro, S. I. Rapoport, H. J. Moller, P. Davies and H. Hampel (2002). "Differential diagnosis of Alzheimer disease with cerebrospinal fluid levels of tau protein phosphorylated at threonine 231." Arch Neurol **59**(8): 1267-1272.

Buschow, S. I., E. N. Nolte-'t Hoen, G. van Niel, M. S. Pols, T. ten Broeke, M. Lauwen, F. Ossendorp, C. J. Melief, G. Raposo, R. Wubbolts, M. H. Wauben and W. Stoorvogel (2009). "MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways." Traffic **10**(10): 1528-1542.

Butterfield, D. A. and D. Boyd-Kimball (2004). "Amyloid beta-peptide(1-42) contributes to the oxidative stress and neurodegeneration found in Alzheimer disease brain." Brain Pathol **14**(4): 426-432.

Butterfield, D. A. and C. M. Lauderback (2002). "Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress." Free Radic Biol Med **32**(11): 1050-1060.

Butterfield, D. A., H. F. Poon, D. St Clair, J. N. Keller, W. M. Pierce, J. B. Klein and W. R. Markesbery (2006). "Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal proteins in mild cognitive impairment: insights into the development of Alzheimer's disease." Neurobiol Dis **22**(2): 223-232.

Cacace, R., K. Slegers and C. Van Broeckhoven (2016). "Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited." Alzheimers Dement **12**(6): 733-748.

Cai, Y., S. S. An and S. Kim (2015). "Mutations in presenilin 2 and its implications in Alzheimer's disease and other dementia-associated disorders." Clin Interv Aging **10**: 1163-1172.

Cairns, N. J., M. D. Ikonovic, T. Benzinger, M. Storandt, A. M. Fagan, A. R. Shah, L. T. Reinwald, D. Carter, A. Felton, D. M. Holtzman, M. A. Mintun, W. E. Klunk and J. C. Morris (2009). "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 **66**(12): 1557-1562.

Calabrese, V., R. Sultana, G. Scapagnini, E. Guagliano, M. Sapienza, R. Bella, J. Kanski, G. Pennisi, C. Mancuso, A. M. Stella and D. A. Butterfield (2006). "Nitrosative stress, cellular stress response, and thiol homeostasis in patients with Alzheimer's disease." Antioxid Redox Signal **8**(11-12): 1975-1986.

- Calero, M., A. Rostagno, E. Matsubara, B. Zlokovic, B. Frangione and J. Ghiso (2000). "Apolipoprotein J (clusterin) and Alzheimer's disease." Microsc Res Tech **50**(4): 305-315.
- Cao, G., S. L. Booth, J. A. Sadowski and R. L. Prior (1998). "Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables." Am J Clin Nutr **68**(5): 1081-1087.
- Carver, K. A. and D. Yang (2016). "N-Acetylcysteine Amide Protects Against Oxidative Stress-Induced Microparticle Release From Human Retinal Pigment Epithelial Cells." Investigative ophthalmology & visual science **57**(2): 360-371.
- Casado, A., M. Encarnacion Lopez-Fernandez, M. Concepcion Casado and R. de La Torre (2008). "Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in vascular and Alzheimer dementias." Neurochem Res **33**(3): 450-458.
- Castegna, A., M. Aksenov, M. Aksenova, V. Thongboonkerd, J. B. Klein, W. M. Pierce, R. Booze, W. R. Markesbery and D. A. Butterfield (2002). "Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1." Free Radic Biol Med **33**(4): 562-571.
- Castegna, A., M. Aksenov, V. Thongboonkerd, J. B. Klein, W. M. Pierce, R. Booze, W. R. Markesbery and D. A. Butterfield (2002). "Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2, alpha-enolase and heat shock cognate 71." J Neurochem **82**(6): 1524-1532.
- Castegna, A., V. Thongboonkerd, J. B. Klein, B. Lynn, W. R. Markesbery and D. A. Butterfield (2003). "Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain." J Neurochem **85**(6): 1394-1401.
- Chai, W. J., A. I. Abd Hamid and J. M. Abdullah (2018). "Working Memory From the Psychological and Neurosciences Perspectives: A Review." Front Psychol **9**: 401.
- Chang, L., D. M. Rissin, D. R. Fournier, T. Piech, P. P. Patel, D. H. Wilson and D. C. Duffy (2012). "Single molecule enzyme-linked immunosorbent assays: theoretical considerations." J Immunol Methods **378**(1-2): 102-115.
- Chang, Y. T., W. N. Chang, N. W. Tsai, C. C. Huang, C. T. Kung, Y. J. Su, W. C. Lin, B. C. Cheng, C. M. Su, Y. F. Chiang and C. H. Lu (2014). "The roles of biomarkers of oxidative stress and antioxidant in Alzheimer's disease: a systematic review." Biomed Res Int **2014**: 182303.
- Chao, J. C., M. D. Yuan, P. Y. Chen and S. W. Chien (2002). "Vitamin C and E supplements improve the impaired antioxidant status and decrease plasma lipid peroxides in hemodialysis patients small star, filled." J Nutr Biochem **13**(11): 653-663.
- Charlton, K. E., T. L. Rabinowitz, L. N. Geffen and M. A. Dhansay (2004). "Lowered plasma vitamin C, but not vitamin E, concentrations in dementia patients." J Nutr Health Aging **8**(2): 99-107.
- Charrin, S., S. Jouannet, C. Boucheix and E. Rubinstein (2014). "Tetraspanins at a glance." J Cell Sci **127**(Pt 17): 3641-3648.

Chaves, M. L., A. L. Camozzato, E. D. Ferreira, I. Piazenski, R. Kochhann, O. Dall'Igna, G. S. Mazzini, D. O. Souza and L. V. Portela (2010). "Serum levels of S100B and NSE proteins in Alzheimer's disease patients." J Neuroinflammation **7**: 6.

Cheignon, C., M. Tomas, D. Bonnefont-Rousselot, P. Faller, C. Hureau and F. Collin (2018). "Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease." Redox Biol **14**: 450-464.

Cheng, S. Y. and L. D. Trombetta (2004). "The induction of amyloid precursor protein and alpha-synuclein in rat hippocampal astrocytes by diethyldithiocarbamate and copper with or without glutathione." Toxicol Lett **146**(2): 139-149.

Chetelat, G., V. L. Villemagne, K. E. Pike, K. A. Ellis, P. Bourgeat, G. Jones, G. J. O'Keefe, O. Salvado, C. Szoeki, R. N. Martins, D. Ames, C. L. Masters and C. C. Rowe (2011). "Independent contribution of temporal beta-amyloid deposition to memory decline in the pre-dementia phase of Alzheimer's disease." Brain **134**(Pt 3): 798-807.

Chi, S., J. T. Yu, M. S. Tan and L. Tan (2014). "Depression in Alzheimer's disease: epidemiology, mechanisms, and management." J Alzheimers Dis **42**(3): 739-755.

Chitramuthu, B. P., H. P. J. Bennett and A. Bateman (2017). "Progranulin: a new avenue towards the understanding and treatment of neurodegenerative disease." Brain **140**(12): 3081-3104.

Chiu, M. J., S. Y. Yang, T. F. Chen, J. J. Chieh, T. Z. Huang, P. K. Yip, H. C. Yang, T. W. Cheng, Y. F. Chen, M. S. Hua and H. E. Horng (2012). "New assay for old markers-plasma beta amyloid of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease." Curr Alzheimer Res **9**(10): 1142-1148.

Choi, H. and D. S. Lee (2016). "Illuminating the physiology of extracellular vesicles." Stem Cell Res Ther **7**(1): 55.

Choi, J., H. W. Lee and K. Suk (2011). "Plasma level of chitinase 3-like 1 protein increases in patients with early Alzheimer's disease." J Neurol **258**(12): 2181-2185.

Choi, J., C. A. Malakowsky, J. M. Talent, C. C. Conrad and R. W. Gracy (2002). "Identification of oxidized plasma proteins in Alzheimer's disease." Biochem Biophys Res Commun **293**(5): 1566-1570.

Christ, L., C. Raiborg, E. M. Wenzel, C. Campsteijn and H. Stenmark (2017). "Cellular Functions and Molecular Mechanisms of the ESCRT Membrane-Scission Machinery." Trends Biochem Sci **42**(1): 42-56.

Citron, M., D. Westaway, W. Xia, G. Carlson, T. Diehl, G. Levesque, K. Johnson-Wood, M. Lee, P. Seubert, A. Davis, D. Kholodenko, R. Motter, R. Sherrington, B. Perry, H. Yao, R. Strome, I. Lieberburg, J. Rommens, S. Kim, D. Schenk, P. Fraser, P. St George Hyslop and D. J. Selkoe (1997). "Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice." Nat Med **3**(1): 67-72.

Clark, C. M., S. Xie, J. Chittams, D. Ewbank, E. Peskind, D. Galasko, J. C. Morris, D. W. McKeel, Jr., M. Farlow, S. L. Weitlauf, J. Quinn, J. Kaye, D. Knopman, H. Arai, R. S. Doody, C. DeCarli, S. Leight, V. M. Lee and J. Q. Trojanowski (2003). "Cerebrospinal

fluid tau and beta-amyloid: how well do these biomarkers reflect autopsy-confirmed dementia diagnoses?" Arch Neurol **60**(12): 1696-1702.

Collin, F., C. Cheignon and C. Hureau (2018). "Oxidative stress as a biomarker for Alzheimer's disease." Biomark Med **12**(3): 201-203.

Colton, C. A., R. T. Mott, H. Sharpe, Q. Xu, W. E. Van Nostrand and M. P. Vitek (2006). "Expression profiles for macrophage alternative activation genes in AD and in mouse models of AD." J Neuroinflammation **3**: 27.

Conrad, C. C., P. L. Marshall, J. M. Talent, C. A. Malakowsky, J. Choi and R. W. Gracy (2000). "Oxidized proteins in Alzheimer's plasma." Biochem Biophys Res Commun **275**(2): 678-681.

Cooper, Y. A., D. Nachun, D. Dokuru, Z. Yang, A. M. Karydas, G. Serrero, B. Yue, A. L. Boxer, B. L. Miller and G. Coppola (2018). "Progranulin levels in blood in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment." Ann Clin Transl Neurol **5**(5): 616-629.

Cordell, C. B., S. Borson, M. Boustani, J. Chodosh, D. Reuben, J. Verghese, W. Thies and L. B. Fried (2013). "Alzheimer's Association recommendations for operationalizing the detection of cognitive impairment during the Medicare Annual Wellness Visit in a primary care setting." Alzheimers Dement **9**(2): 141-150.

Corrado, G., V. Laquintana, R. Loria, M. Carosi, L. de Salvo, I. Sperduti, A. Zampa, L. Cicchillitti, G. Piaggio, G. Cutillo, R. Falcioni and E. Vizza (2018). "Endometrial cancer prognosis correlates with the expression of L1CAM and miR34a biomarkers." J Exp Clin Cancer Res **37**(1): 139.

Cossetti, C., N. Iraci, T. R. Mercer, T. Leonardi, E. Alpi, D. Drago, C. Alfaro-Cervello, H. K. Saini, M. P. Davis, J. Schaeffer, B. Vega, M. Stefanini, C. Zhao, W. Muller, J. M. Garcia-Verdugo, S. Mathivanan, A. Bachi, A. J. Enright, J. S. Mattick and S. Pluchino (2014). "Extracellular vesicles from neural stem cells transfer IFN-gamma via Ifngr1 to activate Stat1 signaling in target cells." Mol Cell **56**(2): 193-204.

Costanzo, M. and C. Zurzolo (2013). "The cell biology of prion-like spread of protein aggregates: mechanisms and implication in neurodegeneration." Biochem J **452**(1): 1-17.

Cottrell, D. A., E. L. Blakely, M. A. Johnson, P. G. Ince and D. M. Turnbull (2001). "Mitochondrial enzyme-deficient hippocampal neurons and choroidal cells in AD." Neurology **57**(2): 260-264.

Cowan, N. (2008). "What are the differences between long-term, short-term, and working memory?" Prog Brain Res **169**: 323-338.

Cowles, A., W. W. Beatty, S. J. Nixon, L. J. Lutz, J. Paulk, K. Paulk and E. D. Ross (2003). "Musical skill in dementia: a violinist presumed to have Alzheimer's disease learns to play a new song." Neurocase **9**(6): 493-503.

Coyle, J. T. and P. Puttfarcken (1993). "Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders." Science **262**(5134): 689-695.

Craig-Schapiro, R., R. J. Perrin, C. M. Roe, C. Xiong, D. Carter, N. J. Cairns, M. A. Mintun, E. R. Peskind, G. Li, D. R. Galasko, C. M. Clark, J. F. Quinn, G. D'Angelo, J. P.

- Malone, R. R. Townsend, J. C. Morris, A. M. Fagan and D. M. Holtzman (2010). "YKL-40: a novel prognostic fluid biomarker for preclinical Alzheimer's disease." Biol Psychiatry **68**(10): 903-912.
- Cristalli, D. O., N. Arnal, F. A. Marra, M. J. de Alaniz and C. A. Marra (2012). "Peripheral markers in neurodegenerative patients and their first-degree relatives." J Neurol Sci **314**(1-2): 48-56.
- Cruchaga, C., J. S. Kauwe, P. Nowotny, K. Bales, E. H. Pickering, K. Mayo, S. Bertelsen, A. Hinrichs, A. M. Fagan, D. M. Holtzman, J. C. Morris and A. M. Goate (2012). "Cerebrospinal fluid APOE levels: an endophenotype for genetic studies for Alzheimer's disease." Hum Mol Genet **21**(20): 4558-4571.
- Cruts, M., J. Theuns and C. Van Broeckhoven (2012). "Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases." Hum Mutat **33**(9): 1340-1344.
- Cummings, J., G. Lee, A. Ritter and K. Zhong (2018). "Alzheimer's disease drug development pipeline: 2018." Alzheimers Dement (N Y) **4**: 195-214.
- Cummings, J. L., T. Morstorf and K. Zhong (2014). "Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures." Alzheimers Res Ther **6**(4): 37.
- Cuyvers, E. and K. Sleegers (2016). "Genetic variations underlying Alzheimer's disease: evidence from genome-wide association studies and beyond." Lancet Neurol **15**(8): 857-868.
- Dalle-Donne, I., R. Rossi, D. Giustarini, A. Milzani and R. Colombo (2003). "Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress." Clin Chim Acta **329**(1-2): 23-38.
- Dang, T. N., M. Arseneault and C. Ramassamy (2011). "Regulation of redox-sensitive signaling pathways in rat primary astrocytes following acrolein exposure." J Alzheimers Dis **25**(2): 263-277.
- Dang, T. N., M. Arseneault, N. Zarkovic, G. Waeg and C. Ramassamy (2010). "Molecular regulations induced by acrolein in neuroblastoma SK-N-SH cells: relevance to Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **21**(4): 1197-1216.
- Dannhauser, T. M., Z. Walker, T. Stevens, L. Lee, M. Seal and S. S. Shergill (2005). "The functional anatomy of divided attention in amnesic mild cognitive impairment." Brain **128**(Pt 6): 1418-1427.
- Davies, K. J. (1993). "Protein modification by oxidants and the role of proteolytic enzymes." Biochem Soc Trans **21**(2): 346-353.
- Davies, P. and A. J. Maloney (1976). "Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease." Lancet **2**(8000): 1403.
- de Leeuw, F. A., C. F. W. Peeters, M. I. Kester, A. C. Harms, E. A. Struys, T. Hankemeier, H. W. T. van Vlijmen, S. J. van der Lee, C. M. van Duijn, P. Scheltens, A. Demirkan, M. A. van de Wiel, W. M. van der Flier and C. E. Teunissen (2017). "Blood-based metabolic signatures in Alzheimer's disease." Alzheimers Dement (Amst) **8**: 196-207.

- de Lustig, E. S., J. A. Serra, S. Kohan, G. A. Canziani, A. L. Famulari and R. O. Dominguez (1993). "Copper-zinc superoxide dismutase activity in red blood cells and serum in demented patients and in aging." J Neurol Sci **115**(1): 18-25.
- de Souza, L. C., M. Chupin, F. Lamari, C. Jardel, D. Leclercq, O. Colliot, S. Lehericy, B. Dubois and M. Sarazin (2012). "CSF tau markers are correlated with hippocampal volume in Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **33**(7): 1253-1257.
- Deane, R., A. Sagare, K. Hamm, M. Parisi, S. Lane, M. B. Finn, D. M. Holtzman and B. V. Zlokovic (2008). "apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain." J Clin Invest **118**(12): 4002-4013.
- DeCarli, C. (2003). "Mild cognitive impairment: prevalence, prognosis, aetiology, and treatment." Lancet Neurol **2**(1): 15-21.
- Deming, Y., J. Xia, Y. Cai, J. Lord, P. Holmans, S. Bertelsen, D. Holtzman, J. C. Morris, K. Bales, E. H. Pickering, J. Kauwe, A. Goate and C. Cruchaga (2016). "A potential endophenotype for Alzheimer's disease: cerebrospinal fluid clusterin." Neurobiol Aging **37**: 208 e201-208 e209.
- Desai, P. P., M. D. Ikonovic, E. E. Abrahamson, R. L. Hamilton, B. A. Isanski, C. E. Hope, W. E. Klunk, S. T. DeKosky and M. I. Kamboh (2005). "Apolipoprotein D is a component of compact but not diffuse amyloid-beta plaques in Alzheimer's disease temporal cortex." Neurobiol Dis **20**(2): 574-582.
- Devore, E. E., J. H. Kang, M. J. Stampfer and F. Grodstein (2010). "Total antioxidant capacity of diet in relation to cognitive function and decline." Am J Clin Nutr **92**(5): 1157-1164.
- Deweer, B., S. Lehericy, B. Pillon, M. Baulac, J. Chiras, C. Marsault, Y. Agid and B. Dubois (1995). "Memory disorders in probable Alzheimer's disease: the role of hippocampal atrophy as shown with MRI." J Neurol Neurosurg Psychiatry **58**(5): 590-597.
- Di Paola, M., E. Macaluso, G. A. Carlesimo, F. Tomaiuolo, K. J. Worsley, L. Fadda and C. Caltagirone (2007). "Episodic memory impairment in patients with Alzheimer's disease is correlated with entorhinal cortex atrophy. A voxel-based morphometry study." J Neurol **254**(6): 774-781.
- Dickerson, B. C. and H. Eichenbaum (2010). "The episodic memory system: neurocircuitry and disorders." Neuropsychopharmacology **35**(1): 86-104.
- Dikic, I. (2017). "Proteasomal and Autophagic Degradation Systems." Annu Rev Biochem **86**: 193-224.
- Dikic, I. and Z. Elazar (2018). "Mechanism and medical implications of mammalian autophagy." Nature Reviews Molecular Cell Biology **19**(6): 349-364.
- Dildar, K., F. Sinem, E. Gokhan, Y. Orhan and M. Filiz (2010). "Serum nitrosative stress levels are increased in Alzheimer disease but not in vascular dementia." Alzheimer Dis Assoc Disord **24**(2): 194-197.

Ding, Q., W. R. Markesbery, V. Cecarini and J. N. Keller (2006). "Decreased RNA, and increased RNA oxidation, in ribosomes from early Alzheimer's disease." Neurochem Res **31**(5): 705-710.

Doggui, S., A. Belkacemi, G. D. Paka, M. Perrotte, R. Pi and C. Ramassamy (2013). "Curcumin protects neuronal-like cells against acrolein by restoring Akt and redox signaling pathways." Mol Nutr Food Res **57**(9): 1660-1670.

Doggui, S., J. K. Sahni, M. Arseneault, L. Dao and C. Ramassamy (2012). "Neuronal uptake and neuroprotective effect of curcumin-loaded PLGA nanoparticles on the human SK-N-SH cell line." J Alzheimers Dis **30**(2): 377-392.

Dorey, A., A. Perret-Liaudet, Y. Tholance, A. Fourier and I. Quadrio (2015). "Cerebrospinal Fluid Abeta40 Improves the Interpretation of Abeta42 Concentration for Diagnosing Alzheimer's Disease." Front Neurol **6**: 247.

Drachman, D. A. and J. Leavitt (1974). "Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging?" Arch Neurol **30**(2): 113-121.

Dubois, B. (2018). "The Emergence of a New Conceptual Framework for Alzheimer's Disease." J Alzheimers Dis **62**(3): 1059-1066.

Dubois, B., H. H. Feldman, C. Jacova, J. L. Cummings, S. T. Dekosky, P. Barberger-Gateau, A. Delacourte, G. Frisoni, N. C. Fox, D. Galasko, S. Gauthier, H. Hampel, G. A. Jicha, K. Meguro, J. O'Brien, F. Pasquier, P. Robert, M. Rossor, S. Salloway, M. Sarazin, L. C. de Souza, Y. Stern, P. J. Visser and P. Scheltens (2010). "Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon." Lancet Neurol **9**(11): 1118-1127.

Dubois, B., H. H. Feldman, C. Jacova, S. T. Dekosky, P. Barberger-Gateau, J. Cummings, A. Delacourte, D. Galasko, S. Gauthier, G. Jicha, K. Meguro, J. O'Brien, F. Pasquier, P. Robert, M. Rossor, S. Salloway, Y. Stern, P. J. Visser and P. Scheltens (2007). "Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria." Lancet Neurol **6**(8): 734-746.

