

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

RECHERCHE DES BIOMARQUEURS PERIPHERIQUES PRECOCES DE LA DEMENCE CHEZ DES SUJETS A RISQUE AYANT UN DEFICIT COGNITIF MAIS NON DEMENTS

Par

Mohamed Raâfet Ben Khedher

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

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Kessen Patten
INRS-IAFSB

Examineur externe

Judes Poirier
Université McGill

Examinatrice externe

Steffi Bosch
Oniris - France

Directeur de recherche

Charles Ramassamy
INRS-IAFSB

Codirectrice de recherche

Danielle Laurin
Université Laval

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tous ceux qui ont eu l'amabilité de me soutenir dans la réalisation de ma présente thèse. Mes remerciements s'adressent particulièrement à :

Monsieur le Professeur **Charles Ramassamy**, Directeur du Laboratoire de Recherche « Neuropharmacologie et toxicologie du stress cellulaire » au centre INRS-IAFSB, pour m'avoir donné l'opportunité, il y a de cela 4 ans, d'effectuer ma thèse de doctorat au sein de son laboratoire. Je vous remercie également pour la confiance que vous m'avez témoignée en m'offrant les moyens de réaliser mes travaux de recherche. Je salue vivement l'agréable ambiance familiale, l'esprit coopératif et la grande motivation que vous imposez dans votre laboratoire. J'espère que j'étais à la hauteur de vos attentes et de votre confiance.

Madame la Professeure **Danielle Laurin**, pour avoir supervisé et co-dirigé cette thèse. Vous avez su donner l'impulsion scientifique à ce travail. Votre esprit critique et vos remarques m'ont aidé à avancer dans la bonne direction. Je porte énormément de respect envers votre personne. Merci pour tout.

Monsieur le Professeur **Kessen Patten**, pour avoir pris le temps d'apporter votre regard d'expert sur ce travail et d'avoir accepté de siéger en tant que membre interne à trois reprises lors de mes examens de doctorat. Vous me faites un grand honneur d'accepter de juger mon manuscrit de thèse. Veuillez trouver ici, l'expression de ma plus haute estime et le témoignage de ma profonde gratitude.

Monsieur le Professeur **Jude Poirier**, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger et d'évaluer ce travail. Vous me faites un grand honneur de siéger dans mon jury et d'accepter de juger mon travail. Veuillez trouver ici, l'expression de ma plus haute estime et le témoignage de ma profonde gratitude.

Madame la Professeure **Steffi Bosch**, qui m'a fait un grand hommage et plaisir en acceptant d'être examinatrice et de juger ce travail. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma grande considération.

Monsieur le Docteur **Mohamed Haddad**, pour avoir apporté son appui, ses excellents conseils et connaissances scientifiques qui ont été essentielles dans la réalisation de mes travaux de recherche. Merci infiniment.

Je tiens à remercier mes collègues de laboratoire avec qui j'ai partagé le quotidien et qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, pour les bons moments passés ensemble, la belle ambiance et le bel esprit de coopération et fraternité. Merci aux Dr. **Mohamed Haddad**, Dr. **Jean-Michel Rabanel**, Dr. **Morganne Perrotte**, Dr. **Vincent Hervé**, Dr. **Morganne Lambert**, **Sarra Landri**, **Rummenigge Oliveira Silva**, **Hermine Council** et **Manilo Delar**. Bonne continuation à vous tous !

Tout le **cadre administratif** de l'INRS-IAFSB pour son professionnalisme, sa disponibilité et sa bienveillance. Une pensée spéciale à Josette, Florian et Séverine.

Enfin, je remercie également tous **les participants** qui ont contribué à l'étude. Chacun d'entre eux a su prendre un peu de son temps et perdre un peu de son sang pour pouvoir réaliser ce travail et quelque part, cette thèse leur appartient.

RÉSUMÉ

Le vieillissement démographique pose un réel problème de santé publique due à l'incidence de plusieurs maladies liées à l'âge, notamment la démence. Selon l'Organisation mondiale de la santé, plus de 55 millions de personnes dans le monde sont atteintes de démences. Ce chiffre risque d'augmenter de façon importante dans les prochaines années en l'absence de mesures préventives et de thérapies efficaces. La maladie d'Alzheimer (MA) est la forme de démence la plus fréquente de démence avec 60 à 80% des cas. C'est une maladie neurodégénérative à évolution lente et discrète qui touche le cerveau et engendre une perte progressive de la mémoire. L'âge avancé et la présence de la forme E4 de l'apolipoprotéine E (*APOE* ϵ 4) sont les principaux facteurs de risque de cette maladie.