Dubois, B., H. H. Feldman, C. Jacova, H. Hampel, J. L. Molinuevo, K. Blennow, S. T. DeKosky, S. Gauthier, D. Selkoe, R. Bateman, S. Cappa, S. Crutch, S. Engelborghs, G. B. Frisoni, N. C. Fox, D. Galasko, M. O. Habert, G. A. Jicha, A. Nordberg, F. Pasquier, G. Rabinovici, P. Robert, C. Rowe, S. Salloway, M. Sarazin, S. Epelbaum, L. C. de Souza, B. Vellas, P. J. Visser, L. Schneider, Y. Stern, P. Scheltens and J. L. Cummings (2014). "Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria." Lancet Neurol **13**(6): 614-629.

Dubois, B., H. Hampel, H. H. Feldman, P. Scheltens, P. Aisen, S. Andrieu, H. Bakardjian, H. Benali, L. Bertram, K. Blennow, K. Broich, E. Cavedo, S. Crutch, J. F. Dartigues, C. Duyckaerts, S. Epelbaum, G. B. Frisoni, S. Gauthier, R. Genthon, A. A. Gouw, M. O. Habert, D. M. Holtzman, M. Kivipelto, S. Lista, J. L. Molinuevo, S. E. O'Bryant, G. D. Rabinovici, C. Rowe, S. Salloway, L. S. Schneider, R. Sperling, M. Teichmann, M. C. Carrillo, J. Cummings and C. R. Jack, Jr. (2016). "Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria." Alzheimers Dement **12**(3): 292-323.

- Dudas, R. B., F. Clague, S. A. Thompson, K. S. Graham and J. R. Hodges (2005). "Episodic and semantic memory in mild cognitive impairment." Neuropsychologia **43**(9): 1266-1276.
- Dumont, M., C. Stack, C. Elipenahli, S. Jainuddin, M. Gerges, N. N. Starkova, L. Yang, A. A. Starkov and F. Beal (2011). "Behavioral deficit, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction precede tau pathology in P301S transgenic mice." FASEB J **25**(11): 4063-4072.
- Duthie, S. J., G. G. Duthie, W. R. Russell, J. A. M. Kyle, J. I. Macdiarmid, V. Rungapamestry, S. Stephen, C. Megias-Baeza, J. J. Kaniewska, L. Shaw, L. Milne, D. Bremner, K. Ross, P. Morrice, L. P. Pirie, G. Horgan and C. S. Bestwick (2018). "Effect of increasing fruit and vegetable intake by dietary intervention on nutritional biomarkers and attitudes to dietary change: a randomised trial." Eur J Nutr **57**(5): 1855-1872.
- Ebly, E. M., D. B. Hogan and I. M. Parhad (1995). "Cognitive impairment in the nondemented elderly. Results from the Canadian Study of Health and Aging." Arch Neurol **52**(6): 612-619.
- Eggert, S., C. Thomas, S. Kins and G. Hervey (2018). "Trafficking in Alzheimer's Disease: Modulation of APP Transport and Processing by the Transmembrane Proteins LRP1, SorLA, SorCS1c, Sortilin, and Calsyntenin." Mol Neurobiol **55**(7): 5809-5829.
- Eldh, M., K. Ekström, H. Valadi, M. Sjöstrand, B. Olsson, M. Jernås and J. Lötvall (2010). "Exosomes Communicate Protective Messages during Oxidative Stress; Possible Role of Exosomal Shuttle RNA." PLOS ONE **5**(12): e15353.
- Engelhart, M. J., A. Ruitenber, J. Meijer, A. Kiliaan, J. C. van Swieten, A. Hofman, J. C. Wittteman and M. M. Breteler (2005). "Plasma levels of antioxidants are not associated with Alzheimer's disease or cognitive decline." Dement Geriatr Cogn Disord **19**(2-3): 134-139.
- Esposito, G., C. Scuderi, J. Lu, C. Savani, D. De Filippis, T. Iuvone, L. Steardo, Jr., V. Sheen and L. Steardo (2008). "S100B induces tau protein hyperphosphorylation via Dickkopf-1 up-regulation and disrupts the Wnt pathway in human neural stem cells." J Cell Mol Med **12**(3): 914-927.
- Esterbauer, H. and K. H. Cheeseman (1990). "Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal." Methods Enzymol **186**: 407-421.
- Esterbauer, H., P. Eckl and A. Ortner (1990). "Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors." Mutat Res **238**(3): 223-233.
- Evans, I. E. M., D. J. Llewellyn, F. E. Matthews, R. T. Woods, C. Brayne and L. Clare (2018). "Social isolation, cognitive reserve, and cognition in healthy older people." PLoS One **13**(8): e0201008.
- Fabbrini, E., M. Serafini, I. Colic Baric, S. L. Hazen and S. Klein (2014). "Effect of plasma uric acid on antioxidant capacity, oxidative stress, and insulin sensitivity in obese subjects." Diabetes **63**(3): 976-981.

Famulari, A. L., E. R. Marschoff, S. F. Llesuy, S. Kohan, J. A. Serra, R. O. Dominguez, M. Repetto, C. Reides and E. S. de Lustig (1996). "The antioxidant enzymatic blood profile in Alzheimer's and vascular diseases. Their association and a possible assay to differentiate demented subjects and controls." Journal of the Neurological Sciences **141**(1): 69-78.

Fang, D., Z. Zhang, H. Li, Q. Yu, J. T. Douglas, A. Bratasz, P. Kuppusamy and S. S. Yan (2016). "Increased Electron Paramagnetic Resonance Signal Correlates with Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in an Alzheimer's disease Mouse Brain." J Alzheimers Dis **51**(2): 571-580.

Farina, N., M. G. Isaac, A. R. Clark, J. Rusted and N. Tabet (2012). "Vitamin E for Alzheimer's dementia and mild cognitive impairment." Cochrane Database Syst Rev **11**: CD002854.

Farrer, L. A., L. A. Cupples, J. L. Haines, B. Hyman, W. A. Kukull, R. Mayeux, R. H. Myers, M. A. Pericak-Vance, N. Risch and C. M. van Duijn (1997). "Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium." JAMA **278**(16): 1349-1356.

Feillet-Coudray, C., R. Tourtauchaux, M. Niculescu, E. Rock, I. Tauveron, M. C. Alexandre-Gouabau, Y. Rayssiguier, I. Jalenques and A. Mazur (1999). "Plasma levels of 8-epiPGF2alpha, an in vivo marker of oxidative stress, are not affected by aging or Alzheimer's disease." Free Radic Biol Med **27**(3-4): 463-469.

Fiandaca, M. S., D. Kapogiannis, M. Mapstone, A. Boxer, E. Eitan, J. B. Schwartz, E. L. Abner, R. C. Petersen, H. J. Federoff, B. L. Miller and E. J. Goetzl (2015). "Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study." Alzheimers Dement **11**(6): 600-607 e601.

Flicker, C., S. H. Ferris and B. Reisberg (1991). "Mild cognitive impairment in the elderly: predictors of dementia." Neurology **41**(7): 1006-1009.

Folstein, M. F., S. E. Folstein and P. R. McHugh (1975). ""Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician." J Psychiatr Res **12**(3): 189-198.

Folstein, M. F., L. N. Robins and J. E. Helzer (1983). "The Mini-Mental State Examination." Arch Gen Psychiatry **40**(7): 812.

Forkink, M., J. A. M. Smeitink, R. Brock, P. H. G. M. Willems and W. J. H. Koopman (2010). "Detection and manipulation of mitochondrial reactive oxygen species in mammalian cells." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1797**(6): 1034-1044.

Forlenza, O. V., B. S. Diniz, A. L. Teixeira, M. Radanovic, L. L. Talib, N. P. Rocha and W. F. Gattaz (2015). "Lower Cerebrospinal Fluid Concentration of Brain-Derived Neurotrophic Factor Predicts Progression from Mild Cognitive Impairment to Alzheimer's Disease." Neuromolecular Med **17**(3): 326-332.

- Forte, G., A. Alimonti, A. Pino, P. Stanzione, S. Brescianini, L. Brusa, G. Sancesario, N. Violante and B. Bocca (2005). "Metals and oxidative stress in patients with Parkinson's disease." Ann Ist Super Sanita **41**(2): 189-195.
- Fox, N. C., E. K. Warrington, P. A. Freeborough, P. Hartikainen, A. M. Kennedy, J. M. Stevens and M. N. Rossor (1996). "Presymptomatic hippocampal atrophy in Alzheimer's disease. A longitudinal MRI study." Brain **119** (Pt 6): 2001-2007.
- Foy, C. J., A. P. Passmore, M. D. Vahidassr, I. S. Young and J. T. Lawson (1999). "Plasma chain-breaking antioxidants in Alzheimer's disease, vascular dementia and Parkinson's disease." QJM **92**(1): 39-45.
- Franzblau, M., C. Gonzales-Portillo, G. S. Gonzales-Portillo, T. Diamandis, M. C. Borlongan, N. Tajiri and C. V. Borlongan (2013). "Vascular damage: a persisting pathology common to Alzheimer's disease and traumatic brain injury." Med Hypotheses **81**(5): 842-845.
- Franzke, B., B. Schober-Halper, M. Hofmann, S. Oesen, A. Tosevska, T. Henriksen, H. E. Poulsen, E. M. Strasser, B. Wessner and K. H. Wagner (2018). "Age and the effect of exercise, nutrition and cognitive training on oxidative stress - The Vienna Active Aging Study (VAAS), a randomized controlled trial." Free Radic Biol Med **121**: 69-77.
- Frejaville, C., H. Karoui, B. Tuccio, F. Le Moigne, M. Culcasi, S. Pietri, R. Lauricella and P. Tordo (1995). "5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide: a new efficient phosphorylated nitron for the in vitro and in vivo spin trapping of oxygen-centered radicals." J Med Chem **38**(2): 258-265.
- Frohlich, D., W. P. Kuo, C. Fruhbeis, J. J. Sun, C. M. Zehendner, H. J. Luhmann, S. Pinto, J. Toedling, J. Trotter and E. M. Kramer-Albers (2014). "Multifaceted effects of oligodendroglial exosomes on neurons: impact on neuronal firing rate, signal transduction and gene regulation." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **369**(1652).
- Fruhbeis, C., D. Frohlich, W. P. Kuo, J. Amphornrat, S. Thilemann, A. S. Saab, F. Kirchhoff, W. Mobius, S. Goebbels, K. A. Nave, A. Schneider, M. Simons, M. Klugmann, J. Trotter and E. M. Kramer-Albers (2013). "Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication." PLoS Biol **11**(7): e1001604.
- Fruhbeis, C., D. Frohlich, W. P. Kuo and E. M. Kramer-Albers (2013). "Extracellular vesicles as mediators of neuron-glia communication." Front Cell Neurosci **7**: 182.
- Fukui, H., F. Diaz, S. Garcia and C. T. Moraes (2007). "Cytochrome c oxidase deficiency in neurons decreases both oxidative stress and amyloid formation in a mouse model of Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(35): 14163-14168.
- Fukumoto, H., M. Ingelsson, N. Garevik, L. O. Wahlund, N. Nukina, Y. Yaguchi, M. Shibata, B. T. Hyman, G. W. Rebeck and M. C. Irizarry (2003). "APOE epsilon 3/ epsilon 4 heterozygotes have an elevated proportion of apolipoprotein E4 in cerebrospinal fluid relative to plasma, independent of Alzheimer's disease diagnosis." Exp Neurol **183**(1): 249-253.

Fukumoto, H., M. Tennis, J. J. Locascio, B. T. Hyman, J. H. Growdon and M. C. Irizarry (2003). "Age but not diagnosis is the main predictor of plasma amyloid beta-protein levels." Arch Neurol **60**(7): 958-964.

Fung, T. C., C. A. Olson and E. Y. Hsiao (2017). "Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease." Nat Neurosci **20**(2): 145-155.

Fyfe, I. (2018). "Exosomes can spread toxic AD pathology." Nat Rev Neurol **14**(8): 451.

Galasko, D. and T. E. Golde (2013). "Biomarkers for Alzheimer's disease in plasma, serum and blood - conceptual and practical problems." Alzheimers Res Ther **5**(2): 10.

Galasko, D. R., E. Peskind, C. M. Clark, J. F. Quinn, J. M. Ringman, G. A. Jicha, C. Cotman, B. Cottrell, T. J. Montine, R. G. Thomas and P. Aisen (2012). "Antioxidants for Alzheimer disease: a randomized clinical trial with cerebrospinal fluid biomarker measures." Arch Neurol **69**(7): 836-841.

Games, D., D. Adams, R. Alessandrini, R. Barbour, P. Berthelette, C. Blackwell, T. Carr, J. Clemens, T. Donaldson, F. Gillespie and et al. (1995). "Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein." Nature **373**(6514): 523-527.

Ganfornina, M. D., S. Do Carmo, J. M. Lora, S. Torres-Schumann, M. Vogel, M. Allhorn, C. Gonzalez, M. J. Bastiani, E. Rassart and D. Sanchez (2008). "Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress." Aging Cell **7**(4): 506-515.

Ganfornina, M. D., S. Do Carmo, E. Martinez, J. Tolia, A. Navarro, E. Rassart and D. Sanchez (2010). "ApoD, a glia-derived apolipoprotein, is required for peripheral nerve functional integrity and a timely response to injury." Glia **58**(11): 1320-1334.

Garcia-Blanco, A., M. Baquero, M. Vento, E. Gil, L. Bataller and C. Chafer-Pericas (2017). "Potential oxidative stress biomarkers of mild cognitive impairment due to Alzheimer disease." J Neurol Sci **373**: 295-302.

Gertsik, N., D. Chiu and Y. M. Li (2014). "Complex regulation of gamma-secretase: from obligatory to modulatory subunits." Front Aging Neurosci **6**: 342.

Gezen-Ak, D., E. Dursun, H. Hanagasi, B. Bilgic, E. Lohman, O. S. Araz, I. L. Atasoy, M. Alaylioglu, B. Onal, H. Gurvit and S. Yilmazer (2013). "BDNF, TNFalpha, HSP90, CFH, and IL-10 serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease or mild cognitive impairment." J Alzheimers Dis **37**(1): 185-195.

Ghiselli, A., M. Serafini, F. Natella and C. Scaccini (2000). "Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data." Free Radic Biol Med **29**(11): 1106-1114.

Giacomello, M., L. Barbiero, G. Zatti, R. Squitti, G. Binetti, T. Pozzan, C. Fasolato, R. Ghidoni and P. Pizzo (2005). "Reduction of Ca²⁺ stores and capacitative Ca²⁺ entry is associated with the familial Alzheimer's disease presenilin-2 T122R mutation and anticipates the onset of dementia." Neurobiol Dis **18**(3): 638-648.

- Gibson, G. E., V. Haroutunian, H. Zhang, L. C. Park, Q. Shi, M. Lesser, R. C. Mohs, R. K. Sheu and J. P. Blass (2000). "Mitochondrial damage in Alzheimer's disease varies with apolipoprotein E genotype." Ann Neurol **48**(3): 297-303.
- Gironi, M., A. Bianchi, A. Russo, M. Alberoni, L. Ceresa, A. Angelini, C. Cursano, E. Mariani, R. Nemni, C. Kullmann, E. Farina and F. Martinelli Boneschi (2011). "Oxidative imbalance in different neurodegenerative diseases with memory impairment." Neurodegener Dis **8**(3): 129-137.
- Glennner, G. G. and C. W. Wong (1984). "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." Biochem Biophys Res Commun **120**(3): 885-890.
- Glennner, G. G., C. W. Wong, V. Quaranta and E. D. Eanes (1984). "The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis." Appl Pathol **2**(6): 357-369.
- Glockner, F. and T. G. Ohm (2003). "Hippocampal apolipoprotein D level depends on Braak stage and APOE genotype." Neuroscience **122**(1): 103-110.
- Goate, A., M. C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, L. James and et al. (1991). "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease." Nature **349**(6311): 704-706.
- Goedert, M. (2015). "NEURODEGENERATION. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled Abeta, tau, and alpha-synuclein." Science **349**(6248): 1255555.
- Goedert, M., M. G. Spillantini, R. Jakes, D. Rutherford and R. A. Crowther (1989). "Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease." Neuron **3**(4): 519-526.
- Goetzl, E. J., E. L. Abner, G. A. Jicha, D. Kapogiannis and J. B. Schwartz (2018). "Declining levels of functionally specialized synaptic proteins in plasma neuronal exosomes with progression of Alzheimer's disease." FASEB J **32**(2): 888-893.
- Goetzl, E. J., A. Boxer, J. B. Schwartz, E. L. Abner, R. C. Petersen, B. L. Miller, O. D. Carlson, M. Mustapic and D. Kapogiannis (2015). "Low neural exosomal levels of cellular survival factors in Alzheimer's disease." Ann Clin Transl Neurol **2**(7): 769-773.
- Goetzl, E. J., A. Boxer, J. B. Schwartz, E. L. Abner, R. C. Petersen, B. L. Miller and D. Kapogiannis (2015). "Altered lysosomal proteins in neural-derived plasma exosomes in preclinical Alzheimer disease." Neurology **85**(1): 40-47.
- Goetzl, E. J., D. Kapogiannis, J. B. Schwartz, I. V. Lobach, L. Goetzl, E. L. Abner, G. A. Jicha, A. M. Karydas, A. Boxer and B. L. Miller (2016). "Decreased synaptic proteins in neuronal exosomes of frontotemporal dementia and Alzheimer's disease." FASEB J **30**(12): 4141-4148.
- Goetzl, E. J., M. Mustapic, D. Kapogiannis, E. Eitan, I. V. Lobach, L. Goetzl, J. B. Schwartz and B. L. Miller (2016). "Cargo proteins of plasma astrocyte-derived exosomes in Alzheimer's disease." FASEB J **30**(11): 3853-3859.

Goetzl, E. J., C. Noguerras-Ortiz, M. Mustapic, R. J. Mullins, E. L. Abner, J. B. Schwartz and D. Kapogiannis (2018). "Deficient neurotrophic factors of CSPG4-type neural cell exosomes in Alzheimer disease." FASEB J: fj201801001.

Goetzl, E. J., J. B. Schwartz, E. L. Abner, G. A. Jicha and D. Kapogiannis (2018). "High complement levels in astrocyte-derived exosomes of Alzheimer disease." Ann Neurol **83**(3): 544-552.

Golub, J. S., J. A. Luchsinger, J. J. Manly, Y. Stern, R. Mayeux and N. Schupf (2017). "Observed Hearing Loss and Incident Dementia in a Multiethnic Cohort." J Am Geriatr Soc **65**(8): 1691-1697.

Gonzalez Flecha, B., S. Llesuy and A. Boveris (1991). "Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle." Free Radic Biol Med **10**(2): 93-100.

Good, P. F., D. P. Perl, L. M. Bierer and J. Schmeidler (1992). "Selective accumulation of aluminum and iron in the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: a laser microprobe (LAMMA) study." Ann Neurol **31**(3): 286-292.

Gopaul, N. K., B. Halliwell and E. E. Anggard (2000). "Measurement of plasma F2-isoprostanes as an index of lipid peroxidation does not appear to be confounded by diet." Free Radic Res **33**(2): 115-127.

Grapp, M., A. Wrede, M. Schweizer, S. Hüwel, H.-J. Galla, N. Snaidero, M. Simons, J. Bückers, P. S. Low, H. Urlaub, J. Gärtner and R. Steinfeld (2013). "Choroid plexus transcytosis and exosome shuttling deliver folate into brain parenchyma." Nature Communications **4**: 2123.

Greenough, M. A., J. Camakaris and A. I. Bush (2013). "Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease." Neurochem Int **62**(5): 540-555.

Greilberger, J., D. Fuchs, F. Leblhuber, M. Greilberger, R. Wintersteiger and E. Tafeit (2010). "Carbonyl proteins as a clinical marker in Alzheimer's disease and its relation to tryptophan degradation and immune activation." Clin Lab **56**(9-10): 441-448.

Greilberger, J., C. Koidl, M. Greilberger, M. Lamprecht, K. Schroecksnadel, F. Leblhuber, D. Fuchs and K. Oettl (2008). "Malondialdehyde, carbonyl proteins and albumin-disulphide as useful oxidative markers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease." Free Radic Res **42**(7): 633-638.

Growdon, J. H. (1998). "Consensus report of the Working Group on: "Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease". The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group." Neurobiol Aging **19**(2): 109-116.

Gschwandtner, M., V. Paulitschke, M. Mildner, P. M. Brunner, S. Hacker, G. Eisenwort, W. R. Sperr, P. Valent, C. Gerner and E. Tschachler (2017). "Proteome analysis identifies L1CAM/CD171 and DPP4/CD26 as novel markers of human skin mast cells." Allergy **72**(1): 85-97.

Guescini, M., S. Genedani, V. Stocchi and L. F. Agnati (2010). "Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA." J Neural Transm (Vienna) **117**(1): 1-4.

Guix, F. X., G. T. Corbett, D. J. Cha, M. Mustapic, W. Liu, D. Mengel, Z. Chen, E. Aikawa, T. Young-Pearse, D. Kapogiannis, D. J. Selkoe and D. M. Walsh (2018). "Detection of Aggregation-Competent Tau in Neuron-Derived Extracellular Vesicles." Int J Mol Sci **19**(3).

Gupta, V. B., S. M. Laws, V. L. Villemagne, D. Ames, A. I. Bush, K. A. Ellis, J. K. Lui, C. Masters, C. C. Rowe, C. Szoeki, K. Taddei and R. N. Martins (2011). "Plasma apolipoprotein E and Alzheimer disease risk: the AIBL study of aging." Neurology **76**(12): 1091-1098.

Gupta, V. B., R. Sundaram and R. N. Martins (2013). "Multiplex biomarkers in blood." Alzheimers Res Ther **5**(3): 31.

Hamano, T., T. F. Gendron, E. Causevic, S. H. Yen, W. L. Lin, C. Isidoro, M. Deture and L. W. Ko (2008). "Autophagic-lysosomal perturbation enhances tau aggregation in transfectants with induced wild-type tau expression." Eur J Neurosci **27**(5): 1119-1130.

Hamlett, E. D., E. J. Goetzl, A. Ledreux, V. Vasilevko, H. A. Boger, A. LaRosa, D. Clark, S. L. Carroll, M. Carmona-Iragui, J. Fortea, E. J. Mufson, M. Sabbagh, A. H. Mohammed, D. Hartley, E. Doran, I. T. Lott and A. C. Granholm (2017). "Neuronal exosomes reveal Alzheimer's disease biomarkers in Down syndrome." Alzheimers Dement **13**(5): 541-549.

Hammond, C. J., L. R. Hallock, R. J. Howanski, D. M. Appelt, C. S. Little and B. J. Balin (2010). "Immunohistological detection of Chlamydia pneumoniae in the Alzheimer's disease brain." BMC Neurosci **11**: 121.

Hempel, H., S. E. O'Bryant, J. L. Molinuevo, H. Zetterberg, C. L. Masters, S. Lista, S. J. Kiddle, R. Batrla and K. Blennow (2018). "Blood-based biomarkers for Alzheimer disease: mapping the road to the clinic." Nat Rev Neurol **14**(11): 639-652.

Hempel, H., N. Toschi, F. Baldacci, H. Zetterberg, K. Blennow, I. Kilimann, S. J. Teipel, E. Cavedo, A. Melo Dos Santos, S. Epelbaum, F. Lamari, R. Genthon, B. Dubois, R. Floris, F. Garaci and S. Lista (2018). "Alzheimer's disease biomarker-guided diagnostic workflow using the added value of six combined cerebrospinal fluid candidates: Abeta1-42, total-tau, phosphorylated-tau, NFL, neurogranin, and YKL-40." Alzheimers Dement **14**(4): 492-501.

Hanger, D. P., B. H. Anderton and W. Noble (2009). "Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease." Trends in Molecular Medicine **15**(3): 112-119.

Haque, A., R. Polcyn, D. Matzelle and N. L. Banik (2018). "New Insights into the Role of Neuron-Specific Enolase in Neuro-Inflammation, Neurodegeneration, and Neuroprotection." Brain Sci **8**(2).

Harada, H., A. Tamaoka, K. Ishii, S. Shoji, S. Kametaka, F. Kametani, Y. Saito and S. Murayama (2006). "Beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) is increased in remaining neurons in Alzheimer's disease brains." Neurosci Res **54**(1): 24-29.

Harasym, J. and R. Oledzki (2014). "Effect of fruit and vegetable antioxidants on total antioxidant capacity of blood plasma." Nutrition **30**(5): 511-517.

Harding, C., J. Heuser and P. Stahl (1983). "Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes." J Cell Biol **97**(2): 329-339.

Hardy, J. and D. Allsop (1991). "Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease." Trends Pharmacol Sci **12**(10): 383-388.

Hardy, J., R. Guerreiro and S. Lovestone (2011). "Clusterin as an Alzheimer biomarker." Arch Neurol **68**(11): 1459-1460.

Hardy, J. and D. J. Selkoe (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." Science **297**(5580): 353-356.

Hardy, J. A. and G. A. Higgins (1992). "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis." Science **256**(5054): 184-185.

Harman, D. (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." J Gerontol **11**(3): 298-300.

Harold, D., R. Abraham, P. Hollingworth, R. Sims, A. Gerrish, M. L. Hamshere, J. S. Pahwa, V. Moskvina, K. Dowzell, A. Williams, N. Jones, C. Thomas, A. Stretton, A. R. Morgan, S. Lovestone, J. Powell, P. Proitsi, M. K. Lupton, C. Brayne, D. C. Rubinsztein, M. Gill, B. Lawlor, A. Lynch, K. Morgan, K. S. Brown, P. A. Passmore, D. Craig, B. McGuinness, S. Todd, C. Holmes, D. Mann, A. D. Smith, S. Love, P. G. Kehoe, J. Hardy, S. Mead, N. Fox, M. Rossor, J. Collinge, W. Maier, F. Jessen, B. Schurmann, R. Heun, H. van den Bussche, I. Heuser, J. Kornhuber, J. Wiltfang, M. Dichgans, L. Frolich, H. Hampel, M. Hull, D. Rujescu, A. M. Goate, J. S. Kauwe, C. Cruchaga, P. Nowotny, J. C. Morris, K. Mayo, K. Sleegers, K. Bettens, S. Engelborghs, P. P. De Deyn, C. Van Broeckhoven, G. Livingston, N. J. Bass, H. Gurling, A. McQuillin, R. Gwilliam, P. Deloukas, A. Al-Chalabi, C. E. Shaw, M. Tsolaki, A. B. Singleton, R. Guerreiro, T. W. Muhleisen, M. M. Nothen, S. Moebus, K. H. Jockel, N. Klopp, H. E. Wichmann, M. M. Carrasquillo, V. S. Pankratz, S. G. Younkin, P. A. Holmans, M. O'Donovan, M. J. Owen and J. Williams (2009). "Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease." Nat Genet **41**(10): 1088-1093.

Harris, M. E., K. Hensley, D. A. Butterfield, R. A. Leedle and J. M. Carney (1995). "Direct evidence of oxidative injury produced by the Alzheimer's beta-amyloid peptide (1-40) in cultured hippocampal neurons." Exp Neurol **131**(2): 193-202.

Hendriks, L., C. M. van Duijn, P. Cras, M. Cruts, W. Van Hul, F. van Harskamp, A. Warren, M. G. McInnis, S. E. Antonarakis, J. J. Martin and et al. (1992). "Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene." Nat Genet **1**(3): 218-221.

Henning, B., K. Stewart, K. Zaman, A. N. Alam, K. H. Brown and R. E. Black (1992). "Lack of therapeutic efficacy of vitamin A for non-cholera, watery diarrhoea in Bangladeshi children." Eur J Clin Nutr **46**(6): 437-443.

Hensley, K., J. M. Carney, M. P. Mattson, M. Aksenova, M. Harris, J. F. Wu, R. A. Floyd and D. A. Butterfield (1994). "A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity

based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(8): 3270-3274.

Hensley, K., N. Hall, R. Subramaniam, P. Cole, M. Harris, M. Aksenov, M. Aksenova, S. P. Gabbita, J. F. Wu, J. M. Carney and et al. (1995). "Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation." J Neurochem **65**(5): 2146-2156.

Hensley, K., M. L. Maidt, Z. Yu, H. Sang, W. R. Markesbery and R. A. Floyd (1998). "Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation." J Neurosci **18**(20): 8126-8132.

Herbert, J. and P. J. Lucassen (2016). "Depression as a risk factor for Alzheimer's disease: Genes, steroids, cytokines and neurogenesis - What do we need to know?" Front Neuroendocrinol **41**: 153-171.

Herholz, K. and K. Ebmeier (2011). "Clinical amyloid imaging in Alzheimer's disease." Lancet Neurol **10**(7): 667-670.

Hermisdorff, H. H., B. Puchau, A. C. Volp, K. B. Barbosa, J. Bressan, M. A. Zulet and J. A. Martinez (2011). "Dietary total antioxidant capacity is inversely related to central adiposity as well as to metabolic and oxidative stress markers in healthy young adults." Nutr Metab (Lond) **8**: 59.

Herrup, K. (2015). "The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis." Nat Neurosci **18**(6): 794-799.

Herukka, S. K., A. H. Simonsen, N. Andreasen, I. Baldeiras, M. Bjerke, K. Blennow, S. Engelborghs, G. B. Frisoni, T. Gabryelewicz, S. Galluzzi, R. Handels, M. G. Kramberger, A. Kulczynska, J. L. Molinuevo, B. Mroczko, A. Nordberg, C. R. Oliveira, M. Otto, J. O. Rinne, U. Rot, E. Saka, H. Soininen, H. Struyfs, S. Suardi, P. J. Visser, B. Winblad, H. Zetterberg and G. Waldemar (2017). "Recommendations for cerebrospinal fluid Alzheimer's disease biomarkers in the diagnostic evaluation of mild cognitive impairment." Alzheimers Dement **13**(3): 285-295.

Hirai, K., G. Aliev, A. Nunomura, H. Fujioka, R. L. Russell, C. S. Atwood, A. B. Johnson, Y. Kress, H. V. Vinters, M. Tabaton, S. Shimohama, A. D. Cash, S. L. Siedlak, P. L. Harris, P. K. Jones, R. B. Petersen, G. Perry and M. A. Smith (2001). "Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease." J Neurosci **21**(9): 3017-3023.

Hock, C., K. Heese, C. Hulette, C. Rosenberg and U. Otten (2000). "Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas." Arch Neurol **57**(6): 846-851.

Hoglund, K., A. Fourier, A. Perret-Liaudet, H. Zetterberg, K. Blennow and E. Portelius (2015). "Alzheimer's disease--Recent biomarker developments in relation to updated diagnostic criteria." Clin Chim Acta **449**: 3-8.

Hollingworth, P., D. Harold, R. Sims, A. Gerrish, J. C. Lambert, M. M. Carrasquillo, R. Abraham, M. L. Hamshere, J. S. Pahwa, V. Moskvina, K. Dowzell, N. Jones, A. Stretton, C. Thomas, A. Richards, D. Ivanov, C. Widdowson, J. Chapman, S. Lovestone, J. Powell, P. Proitsi, M. K. Lupton, C. Brayne, D. C. Rubinsztein, M. Gill, B. Lawlor, A.

Lynch, K. S. Brown, P. A. Passmore, D. Craig, B. McGuinness, S. Todd, C. Holmes, D. Mann, A. D. Smith, H. Beaumont, D. Warden, G. Wilcock, S. Love, P. G. Kehoe, N. M. Hooper, E. R. Vardy, J. Hardy, S. Mead, N. C. Fox, M. Rossor, J. Collinge, W. Maier, F. Jessen, E. Ruther, B. Schurmann, R. Heun, H. Kolsch, H. van den Bussche, I. Heuser, J. Kornhuber, J. Wiltfang, M. Dichgans, L. Frolich, H. Hampel, J. Gallacher, M. Hull, D. Rujescu, I. Giegling, A. M. Goate, J. S. Kauwe, C. Cruchaga, P. Nowotny, J. C. Morris, K. Mayo, K. Sleegers, K. Bettens, S. Engelborghs, P. P. De Deyn, C. Van Broeckhoven, G. Livingston, N. J. Bass, H. Gurling, A. McQuillin, R. Gwilliam, P. Deloukas, A. Al-Chalabi, C. E. Shaw, M. Tsolaki, A. B. Singleton, R. Guerreiro, T. W. Muhleisen, M. M. Nothen, S. Moebus, K. H. Jockel, N. Klopp, H. E. Wichmann, V. S. Pankratz, S. B. Sando, J. O. Aasly, M. Barcikowska, Z. K. Wszolek, D. W. Dickson, N. R. Graff-Radford, R. C. Petersen, C. M. van Duijn, M. M. Breteler, M. A. Ikram, A. L. DeStefano, A. L. Fitzpatrick, O. Lopez, L. J. Launer, S. Seshadri, C. Berr, D. Champion, J. Epelbaum, J. F. Dartigues, C. Tzourio, A. Alperovitch, M. Lathrop, T. M. Feulner, P. Friedrich, C. Riehle, M. Krawczak, S. Schreiber, M. Mayhaus, S. Nicolhaus, S. Wagenpfeil, S. Steinberg, H. Stefansson, K. Stefansson, J. Snaedal, S. Bjornsson, P. V. Jonsson, V. Chouraki, B. Genier-Boley, M. Hiltunen, H. Soininen, O. Combarros, D. Zelenika, M. Delepine, M. J. Bullido, F. Pasquier, I. Mateo, A. Frank-Garcia, E. Porcellini, O. Hanon, E. Coto, V. Alvarez, P. Bosco, G. Siciliano, M. Mancuso, F. Panza, V. Solfrizzi, B. Nacmias, S. Sorbi, P. Bossu, P. Piccardi, B. Arosio, G. Annoni, D. Seripa, A. Pilotto, E. Scarpini, D. Galimberti, A. Brice, D. Hannequin, F. Licastro, L. Jones, P. A. Holmans, T. Jonsson, M. Riemenschneider, K. Morgan, S. G. Younkin, M. J. Owen, M. O'Donovan, P. Amouyel and J. Williams (2011). "Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease." Nat Genet **43**(5): 429-435.

Holmes, C., C. Cunningham, E. Zotova, J. Woolford, C. Dean, S. Kerr, D. Culliford and V. H. Perry (2009). "Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease." Neurology **73**(10): 768-774.

Holsinger, R. M., J. Schnarr, P. Henry, V. T. Castelo and M. Fahnestock (2000). "Quantitation of BDNF mRNA in human parietal cortex by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: decreased levels in Alzheimer's disease." Brain Res Mol Brain Res **76**(2): 347-354.

Hsiao, K., P. Chapman, S. Nilsen, C. Eckman, Y. Harigaya, S. Younkin, F. Yang and G. Cole (1996). "Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice." Science **274**(5284): 99-102.

Hu, N., M. S. Tan, J. T. Yu, L. Sun, L. Tan, Y. L. Wang, T. Jiang and L. Tan (2014). "Increased expression of TREM2 in peripheral blood of Alzheimer's disease patients." J Alzheimers Dis **38**(3): 497-501.

Hu, W. T., D. M. Holtzman, A. M. Fagan, L. M. Shaw, R. Perrin, S. E. Arnold, M. Grossman, C. Xiong, R. Craig-Schapiro, C. M. Clark, E. Pickering, M. Kuhn, Y. Chen, V. M. Van Deerlin, L. McCluskey, L. Elman, J. Karlawish, A. Chen-Plotkin, H. I. Hurtig, A. Siderowf, F. Swenson, V. M. Lee, J. C. Morris, J. Q. Trojanowski and H. Soares (2012). "Plasma multianalyte profiling in mild cognitive impairment and Alzheimer disease." Neurology **79**(9): 897-905.

Hu, Y. Y., S. S. He, X. Wang, Q. H. Duan, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal and J. Wang (2002). "Levels of nonphosphorylated and phosphorylated tau in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients : an ultrasensitive bienzyme-substrate-recycle enzyme-linked immunosorbent assay." Am J Pathol **160**(4): 1269-1278.

Hu, Y. Y., S. S. He, X. C. Wang, Q. H. Duan, S. Khatoon, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal and J. Z. Wang (2002). "Elevated levels of phosphorylated neurofilament proteins in cerebrospinal fluid of Alzheimer disease patients." Neurosci Lett **320**(3): 156-160.

Huang, Y. J., M. H. Jin, R. B. Pi, J. J. Zhang, Y. Ouyang, X. J. Chao, M. H. Chen, P. Q. Liu, J. C. Yu, C. Ramassamy, J. Dou, X. H. Chen, Y. M. Jiang and J. Qin (2013). "Acrolein induces Alzheimer's disease-like pathologies in vitro and in vivo." Toxicol Lett **217**(3): 184-191.

Hubbard, B. M., G. W. Fenton and J. M. Anderson (1990). "A quantitative histological study of early clinical and preclinical Alzheimer's disease." Neuropathol Appl Neurobiol **16**(2): 111-121.

Hye, A., J. Riddoch-Contreras, A. L. Baird, N. J. Ashton, C. Bazenet, R. Leung, E. Westman, A. Simmons, R. Dobson, M. Sattlecker, M. Lupton, K. Lunnon, A. Keohane, M. Ward, I. Pike, H. D. Zucht, D. Pepin, W. Zheng, A. Tunnicliffe, J. Richardson, S. Gauthier, H. Soininen, I. Kloszewska, P. Mecocci, M. Tsolaki, B. Vellas and S. Lovestone (2014). "Plasma proteins predict conversion to dementia from prodromal disease." Alzheimers Dement **10**(6): 799-807 e792.

Hyman, B. T., C. H. Phelps, T. G. Beach, E. H. Bigio, N. J. Cairns, M. C. Carrillo, D. W. Dickson, C. Duyckaerts, M. P. Frosch, E. Masliah, S. S. Mirra, P. T. Nelson, J. A. Schneider, D. R. Thal, B. Thies, J. Q. Trojanowski, H. V. Vinters and T. J. Montine (2012). "National Institute on Aging–Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease." Alzheimer's & Dementia **8**(1): 1-13.

Ihara, Y., M. Chuda, S. Kuroda and T. Hayabara (1999). "Hydroxyl radical and superoxide dismutase in blood of patients with Parkinson's disease: relationship to clinical data." J Neurol Sci **170**(2): 90-95.

Ilic, T. V., M. Jovanovic, A. Jovicic and M. Tomovic (1999). "Oxidative stress indicators are elevated in de novo Parkinson's disease patients." Funct Neurol **14**(3): 141-147.

Inekci, D., K. Henriksen, T. Linemann, M. A. Karsdal, A. Habib, C. Bisgaard, F. B. Eriksen and O. J. Vilholm (2015). "Serum Fragments of Tau for the Differential Diagnosis of Alzheimer's Disease." Curr Alzheimer Res **12**(9): 829-836.

Irizarry, M. C., Y. Yao, B. T. Hyman, J. H. Growdon and D. Pratico (2007). "Plasma F2A isoprostane levels in Alzheimer's and Parkinson's disease." Neurodegener Dis **4**(6): 403-405.

Ishiguro, K., H. Ohno, H. Arai, H. Yamaguchi, K. Urakami, J. M. Park, K. Sato, H. Kohno and K. Imahori (1999). "Phosphorylated tau in human cerebrospinal fluid is a diagnostic marker for Alzheimer's disease." Neurosci Lett **270**(2): 91-94.

Itoh, N., H. Arai, K. Urakami, K. Ishiguro, H. Ohno, H. Hampel, K. Buerger, J. Wiltfang, M. Otto, H. Kretzschmar, H. J. Moeller, M. Imagawa, H. Kohno, K. Nakashima, S.

Kuzuhara, H. Sasaki and K. Imahori (2001). "Large-scale, multicenter study of cerebrospinal fluid tau protein phosphorylated at serine 199 for the antemortem diagnosis of Alzheimer's disease." Ann Neurol **50**(2): 150-156.

Itzhaki, R. F. (2017). "Herpes simplex virus type 1 and Alzheimer's disease: possible mechanisms and signposts." FASEB J **31**(8): 3216-3226.

Jack, C. R., Jr. (2011). "Alliance for aging research AD biomarkers work group: structural MRI." Neurobiol Aging **32 Suppl 1**: S48-57.

Jack, C. R., Jr., M. S. Albert, D. S. Knopman, G. M. McKhann, R. A. Sperling, M. C. Carrillo, B. Thies and C. H. Phelps (2011). "Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease." Alzheimers Dement **7**(3): 257-262.

Jack, C. R., Jr. and D. M. Holtzman (2013). "Biomarker modeling of Alzheimer's disease." Neuron **80**(6): 1347-1358.

Jack, C. R., Jr., D. S. Knopman, W. J. Jagust, L. M. Shaw, P. S. Aisen, M. W. Weiner, R. C. Petersen and J. Q. Trojanowski (2010). "Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade." Lancet Neurol **9**(1): 119-128.

Jacob, R. A., G. M. Spinozzi, V. A. Simon, D. S. Kelley, R. L. Prior, B. Hess-Pierce and A. A. Kader (2003). "Consumption of cherries lowers plasma urate in healthy women." J Nutr **133**(6): 1826-1829.

Jamieson, G. A., N. J. Maitland, G. K. Wilcock, J. Craske and R. F. Itzhaki (1991). "Latent herpes simplex virus type 1 in normal and Alzheimer's disease brains." J Med Virol **33**(4): 224-227.

Janelidze, S., J. Hertz, H. Zetterberg, M. Landqvist Waldo, A. Santillo, K. Blennow and O. Hansson (2016). "Cerebrospinal fluid neurogranin and YKL-40 as biomarkers of Alzheimer's disease." Ann Clin Transl Neurol **3**(1): 12-20.

Janelidze, S., E. Stomrud, S. Palmqvist, H. Zetterberg, D. van Westen, A. Jeromin, L. Song, D. Hanlon, C. A. Tan Hehir, D. Baker, K. Blennow and O. Hansson (2016). "Plasma beta-amyloid in Alzheimer's disease and vascular disease." Sci Rep **6**: 26801.

Janelidze, S., H. Zetterberg, N. Mattsson, S. Palmqvist, H. Vanderstichele, O. Lindberg, D. van Westen, E. Stomrud, L. Minthon, K. Blennow and O. Hansson (2016). "CSF Abeta42/Abeta40 and Abeta42/Abeta38 ratios: better diagnostic markers of Alzheimer disease." Ann Clin Transl Neurol **3**(3): 154-165.