Le dépistage de la MA avec les techniques actuellement disponibles, notamment la neuroimagerie et la ponction lombaire, présente plusieurs inconvénients. L'imagerie cérébrale est coûteuse et peu sensible et la collecte du liquide céphalo-rachidien est invasive, pouvant difficilement être appliquée en routine. Par ailleurs, les personnes atteintes d'Alzheimer reçoivent souvent leur diagnostic à un stade trop avancé de la maladie. Ainsi, il est important d'établir rapidement le diagnostic car les troubles cognitifs deviennent irréversibles après l'apparition des symptômes et les traitements médicamenteux sont généralement inefficaces.

L'objectif de notre projet est de démontrer la faisabilité de développer un test sanguin peu coûteux et non invasif pour la surveillance précoce de l'apparition et l'évolution de la MA. Dans cette perspective, notre étude vise à identifier des biomarqueurs au stade pré-clinique de la MA liés aux facteurs de risques majeurs de la maladie, notamment la présence du gène de susceptibilité *APOE* ϵ 4. Ces marqueurs se trouveraient dans des particules nanométriques appelées vésicules extracellulaires, qui circulent entre la périphérie et le cerveau.

Pour conduire la recherche, une analyse approfondie a été effectuée sur des échantillons sanguins prélevés dans le cadre de l'Étude sur la santé et le vieillissement au Canada. La population étudiée regroupe des participants qui ne souffraient pas de démences au moment du recrutement mais qui ont développé la MA après 5 ans. La cohorte de cette étude offre une opportunité unique pour pouvoir identifier certains marqueurs périphériques précoces de la MA. Notre étude vise ainsi à établir un diagnostic précoce qui permettrait d'appliquer assez tôt les traitements ainsi que tous les conseils préconisés en matière de prévention et offrir aux patients l'opportunité d'une meilleure qualité de vie.

Mots clés : Maladie d'Alzheimer, Diagnostic précoce, Biomarqueurs sanguins, Vésicules extracellulaires, apolipoprotéine E, Stress oxydatif

ABSTRACT

Population ageing is a real public health problem due to the incidence of several age-related diseases, in particular dementia. According to the World Health Organization, more than 55 million people worldwide have dementia. This figure is likely to increase significantly in the coming years due to the lack of preventive measures and effective drug therapies. Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia with 60 to 80% of cases. It is a slow and insidious progressive neurodegenerative disease that affects the brain and causes progressive loss of memory. Advanced age and the presence of the E4 form of apolipoprotein E (*APOE* ϵ 4) are the main risk factors for this disease.

The techniques used for AD screening, including neuroimaging and lumbar puncture, has several drawbacks. Brain imaging is expensive and insensitive, and the collection of cerebrospinal fluid is invasive, difficult to perform routinely. In addition, patients are diagnosed at advanced stages of AD. Hence, it is important to establish the diagnosis as early as possible since cognitive impairment becomes irreversible after the first symptoms and treatments are then ineffective.

The aim of our project is to demonstrate the feasibility of developing an inexpensive, non-invasive blood test for the early monitoring of the onset and course of AD. In this perspective, our study aims to identify biomarkers at the preclinical stage of AD linked to major risk factors for the disease, especially the presence of the susceptibility gene *APOE* ϵ 4. These markers are thought to be found in nanometric plasma lipid particles called "extracellular vesicles", that shuttle between the brain and the peripheral blood circulation.

To conduct the research, an in-depth analysis was performed on blood samples collected as part of the Canadian Study of Health and Aging. The study population includes participants who did not suffer from dementia at the time of recruitment but who developed AD 5 years later. This study cohort offers a unique opportunity to identify potential early peripheral markers of AD.

Our study aims to establish an early diagnosis that could help to adapt the treatments more effectively in order to better stimulate the cognitive and memorization faculties as well as to monitor the disease progression. Patients will gain in comfort and will have the opportunity to anticipate and better manage the disease development.

Keywords : Alzheimer's disease, Early diagnosis, Blood biomarkers, Extracellular vesicles, apolipoprotein E, Oxidative stress

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	I
RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XII
1 INTRODUCTION.....	1
1.1 LA DEMENCE.....	4
1.1.1 <i>Définition</i>	4
1.1.2 <i>Prévalence, incidence et facteurs de risque</i>	4
1.1.3 <i>Classification</i>	5
1.2 LA MALADIE D'ALZHEIMER	6
1.2.1 <i>Généralités</i>	6
1.2.2 <i>Stades de la maladie</i>	6
1.2.2.1 <i>Phase asymptomatique</i>	7
1.2.2.2 <i>Phase symptomatique</i>	9
1.2.2.3 <i>Autres classifications de la maladie d'Alzheimer</i>	10
1.2.3 <i>Physiopathologie</i>	11
1.2.3.1 <i>Le peptide β-amyloïde</i>	11
1.2.3.2 <i>La protéine Tau (τ)</i>	14
1.2.3.3 <i>Le stress oxydant</i>	16
1.2.3.4 <i>Les apolipoprotéines</i>	19
1.2.3.5 <i>Autres facteurs</i>	23
1.2.4 <i>Critères diagnostiques des démences</i>	25
1.2.4.1 <i>Les tests neuropsychométriques</i>	25
1.2.4.2 <i>Imagerie cérébrale</i>	27
1.2.4.3 <i>Biomarqueurs des fluides biologiques</i>	28
1.2.4.4 <i>Nouvelles cibles</i>	32
1.3 LES VESICULES EXTRACELLULAIRES.....	32
1.3.1 <i>Histoire des EVs</i>	32
1.3.2 <i>Généralités</i>	34
1.3.3 <i>Les corps apoptotiques</i>	35

1.3.4	<i>Les microvésicules</i>	35
1.3.5	<i>Les exosomes</i>	36
	1.3.5.1 <i>Généralités</i>	36
	1.3.5.2 <i>Biogenèse des exosomes</i>	36
1.3.6	<i>Extraction et purification des EVs</i>	38
1.3.7	<i>Caractérisation des EVs</i>	40
1.3.8	<i>Rôle des EVs dans les processus physiologique et la pathologique</i>	41
	1.3.8.1 <i>Les EVs dans les processus neurophysiologiques</i>	41
	1.3.8.2 <i>Les EVs dans les processus neuropathologiques</i>	42
1.3.9	<i>Les EVs : un outil de diagnostic innovant</i>	43
1.4	MISE EN SITUATION	46
1.5	HYPOTHESE ET OBJECTIFS	47
2	PREMIER ARTICLE	48
2.1	INTRODUCTION	49
2.2	METHODS	50
	2.2.1 <i>Study cohort</i>	50
	2.2.2 <i>Blood sampling</i>	51
	2.2.3 <i>Isolation and characterization of extracellular vesicles</i>	51
	2.2.3.1 <i>Nanoparticles tracking analysis</i>	51
	2.2.3.2 <i>Transmission electron microscopy</i>	52
	2.2.3.3 <i>Western blot analysis</i>	52
	2.2.3.4 <i>Dual immune-labeling of EVs</i>	52
	2.2.4 <i>Luminex assay</i>	52
	2.2.5 <i>Statistical analysis</i>	53
2.3	RESULTS	53
2.4	DISCUSSION	57
2.5	CONCLUSION	60
3	BIBLIOGRAPHIE 1^{ER} ARTICLE	61
4	DEUXIÈME ARTICLE	65
4.1	INTRODUCTION	66
4.2	METHODS	67
	4.2.1 <i>Participants and data source</i>	67
	4.2.2 <i>Isolation and characterization of extracellular vesicles</i>	68
	4.2.2.1 <i>Nanoparticles tracking analysis</i>	69
	4.2.2.2 <i>Transmission electron microscopy</i>	69