Jansen, W. J., R. Ossenkoppele, D. L. Knol, B. M. Tijms, P. Scheltens, F. R. Verhey, P. J. Visser, P. Aalten, D. Aarsland, D. Alcolea, M. Alexander, I. S. Almdahl, S. E. Arnold, I. Baldeiras, H. Barthel, B. N. van Berckel, K. Bibeau, K. Blennow, D. J. Brooks, M. A. van Buchem, V. Camus, E. Cavedo, K. Chen, G. Chetelat, A. D. Cohen, A. Drzezga, S. Engelborghs, A. M. Fagan, T. Fladby, A. S. Fleisher, W. M. van der Flier, L. Ford, S. Forster, J. Fortea, N. Fosskett, K. S. Frederiksen, Y. Freund-Levi, G. B. Frisoni, L. Froelich, T. Gabryelewicz, K. D. Gill, O. Gkatzima, E. Gomez-Tortosa, M. F. Gordon, T. Grimmer, H. Hampel, L. Hausner, S. Hellwig, S. K. Herukka, H. Hildebrandt, L. Ishihara, A. Ivanoiu, W. J. Jagust, P. Johannsen, R. Kandimalla, E. Kapaki, A. Klimkiewicz-Mrowiec, W. E. Klunk, S. Kohler, N. Koglin, J. Kornhuber, M. G. Kramberger, K. Van

Laere, S. M. Landau, D. Y. Lee, M. de Leon, V. Lisetti, A. Lleo, K. Madsen, W. Maier, J. Marcusson, N. Mattsson, A. de Mendonca, O. Meulenbroek, P. T. Meyer, M. A. Mintun, V. Mok, J. L. Molinuevo, H. M. Mollergard, J. C. Morris, B. Mroczko, S. Van der Mussele, D. L. Na, A. Newberg, A. Nordberg, A. Nordlund, G. P. Novak, G. P. Paraskevas, L. Parnetti, G. Perera, O. Peters, J. Popp, S. Prabhakar, G. D. Rabinovici, I. H. Ramakers, L. Rami, C. Resende de Oliveira, J. O. Rinne, K. M. Rodrigue, E. Rodriguez-Rodriguez, C. M. Roe, U. Rot, C. C. Rowe, E. Ruther, O. Sabri, P. Sanchez-Juan, I. Santana, M. Sarazin, J. Schroder, C. Schutte, S. W. Seo, F. Soetewey, H. Soininen, L. Spuru, H. Struyfs, C. E. Teunissen, M. Tsolaki, R. Vandenberghe, M. M. Verbeek, V. L. Villemagne, S. J. Vos, L. J. van Waalwijk van Doorn, G. Waldemar, A. Wallin, A. K. Wallin, J. Wiltfang, D. A. Wolk, M. Zboch and H. Zetterberg (2015). "Prevalence of cerebral amyloid pathology in persons without dementia: a meta-analysis." JAMA **313**(19): 1924-1938.

Ji, Y., B. Permanne, E. M. Sigurdsson, D. M. Holtzman and T. Wisniewski (2001). "Amyloid beta40/42 clearance across the blood-brain barrier following intra-ventricular injections in wild-type, apoE knock-out and human apoE3 or E4 expressing transgenic mice." J Alzheimers Dis **3**(1): 23-30.

Jo, C., S. Gundemir, S. Pritchard, Y. N. Jin, I. Rahman and G. V. Johnson (2014). "Nrf2 reduces levels of phosphorylated tau protein by inducing autophagy adaptor protein NDP52." Nat Commun **5**: 3496.

Joachim, C. L., H. Mori and D. J. Selkoe (1989). "Amyloid beta-protein deposition in tissues other than brain in Alzheimer's disease." Nature **341**(6239): 226-230.

Jofre-Monseny, L., A. M. Minihane and G. Rimbach (2008). "Impact of apoE genotype on oxidative stress, inflammation and disease risk." Mol Nutr Food Res **52**(1): 131-145.

Johnson, K. A., N. C. Fox, R. A. Sperling and W. E. Klunk (2012). "Brain imaging in Alzheimer disease." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(4): a006213.

Jones, N. (2010). "Alzheimer disease: plasma clusterin predicts degree of pathogenesis in AD." Nat Rev Neurol **6**(9): 469.

Jucker, M. and L. C. Walker (2013). "Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases." Nature **501**(7465): 45-51.

Kadioglu, E., S. Sardas, S. Aslan, E. Isik and A. Esat Karakaya (2004). "Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease." Biomarkers **9**(2): 203-209.

Kajimoto, T., T. Okada, S. Miya, L. Zhang and S. Nakamura (2013). "Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes." Nat Commun **4**: 2712.

Kalman, J., I. Dey, S. V. Ilona, B. Matkovics, D. Brown, Z. Janka, T. Farkas and F. Joo (1994). "Platelet membrane fluidity and plasma malondialdehyde levels in Alzheimer's demented patients with and without family history of dementia." Biol Psychiatry **35**(3): 190-194.

Kalman, J., W. McConathy, C. Araoz, P. Kasa and A. G. Lacko (2000). "Apolipoprotein D in the aging brain and in Alzheimer's dementia." Neurol Res **22**(4): 330-336.

Kalra, J., A. H. Rajput, S. V. Mantha and K. Prasad (1992). "Serum antioxidant enzyme activity in Parkinson's disease." Mol Cell Biochem **110**(2): 165-168.

Kalyanaraman, B., V. Darley-USmar, K. J. Davies, P. A. Dennery, H. J. Forman, M. B. Grisham, G. E. Mann, K. Moore, L. J. Roberts, 2nd and H. Ischiropoulos (2012). "Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations." Free Radic Biol Med **52**(1): 1-6.

Kanada, M., M. H. Bachmann and C. H. Contag (2016). "Signaling by Extracellular Vesicles Advances Cancer Hallmarks." Trends Cancer **2**(2): 84-94.

Kang, J. H., A. Ascherio and F. Grodstein (2005). "Fruit and vegetable consumption and cognitive decline in aging women." Ann Neurol **57**(5): 713-720.

Kao, A. W., A. McKay, P. P. Singh, A. Brunet and E. J. Huang (2017). "Progranulin, lysosomal regulation and neurodegenerative disease." Nat Rev Neurosci **18**(6): 325-333.

Kapogiannis, D., A. Boxer, J. B. Schwartz, E. L. Abner, A. Biragyn, U. Masharani, L. Frassetto, R. C. Petersen, B. L. Miller and E. J. Goetzl (2015). "Dysfunctionally phosphorylated type 1 insulin receptor substrate in neural-derived blood exosomes of preclinical Alzheimer's disease." FASEB J **29**(2): 589-596.

Karch, C. M. and A. M. Goate (2015). "Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis." Biol Psychiatry **77**(1): 43-51.

Kassner, S. S., G. A. Bonaterra, E. Kaiser, W. Hildebrandt, J. Metz, J. Schroder and R. Kinscherf (2008). "Novel systemic markers for patients with Alzheimer disease? - a pilot study." Curr Alzheimer Res **5**(4): 358-366.

Kastle, M., S. Reeg, A. Rogowska-Wrzesinska and T. Grune (2012). "Chaperones, but not oxidized proteins, are ubiquitinated after oxidative stress." Free Radic Biol Med **53**(7): 1468-1477.

Katzman, R. (1976). "Editorial: The prevalence and malignancy of Alzheimer disease. A major killer." Arch Neurol **33**(4): 217-218.

Kelleher, R. J., 3rd and J. Shen (2017). "Presenilin-1 mutations and Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **114**(4): 629-631.

Kester, M. I., C. E. Teunissen, C. Sutphen, E. M. Herries, J. H. Ladenson, C. Xiong, P. Scheltens, W. M. van der Flier, J. C. Morris, D. M. Holtzman and A. M. Fagan (2015). "Cerebrospinal fluid VILIP-1 and YKL-40, candidate biomarkers to diagnose, predict and monitor Alzheimer's disease in a memory clinic cohort." Alzheimers Res Ther **7**(1): 59.

Kiddle, S. J., M. Sattlecker, P. Proitsi, A. Simmons, E. Westman, C. Bazenet, S. K. Nelson, S. Williams, A. Hodges, C. Johnston, H. Soininen, I. Kloszewska, P. Mecocci, M. Tsolaki, B. Vellas, S. Newhouse, S. Lovestone and R. J. Dobson (2014). "Candidate blood proteome markers of Alzheimer's disease onset and progression: a systematic review and replication study." J Alzheimers Dis **38**(3): 515-531.

Kilinc, A., A. S. Yalcin, D. Yalcin, Y. Taga and K. Emerk (1988). "Increased erythrocyte susceptibility to lipid peroxidation in human Parkinson's disease." Neurosci Lett **87**(3): 307-310.

- Kim, T. S., C. U. Pae, S. J. Yoon, W. Y. Jang, N. J. Lee, J. J. Kim, S. J. Lee, C. Lee, I. H. Paik and C. U. Lee (2006). "Decreased plasma antioxidants in patients with Alzheimer's disease." Int J Geriatr Psychiatry **21**(4): 344-348.
- Klugman, A., D. P. Naughton, M. Isaac, I. Shah, A. Petroczi and N. Tabet (2012). "Antioxidant enzymatic activities in Alzheimer's disease: the relationship to acetylcholinesterase inhibitors." J Alzheimers Dis **30**(3): 467-474.
- Klunk, W. E., H. Engler, A. Nordberg, Y. Wang, G. Blomqvist, D. P. Holt, M. Bergstrom, I. Savitcheva, G. F. Huang, S. Estrada, B. Ausen, M. L. Debnath, J. Barletta, J. C. Price, J. Sandell, B. J. Lopresti, A. Wall, P. Koivisto, G. Antoni, C. A. Mathis and B. Langstrom (2004). "Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B." Ann Neurol **55**(3): 306-319.
- Knight, J. A., R. K. Pieper and L. McClellan (1988). "Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation." Clin Chem **34**(12): 2433-2438.
- Kocaturk, P. A., M. C. Akbostanci, F. Tan and G. O. Kavas (2000). "Superoxide dismutase activity and zinc and copper concentrations in Parkinson's disease." Pathophysiology **7**(1): 63-67.
- Kochan, N. A., M. Breakspear, M. J. Slavin, M. Valenzuela, S. McCraw, H. Brodaty and P. S. Sachdev (2010). "Functional alterations in brain activation and deactivation in mild cognitive impairment in response to a graded working memory challenge." Dement Geriatr Cogn Disord **30**(6): 553-568.
- Koo, E. H. and S. L. Squazzo (1994). "Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway." J Biol Chem **269**(26): 17386-17389.
- Koren, E., R. Kohen and I. Ginsburg (2010). "Polyphenols enhance total oxidant-scavenging capacities of human blood by binding to red blood cells." Exp Biol Med (Maywood) **235**(6): 689-699.
- Korkut, C., Y. Li, K. Koles, C. Brewer, J. Ashley, M. Yoshihara and V. Budnik (2013). "Regulation of postsynaptic retrograde signaling by presynaptic exosome release." Neuron **77**(6): 1039-1046.
- Korolainen, M. A. and T. Pirttila (2009). "Cerebrospinal fluid, serum and plasma protein oxidation in Alzheimer's disease." Acta Neurol Scand **119**(1): 32-38.
- Kramer-Albers, E. M., N. Bretz, S. Tenzer, C. Winterstein, W. Mobius, H. Berger, K. A. Nave, H. Schild and J. Trotter (2007). "Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons?" Proteomics Clin Appl **1**(11): 1446-1461.
- Kriscio, R. J., E. L. Abner, F. A. Schmitt, P. J. Goodman, M. Mendiondo, A. Caban-Holt, B. C. Dennis, M. Mathews, E. A. Klein and J. J. Crowley (2013). "A randomized controlled Alzheimer's disease prevention trial's evolution into an exposure trial: the PREADViSE Trial." J Nutr Health Aging **17**(1): 72-75.
- Kumar, A., D. Bhartiya, J. Kaur, S. Kumari, H. Singh, D. Saraf, D. N. Sinha and R. Mehrotra (2018). "Regulation of toxic contents of smokeless tobacco products." Indian J Med Res **148**(1): 14-24.

L, I. J., L. J. Dekker, P. J. Koudstaal, A. Hofman, P. A. Sillevius Smitt, M. M. Breteler and T. M. Luider (2011). "Serum clusterin levels are not increased in presymptomatic Alzheimer's disease." J Proteome Res **10**(4): 2006-2010.

Lachenal, G., K. Pernet-Gallay, M. Chivet, F. J. Hemming, A. Belly, G. Bodon, B. Blot, G. Haase, Y. Goldberg and R. Sadoul (2011). "Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity." Mol Cell Neurosci **46**(2): 409-418.

Lai, K. S. P., C. S. Liu, A. Rau, K. L. Lanctot, C. A. Kohler, M. Pakosh, A. F. Carvalho and N. Herrmann (2017). "Peripheral inflammatory markers in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of 175 studies." J Neurol Neurosurg Psychiatry **88**(10): 876-882.

Lajoie, I., S. Nugent, C. Debacker, K. Dyson, F. B. Tancredi, A. Badhwar, S. Belleville, Y. Deschaintre, P. Bellec, J. Doyon, C. Bocti, S. Gauthier, D. Arnold, M. J. Kergoat, H. Chertkow, O. Monchi and R. D. Hoge (2017). "Application of calibrated fMRI in Alzheimer's disease." Neuroimage Clin **15**: 348-358.

Lakhal, S. and M. J. Wood (2011). "Exosome nanotechnology: an emerging paradigm shift in drug delivery: exploitation of exosome nanovesicles for systemic in vivo delivery of RNAi heralds new horizons for drug delivery across biological barriers." Bioessays **33**(10): 737-741.

Lambert, J. C., C. A. Ibrahim-Verbaas, D. Harold, A. C. Naj, R. Sims, C. Bellenguez, A. L. DeStafano, J. C. Bis, G. W. Beecham, B. Grenier-Boley, G. Russo, T. A. Thornton-Wells, N. Jones, A. V. Smith, V. Chouraki, C. Thomas, M. A. Ikram, D. Zelenika, B. N. Vardarajan, Y. Kamatani, C. F. Lin, A. Gerrish, H. Schmidt, B. Kunkle, M. L. Dunstan, A. Ruiz, M. T. Bihoreau, S. H. Choi, C. Reitz, F. Pasquier, C. Cruchaga, D. Craig, N. Amin, C. Berr, O. L. Lopez, P. L. De Jager, V. Deramecourt, J. A. Johnston, D. Evans, S. Lovestone, L. Letenneur, F. J. Moron, D. C. Rubinsztein, G. Eiriksdottir, K. Sleegers, A. M. Goate, N. Fievet, M. W. Huentelman, M. Gill, K. Brown, M. I. Kamboh, L. Keller, P. Barberger-Gateau, B. McGuinness, E. B. Larson, R. Green, A. J. Myers, C. Dufouil, S. Todd, D. Wallon, S. Love, E. Rogaeva, J. Gallacher, P. St George-Hyslop, J. Clarimon, A. Lleo, A. Bayer, D. W. Tsuang, L. Yu, M. Tsolaki, P. Bossu, G. Spalletta, P. Proitsi, J. Collinge, S. Sorbi, F. Sanchez-Garcia, N. C. Fox, J. Hardy, M. C. Deniz Naranjo, P. Bosco, R. Clarke, C. Brayne, D. Galimberti, M. Mancuso, F. Matthews, S. Moebus, P. Mecocci, M. Del Zompo, W. Maier, H. Hampel, A. Pilotto, M. Bullido, F. Panza, P. Caffarra, B. Nacmias, J. R. Gilbert, M. Mayhaus, L. Lannefelt, H. Hakonarson, S. Pichler, M. M. Carrasquillo, M. Ingelsson, D. Beekly, V. Alvarez, F. Zou, O. Valladares, S. G. Younkin, E. Coto, K. L. Hamilton-Nelson, W. Gu, C. Razquin, P. Pastor, I. Mateo, M. J. Owen, K. M. Faber, P. V. Jonsson, O. Combarros, M. C. O'Donovan, L. B. Cantwell, H. Soininen, D. Blacker, S. Mead, T. H. Mosley, Jr., D. A. Bennett, T. B. Harris, L. Fratiglioni, C. Holmes, R. F. de Bruijn, P. Passmore, T. J. Montine, K. Bettens, J. I. Rotter, A. Brice, K. Morgan, T. M. Foroud, W. A. Kukull, D. Hannequin, J. F. Powell, M. A. Nalls, K. Ritchie, K. L. Lunetta, J. S. Kauwe, E. Boerwinkle, M. Riemenschneider, M. Boada, M. Hiltunen, E. R. Martin, R. Schmidt, D. Rujescu, L. S. Wang, J. F. Dartigues, R. Mayeux, C. Tzourio, A. Hofman, M. M. Nothen, C. Graff, B. M. Psaty, L. Jones, J. L. Haines, P. A. Holmans, M. Lathrop, M. A. Pericak-Vance, L. J. Launer, L. A.

- Farrer, C. M. van Duijn, C. Van Broeckhoven, V. Moskvina, S. Seshadri, J. Williams, G. D. Schellenberg and P. Amouyel (2013). "Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease." Nat Genet **45**(12): 1452-1458.
- Langui, D., N. Girardot, K. H. El Hachimi, B. Allinquant, V. Blanchard, L. Pradier and C. Duyckaerts (2004). "Subcellular topography of neuronal Abeta peptide in APPxPS1 transgenic mice." Am J Pathol **165**(5): 1465-1477.
- Larbi, A., G. Pawelec, J. M. Witkowski, H. M. Schipper, E. Derhovanessian, D. Goldeck and T. Fulop (2009). "Dramatic shifts in circulating CD4 but not CD8 T cell subsets in mild Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **17**(1): 91-103.
- Larson, M. C., C. A. Hillery and N. Hogg (2014). "Circulating membrane-derived microvesicles in redox biology." Free radical biology & medicine **73**: 214-228.
- Laske, C., E. Stransky, T. Leyhe, G. W. Eschweiler, W. Maetzler, A. Wittorf, S. Soekadar, E. Richartz, N. Koehler, M. Bartels, G. Buchkremer and K. Schott (2007). "BDNF serum and CSF concentrations in Alzheimer's disease, normal pressure hydrocephalus and healthy controls." J Psychiatr Res **41**(5): 387-394.
- Laske, C., E. Stransky, T. Leyhe, G. W. Eschweiler, A. Wittorf, E. Richartz, M. Bartels, G. Buchkremer and K. Schott (2006). "Stage-dependent BDNF serum concentrations in Alzheimer's disease." J Neural Transm (Vienna) **113**(9): 1217-1224.
- Le Page, A., K. Bourgade, J. Lamoureux, E. Frost, G. Pawelec, A. Larbi, J. M. Witkowski, G. Dupuis and T. Fulop (2015). "NK Cells are Activated in Amnesic Mild Cognitive Impairment but not in Mild Alzheimer's Disease Patients." J Alzheimers Dis **46**(1): 93-107.
- Le Page, A., G. Dupuis, E. H. Frost, A. Larbi, G. Pawelec, J. M. Witkowski and T. Fulop (2018). "Role of the peripheral innate immune system in the development of Alzheimer's disease." Exp Gerontol **107**: 59-66.
- Lee, J., S. Giordano and J. Zhang (2012). "Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling." Biochemical Journal **441**(2): 523.
- Lehericy, S., M. Marjanska, L. Mesrob, M. Sarazin and S. Kinkingnehun (2007). "Magnetic resonance imaging of Alzheimer's disease." Eur Radiol **17**(2): 347-362.
- Leinonen, V., I. Alafuzoff, S. Aalto, T. Suotunen, S. Savolainen, K. Nagren, T. Tapiola, T. Pirtila, J. Rinne, J. E. Jaaskelainen, H. Soininen and J. O. Rinne (2008). "Assessment of beta-amyloid in a frontal cortical brain biopsy specimen and by positron emission tomography with carbon 11-labeled Pittsburgh Compound B." Arch Neurol **65**(10): 1304-1309.
- Leuner, K., K. Schulz, T. Schutt, J. Pantel, D. Prvulovic, V. Rhein, E. Savaskan, C. Czech, A. Eckert and W. E. Muller (2012). "Peripheral mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: focus on lymphocytes." Mol Neurobiol **46**(1): 194-204.
- Levine, R. L., J. A. Williams, E. R. Stadtman and E. Shacter (1994). "Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins." Methods Enzymol **233**: 346-357.

- Levy-Lahad, E., E. M. Wijsman, E. Nemens, L. Anderson, K. A. Goddard, J. L. Weber, T. D. Bird and G. D. Schellenberg (1995). "A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1." Science **269**(5226): 970-973.
- Li, Y., Y. Li, X. Li, S. Zhang, J. Zhao, X. Zhu and G. Tian (2017). "Head Injury as a Risk Factor for Dementia and Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of 32 Observational Studies." PLoS One **12**(1): e0169650.
- Liang, X., A. Kaya, Y. Zhang, D. T. Le, D. Hua and V. N. Gladyshev (2012). "Characterization of methionine oxidation and methionine sulfoxide reduction using methionine-rich cysteine-free proteins." BMC Biochem **13**: 21.
- Lista, S., N. Toschi, F. Baldacci, H. Zetterberg, K. Blennow, I. Kilimann, S. J. Teipel, E. Cavedo, A. M. Dos Santos, S. Epelbaum, F. Lamari, B. Dubois, R. Floris, F. Garaci and H. Hampel (2017). "Diagnostic accuracy of CSF neurofilament light chain protein in the biomarker-guided classification system for Alzheimer's disease." Neurochem Int **108**: 355-360.
- Little, C. S., C. J. Hammond, A. MacIntyre, B. J. Balin and D. M. Appelt (2004). "Chlamydia pneumoniae induces Alzheimer-like amyloid plaques in brains of BALB/c mice." Neurobiol Aging **25**(4): 419-429.
- Liu, D., B. Cao, Y. Zhao, H. Huang, R. S. McIntyre, J. D. Rosenblat and H. Zhou (2018). "Soluble TREM2 changes during the clinical course of Alzheimer's disease: A meta-analysis." Neurosci Lett **686**: 10-16.
- Livingston, G., A. Sommerlad, V. Orgeta, S. G. Costafreda, J. Huntley, D. Ames, C. Ballard, S. Banerjee, A. Burns, J. Cohen-Mansfield, C. Cooper, N. Fox, L. N. Gitlin, R. Howard, H. C. Kales, E. B. Larson, K. Ritchie, K. Rockwood, E. L. Sampson, Q. Samus, L. S. Schneider, G. Selbaek, L. Teri and N. Mukadam (2017). "Dementia prevention, intervention, and care." Lancet **390**(10113): 2673-2734.
- Llorens, F., M. Schmitz, T. Knipper, C. Schmidt, P. Lange, A. Fischer, P. Hermann and I. Zerr (2017). "Cerebrospinal Fluid Biomarkers of Alzheimer's Disease Show Different but Partially Overlapping Profile Compared to Vascular Dementia." Front Aging Neurosci **9**: 289.
- Lopez-Verrilli, M. A., F. Picou and F. A. Court (2013). "Schwann cell-derived exosomes enhance axonal regeneration in the peripheral nervous system." Glia **61**(11): 1795-1806.
- Lovell, M. A. and W. R. Markesbery (2008). "Oxidatively modified RNA in mild cognitive impairment." Neurobiol Dis **29**(2): 169-175.
- Lovell, M. A., S. Xiong, C. Xie, P. Davies and W. R. Markesbery (2004). "Induction of hyperphosphorylated tau in primary rat cortical neuron cultures mediated by oxidative stress and glycogen synthase kinase-3." J Alzheimers Dis **6**(6): 659-671; discussion 673-681.
- Lu, C., G. Song and J.-M. Lin (2006). "Reactive oxygen species and their chemiluminescence-detection methods." TrAC Trends in Analytical Chemistry **25**(10): 985-995.
- Lu, S. C. (2013). "Glutathione synthesis." Biochim Biophys Acta **1830**(5): 3143-3153.