4.2.3.3	<i>Western blot analysis of EVs markers</i>	69
4.2.3	<i>Plasma total antioxidant capacity</i>	69
4.2.4	<i>Proteasome activity assay</i>	70
4.2.5	<i>Immunoblotting analysis of protein carbonyls and apolipoproteins</i>	70
4.2.6	<i>Statistical analysis</i>	71
4.3	RESULTS	71
4.3.1	<i>Baseline and specific cohort characteristics</i>	71
4.3.2	<i>Characterisation of isolated cEVs</i>	71
4.3.3	<i>Plasma and cEVs levels of oxidative markers</i>	72
4.3.4	<i>APOE ϵ4-driven effect on oxidative factor regulation</i>	74
4.4	DISCUSSION	76
4.5	CONCLUSION	79
5	BIBLIOGRAPHIE 2^E ARTICLE	80
6	TROISIEME ARTICLE	84
6.1	INTRODUCTION	86
6.2	METHODS	87
6.2.1	<i>Participants and data source</i>	87
6.2.2	<i>Isolation and characterization of extracellular vesicles</i>	88
6.2.2.1	<i>EVs isolation procedure</i>	88
6.2.2.2	<i>Transmission electron microscopy (TEM)</i>	88
6.2.2.3	<i>Nanoparticles tracking analysis (NTA)</i>	88
6.2.2.4	<i>Western blot analysis (WB)</i>	88
6.2.3	<i>Aβ1-42 oligomers preparation and characterization</i>	89
6.2.4	<i>Crosstalk between cEVs and oAβ1-42</i>	90
6.2.5	<i>Detection and localisation of proteins and lipids involved in cEVs- oAβ1-42 interaction</i>	90
6.2.5.1	<i>Shaved cEVs preparation</i>	90
6.2.5.2	<i>ELISA assay</i>	90
6.2.6	<i>Measurement of cEVs proteins levels</i>	91
6.2.7	<i>Statistical analysis</i>	91
6.3	RESULTS	91
6.3.1	<i>Characterization of Aβ oligomers and human circulating EVs</i>	91
6.3.2	<i>cEVs- oAβ1-42 interaction</i>	92
6.3.3	<i>cEVs corona proteins are implicated in EVs-oAβ interaction</i>	93
6.3.4	<i>Cohort characteristics</i>	94
6.3.5	<i>cEVs levels of proteins involved in EVs-oAβ interaction</i>	95

6.4	DISCUSSION	96
6.5	CONCLUSION	100
7	BIBLIOGRAPHIE 3^E ARTICLE	101
8	DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION	105
8.1	APERÇU GENERAL.....	105
8.2	PARTIE I : CARACTERISATION DE EVs ET IMPACT DU VARIANT APOE E4.....	105
8.3	PARTIE II : IDENTIFICATION DES MARQUEURS PRECOCES DE LA MA	108
8.3.1	<i>Étude des marqueurs liés à la neurodégénérescence et la survie neuronale</i>	<i>108</i>
8.3.2	<i>Étude des marqueurs liés au stress oxydant.....</i>	<i>110</i>
8.4	PARTIE III : ÉTUDE DU ROLE PHYSIOLOGIQUE DES EVs	113
8.5	LIMITATIONS DE L'ÉTUDE.....	117
8.5.1	<i>Conservation des échantillons biologiques</i>	<i>117</i>
8.5.2	<i>Validation des marqueurs étudiés.....</i>	<i>118</i>
8.5.3	<i>Éthnicité et sexe</i>	<i>118</i>
8.6	CONCLUSION GENERALE.....	119
9	PERSPECTIVES.....	120
10	BIBLIOGRAPHIE	122
11	ANNEXE I.....	149
12	ANNEXE II	151
13	ANNEXE III	153
14	ANNEXE IV.....	155
15	ANNEXE V.....	156
16	ANNEXE VI.....	157

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1	PREVALENCE MONDIALE DE LA DEMENCE DE TOUS TYPES, DE LA MALADIE D'ALZHEIMER ET DE LA DEMENCE VASCULAIRE SELON LES CATEGORIES D'AGE	4
FIGURE 1.2	INCIDENCE GLOBALE DE LA DEMENCE DE TOUS TYPES ET DE LA MALADIE D'ALZHEIMER	5
FIGURE 1.3	LES TYPES DE DÉMENCES	5
FIGURE 1.4	PROGRESSION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	7
FIGURE 1.5	PROGRESSION SPATIOTEMPORELLE DES PROTEINES IMPLIQUEES DANS LA MA	9
FIGURE 1.6	ÉVOLUTION DE LA FONCTION COGNITIVE DE L'ETAT NORMAL A LA MA	10
FIGURE 1.7	METABOLISME DE L'APP	11
FIGURE 1.8	HYPOTHESE DE LA CASCADE AMYLOÏDE	13
FIGURE 1.9	FORMATION D'ENCHEVETREMENTS NEUROFIBRILLAIRES	15
FIGURE 1.10	PRODUCTION DES ERO DANS LES MITOCHONDRIES ET MECANISMES ANTIOXYDANTS	16
FIGURE 1.11	MECANISMES DE LA CLAIRANCE D'AB PAR LES APOE/J	20
FIGURE 1.12	RISQUE DE LA MA EN FONCTION DU GENOTYPE DE L'APOE	21
FIGURE 1.13	POURCENTAGE DE DYSFONCTIONS COGNITIVES CIBLES PAR LE TEST 3MS	26
FIGURE 1.14	COMPARAISON DE L'ACCUMULATION DE TAU ET DE L'AB ENTRE UN PATIENT MA ET DES SUJETS SAINS AGES PAR TEP AMYLOÏDE ET TEP TAU	27
FIGURE 1.15	VARIATION DES BIOMARQUEURS DE LA MA MESURES DANS LE LCR	28
FIGURE 1.16	CHRONOLOGIE DES EVENEMENTS LES PLUS MARQUANTS DEPUIS LA DECOUVERTE DES VESICULES EXTRACELLULAIRES	33
FIGURE 1.17	LES VESICULES EXTRACELLULAIRES.....	34
FIGURE 1.18	BIOGENESE DES EXOSOMES.....	37
FIGURE 1.19	LISTE DES TECHNIQUES D'ISOLEMENT ET DE PURIFICATION DES EVs	38
FIGURE 1.20	SPECIFICITE ET RENDEMENT DES TECHNIQUES D'EXTRACTION ET PURIFICATION DES EVs	39
FIGURE 1.21	LISTE DES METHODES DE CARACTERISATION DES EVs	40
FIGURE 1.22	VOIES DE SIGNALISATIONS MEDIEES PAR LES EVs AU NIVEAU DU SNC	42
FIGURE 1.23	FORMATION DES EXOSOMES CONTENANT DES PROTEINES ASSOCIEES A DES MALADIES NEURODEGENERATIVES	42
FIGURE 2.1	CHARACTERIZATION AND VISUALIZATION OF PEV	54
FIGURE 2.2	EFFECTS OF APOE E4 VARIANT ON PEVS AND PLASMA CHARACTERISTICS.....	54
FIGURE 2.3	LEVELS OF NEUROTROPHIC FACTORS IN PEVS AND IN PLASMA.....	55
FIGURE 2.4	LEVELS OF INFLAMMATORY FACTORS IN PEVS AND IN PLASMA	56
FIGURE 2.5	LEVELS AND STATISTICAL CORRELATION OF PENTRAXIN-2 AND A-SYNUCLEIN IN PEVS WITH COGNITIVE PERFORMANCE	57
FIGURE 2.6	ASSOCIATION ENTRE LE STRESS OXYDATIF ET LES DIFFERENTES COMPOSANTES IMPLIQUEES DANS LE RISQUE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	64
FIGURE 4.1	VISUALIZATION AND CHARACTERIZATION OF CEVS ISOLATED FROM PLASMA	73
FIGURE 4.2	PLASMA AND CEVS LEVELS OF OXIDATIVE FACTORS	73

FIGURE 4.3	LINEAR REGRESSION ANALYSIS BETWEEN THE COGNITIVE PERFORMANCES AND THE STUDIED MARKERS	74
FIGURE 4.4	PLASMA AND CEVs LEVELS OF OXIDATIVE FACTORS ACCORDING TO APOE ISOFORM	75
FIGURE 4.5	RECEIVER OPERATING CHARACTERISTIC (ROC) CURVE ANALYSIS ACCORDING TO APOE ISOFORM.....	76
FIGURE 6.1	CHARACTERIZATION AND VISUALIZATION OF OAb1-42 AND CEVs.....	92
FIGURE 6.2	CROSS-TALK BETWEEN OAb ₁₋₄₂ AND CEVs.	93
FIGURE 6.3	LOCALIZATION OF THE STUDIED PROTEINS ON CEVs.....	94
FIGURE 6.4	CEVs DISTRIBUTION IN THE STUDY POPULATION.....	95
FIGURE 6.5	CEVs LEVELS OF CLUSTERINE AND LINEAR REGRESSION ANALYSIS BETWEEN THE STUDIED PROTEINS.....	96
FIGURE 6.6	HYPOTHETICAL PATHWAYS OF Ab OLIGOMERS CLEARANCE IN BRAIN AND IN PERIPHERY BY EVs AND POSSIBLE COUNTEREFFECTS.....	99
FIGURE 8.1	LISTE DES PROTÉINES ANALYSÉES DANS LA COHORTE D'ÉTUDE	107