- Lue, L. F., A. Guerra and D. G. Walker (2017). "Amyloid Beta and Tau as Alzheimer's Disease Blood Biomarkers: Promise From New Technologies." Neurol Ther **6**(Suppl 1): 25-36.
- Lyras, L., N. J. Cairns, A. Jenner, P. Jenner and B. Halliwell (1997). "An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease." J Neurochem **68**(5): 2061-2069.
- MacDonald, A. B. (2006). "Plaques of Alzheimer's disease originate from cysts of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete." Med Hypotheses **67**(3): 592-600.
- MacDonald, A. B. (2007). "Alzheimer's disease Braak Stage progressions: reexamined and redefined as *Borrelia* infection transmission through neural circuits." Med Hypotheses **68**(5): 1059-1064.
- Maddalena, A., A. Papassotiropoulos, B. Muller-Tillmanns, H. H. Jung, T. Hegi, R. M. Nitsch and C. Hock (2003). "Biochemical diagnosis of Alzheimer disease by measuring the cerebrospinal fluid ratio of phosphorylated tau protein to beta-amyloid peptide₄₂." Arch Neurol **60**(9): 1202-1206.
- Mancini, F. R., A. Affret, C. Dow, B. Balkau, F. Bonnet, M. C. Boutron-Ruault and G. Fagherazzi (2018). "Dietary antioxidant capacity and risk of type 2 diabetes in the large prospective E3N-EPIC cohort." Diabetologia **61**(2): 308-316.
- Mangialasche, F., M. Kivipelto, P. Mecocci, D. Rizzuto, K. Palmer, B. Winblad and L. Fratiglioni (2010). "High plasma levels of vitamin E forms and reduced Alzheimer's disease risk in advanced age." J Alzheimers Dis **20**(4): 1029-1037.
- Mangialasche, F., E. Westman, M. Kivipelto, J. S. Muehlboeck, R. Cecchetti, M. Baglioni, R. Tarducci, G. Gobbi, P. Floridi, H. Soininen, I. Kloszewska, M. Tsolaki, B. Vellas, C. Spenger, S. Lovestone, L. O. Wahlund, A. Simmons and P. Mecocci (2013). "Classification and prediction of clinical diagnosis of Alzheimer's disease based on MRI and plasma measures of alpha-/gamma-tocotrienols and gamma-tocopherol." J Intern Med **273**(6): 602-621.
- Markesbery, W. R., R. J. Kryscio, M. A. Lovell and J. D. Morrow (2005). "Lipid peroxidation is an early event in the brain in amnesic mild cognitive impairment." Ann Neurol **58**(5): 730-735.
- Markovic-Lipkovski, J., M. Zivotic, C. A. Muller, B. Tampe, S. Cirovic, J. Vjestica, N. Tomanovic, M. Zeisberg and G. A. Muller (2015). "Variable Expression of Neural Cell Adhesion Molecule Isoforms in Renal Tissue: Possible Role in Incipient Renal Fibrosis." PLoS One **10**(9): e0137028.
- Markx, D., C. Loos, S. Claus, C. Haupt, C. Mawrin and M. Fandrich (2018). "Cell model for the identification and characterization of prion-like components from Alzheimer brain tissue." Biochem Biophys Res Commun **497**(3): 857-862.
- Martin-Aragon, S., P. Bermejo-Bescos, J. Benedi, E. Felici, P. Gil, J. M. Ribera and A. M. Villar (2009). "Metalloproteinase's activity and oxidative stress in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease." Neurochem Res **34**(2): 373-378.

- Martin, L., X. Latypova, C. M. Wilson, A. Magnaudeix, M. L. Perrin and F. Terro (2013). "Tau protein phosphatases in Alzheimer's disease: the leading role of PP2A." Ageing Res Rev **12**(1): 39-49.
- Martin, L., X. Latypova, C. M. Wilson, A. Magnaudeix, M. L. Perrin, C. Yardin and F. Terro (2013). "Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease." Ageing Res Rev **12**(1): 289-309.
- Martinez, A., M. Portero-Otin, R. Pamplona and I. Ferrer (2010). "Protein targets of oxidative damage in human neurodegenerative diseases with abnormal protein aggregates." Brain Pathol **20**(2): 281-297.
- Matsumoto, J., T. Stewart, W. A. Banks and J. Zhang (2017). "The Transport Mechanism of Extracellular Vesicles at the Blood-Brain Barrier." Curr Pharm Des **23**(40): 6206-6214.
- Matsumura, A., M. C. Emoto, S. Suzuki, N. Iwahara, S. Hisahara, J. Kawamata, H. Suzuki, A. Yamauchi, H. Sato-Akaba, H. G. Fujii and S. Shimohama (2015). "Evaluation of oxidative stress in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer disease by in vivo electron paramagnetic resonance imaging." Free Radic Biol Med **85**: 165-173.
- Mattsson, N., H. Zetterberg, S. Janelidze, P. S. Insel, U. Andreasson, E. Stomrud, S. Palmqvist, D. Baker, C. A. Tan Hehir, A. Jeromin, D. Hanlon, L. Song, L. M. Shaw, J. Q. Trojanowski, M. W. Weiner, O. Hansson and K. Blennow (2016). "Plasma tau in Alzheimer disease." Neurology **87**(17): 1827-1835.
- Maurer, K., S. Volk and H. Gerbaldo (1997). "Auguste D and Alzheimer's disease." Lancet **349**(9064): 1546-1549.
- Mayeux, R. (2004). "Biomarkers: potential uses and limitations." NeuroRx **1**(2): 182-188.
- Mazza, G., C. D. Kay, T. Cottrell and B. J. Holub (2002). "Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects." J Agric Food Chem **50**(26): 7731-7737.
- McGeer, P. L., T. Kawamata and D. G. Walker (1992). "Distribution of clusterin in Alzheimer brain tissue." Brain Res **579**(2): 337-341.
- McGrath, L. T., B. M. McGleenon, S. Brennan, D. McColl, I. S. Mc and A. P. Passmore (2001). "Increased oxidative stress in Alzheimer's disease as assessed with 4-hydroxynonenal but not malondialdehyde." QJM **94**(9): 485-490.
- McKhann, G., D. Drachman, M. Folstein, R. Katzman, D. Price and E. M. Stadlan (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): 939-944.
- McKhann, G. M., D. S. Knopman, H. Chertkow, B. T. Hyman, C. R. Jack, Jr., C. H. Kawas, W. E. Klunk, W. J. Koroshetz, J. J. Manly, R. Mayeux, R. C. Mohs, J. C. Morris, M. N. Rossor, P. Scheltens, M. C. Carrillo, B. Thies, S. Weintraub and C. H. Phelps (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." Alzheimers Dement **7**(3): 263-269.

Meckler, X. and F. Checler (2016). "Presenilin 1 and Presenilin 2 Target gamma-Secretase Complexes to Distinct Cellular Compartments." J Biol Chem **291**(24): 12821-12837.

Mecocci, P., U. MacGarvey and M. F. Beal (1994). "Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease." Ann Neurol **36**(5): 747-751.

Mecocci, P., M. C. Polidori, A. Cherubini, T. Ingegneri, P. Mattioli, M. Catani, P. Rinaldi, R. Cecchetti, W. Stahl, U. Senin and M. F. Beal (2002). "Lymphocyte oxidative DNA damage and plasma antioxidants in Alzheimer disease." Arch Neurol **59**(5): 794-798.

Mecocci, P., M. C. Polidori, T. Ingegneri, A. Cherubini, F. Chionne, R. Cecchetti and U. Senin (1998). "Oxidative damage to DNA in lymphocytes from AD patients." Neurology **51**(4): 1014-1017.

Meer-Scherrer, L., C. Chang Loa, M. E. Adelson, E. Mordechai, J. A. Lobrinus, B. A. Fallon and R. C. Tilton (2006). "Lyme disease associated with Alzheimer's disease." Curr Microbiol **52**(4): 330-332.

Mehta, P. D., T. Pirttila, S. P. Mehta, E. A. Sersen, P. S. Aisen and H. M. Wisniewski (2000). "Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid beta proteins 1-40 and 1-42 in Alzheimer disease." Arch Neurol **57**(1): 100-105.

Melov, S., P. A. Adlard, K. Morten, F. Johnson, T. R. Golden, D. Hinerfeld, B. Schilling, C. Mavros, C. L. Masters, I. Volitakis, Q. X. Li, K. Laughton, A. Hubbard, R. A. Cherny, B. Gibson and A. I. Bush (2007). "Mitochondrial oxidative stress causes hyperphosphorylation of tau." PLoS One **2**(6): e536.

Meltzer, C. C., G. Smith, S. T. DeKosky, B. G. Pollock, C. A. Mathis, R. Y. Moore, D. J. Kupfer and C. F. Reynolds, 3rd (1998). "Serotonin in aging, late-life depression, and Alzheimer's disease: the emerging role of functional imaging." Neuropsychopharmacology **18**(6): 407-430.

Meredith, J. E., Jr., S. Sankaranarayanan, V. Guss, A. J. Lanzetti, F. Berisha, R. J. Neely, J. R. Slemmon, E. Portelius, H. Zetterberg, K. Blennow, H. Soares, M. Ahljianian and C. F. Albright (2013). "Characterization of novel CSF Tau and ptau biomarkers for Alzheimer's disease." PLoS One **8**(10): e76523.

Mielke, M. M., C. E. Hagen, A. M. V. Wennberg, D. C. Airey, R. Savica, D. S. Knopman, M. M. Machulda, R. O. Roberts, C. R. Jack, Jr., R. C. Petersen and J. L. Dage (2017). "Association of Plasma Total Tau Level With Cognitive Decline and Risk of Mild Cognitive Impairment or Dementia in the Mayo Clinic Study on Aging." JAMA Neurol **74**(9): 1073-1080.

Mielke, M. M., C. E. Hagen, J. Xu, X. Chai, P. Vemuri, V. J. Lowe, D. C. Airey, D. S. Knopman, R. O. Roberts, M. M. Machulda, C. R. Jack, Jr., R. C. Petersen and J. L. Dage (2018). "Plasma phospho-tau181 increases with Alzheimer's disease clinical severity and is associated with tau- and amyloid-positron emission tomography." Alzheimers Dement **14**(8): 989-997.

Migliore, L., I. Fontana, F. Trippi, R. Colognato, F. Coppede, G. Tognoni, B. Nucciarone and G. Siciliano (2005). "Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AD patients." Neurobiol Aging **26**(5): 567-573.

Misonou, H., M. Morishima-Kawashima and Y. Ihara (2000). "Oxidative stress induces intracellular accumulation of amyloid beta-protein (Abeta) in human neuroblastoma cells." Biochemistry **39**(23): 6951-6959.

Miyata, M. and J. D. Smith (1996). "Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides." Nat Genet **14**(1): 55-61.

Mohr, E., G. Bruno, N. Foster, M. Gillespie, C. Cox, T. A. Hare, C. Tamminga, P. Fedio and T. N. Chase (1986). "GABA-agonist therapy for Alzheimer's disease." Clin Neuropharmacol **9**(3): 257-263.

Molina, J. A., F. J. Jimenez-Jimenez, P. Fernandez-Calle, L. Lalinde, J. M. Tenias, M. Pondal, A. Vazquez and R. Codoceo (1992). "Serum lipid peroxides in patients with Parkinson's disease." Neurosci Lett **136**(2): 137-140.

Molinuevo, J. L., S. Ayton, R. Batrla, M. M. Bednar, T. Bittner, J. Cummings, A. M. Fagan, H. Hampel, M. M. Mielke, A. Mikulskis, S. O'Bryant, P. Scheltens, J. Sevigny, L. M. Shaw, H. D. Soares, G. Tong, J. Q. Trojanowski, H. Zetterberg and K. Blennow (2018). "Current state of Alzheimer's fluid biomarkers." Acta Neuropathol **136**(6): 821-853.

Montine, K. S., E. Reich, M. D. Neely, K. R. Sidell, S. J. Olson, W. R. Markesbery and T. J. Montine (1998). "Distribution of reducible 4-hydroxynonenal adduct immunoreactivity in Alzheimer disease is associated with APOE genotype." J Neuropathol Exp Neurol **57**(5): 415-425.

Montine, T. J., J. F. Quinn, D. Milatovic, L. C. Silbert, T. Dang, S. Sanchez, E. Terry, L. J. Roberts, 2nd, J. A. Kaye and J. D. Morrow (2002). "Peripheral F2-isoprostanes and F4-neuroprostanes are not increased in Alzheimer's disease." Ann Neurol **52**(2): 175-179.

Morel, L., M. Regan, H. Higashimori, S. K. Ng, C. Esau, S. Vidensky, J. Rothstein and Y. Yang (2013). "Neuronal exosomal miRNA-dependent translational regulation of astroglial glutamate transporter GLT1." J Biol Chem **288**(10): 7105-7116.

Morishita, M., Y. Takahashi, M. Nishikawa, K. Sano, K. Kato, T. Yamashita, T. Imai, H. Saji and Y. Takakura (2015). "Quantitative analysis of tissue distribution of the B16BL6-derived exosomes using a streptavidin-lactadherin fusion protein and iodine-125-labeled biotin derivative after intravenous injection in mice." J Pharm Sci **104**(2): 705-713.

Morris, J. C. (1997). "Clinical dementia rating: a reliable and valid diagnostic and staging measure for dementia of the Alzheimer type." Int Psychogeriatr **9 Suppl 1**: 173-176; discussion 177-178.

Morris, J. C. and J. Cummings (2005). "Mild cognitive impairment (MCI) represents early-stage Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **7**(3): 235-239; discussion 255-262.

Morris, J. C., M. Storandt, J. P. Miller, D. W. McKeel, J. L. Price, E. H. Rubin and L. Berg (2001). "Mild cognitive impairment represents early-stage Alzheimer disease." Arch Neurol **58**(3): 397-405.

- Morris, J. K., E. D. Vidoni, R. A. Honea and J. M. Burns (2014). "Impaired glycemia increases disease progression in mild cognitive impairment." Neurobiol Aging **35**(3): 585-589.
- Morris, M. C., D. A. Evans, J. L. Bienias, C. C. Tangney and R. S. Wilson (2002). "Vitamin E and cognitive decline in older persons." Arch Neurol **59**(7): 1125-1132.
- Morris, M. C., D. A. Evans, C. C. Tangney, J. L. Bienias and R. S. Wilson (2006). "Associations of vegetable and fruit consumption with age-related cognitive change." Neurology **67**(8): 1370-1376.
- Mueller, S. G., M. W. Weiner, L. J. Thal, R. C. Petersen, C. R. Jack, W. Jagust, J. Q. Trojanowski, A. W. Toga and L. Beckett (2005). "Ways toward an early diagnosis in Alzheimer's disease: the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI)." Alzheimers Dement **1**(1): 55-66.
- Mullaart, E., M. E. Boerrigter, R. Ravid, D. F. Swaab and J. Vijg (1990). "Increased levels of DNA breaks in cerebral cortex of Alzheimer's disease patients." Neurobiol Aging **11**(3): 169-173.
- Mullan, M., F. Crawford, K. Axelman, H. Houlden, L. Lilius, B. Winblad and L. Lannfelt (1992). "A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid." Nat Genet **1**(5): 345-347.
- Mustapic, M., E. Eitan, J. K. Werner, Jr., S. T. Berkowitz, M. P. Lazaropoulos, J. Tran, E. J. Goetzl and D. Kapogiannis (2017). "Plasma Extracellular Vesicles Enriched for Neuronal Origin: A Potential Window into Brain Pathologic Processes." Front Neurosci **11**: 278.
- Najyb, O., S. Do Carmo, A. Alikashani and E. Rassart (2017). "Apolipoprotein D Overexpression Protects Against Kainate-Induced Neurotoxicity in Mice." Mol Neurobiol **54**(6): 3948-3963.
- Nakamura, A., N. Kaneko, V. L. Villemagne, T. Kato, J. Doecke, V. Dore, C. Fowler, Q. X. Li, R. Martins, C. Rowe, T. Tomita, K. Matsuzaki, K. Ishii, K. Ishii, Y. Arahata, S. Iwamoto, K. Ito, K. Tanaka, C. L. Masters and K. Yanagisawa (2018). "High performance plasma amyloid-beta biomarkers for Alzheimer's disease." Nature **554**(7691): 249-254.
- Namba, Y., M. Tomonaga, H. Kawasaki, E. Otomo and K. Ikeda (1991). "Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease." Brain Res **541**(1): 163-166.
- Nasreddine, Z. S. and B. B. Patel (2016). "Validation of Montreal Cognitive Assessment, MoCA, Alternate French Versions." Can J Neurol Sci **43**(5): 665-671.
- Nasreddine, Z. S., N. A. Phillips, V. Bedirian, S. Charbonneau, V. Whitehead, I. Collin, J. L. Cummings and H. Chertkow (2005). "The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment." J Am Geriatr Soc **53**(4): 695-699.
- Nelson, P. T., I. Alafuzoff, E. H. Bigio, C. Bouras, H. Braak, N. J. Cairns, R. J. Castellani, B. J. Crain, P. Davies, K. Del Tredici, C. Duyckaerts, M. P. Frosch, V. Haroutunian, P. R.

Hof, C. M. Hulette, B. T. Hyman, T. Iwatsubo, K. A. Jellinger, G. A. Jicha, E. Kovari, W. A. Kukull, J. B. Leverenz, S. Love, I. R. Mackenzie, D. M. Mann, E. Masliah, A. C. McKee, T. J. Montine, J. C. Morris, J. A. Schneider, J. A. Sonnen, D. R. Thal, J. Q. Trojanowski, J. C. Troncoso, T. Wisniewski, R. L. Woltjer and T. G. Beach (2012). "Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature." J Neuropathol Exp Neurol **71**(5): 362-381.

Neu, S. C., J. Pa, W. Kukull, D. Beekly, A. Kuzma, P. Gangadharan, L. S. Wang, K. Romero, S. P. Arneric, A. Redolfi, D. Orlandi, G. B. Frisoni, R. Au, S. Devine, S. Auerbach, A. Espinosa, M. Boada, A. Ruiz, S. C. Johnson, R. Kosciak, J. J. Wang, W. C. Hsu, Y. L. Chen and A. W. Toga (2017). "Apolipoprotein E Genotype and Sex Risk Factors for Alzheimer Disease: A Meta-analysis." JAMA Neurol **74**(10): 1178-1189.

Nunomura, A., G. Perry, G. Aliev, K. Hirai, A. Takeda, E. K. Balraj, P. K. Jones, H. Ghanbari, T. Wataya, S. Shimohama, S. Chiba, C. S. Atwood, R. B. Petersen and M. A. Smith (2001). "Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease." J Neuropathol Exp Neurol **60**(8): 759-767.

O'Bryant, S. E., V. Gupta, K. Henriksen, M. Edwards, A. Jeromin, S. Lista, C. Bazenet, H. Soares, S. Lovestone, H. Hampel, T. Montine, K. Blennow, T. Foroud, M. Carrillo, N. Graff-Radford, C. Laske, M. Breteler, L. Shaw, J. Q. Trojanowski, N. Schupf, R. A. Rissman, A. M. Fagan, P. Oberoi, R. Umek, M. W. Weiner, P. Grammas, H. Posner and R. Martins (2015). "Guidelines for the standardization of preanalytic variables for blood-based biomarker studies in Alzheimer's disease research." Alzheimer's & Dementia **11**(5): 549-560.

O'Bryant, S. E., V. Hobson, J. R. Hall, S. C. Waring, W. Chan, P. Massman, L. Lacritz, C. M. Cullum and R. Diaz-Arrastia (2009). "Brain-derived neurotrophic factor levels in Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **17**(2): 337-341.

Oddo, S., A. Caccamo, M. Kitazawa, B. P. Tseng and F. M. LaFerla (2003). "Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **24**(8): 1063-1070.

Oddo, S., A. Caccamo, J. D. Shepherd, M. P. Murphy, T. E. Golde, R. Kaye, R. Metherate, M. P. Mattson, Y. Akbari and F. M. LaFerla (2003). "Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction." Neuron **39**(3): 409-421.

Okubo, H., H. E. Syddall, D. I. Phillips, A. A. Sayer, E. M. Dennison, C. Cooper and S. M. Robinson (2014). "Dietary total antioxidant capacity is related to glucose tolerance in older people: the Hertfordshire Cohort Study." Nutr Metab Cardiovasc Dis **24**(3): 301-308.