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.1	DIFFERENCES ENTRE MICROVESICULES ET EXOSOMES	35
TABLEAU 1.2	LISTE DE BIOMARQUEURS DERIVES DES EVS DANS LE CADRE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER	44
TABLEAU 2.1	UNIVARIATE CORRELATION OF PLASMA AND EVS STUDIED FACTORS WITH APOE GENOTYPE AMONG THE STUDY POPULATION.....	56
TABLEAU 4.1	CLINICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE STUDY PARTICIPANTS	72
TABLEAU 4.2	UNIVARIATE CORRELATION OF OXIDATIVE STRESS FACTORS AND <i>APOE</i> E4 ISOFORM IN THE STUDY POPULATION	74
TABLEAU 6.1	CLINICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE STUDY PARTICIPANTS	94
TABLEAU 14.1	LIMITE DE DÉTECTION PAR LA TECHNIQUE LUMINEX DES PROTÉINES ÉTUDIÉES	155

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA : Association Alzheimer

A β : Amyloïde Bêta

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AFM : Microscopie à force atomique

AGPI : Acides Gras Polyinsaturés

Akt : Protéine kinase B

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor

ANGPTL-4 : Angiopoietin-like 4 protein

APOE : Apolipoprotéine E (gène)

ApoEVs : Corps Apoptotiques

apoD : Apolipoprotéine D (protéine)

apoE : Apolipoprotéine E (protéine)

apoJ : Apolipoprotéine J (protéine)

APP : Protéine Précurseur d'Amyloïde

ARN : Acide Ribonucléique

BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor

BET : Bromure d'Éthidium

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

Ca : Calcium

CAT : Catalase

CIND : Cognitively Impaired Not Demented

Cl : Chlorure

Cryo-EM : Microscopie électronique cryogénique

CSHA : Étude sur la Santé et le Vieillissement au Canada

CTR : Controls

DG : Gradient de Densité

DJ-1 : Protein deglycase

DNF : Dépôts neurofibrillaires

DSM-5 : Manuel Diagnostique et Statistique des Troubles mentaux, 5^e édition

dUC, Ultracentrifugation différentielle

DV : Démence Vaculaire

ELISA : Enzyme-Linked Immuno Assay

ERO : Espèces Réactives d'Oxygène

ET : Écart-Type

EVs : Vésicules Extracellulaires

IEVs : Vésicules Extracellulaires larges

pEVs : Vésicules Extracellulaires périphériques

sEVs : Vésicules Extracellulaires petites

FDA : Food and Drug Administration

FDG : Fluorodésoxyglucose

ESCRT : Endosomal Sorting Complexes Required for Transport

Fyn : Tyrosine-protein kinase

GluR : Glutamate Receptor

GPx : Glutathion Peroxydase

GSK3 β : Glycogène Synthétase Kinase 3 β

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

4-HNE : 4-Hydroxynonéal

HDL : Lipoprotéines de Haute Densité

IC : Intervalle de Confiance

IDE : Enzyme de dégradation de l'insuline

IFN- γ : Interféron- γ
IL-6 : Interleukine-6
IMC : Indice de Masse Corporelle
IP : Immunoprécipitation
IRM : Imagerie par résonance magnétique
KDa : Kilo dalton
KO : Knock-Out
L1CAM : L1 Cell Adhesion Molecule
LCN-2 : Lipocaline-2
LCR : Liquide céphalorachidien
LilrB2 : Leukocyte immunoglobulin-like receptor
LRP-1 : Lipoprotein receptor-related protein-1
LRP-2 : Lipoprotein receptor-related protein-2
MA : Maladie d'Alzheimer
MCI : Mild Cognitive Impairment
MDA : Malondialdéhyde
MetOH : Méthanol
mg : Milligramme
MISEV : Guide méthodologique de l'étude des EVs
ml : Millilitre
MM : Masse molaire
MMSE : Mini Mental State Examination
mmol/L : Millimole par litre
MMP-9 : Métalloprotéinase matricielle 9
MoCA : Montreal Cognitive Assessment
3MS : Modified Mini Mental State