Olsson, B., J. Herte, R. Lautner, H. Zetterberg, K. Nagga, K. Hoglund, H. Basun, P. Annas, L. Lannfelt, N. Andreasen, L. Minthon, K. Blennow and O. Hansson (2013). "Microglial markers are elevated in the prodromal phase of Alzheimer's disease and vascular dementia." J Alzheimers Dis **33**(1): 45-53.

Olsson, B., R. Lautner, U. Andreasson, A. Ohrfelt, E. Portelius, M. Bjerke, M. Holtta, C. Rosen, C. Olsson, G. Strobel, E. Wu, K. Dakin, M. Petzold, K. Blennow and H.

Zetterberg (2016). "CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis." Lancet Neurol **15**(7): 673-684.

Omar, R. A., Y. J. Chyan, A. C. Andorn, B. Poeggeler, N. K. Robakis and M. A. Pappolla (1999). "Increased Expression but Reduced Activity of Antioxidant Enzymes in Alzheimer's Disease." J Alzheimers Dis **1**(3): 139-145.

Ortiz, A. (2017). "Not all extracellular vesicles were created equal: clinical implications." Ann Transl Med **5**(5): 111.

Ossenkoppele, R., W. J. Jansen, G. D. Rabinovici, D. L. Knol, W. M. van der Flier, B. N. van Berckel, P. Scheltens, P. J. Visser, S. C. Verfaillie, M. D. Zwan, S. M. Adriaanse, A. A. Lammertsma, F. Barkhof, W. J. Jagust, B. L. Miller, H. J. Rosen, S. M. Landau, V. L. Villemagne, C. C. Rowe, D. Y. Lee, D. L. Na, S. W. Seo, M. Sarazin, C. M. Roe, O. Sabri, H. Barthel, N. Koglin, J. Hodges, C. E. Leyton, R. Vandenberghe, K. van Laere, A. Drzezga, S. Forster, T. Grimmer, P. Sanchez-Juan, J. M. Carril, V. Mok, V. Camus, W. E. Klunk, A. D. Cohen, P. T. Meyer, S. Hellwig, A. Newberg, K. S. Frederiksen, A. S. Fleisher, M. A. Mintun, D. A. Wolk, A. Nordberg, J. O. Rinne, G. Chetelat, A. Lleo, R. Blesa, J. Fortea, K. Madsen, K. M. Rodrigue and D. J. Brooks (2015). "Prevalence of amyloid PET positivity in dementia syndromes: a meta-analysis." JAMA **313**(19): 1939-1949.

Overdorp, E. J., R. P. Kessels, J. A. Claassen and J. M. Oosterman (2014). "Cognitive impairments associated with medial temporal atrophy and white matter hyperintensities: an MRI study in memory clinic patients." Front Aging Neurosci **6**: 98.

Ovod, V., K. N. Ramsey, K. G. Mawuenyega, J. G. Bollinger, T. Hicks, T. Schneider, M. Sullivan, K. Paumier, D. M. Holtzman, J. C. Morris, T. Benzinger, A. M. Fagan, B. W. Patterson and R. J. Bateman (2017). "Amyloid beta concentrations and stable isotope labeling kinetics of human plasma specific to central nervous system amyloidosis." Alzheimers Dement **13**(8): 841-849.

Ozcankaya, R. and N. Delibas (2002). "Malondialdehyde, superoxide dismutase, melatonin, iron, copper, and zinc blood concentrations in patients with Alzheimer disease: cross-sectional study." Croat Med J **43**(1): 28-32.

Pacher, P., J. S. Beckman and L. Liaudet (2007). "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease." Physiol Rev **87**(1): 315-424.

Padurariu, M., A. Ciobica, L. Hritcu, B. Stoica, W. Bild and C. Stefanescu (2010). "Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease." Neurosci Lett **469**(1): 6-10.

Palumbo, B., D. Siepi, I. Sabalich, C. Tranfaglia and L. Parnetti (2008). "Cerebrospinal fluid neuron-specific enolase: a further marker of Alzheimer's disease?" Funct Neurol **23**(2): 93-96.

Pan, B. T., R. Blostein and R. M. Johnstone (1983). "Loss of the transferrin receptor during the maturation of sheep reticulocytes in vitro. An immunological approach." Biochem J **210**(1): 37-47.

Pan, B. T. and R. M. Johnstone (1983). "Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor." Cell **33**(3): 967-978.

Pannee, J., U. Tornqvist, A. Westerlund, M. Ingelsson, L. Lannfelt, G. Brinkmalm, R. Persson, J. Gobom, J. Svensson, P. Johansson, H. Zetterberg, K. Blennow and E. Portelius (2014). "The amyloid-beta degradation pattern in plasma--a possible tool for clinical trials in Alzheimer's disease." Neurosci Lett **573**: 7-12.

Paolicelli, R. C., G. Bergamini and L. Rajendran (2018). "Cell-to-cell Communication by Extracellular Vesicles: Focus on Microglia." Neuroscience.

Park, J.-C., S.-H. Han, D. Yi, M. S. Byun, J. H. Lee, S. Jang, K. Ko, S. Y. Jeon, Y.-S. Lee, Y. K. Kim, D. Y. Lee, I. Mook-Jung and K. R. Group (2019). "Plasma tau/amyloid- β 1-42 ratio predicts brain tau deposition and neurodegeneration in Alzheimer's disease." Brain: awy347-awy347.

Park, S. M., J. D. Gabrieli, S. L. Reminger, L. A. Monti, D. A. Fleischman, R. S. Wilson, J. R. Tinklenberg and J. A. Yesavage (1998). "Preserved priming across study-test picture transformations in patients with Alzheimer's disease." Neuropsychology **12**(3): 340-352.

Parker, W. D., Jr., C. M. Filley and J. K. Parks (1990). "Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease." Neurology **40**(8): 1302-1303.

Parnetti, L., B. Palumbo, L. Cardinali, F. Loreti, F. Chionne, R. Cecchetti and U. Senin (1995). "Cerebrospinal fluid neuron-specific enolase in Alzheimer's disease and vascular dementia." Neurosci Lett **183**(1-2): 43-45.

Parsons, C. G., W. Danysz and G. Quack (1998). "Glutamate in CNS disorders as a target for drug development: an update." Drug News Perspect **11**(9): 523-569.

Pascua-Maestro, R., E. González, C. Lillo, M. D. Ganfornina, J. M. Falcón-Pérez and D. Sanchez (2019). "Extracellular Vesicles Secreted by Astroglial Cells Transport Apolipoprotein D to Neurons and Mediate Neuronal Survival Upon Oxidative Stress." Frontiers in Cellular Neuroscience **12**(526).

Pelletier, A., C. Barul, C. Feart, C. Helmer, C. Bernard, O. Periot, B. Dilharreguy, J. F. Dartigues, M. Allard, P. Barberger-Gateau, G. Catheline and C. Samieri (2015). "Mediterranean diet and preserved brain structural connectivity in older subjects." Alzheimers Dement **11**(9): 1023-1031.

Pereson, S., H. Wils, G. Kleinberger, E. McGowan, M. Vandewoestyne, B. Van Broeck, G. Joris, I. Cuijt, D. Deforce, M. Hutton, C. Van Broeckhoven and S. Kumar-Singh (2009). "Progranulin expression correlates with dense-core amyloid plaque burden in Alzheimer disease mouse models." J Pathol **219**(2): 173-181.

Perez-Gonzalez, R., S. A. Gauthier, A. Kumar and E. Levy (2012). "The exosome secretory pathway transports amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragments from the cell into the brain extracellular space." J Biol Chem **287**(51): 43108-43115.

Perry, D. C., M. Lehmann, J. S. Yokoyama, A. Karydas, J. J. Lee, G. Coppola, L. T. Grinberg, D. Geschwind, W. W. Seeley, B. L. Miller, H. Rosen and G. Rabinovici (2013).

"Progranulin mutations as risk factors for Alzheimer disease." JAMA Neurol **70**(6): 774-778.

Perry, E. K., P. H. Gibson, G. Blessed, R. H. Perry and B. E. Tomlinson (1977). "Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue." J Neurol Sci **34**(2): 247-265.

Perry, E. K., B. E. Tomlinson, G. Blessed, K. Bergmann, P. H. Gibson and R. H. Perry (1978). "Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia." Br Med J **2**(6150): 1457-1459.

Perry, R. J., P. Watson and J. R. Hodges (2000). "The nature and staging of attention dysfunction in early (minimal and mild) Alzheimer's disease: relationship to episodic and semantic memory impairment." Neuropsychologia **38**(3): 252-271.

Peskind, E. R., W. S. Griffin, K. T. Akama, M. A. Raskind and L. J. Van Eldik (2001). "Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease." Neurochem Int **39**(5-6): 409-413.

Petersen, R. C., B. Caracciolo, C. Brayne, S. Gauthier, V. Jelic and L. Fratiglioni (2014). "Mild cognitive impairment: a concept in evolution." J Intern Med **275**(3): 214-228.

Petersson, S. D. and E. Philippou (2016). "Mediterranean Diet, Cognitive Function, and Dementia: A Systematic Review of the Evidence." Adv Nutr **7**(5): 889-904.

Petzold, A., R. Jenkins, H. C. Watt, A. J. Green, E. J. Thompson, G. Keir, N. C. Fox and M. N. Rossor (2003). "Cerebrospinal fluid S100B correlates with brain atrophy in Alzheimer's disease." Neurosci Lett **336**(3): 167-170.

Philips, T., L. De Muynck, H. N. Thu, B. Weynants, P. Vanacker, J. Dhondt, K. Slegers, H. J. Schelhaas, M. Verbeek, R. Vandenberghe, R. Sciot, C. Van Broeckhoven, D. Lambrechts, F. Van Leuven, L. Van Den Bosch, W. Robberecht and P. Van Damme (2010). "Microglial upregulation of progranulin as a marker of motor neuron degeneration." J Neuropathol Exp Neurol **69**(12): 1191-1200.

Phillips, H. S., J. M. Hains, M. Armanini, G. R. Laramée, S. A. Johnson and J. W. Winslow (1991). "BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease." Neuron **7**(5): 695-702.

Piccio, L., Y. Deming, J. L. Del-Aguila, L. Ghezzi, D. M. Holtzman, A. M. Fagan, C. Fenoglio, D. Galimberti, B. Borroni and C. Cruchaga (2016). "Cerebrospinal fluid soluble TREM2 is higher in Alzheimer disease and associated with mutation status." Acta Neuropathol **131**(6): 925-933.

Pijnenburg, Y. A., J. C. Janssen, N. S. Schoonenboom, A. Petzold, C. Mulder, T. Stigbrand, N. Norgren, H. Heijst, C. E. Hack, P. Scheltens and C. E. Teunissen (2007). "CSF neurofilaments in frontotemporal dementia compared with early onset Alzheimer's disease and controls." Dement Geriatr Cogn Disord **23**(4): 225-230.

Pisoschi, A. M. and A. Pop (2015). "The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review." European Journal of Medicinal Chemistry **97**: 55-74.

- Poirier, J., J. Davignon, D. Bouthillier, S. Kogan, P. Bertrand and S. Gauthier (1993). "Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease." Lancet **342**(8873): 697-699.
- Polanco, J. C., B. J. Scicluna, A. F. Hill and J. Gotz (2016). "Extracellular Vesicles Isolated from the Brains of rTg4510 Mice Seed Tau Protein Aggregation in a Threshold-dependent Manner." J Biol Chem **291**(24): 12445-12466.
- Polidori, M. C., P. Mattioli, S. Aldred, R. Cecchetti, W. Stahl, H. Griffiths, U. Senin, H. Sies and P. Mecocci (2004). "Plasma antioxidant status, immunoglobulin g oxidation and lipid peroxidation in demented patients: relevance to Alzheimer disease and vascular dementia." Dement Geriatr Cogn Disord **18**(3-4): 265-270.
- Polidori, M. C. and P. Mecocci (2002). "Plasma susceptibility to free radical-induced antioxidant consumption and lipid peroxidation is increased in very old subjects with Alzheimer disease." J Alzheimers Dis **4**(6): 517-522.
- Pratico, D. (2008). "Evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease brain and antioxidant therapy: lights and shadows." Ann N Y Acad Sci **1147**: 70-78.
- Pratico, D., O. P. Barry, J. A. Lawson, M. Adiyaman, S. W. Hwang, S. P. Khanapure, L. Iuliano, J. Rokach and G. A. FitzGerald (1998). "IPF2alpha-I: an index of lipid peroxidation in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 3449-3454.
- Pratico, D., C. M. Clark, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, J. Rokach and G. A. FitzGerald (2000). "Increased 8,12-iso-iPF2alpha-VI in Alzheimer's disease: correlation of a noninvasive index of lipid peroxidation with disease severity." Ann Neurol **48**(5): 809-812.
- Pratico, D., C. M. Clark, F. Liun, J. Rokach, V. Y. Lee and J. Q. Trojanowski (2002). "Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment: a possible predictor of Alzheimer disease." Arch Neurol **59**(6): 972-976.
- Pratico, D., R. K. Tangirala, D. J. Rader, J. Rokach and G. A. FitzGerald (1998). "Vitamin E suppresses isoprostane generation in vivo and reduces atherosclerosis in ApoE-deficient mice." Nat Med **4**(10): 1189-1192.
- Pratico, D., K. Uryu, S. Leight, J. Q. Trojanoswki and V. M. Lee (2001). "Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis." J Neurosci **21**(12): 4183-4187.
- Pratico, D., M. Y. L. V, J. Q. Trojanowski, J. Rokach and G. A. Fitzgerald (1998). "Increased F2-isoprostanes in Alzheimer's disease: evidence for enhanced lipid peroxidation in vivo." FASEB J **12**(15): 1777-1783.
- Prikrylova Vranova, H., E. Henykova, J. Mares, M. Kaiserova, K. Mensikova, M. Vastik, P. Hlustik, J. Zapletalova, M. Strnad, D. Stejskal and P. Kanovsky (2016). "Clusterin CSF levels in differential diagnosis of neurodegenerative disorders." J Neurol Sci **361**: 117-121.
- Prior, R. L., L. Gu, X. Wu, R. A. Jacob, G. Sotoudeh, A. A. Kader and R. A. Cook (2007). "Plasma antioxidant capacity changes following a meal as a measure of the ability of a food to alter in vivo antioxidant status." J Am Coll Nutr **26**(2): 170-181.

- Puchau, B., M. A. Zulet, A. G. de Echavarri, H. H. Hermsdorff and J. A. Martinez (2010). "Dietary total antioxidant capacity is negatively associated with some metabolic syndrome features in healthy young adults." Nutrition **26**(5): 534-541.
- Puertas, M. C., J. M. Martinez-Martos, M. P. Cobo, M. P. Carrera, M. D. Mayas and M. J. Ramirez-Exposito (2012). "Plasma oxidative stress parameters in men and women with early stage Alzheimer type dementia." Exp Gerontol **47**(8): 625-630.
- Pulido, R., A. Jimenez-Escrig, L. Orensanz, F. Saura-Calixto and A. Jimenez-Escrig (2005). "Study of plasma antioxidant status in Alzheimer's disease." Eur J Neurol **12**(7): 531-535.
- Qiang, W., W. M. Yau, J. X. Lu, J. Collinge and R. Tycko (2017). "Structural variation in amyloid-beta fibrils from Alzheimer's disease clinical subtypes." Nature **541**(7636): 217-221.
- Rajendran, L., M. Honsho, T. R. Zahn, P. Keller, K. D. Geiger, P. Verkade and K. Simons (2006). "Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(30): 11172-11177.
- Ramassamy, C., D. Averill, U. Beffert, S. Bastianetto, L. Theroux, S. Lussier-Cacan, J. S. Cohn, Y. Christen, J. Davignon, R. Quirion and J. Poirier (1999). "Oxidative damage and protection by antioxidants in the frontal cortex of Alzheimer's disease is related to the apolipoprotein E genotype." Free Radic Biol Med **27**(5-6): 544-553.
- Ramassamy, C., D. Averill, U. Beffert, L. Theroux, S. Lussier-Cacan, J. S. Cohn, Y. Christen, A. Schoofs, J. Davignon and J. Poirier (2000). "Oxidative insults are associated with apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease brain." Neurobiol Dis **7**(1): 23-37.
- Randall, J., E. Mortberg, G. K. Provuncher, D. R. Fournier, D. C. Duffy, S. Rubertsson, K. Blennow, H. Zetterberg and D. H. Wilson (2013). "Tau proteins in serum predict neurological outcome after hypoxic brain injury from cardiac arrest: results of a pilot study." Resuscitation **84**(3): 351-356.
- Rassart, E., A. Bedirian, S. Do Carmo, O. Guinard, J. Sirois, L. Terrisse and R. Milne (2000). "Apolipoprotein D." Biochim Biophys Acta **1482**(1-2): 185-198.
- Rautiainen, S., S. Larsson, J. Virtamo and A. Wolk (2012). "Total antioxidant capacity of diet and risk of stroke: a population-based prospective cohort of women." Stroke **43**(2): 335-340.
- Rautiainen, S., E. B. Levitan, N. Orsini, A. Akesson, R. Morgenstern, M. A. Mittleman and A. Wolk (2012). "Total antioxidant capacity from diet and risk of myocardial infarction: a prospective cohort of women." Am J Med **125**(10): 974-980.
- Ray, S., M. Britschgi, C. Herbert, Y. Takeda-Uchimura, A. Boxer, K. Blennow, L. F. Friedman, D. R. Galasko, M. Jutel, A. Karydas, J. A. Kaye, J. Leszek, B. L. Miller, L. Minthon, J. F. Quinn, G. D. Rabinovici, W. H. Robinson, M. N. Sabbagh, Y. T. So, D. L. Sparks, M. Tabaton, J. Tinklenberg, J. A. Yesavage, R. Tibshirani and T. Wyss-Coray (2007). "Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins." Nat Med **13**(11): 1359-1362.

Raynes, R., L. C. Pomatto and K. J. Davies (2016). "Degradation of oxidized proteins by the proteasome: Distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways." Mol Aspects Med **50**: 41-55.

Reed, T. T., W. M. Pierce, Jr., D. M. Turner, W. R. Markesbery and D. A. Butterfield (2009). "Proteomic identification of nitrated brain proteins in early Alzheimer's disease inferior parietal lobule." J Cell Mol Med **13**(8B): 2019-2029.

Reinheckel, T., N. Sitte, O. Ullrich, U. Kuckelkorn, K. J. Davies and T. Grune (1998). "Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress." Biochem J **335 (Pt 3)**: 637-642.

Reinheckel, T., O. Ullrich, N. Sitte and T. Grune (2000). "Differential impairment of 20S and 26S proteasome activities in human hematopoietic K562 cells during oxidative stress." Arch Biochem Biophys **377**(1): 65-68.

Rembach, A., T. M. Ryan, B. R. Roberts, J. D. Doecke, W. J. Wilson, A. D. Watt, K. J. Barnham and C. L. Masters (2013). "Progress towards a consensus on biomarkers for Alzheimer's disease: a review of peripheral analytes." Biomark Med **7**(4): 641-662.

Repetto, M. G., C. G. Reides, P. Evelson, S. Kohan, E. S. de Lustig and S. F. Llesuy (1999). "Peripheral markers of oxidative stress in probable Alzheimer patients." Eur J Clin Invest **29**(7): 643-649.

Resende, R., P. I. Moreira, T. Proenca, A. Deshpande, J. Busciglio, C. Pereira and C. R. Oliveira (2008). "Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease." Free Radic Biol Med **44**(12): 2051-2057.

Revet, T. J., G. B. Baker, J. Jhamandas and S. Kar (2013). "Glutamate system, amyloid ss peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology." J Psychiatry Neurosci **38**(1): 6-23.

Rinaldi, P., M. C. Polidori, A. Metastasio, E. Mariani, P. Mattioli, A. Cherubini, M. Catani, R. Cecchetti, U. Senin and P. Mecocci (2003). "Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **24**(7): 915-919.

Ringman, J. M., S. A. Frautschy, E. Teng, A. N. Begum, J. Bardens, M. Beigi, K. H. Gylys, V. Badmaev, D. D. Heath, L. G. Apostolova, V. Porter, Z. Vanek, G. A. Marshall, G. Helleman, C. Sugar, D. L. Masterman, T. J. Montine, J. L. Cummings and G. M. Cole (2012). "Oral curcumin for Alzheimer's disease: tolerability and efficacy in a 24-week randomized, double blind, placebo-controlled study." Alzheimers Res Ther **4**(5): 43.

Rissin, D. M., C. W. Kan, T. G. Campbell, S. C. Howes, D. R. Fournier, L. Song, T. Piech, P. P. Patel, L. Chang, A. J. Rivnak, E. P. Ferrell, J. D. Randall, G. K. Provuncher, D. R. Walt and D. C. Duffy (2010). "Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations." Nat Biotechnol **28**(6): 595-599.

Roltsch, E., L. Holcomb, K. A. Young, A. Marks and D. B. Zimmer (2010). "PSAPP mice exhibit regionally selective reductions in gliosis and plaque deposition in response to S100B ablation." J Neuroinflammation **7**: 78.

Rommer, P. S., D. Fuchs, F. Leblhuber, R. Schroth, M. Greilberger, E. Tafeit and J. Greilberger (2016). "Lowered Levels of Carbonyl Proteins after Vitamin B Supplementation in Patients with Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease." Neurodegener Dis **16**(3-4): 284-289.

Rosen, C., N. Mattsson, P. M. Johansson, U. Andreasson, A. Wallin, O. Hansson, J. O. Johansson, J. Lamont, J. Svensson, K. Blennow and H. Zetterberg (2011). "Discriminatory Analysis of Biochip-Derived Protein Patterns in CSF and Plasma in Neurodegenerative Diseases." Front Aging Neurosci **3**: 1.

Rowe, C. C., S. Ng, U. Ackermann, S. J. Gong, K. Pike, G. Savage, T. F. Cowie, K. L. Dickinson, P. Maruff, D. Darby, C. Smith, M. Woodward, J. Merory, H. Tochon-Danguy, G. O'Keefe, W. E. Klunk, C. A. Mathis, J. C. Price, C. L. Masters and V. L. Villemagne (2007). "Imaging beta-amyloid burden in aging and dementia." Neurology **68**(20): 1718-1725.

Roy, R., F. Niccolini, G. Pagano and M. Politis (2016). "Cholinergic imaging in dementia spectrum disorders." Eur J Nucl Med Mol Imaging **43**(7): 1376-1386.

Rubenstein, R., B. Chang, J. K. Yue, A. Chiu, E. A. Winkler, A. M. Puccio, R. Diaz-Arrastia, E. L. Yuh, P. Mukherjee, A. B. Valadka, W. A. Gordon, D. O. Okonkwo, P. Davies, S. Agarwal, F. Lin, G. Sarkis, H. Yadikar, Z. Yang, G. T. Manley, K. K. W. Wang, S. R. Cooper, K. Dams-O'Connor, A. J. Borraso, T. Inoue, A. I. R. Maas, D. K. Menon, D. M. Schnyer and M. J. Vassar (2017). "Comparing Plasma Phospho Tau, Total Tau, and Phospho Tau-Total Tau Ratio as Acute and Chronic Traumatic Brain Injury Biomarkers." JAMA Neurol **74**(9): 1063-1072.

Saman, S., W. Kim, M. Raya, Y. Visnick, S. Miro, S. Saman, B. Jackson, A. C. McKee, V. E. Alvarez, N. C. Lee and G. F. Hall (2012). "Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease." J Biol Chem **287**(6): 3842-3849.

Sato, C., N. R. Barthelemy, K. G. Mawuenyega, B. W. Patterson, B. A. Gordon, J. Jockel-Balsarotti, M. Sullivan, M. J. Crisp, T. Kasten, K. M. Kirmess, N. M. Kanaan, K. E. Yarasheski, A. Baker-Nigh, T. L. S. Benzinger, T. M. Miller, C. M. Karch and R. J. Bateman (2018). "Tau Kinetics in Neurons and the Human Central Nervous System." Neuron **98**(4): 861-864.

Saunders, A. M., W. J. Strittmatter, D. Schmechel, P. H. George-Hyslop, M. A. Pericak-Vance, S. H. Joo, B. L. Rosi, J. F. Gusella, D. R. Crapper-MacLachlan, M. J. Alberts and et al. (1993). "Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease." Neurology **43**(8): 1467-1472.

Saunders, N. L. and M. J. Summers (2010). "Attention and working memory deficits in mild cognitive impairment." J Clin Exp Neuropsychol **32**(4): 350-357.

Savage, M. J., J. Kalinina, A. Wolfe, K. Tugusheva, R. Korn, T. Cash-Mason, J. W. Maxwell, N. G. Hatcher, S. J. Haugabook, G. Wu, B. J. Howell, J. J. Renger, P. J. Shughrue and A. McCampbell (2014). "A sensitive abeta oligomer assay discriminates Alzheimer's and aged control cerebrospinal fluid." J Neurosci **34**(8): 2884-2897.

Scahill, R. I., J. M. Schott, J. M. Stevens, M. N. Rossor and N. C. Fox (2002). "Mapping the evolution of regional atrophy in Alzheimer's disease: unbiased analysis of fluid-registered serial MRI." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4703-4707.

Scarmeas, N., J. A. Luchsinger, N. Schupf, A. M. Brickman, S. Cosentino, M. X. Tang and Y. Stern (2009). "Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease." JAMA **302**(6): 627-637.

Schieber, M. and N. S. Chandel (2014). "ROS function in redox signaling and oxidative stress." Current biology : CB **24**(10): R453-R462.

Schindowski, K., K. Belarbi and L. Buee (2008). "Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport." Genes Brain Behav **7 Suppl 1**: 43-56.

Schippling, S., A. Kontush, S. Arlt, C. Buhmann, H. J. Sturenburg, U. Mann, T. Muller-Thomsen and U. Beisiegel (2000). "Increased lipoprotein oxidation in Alzheimer's disease." Free Radic Biol Med **28**(3): 351-360.

Schmidt, F. M., R. Mergl, B. Stach, I. Jahn, H. J. Gertz and P. Schonknecht (2014). "Elevated levels of cerebrospinal fluid neuron-specific enolase (NSE) in Alzheimer's disease." Neurosci Lett **570**: 81-85.

Schneider, J. A., Z. Arvanitakis, W. Bang and D. A. Bennett (2007). "Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons." Neurology **69**(24): 2197-2204.

Schrag, M., C. Mueller, M. Zabel, A. Crofton, W. M. Kirsch, O. Ghribi, R. Squitti and G. Perry (2013). "Oxidative stress in blood in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a meta-analysis." Neurobiol Dis **59**: 100-110.

Schrijvers, E. M., P. J. Koudstaal, A. Hofman and M. M. Breteler (2011). "Plasma clusterin and the risk of Alzheimer disease." JAMA **305**(13): 1322-1326.

Schuh, A. L. and A. Audhya (2014). "The ESCRT machinery: from the plasma membrane to endosomes and back again." Crit Rev Biochem Mol Biol **49**(3): 242-261.

Schupf, N., M. X. Tang, H. Fukuyama, J. Manly, H. Andrews, P. Mehta, J. Ravetch and R. Mayeux (2008). "Peripheral Aβ subspecies as risk biomarkers of Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(37): 14052-14057.

Sedaghat, F., E. Dedousi, V. Costa, A. S. Dimitriadis and S. J. Baloyannis (2009). "Plasma levels of amyloid beta1-42 are independent of neuronal function in Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **17**(2): 343-348.

Selkoe, D. J. (1991). "The molecular pathology of Alzheimer's disease." Neuron **6**(4): 487-498.

Selkoe, D. J. and J. Hardy (2016). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years." EMBO Mol Med **8**(6): 595-608.

Selley, M. L., D. R. Close and S. E. Stern (2002). "The effect of increased concentrations of homocysteine on the concentration of (E)-4-hydroxy-2-nonenal in the plasma and cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **23**(3): 383-388.

Serafini, M., R. Bellocco, A. Wolk and A. M. Ekstrom (2002). "Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer." Gastroenterology **123**(4): 985-991.

Serafini, M. and D. Del Rio (2004). "Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the Total Antioxidant Capacity the right tool?" Redox Rep **9**(3): 145-152.

Serra, J. A., R. O. Dominguez, E. S. de Lustig, E. M. Guareschi, A. L. Famulari, E. L. Bartolome and E. R. Marschoff (2001). "Parkinson's disease is associated with oxidative stress: comparison of peripheral antioxidant profiles in living Parkinson's, Alzheimer's and vascular dementia patients." J Neural Transm (Vienna) **108**(10): 1135-1148.

Serra, J. A., R. O. Dominguez, E. R. Marschoff, E. M. Guareschi, A. L. Famulari and A. Boveris (2009). "Systemic oxidative stress associated with the neurological diseases of aging." Neurochem Res **34**(12): 2122-2132.

Serra, J. A., E. R. Marschoff, R. O. Dominguez, E. M. Guareschi, A. L. Famulari, M. A. Pagano and E. S. de Lustig (2004). "Oxidative stress in Alzheimer's and vascular dementias: masking of the antioxidant profiles by a concomitant Type II diabetes mellitus condition." J Neurol Sci **218**(1-2): 17-24.

Serrano-Pozo, A., J. Qian, A. Muzikansky, S. E. Monsell, T. J. Montine, M. P. Frosch, R. A. Betensky and B. T. Hyman (2016). "Thal Amyloid Stages Do Not Significantly Impact the Correlation Between Neuropathological Change and Cognition in the Alzheimer Disease Continuum." J Neuropathol Exp Neurol **75**(6): 516-526.

Sharples, R. A., L. J. Vella, R. M. Nisbet, R. Naylor, K. Perez, K. J. Barnham, C. L. Masters and A. F. Hill (2008). "Inhibition of gamma-secretase causes increased secretion of amyloid precursor protein C-terminal fragments in association with exosomes." FASEB J **22**(5): 1469-1478.

Shatenstein, B., H. Payette, S. Nadon and K. Gray-Donald (2003). "An approach for evaluating lifelong intakes of functional foods in elderly people." J Nutr **133**(7): 2384-2391.

Shekhar, S., R. Kumar, N. Rai, V. Kumar, K. Singh, A. D. Upadhyay, M. Tripathi, S. Dwivedi, A. B. Dey and S. Dey (2016). "Estimation of Tau and Phosphorylated Tau181 in Serum of Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment Patients." PLoS One **11**(7): e0159099.

Sheng, J. G., R. E. Mrak and W. S. Griffin (1994). "S100 beta protein expression in Alzheimer disease: potential role in the pathogenesis of neuritic plaques." J Neurosci Res **39**(4): 398-404.

Sherrington, R., E. I. Rogaeve, Y. Liang, E. A. Rogaeve, G. Levesque, M. Ikeda, H. Chi, C. Lin, G. Li, K. Holman, T. Tsuda, L. Mar, J. F. Foncin, A. C. Bruni, M. P. Montesi, S. Sorbi, I. Rainero, L. Pinessi, L. Nee, I. Chumakov, D. Pollen, A. Brookes, P. Sanseau, R. J. Polinsky, W. Wasco, H. A. Da Silva, J. L. Haines, M. A. Pericak-Vance, R. E. Tanzi, A. D. Roses, P. E. Fraser, J. M. Rommens and P. H. St George-Hyslop (1995). "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease." Nature **375**(6534): 754-760.

Shi, M., A. Kovac, A. Korff, T. J. Cook, C. Gingham, K. M. Bullock, L. Yang, T. Stewart, D. Zheng, P. Aro, A. Atik, K. F. Kerr, C. P. Zabetian, E. R. Peskind, S. C. Hu, J. F. Quinn, D. R. Galasko, T. J. Montine, W. A. Banks and J. Zhang (2016). "CNS tau efflux via exosomes is likely increased in Parkinson's disease but not in Alzheimer's disease." Alzheimers Dement **12**(11): 1125-1131.

Shi, M., C. Liu, T. J. Cook, K. M. Bullock, Y. Zhao, C. Gingham, Y. Li, P. Aro, R. Dator, C. He, M. J. Hipp, C. P. Zabetian, E. R. Peskind, S. C. Hu, J. F. Quinn, D. R. Galasko, W. A. Banks and J. Zhang (2014). "Plasma exosomal alpha-synuclein is likely CNS-derived and increased in Parkinson's disease." Acta Neuropathol **128**(5): 639-650.

Shringarpure, R., T. Grune, J. Mehlhase and K. J. Davies (2003). "Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome." J Biol Chem **278**(1): 311-318.

Siest, G., P. Bertrand, B. Qin, B. Herbeth, J. M. Serot, L. Masana, J. Ribalta, A. P. Passmore, A. Evans, M. Ferrari, M. Franceschi, J. Shepherd, M. Cuchel, U. Beisiegel, K. Zuchowsky, A. S. Rukavina, J. Sertic, M. Stojanov, V. Kostic, A. Mitrevski, V. Petrova, C. Sass, A. Merched, J. T. Salonen, L. Tiret and S. Visvikis (2000). "Apolipoprotein E polymorphism and serum concentration in Alzheimer's disease in nine European centres: the ApoEurope study. ApoEurope group." Clin Chem Lab Med **38**(8): 721-730.

Silajdzic, E., L. Minthon, M. Bjorkqvist and O. Hansson (2012). "No diagnostic value of plasma clusterin in Alzheimer's disease." PLoS One **7**(11): e50237.

Sinclair, A. J., A. J. Bayer, J. Johnston, C. Warner and S. R. Maxwell (1998). "Altered plasma antioxidant status in subjects with Alzheimer's disease and vascular dementia." Int J Geriatr Psychiatry **13**(12): 840-845.

Sinem, F., K. Dildar, E. Gokhan, B. Melda, Y. Orhan and M. Filiz (2010). "The serum protein and lipid oxidation marker levels in Alzheimer's disease and effects of cholinesterase inhibitors and antipsychotic drugs therapy." Curr Alzheimer Res **7**(5): 463-469.

Singh, B., A. K. Parsaik, M. M. Mielke, P. J. Erwin, D. S. Knopman, R. C. Petersen and R. O. Roberts (2014). "Association of mediterranean diet with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis." J Alzheimers Dis **39**(2): 271-282.

Singh, M., T. N. Dang, M. Arseneault and C. Ramassamy (2010). "Role of by-products of lipid oxidation in Alzheimer's disease brain: a focus on acrolein." J Alzheimers Dis **21**(3): 741-756.

Sjogren, M., M. Blomberg, M. Jonsson, L. O. Wahlund, A. Edman, K. Lind, L. Rosengren, K. Blennow and A. Wallin (2001). "Neurofilament protein in cerebrospinal fluid: a marker of white matter changes." J Neurosci Res **66**(3): 510-516.

Skog, J., T. Wurdinger, S. van Rijn, D. H. Meijer, L. Gainche, M. Sena-Esteves, W. T. Curry, Jr., B. S. Carter, A. M. Krichevsky and X. O. Breakefield (2008). "Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers." Nat Cell Biol **10**(12): 1470-1476.

- Skoumalova, A. and J. Hort (2012). "Blood markers of oxidative stress in Alzheimer's disease." J Cell Mol Med **16**(10): 2291-2300.
- Sleegers, K., N. Brouwers and C. Van Broeckhoven (2010). "Role of progranulin as a biomarker for Alzheimer's disease." Biomark Med **4**(1): 37-50.
- Small, B. J., L. Fratiglioni, M. Viitanen, B. Winblad and L. Backman (2000). "The course of cognitive impairment in preclinical Alzheimer disease: three- and 6-year follow-up of a population-based sample." Arch Neurol **57**(6): 839-844.
- Smogeli, E., B. Davidson, M. Cvancarova, A. Holth, B. Katz, B. Risberg, G. Kristensen and K. Lindemann (2016). "L1CAM as a prognostic marker in stage I endometrial cancer: a validation study." BMC Cancer **16**: 596.
- Snaedal, J., J. Kristinsson, S. Gunnarsdottir, Olafsdottir, M. Baldvinsson and T. Johannesson (1998). "Copper, ceruloplasmin and superoxide dismutase in patients with Alzheimer's disease . a case-control study." Dement Geriatr Cogn Disord **9**(5): 239-242.
- Soares, H. D., Y. Chen, M. Sabbagh, A. Roher, E. Schrijvers and M. Breteler (2009). "Identifying early markers of Alzheimer's disease using quantitative multiplex proteomic immunoassay panels." Ann N Y Acad Sci **1180**: 56-67.
- Soffler, C., V. L. Campbell and D. M. Hassel (2010). "Measurement of urinary F2-isoprostanes as markers of in vivo lipid peroxidation: a comparison of enzyme immunoassays with gas chromatography-mass spectrometry in domestic animal species." J Vet Diagn Invest **22**(2): 200-209.
- Sofic, E., A. Rustembegovic, G. Kroyer and G. Cao (2002). "Serum antioxidant capacity in neurological, psychiatric, renal diseases and cardiomyopathy." J Neural Transm (Vienna) **109**(5-6): 711-719.
- Song, J. H., J. T. Yu and L. Tan (2015). "Brain-Derived Neurotrophic Factor in Alzheimer's Disease: Risk, Mechanisms, and Therapy." Mol Neurobiol **52**(3): 1477-1493.
- Spector, R. and C. E. Johanson (2007). "Vitamin transport and homeostasis in mammalian brain: focus on Vitamins B and E." J Neurochem **103**(2): 425-438.
- Sperling, R. A., P. S. Aisen, L. A. Beckett, D. A. Bennett, S. Craft, A. M. Fagan, T. Iwatsubo, C. R. Jack, Jr., J. Kaye, T. J. Montine, D. C. Park, E. M. Reiman, C. C. Rowe, E. Siemers, Y. Stern, K. Yaffe, M. C. Carrillo, B. Thies, M. Morrison-Bogorad, M. V. Wagster and C. H. Phelps (2011). "Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease." Alzheimers Dement **7**(3): 280-292.
- St-Laurent-Thibault, C., M. Arseneault, F. Longpre and C. Ramassamy (2011). "Tyrosol and hydroxytyrosol, two main components of olive oil, protect N2a cells against amyloid-beta-induced toxicity. Involvement of the NF-kappaB signaling." Curr Alzheimer Res **8**(5): 543-551.
- Sternberger, N. H., L. A. Sternberger and J. Ulrich (1985). "Aberrant neurofilament phosphorylation in Alzheimer disease." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(12): 4274-4276.

Strittmatter, W. J., K. H. Weisgraber, M. Goedert, A. M. Saunders, D. Huang, E. H. Corder, L. M. Dong, R. Jakes, M. J. Alberts, J. R. Gilbert and et al. (1994). "Hypothesis: microtubule instability and paired helical filament formation in the Alzheimer disease brain are related to apolipoprotein E genotype." Exp Neurol **125**(2): 163-171; discussion 172-164.

Strittmatter, W. J., K. H. Weisgraber, D. Y. Huang, L. M. Dong, G. S. Salvesen, M. Pericak-Vance, D. Schmechel, A. M. Saunders, D. Goldgaber and A. D. Roses (1993). "Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(17): 8098-8102.

Strocchi, P., M. A. Smith, G. Perry, E. Tamagno, O. Danni, A. Pession, A. Gaiba and B. Dozza (2006). "Clusterin up-regulation following sub-lethal oxidative stress and lipid peroxidation in human neuroblastoma cells." Neurobiol Aging **27**(11): 1588-1594.

Stuffers, S., C. Sem Wegner, H. Stenmark and A. Brech (2009). "Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs." Traffic **10**(7): 925-937.

Su, B., X. Wang, H. G. Lee, M. Tabaton, G. Perry, M. A. Smith and X. Zhu (2010). "Chronic oxidative stress causes increased tau phosphorylation in M17 neuroblastoma cells." Neurosci Lett **468**(3): 267-271.

Suarez-Calvet, M., M. A. Araque Caballero, G. Kleinberger, R. J. Bateman, A. M. Fagan, J. C. Morris, J. Levin, A. Danek, M. Ewers and C. Haass (2016). "Early changes in CSF sTREM2 in dominantly inherited Alzheimer's disease occur after amyloid deposition and neuronal injury." Sci Transl Med **8**(369): 369ra178.

Suarez-Calvet, M., A. Capell, M. A. Araque Caballero, E. Morenas-Rodriguez, K. Fellerer, N. Franzmeier, G. Kleinberger, E. Eren, Y. Deming, L. Piccio, C. M. Karch, C. Cruchaga, K. Paumier, R. J. Bateman, A. M. Fagan, J. C. Morris, J. Levin, A. Danek, M. Jucker, C. L. Masters, M. N. Rossor, J. M. Ringman, L. M. Shaw, J. Q. Trojanowski, M. Weiner, M. Ewers and C. Haass (2018). "CSF progranulin increases in the course of Alzheimer's disease and is associated with sTREM2, neurodegeneration and cognitive decline." EMBO Mol Med **10**(12).

Sudha, K., A. V. Rao, S. Rao and A. Rao (2003). "Free radical toxicity and antioxidants in Parkinson's disease." Neurol India **51**(1): 60-62.

Sultana, R., M. Piroddi, F. Galli and D. A. Butterfield (2008). "Protein levels and activity of some antioxidant enzymes in hippocampus of subjects with amnesic mild cognitive impairment." Neurochem Res **33**(12): 2540-2546.

Sun, L., R. Zhou, G. Yang and Y. Shi (2017). "Analysis of 138 pathogenic mutations in presenilin-1 on the in vitro production of Abeta42 and Abeta40 peptides by gamma-secretase." Proc Natl Acad Sci U S A **114**(4): E476-E485.

Sundelof, J., L. Kilander, J. Helmersson, A. Larsson, E. Ronnema, M. Degerman-Gunnarsson, P. Sjogren, H. Basun, L. Lannfelt and S. Basu (2009). "Systemic tocopherols and F2-isoprostanes and the risk of Alzheimer's disease and dementia: a prospective population-based study." J Alzheimers Dis **18**(1): 71-78.

Swardfager, W., K. Lanctot, L. Rothenburg, A. Wong, J. Cappell and N. Herrmann (2010). "A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease." Biol Psychiatry **68**(10): 930-941.

Szabó-Taylor, K., B. Ryan, X. Osteikoetxea, T. G. Szabó, B. Sódar, M. Holub, A. Németh, K. Pálóczi, É. Pállinger, P. Winyard and E. I. Buzás (2015). "Oxidative and other posttranslational modifications in extracellular vesicle biology." Seminars in Cell & Developmental Biology **40**: 8-16.

Tabet, N., D. Mantle, Z. Walker and M. Orrell (2001). "Vitamins, trace elements, and antioxidant status in dementia disorders." Int Psychogeriatr **13**(3): 265-275.

Tabet, N., D. Mantle, Z. Walker and M. Orrell (2002). "Endogenous antioxidant activities in relation to concurrent vitamins A, C, and E intake in dementia." Int Psychogeriatr **14**(1): 7-15.

Tai, H. C. and E. M. Schuman (2008). "Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction." Nat Rev Neurosci **9**(11): 826-838.