MVB : Corps Multivésiculaires

MVs : Mirovésicules

Na : Sodium

nAChR : Nicotinic acetylcholine receptors

NEP : Néprilysine

NFL : Neurofilament Light chain

NIA : Institut national du vieillissement

NINCDS-ADRDA : National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association

NKA α 3 : Na+K+ ATPase α 3 subunit

nm : Nanomètre

NMDAR : N-methyl-D-aspartate receptor

NO : Oxyde Nitrique

NPTX-2 : Pentraxine-2

NS : Non Significatif

NSE : Neuron specific enolase

NTA : Nanoparticles Tracking Analysis

O₂⁻ : Anion Superoxyde

α A β : oligomères du peptide Amyloïde Bêta

\cdot OH⁻ : Radical hydroxyle

8-OHdG : 8-Hydroxydésoxyguanosine

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OR : Odds Ratio

p75NTR : Récepteur de Neurotrophine p75

PBS : Phosphate-Buffered Saline

PCs : Protéines carbonylées

PKA : Protéine kinase A
PP1 : Phosphatases-1
PP2A : Phosphatases-2A
PP2B : Phosphatases-2B
PP5 : Phosphatases-5
PrGN : Progranuline
PrPC : Protéine Prion
PSEN : Présénilines
RAGE : Récepteur des Produits Avancés de Glycation
SCD : Déclin Cognitif Subjectif
SEC : Chromatographie d'exclusion sérique
SNC : Système Nerveux Central
SO : Stress Oxydant
SOD : Superoxydes Dismutases
Tau : Tubule-associated unit
t-Tau : Protéine tau totale
p-Tau : Protéine tau phosphorylée
TEM : Microscopie électronique en transmission
TEP : Tomographie par émission de positrons
TNF- α : Tumor Necrosis Factor α
TNFR1 : Tumor Necrosis Factor α Receptor 1
TNFR2 : Tumor Necrosis Factor α Receptor 2
TREM-2 : Trem-like transcript 2
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
TNC : Trouble Neurocognitif Majeur
UC : Ultracentrifugation

UV : Ultra Violet

VIL : Vésicules intraluminales

WB : Western blot

°C : Degré Celsius

% : Pourcentage

ϵ : Epsilon

β 2-AR : beta-2 adrenergic receptor

μ g : Microgramme

μ l : Microlitre

1 INTRODUCTION

La démence, aussi appelée trouble neurocognitif majeur, regroupe l'ensemble des atteintes pathologiques touchant le cerveau et provoquant une perte des facultés cognitives qui réduisent la capacité d'une personne à s'occuper d'elle-même de façon autonome (Emmady & Tadi, 2022). Il y a un affaiblissement psychique profond, global et progressif qui altère la performance dans une ou plusieurs fonctions cognitives comme le langage, les fonctions exécutives (ex., planification, organisation), la mémoire, les fonctions visio-motrices ou les aptitudes sociales (Emmady & Tadi, 2022). De nos jours, le nombre de personnes dans le monde souffrant de démence est estimé à 55 millions, et ce nombre devrait tripler d'ici 2050 (OMS, 2022).

La maladie d'Alzheimer (MA) est le type majeur de démence et serait à l'origine de 60 à 80% des cas (Bellenguez *et al.*, 2022). La MA a des conséquences physiques, psychologiques, sociales et économiques pour la personne atteinte ainsi que pour son entourage et la société. Au Canada, la démence affecte plus de 564 000 personnes dont 153 000 Québécois avec des coûts annuels de 2 milliards de dollars qui devraient atteindre 123 milliards de dollars d'ici 2040 (Fédération québécoise des Sociétés Alzheimer, 2020). La MA est la deuxième cause de mortalité dans les pays à revenu élevé (OMS, 2019), principalement en raison du vieillissement de la population, de l'absence de traitement efficace et du diagnostic clinique tardif qui est établi souvent à un stade trop avancé de la maladie. En attribuant à la MA le statut de « grande cause nationale » en 2007, le gouvernement canadien en a fait une priorité nationale en termes de santé et de recherche. Dans le but de mieux appréhender les processus menant à la MA, il est nécessaire d'établir des stratégies de prévention efficaces et novatrices afin d'améliorer la prise en charge des patients et d'atténuer le fardeau socio-économique qui en est lié.