Takahashi, R. H., T. A. Milner, F. Li, E. E. Nam, M. A. Edgar, H. Yamaguchi, M. F. Beal, H. Xu, P. Greengard and G. K. Gouras (2002). "Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology." Am J Pathol **161**(5): 1869-1879.

Takahashi, Y., M. Nishikawa, H. Shinotsuka, Y. Matsui, S. Ohara, T. Imai and Y. Takakura (2013). "Visualization and in vivo tracking of the exosomes of murine melanoma B16-BL6 cells in mice after intravenous injection." J Biotechnol **165**(2): 77-84.

Takashima, A. (2010). "Tau aggregation is a therapeutic target for Alzheimer's disease." Curr Alzheimer Res **7**(8): 665-669.

Tamagno, E., P. Bardini, A. Obbili, A. Vitali, R. Borghi, D. Zaccheo, M. A. Pronzato, O. Danni, M. A. Smith, G. Perry and M. Tabaton (2002). "Oxidative stress increases expression and activity of BACE in NT2 neurons." Neurobiology of Disease **10**(3): 279-288.

Tan, Z. S., A. S. Beiser, R. S. Vasan, R. Roubenoff, C. A. Dinarello, T. B. Harris, E. J. Benjamin, R. Au, D. P. Kiel, P. A. Wolf and S. Seshadri (2007). "Inflammatory markers and the risk of Alzheimer disease: the Framingham Study." Neurology **68**(22): 1902-1908.

Teixeira, D., R. Fernandes, C. Prudencio and M. Vieira (2016). "3-Nitrotyrosine quantification methods: Current concepts and future challenges." Biochimie **125**: 1-11.

Teng, E. L., H. C. Chui, L. S. Schneider and L. E. Metzger (1987). "Alzheimer's dementia: performance on the Mini-Mental State Examination." J Consult Clin Psychol **55**(1): 96-100.

Terrisse, L., J. Poirier, P. Bertrand, A. Merched, S. Visvikis, G. Siest, R. Milne and E. Rassart (1998). "Increased levels of apolipoprotein D in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer's patients." J Neurochem **71**(4): 1643-1650.

Terrisse, L., D. Seguin, P. Bertrand, J. Poirier, R. Milne and E. Rassart (1999). "Modulation of apolipoprotein D and apolipoprotein E expression in rat hippocampus after entorhinal cortex lesion." Brain Res Mol Brain Res **70**(1): 26-35.

Terry, R. D. (2001). "Commentary. Copernicus revisited: amyloid beta in alzheimer disease." Neurobiol Aging **22**(1): 155; discussion 161-153.

Thambisetty, M., A. Simmons, L. Velayudhan, A. Hye, J. Campbell, Y. Zhang, L. O. Wahlund, E. Westman, A. Kinsey, A. Guntert, P. Proitsi, J. Powell, M. Causevic, R. Killick, K. Lunnon, S. Lynham, M. Broadstock, F. Choudhry, D. R. Howlett, R. J. Williams, S. I. Sharp, C. Mitchelmore, C. Tunnard, R. Leung, C. Foy, D. O'Brien, G. Breen, S. J. Furney, M. Ward, I. Kloszewska, P. Mecocci, H. Soininen, M. Tsolaki, B. Vellas, A. Hodges, D. G. Murphy, S. Parkins, J. C. Richardson, S. M. Resnick, L. Ferrucci, D. F. Wong, Y. Zhou, S. Muehlboeck, A. Evans, P. T. Francis, C. Spenger and S. Lovestone (2010). "Association of plasma clusterin concentration with severity, pathology, and progression in Alzheimer disease." Arch Gen Psychiatry **67**(7): 739-748.

Theos, A. C., S. T. Truschel, D. Tenza, I. Hurbain, D. C. Harper, J. F. Berson, P. C. Thomas, G. Raposo and M. S. Marks (2006). "A luminal domain-dependent pathway for sorting to intraluminal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis." Dev Cell **10**(3): 343-354.

Thery, C., A. Regnault, J. Garin, J. Wolfers, L. Zitvogel, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo and S. Amigorena (1999). "Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73." J Cell Biol **147**(3): 599-610.

Thompson, S. A., K. S. Graham, K. Patterson, B. J. Sahakian and J. R. Hodges (2002). "Is knowledge of famous people disproportionately impaired in patients with early and questionable Alzheimer's disease?" Neuropsychology **16**(3): 344-358.

Thomson, R. S., P. Auduong, A. T. Miller and R. K. Gurgel (2017). "Hearing loss as a risk factor for dementia: A systematic review." Laryngoscope Investig Otolaryngol **2**(2): 69-79.

Tkach, M., J. Kowal and C. Théry (2018). "Why the need and how to approach the functional diversity of extracellular vesicles." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **373**(1737): 20160479.

Tokarz, P., K. Kaarniranta and J. Blasiak (2013). "Role of antioxidant enzymes and small molecular weight antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD)." Biogerontology **14**(5): 461-482.

Tolonen, M., M. Halme and S. Sarna (1985). "Vitamin E and selenium supplementation in geriatric patients : A double-blind preliminary clinical trial." Biol Trace Elem Res **7**(3): 161-168.

Tong, Y., W. Zhou, V. Fung, M. A. Christensen, H. Qing, X. Sun and W. Song (2005). "Oxidative stress potentiates BACE1 gene expression and Abeta generation." J Neural Transm (Vienna) **112**(3): 455-469.

Torres, L. L., N. B. Quaglio, G. T. de Souza, R. T. Garcia, L. M. Dati, W. L. Moreira, A. P. Loureiro, J. N. de Souza-Talarico, J. Smid, C. S. Porto, C. M. Bottino, R. Nitrini, S. B.

Barros, R. Camarini and T. Marcourakis (2011). "Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **26**(1): 59-68.

Trajkovic, K., C. Hsu, S. Chiantia, L. Rajendran, D. Wenzel, F. Wieland, P. Schwille, B. Brugger and M. Simons (2008). "Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes." Science **319**(5867): 1244-1247.

Trams, E. G., C. J. Lauter, N. Salem, Jr. and U. Heine (1981). "Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles." Biochim Biophys Acta **645**(1): 63-70.

Trzepacz, P. T., H. Hochstetler, S. Wang, B. Walker and A. J. Saykin (2015). "Relationship between the Montreal Cognitive Assessment and Mini-mental State Examination for assessment of mild cognitive impairment in older adults." BMC Geriatr **15**: 107.

Tsutsumi, S., S. Morohashi, Y. Kudo, H. Akasaka, H. Ogasawara, M. Ono, K. Takasugi, K. Ishido, K. Hakamada and H. Kijima (2011). "L1 Cell adhesion molecule (L1CAM) expression at the cancer invasive front is a novel prognostic marker of pancreatic ductal adenocarcinoma." J Surg Oncol **103**(7): 669-673.

Tulving, E. (2002). "Episodic memory: from mind to brain." Annu Rev Psychol **53**: 1-25.

Tulving, E. and H. J. Markowitsch (1998). "Episodic and declarative memory: role of the hippocampus." Hippocampus **8**(3): 198-204.

van Niel, G., S. Charrin, S. Simoes, M. Romao, L. Rochin, P. Saftig, M. S. Marks, E. Rubinstein and G. Raposo (2011). "The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis." Dev Cell **21**(4): 708-721.

van Niel, G., G. D'Angelo and G. Raposo (2018). "Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles." Nat Rev Mol Cell Biol **19**(4): 213-228.

van Vliet, P., R. G. Westendorp, P. Eikelenboom, H. C. Comijs, M. Frolich, E. Bakker, W. van der Flier and E. van Exel (2009). "Parental history of Alzheimer disease associated with lower plasma apolipoprotein E levels." Neurology **73**(9): 681-687.

Vandermeeren, M., M. Mercken, E. Vanmechelen, J. Six, A. van de Voorde, J. J. Martin and P. Cras (1993). "Detection of tau proteins in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay." J Neurochem **61**(5): 1828-1834.

Vanderstichele, H., E. Stoops, E. Vanmechelen and A. Jeromin (2012). "Potential sources of interference on Abeta immunoassays in biological samples." Alzheimers Res Ther **4**(5): 39.

Venkateshappa, C., G. Harish, A. Mahadevan, M. M. Srinivas Bharath and S. K. Shankar (2012). "Elevated oxidative stress and decreased antioxidant function in the human hippocampus and frontal cortex with increasing age: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease." Neurochem Res **37**(8): 1601-1614.

Verbeek, M. M., D. De Jong and H. P. Kremer (2003). "Brain-specific proteins in cerebrospinal fluid for the diagnosis of neurodegenerative diseases." Ann Clin Biochem **40**(Pt 1): 25-40.

- Verberk, I. M. W., R. E. Slot, S. C. J. Verfaillie, H. Heijst, N. D. Prins, B. N. M. van Berckel, P. Scheltens, C. E. Teunissen and W. M. van der Flier (2018). "Plasma Amyloid as Prescreener for the Earliest Alzheimer Pathological Changes." Ann Neurol **84**(5): 648-658.
- Vestad, B., A. Llorente, A. Neurauder, S. Phuyal, B. Kierulf, P. Kierulf, T. Skotland, K. Sandvig, K. B. F. Haug and R. Ovstebo (2017). "Size and concentration analyses of extracellular vesicles by nanoparticle tracking analysis: a variation study." J Extracell Vesicles **6**(1): 1344087.
- Victoria, G. S. and C. Zurzolo (2017). "The spread of prion-like proteins by lysosomes and tunneling nanotubes: Implications for neurodegenerative diseases." J Cell Biol **216**(9): 2633-2644.
- Vingtdeux, V., M. Hamdane, A. Loyens, P. Gele, H. Drobeck, S. Begard, M. C. Galas, A. Delacourte, J. C. Beauvillain, L. Buee and N. Sergeant (2007). "Alkalizing drugs induce accumulation of amyloid precursor protein by-products in luminal vesicles of multivesicular bodies." J Biol Chem **282**(25): 18197-18205.
- Vogt, N. M., R. L. Kerby, K. A. Dill-McFarland, S. J. Harding, A. P. Merluzzi, S. C. Johnson, C. M. Carlsson, S. Asthana, H. Zetterberg, K. Blennow, B. B. Bendlin and F. E. Rey (2017). "Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease." Scientific Reports **7**(1): 13537.
- Walker, E. S., M. Martinez, A. L. Brunkan and A. Goate (2005). "Presenilin 2 familial Alzheimer's disease mutations result in partial loss of function and dramatic changes in Abeta 42/40 ratios." J Neurochem **92**(2): 294-301.
- Wang, J., B. J. Gu, C. L. Masters and Y. J. Wang (2017). "A systemic view of Alzheimer disease - insights from amyloid-beta metabolism beyond the brain." Nat Rev Neurol **13**(10): 612-623.
- Wang, J., Y. C. Tung, Y. Wang, X. T. Li, K. Iqbal and I. Grundke-Iqbal (2001). "Hyperphosphorylation and accumulation of neurofilament proteins in Alzheimer disease brain and in okadaic acid-treated SY5Y cells." FEBS Lett **507**(1): 81-87.
- Wang, M. J., S. Yi, J. Y. Han, S. Y. Park, J. W. Jang, I. K. Chun, S. E. Kim, B. S. Lee, G. J. Kim, J. S. Yu, K. Lim, S. M. Kang, Y. H. Park, Y. C. Youn, S. S. A. An and S. Kim (2017). "Oligomeric forms of amyloid-beta protein in plasma as a potential blood-based biomarker for Alzheimer's disease." Alzheimers Res Ther **9**(1): 98.
- Wang, X., W. Wang, L. Li, G. Perry, H. G. Lee and X. Zhu (2014). "Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease." Biochim Biophys Acta **1842**(8): 1240-1247.
- Watt, A. D., K. A. Perez, A. R. Rembach, C. L. Masters, V. L. Villemagne and K. J. Barnham (2012). "Variability in blood-based amyloid-beta assays: the need for consensus on pre-analytical processing." J Alzheimers Dis **30**(2): 323-336.
- Wayner, D. D., G. W. Burton, K. U. Ingold, L. R. Barclay and S. J. Locke (1987). "The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma." Biochim Biophys Acta **924**(3): 408-419.

- Weledji, E. P. and J. C. Assob (2014). "The ubiquitous neural cell adhesion molecule (N-CAM)." Ann Med Surg (Lond) **3**(3): 77-81.
- Weston, P. S. J., T. Poole, N. S. Ryan, A. Nair, Y. Liang, K. Macpherson, R. Druyeh, I. B. Malone, R. L. Ahsan, H. Pemberton, J. Klimova, S. Mead, K. Blennow, M. N. Rossor, J. M. Schott, H. Zetterberg and N. C. Fox (2017). "Serum neurofilament light in familial Alzheimer disease: A marker of early neurodegeneration." Neurology **89**(21): 2167-2175.
- Wheeler, M. A., D. T. Stuss and E. Tulving (1997). "Toward a theory of episodic memory: the frontal lobes and auto-noetic consciousness." Psychol Bull **121**(3): 331-354.
- Whitwell, J. L., D. W. Dickson, M. E. Murray, S. D. Weigand, N. Tosakulwong, M. L. Senjem, D. S. Knopman, B. F. Boeve, J. E. Parisi, R. C. Petersen, C. R. Jack, Jr. and K. A. Josephs (2012). "Neuroimaging correlates of pathologically defined subtypes of Alzheimer's disease: a case-control study." Lancet Neurol **11**(10): 868-877.
- Whitwell, J. L., H. J. Wiste, S. D. Weigand, W. A. Rocca, D. S. Knopman, R. O. Roberts, B. F. Boeve, R. C. Petersen and C. R. Jack, Jr. (2012). "Comparison of imaging biomarkers in the Alzheimer Disease Neuroimaging Initiative and the Mayo Clinic Study of Aging." Arch Neurol **69**(5): 614-622.
- Wilcock, G. K., M. M. Esiri, D. M. Bowen and C. C. Smith (1982). "Alzheimer's disease. Correlation of cortical choline acetyltransferase activity with the severity of dementia and histological abnormalities." J Neurol Sci **57**(2-3): 407-417.
- Williams, T. I., B. C. Lynn, W. R. Markesbery and M. A. Lovell (2006). "Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein, neurotoxic markers of lipid peroxidation, in the brain in Mild Cognitive Impairment and early Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **27**(8): 1094-1099.
- Winston, C. N., E. J. Goetzl, J. C. Akers, B. S. Carter, E. M. Rockenstein, D. Galasko, E. Masliah and R. A. Rissman (2016). "Prediction of conversion from mild cognitive impairment to dementia with neuronally derived blood exosome protein profile." Alzheimers Dement (Amst) **3**: 63-72.
- Wolf, P. (1967). "The nature and significance of platelet products in human plasma." Br J Haematol **13**(3): 269-288.
- Wolfe, M. S. (2007). "When loss is gain: reduced presenilin proteolytic function leads to increased A β ₄₂/A β ₄₀. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease." EMBO Rep **8**(2): 136-140.
- Wood, J. G., S. S. Mirra, N. J. Pollock and L. I. Binder (1986). "Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau)." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(11): 4040-4043.
- Wood, M. J., A. J. O'Loughlin and L. Samira (2011). "Exosomes and the blood-brain barrier: implications for neurological diseases." Ther Deliv **2**(9): 1095-1099.
- Yamazaki, Y., M. M. Painter, G. Bu and T. Kanekiyo (2016). "Apolipoprotein E as a Therapeutic Target in Alzheimer's Disease: A Review of Basic Research and Clinical Evidence." CNS Drugs **30**(9): 773-789.

- Yanez-Mo, M., P. R. Siljander, Z. Andreu, A. B. Zavec, F. E. Borrás, E. I. Buzas, K. Buzas, E. Casal, F. Cappello, J. Carvalho, E. Colas, A. Cordeiro-da Silva, S. Fais, J. M. Falcon-Perez, I. M. Ghobrial, B. Giebel, M. Gimona, M. Graner, I. Gursel, M. Gursel, N. H. Heegaard, A. Hendrix, P. Kierulf, K. Kokubun, M. Kosanovic, V. Kralj-Iglic, E. M. Kramer-Albers, S. Laitinen, C. Lasser, T. Lener, E. Ligeti, A. Line, G. Lipps, A. Llorente, J. Lotvall, M. Mancek-Keber, A. Marcilla, M. Mittelbrunn, I. Nazarenko, E. N. Nolte-t Hoen, T. A. Nyman, L. O'Driscoll, M. Olivan, C. Oliveira, E. Pallinger, H. A. Del Portillo, J. Reventos, M. Rigau, E. Rohde, M. Sammar, F. Sanchez-Madrid, N. Santarem, K. Schallmoser, M. S. Ostefeld, W. Stoorvogel, R. Stukelj, S. G. Van der Grein, M. H. Vasconcelos, M. H. Wauben and O. De Wever (2015). "Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions." J Extracell Vesicles **4**: 27066.
- Yang, K. Y., L. C. Lin, T. Y. Tseng, S. C. Wang and T. H. Tsai (2007). "Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **853**(1-2): 183-189.
- Yang, S. Y., M. J. Chiu, T. F. Chen, C. H. Lin, J. S. Jeng, S. C. Tang, Y. F. Lee, C. C. Yang, B. H. Liu, H. H. Chen and C. C. Wu (2017). "Analytical performance of reagent for assaying tau protein in human plasma and feasibility study screening neurodegenerative diseases." Sci Rep **7**(1): 9304.
- Yasutake, C., K. Kuroda, T. Yanagawa, T. Okamura and H. Yoneda (2006). "Serum BDNF, TNF-alpha and IL-1beta levels in dementia patients: comparison between Alzheimer's disease and vascular dementia." Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci **256**(7): 402-406.
- Yeh, F. L., D. V. Hansen and M. Sheng (2017). "TREM2, Microglia, and Neurodegenerative Diseases." Trends Mol Med **23**(6): 512-533.
- Yeum, K. J., S. L. Booth, J. A. Sadowski, C. Liu, G. Tang, N. I. Krinsky and R. M. Russell (1996). "Human plasma carotenoid response to the ingestion of controlled diets high in fruits and vegetables." Am J Clin Nutr **64**(4): 594-602.
- Yin, F., H. Sancheti, I. Patil and E. Cadenas (2016). "Energy metabolism and inflammation in brain aging and Alzheimer's disease." Free Radic Biol Med **100**: 108-122.
- Younes-Mhenni, S., M. Frih-Ayed, A. Kerkeni, M. Bost and G. Chazot (2007). "Peripheral blood markers of oxidative stress in Parkinson's disease." Eur Neurol **58**(2): 78-83.
- Yu, H. L., H. M. Chertkow, H. Bergman and H. M. Schipper (2003). "Aberrant profiles of native and oxidized glycoproteins in Alzheimer plasma." Proteomics **3**(11): 2240-2248.
- Yuan, D., Y. Zhao, W. A. Banks, K. M. Bullock, M. Haney, E. Batrakova and A. V. Kabanov (2017). "Macrophage exosomes as natural nanocarriers for protein delivery to inflamed brain." Biomaterials **142**: 1-12.
- Yuan, Y., Q. Tong, L. Zhang, S. Jiang, H. Zhou, R. Zhang, S. Zhang, Q. Xu, D. Li, X. Zhou, J. Ding and K. Zhang (2016). "Plasma antioxidant status and motor features in de novo Chinese Parkinson's disease patients." Int J Neurosci **126**(7): 641-646.

- Zafrilla, P., J. Mulero, J. M. Xandri, E. Santo, G. Caravaca and J. M. Morillas (2006). "Oxidative stress in Alzheimer patients in different stages of the disease." Curr Med Chem **13**(9): 1075-1083.
- Zaman, Z., S. Roche, P. Fielden, P. G. Frost, D. C. Niriella and A. C. Cayley (1992). "Plasma concentrations of vitamins A and E and carotenoids in Alzheimer's disease." Age Ageing **21**(2): 91-94.
- Zatti, G., A. Burgo, M. Giacomello, L. Barbiero, R. Ghidoni, G. Sinigaglia, C. Florean, S. Bagnoli, G. Binetti, S. Sorbi, P. Pizzo and C. Fasolato (2006). "Presenilin mutations linked to familial Alzheimer's disease reduce endoplasmic reticulum and Golgi apparatus calcium levels." Cell Calcium **39**(6): 539-550.
- Zetterberg, H. (2017). "Review: Tau in biofluids - relation to pathology, imaging and clinical features." Neuropathol Appl Neurobiol **43**(3): 194-199.
- Zetterberg, H., E. Mortberg, L. Song, L. Chang, G. K. Provuncher, P. P. Patel, E. Ferrell, D. R. Fournier, C. W. Kan, T. G. Campbell, R. Meyer, A. J. Rivnak, B. A. Pink, K. A. Minnehan, T. Piech, D. M. Rissin, D. C. Duffy, S. Rubertsson, D. H. Wilson and K. Blennow (2011). "Hypoxia due to cardiac arrest induces a time-dependent increase in serum amyloid beta levels in humans." PLoS One **6**(12): e28263.
- Zhang, H., K. P. Ng, J. Therriault, M. S. Kang, T. A. Pascoal, P. Rosa-Neto and S. Gauthier (2018). "Cerebrospinal fluid phosphorylated tau, visinin-like protein-1, and chitinase-3-like protein 1 in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease." Transl Neurodegener **7**: 23.
- Zhang, X., Y. Li, H. Xu and Y. W. Zhang (2014). "The gamma-secretase complex: from structure to function." Front Cell Neurosci **8**: 427.
- Zheng, Y., S. Fan, W. Liao, W. Fang, S. Xiao and J. Liu (2017). "Hearing impairment and risk of Alzheimer's disease: a meta-analysis of prospective cohort studies." Neurol Sci **38**(2): 233-239.