L'étude histopathologique du cerveau des patients atteints de MA montre l'existence de deux types de lésions : les plaques amyloïdes et les dépôts neurofibrillaires (DNF). Ces deux types de lésions sont chacune associée à un composé protéique, lui-même associé à la survenue et la progression de la maladie : le peptide bêta amyloïde (A β) pour les plaques amyloïdes, et la protéine tau phosphorylée pour les DNF. En plus de ces deux lésions caractéristiques, d'autres manifestations pathologiques sont observées telles que : le stress oxydatif, l'inflammation, le défaut de la transmission synaptique ou encore le dysfonctionnement mitochondrial (Gulyaeva *et al.*, 2017; Sheppard & Coleman, 2020).

Le diagnostic clinique de la MA repose tout d'abord sur des tests des fonctions cognitives et sur des tests neuropsychologiques qui sont relativement sensibles. Afin de renforcer le diagnostic, l'imagerie cérébrale par résonance magnétique (IRM) est utilisée pour détecter des anomalies morphologiques du cerveau comme le repli du cortex et l'atrophie de l'hippocampe (Lama *et al.*, 2017). De même, l'IRM associée à la tomodensitométrie cérébrale permet d'identifier des lésions cérébrales de type vasculaire (Khan *et al.*, 2016). Parallèlement, une technique récente d'imagerie connue sous l'appellation de tomographie par émission de positrons (TEP) permet de détecter la présence des lésions neurodégénératives par l'utilisation de radiotraceurs qui vont se fixer spécifiquement au niveau des enchevêtrements neurofibrillaires (protéine Tau) (Saint-Aubert *et al.*, 2017) ou des plaques amyloïdes (Barthel & Sabri, 2017). Le problème des techniques de neuroimageries est qu'elles sont coûteuses, pouvant difficilement être appliquées en routine et peu accessibles dans un bon nombre de pays.

Le défi actuel repose sur l'identification des marqueurs périphériques pour le diagnostic de la MA. Actuellement, les seuls marqueurs biologiques disponibles sont les rapports de tau phosphorylée (p-Tau)/A β 42, tau totale (t-Tau)/A β 42 et A β 42/A β 40 dosés au niveau du liquide céphalo-rachidien (LCR) (Blennow & Zetterberg, 2015b). Le prélèvement du LCR est cependant invasif et il est très difficile de faire un suivi régulier. D'autres études ont montré la pertinence de certains marqueurs sanguins pour le diagnostic de la MA. Ces derniers peuvent être détectés directement dans le plasma (Ashton *et al.*, 2021; Clark *et al.*, 2021; Haddad *et al.*, 2019a; Janelidze *et al.*, 2021; Mattsson *et al.*, 2017; Moscoso *et al.*, 2021; Nakamura *et al.*, 2018b; Perrotte *et al.*, 2019; Shen *et al.*, 2021) ou au niveau de petites poches lipidiques qui circulent entre la périphérie et le cerveau appelées vésicules extracellulaires ou EVs (Aharon *et al.*, 2020; Haddad *et al.*, 2021; Haddad *et al.*, 2019b; Jia *et al.*, 2019a; Jia *et al.*, 2021; Kapogiannis *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020; Mattsson *et al.*, 2017; Perrotte *et al.*, 2019; Winston *et al.*, 2016b). Ces EVs sont des nouvelles cibles prometteuses de biomarqueurs et ouvrent des nouvelles perspectives pour le diagnostic de la MA. Enfin, il est à préciser que le diagnostic avec certitude de la MA est effectué seulement par autopsie en *post-mortem*.

Compte tenu de l'absence d'un traitement curatif et de l'évolution silencieuse et irréversible des troubles neurologiques, la mise en place d'un diagnostic précoce permettra de mieux gérer le développement de la MA et de prévenir les lésions cérébrales à l'origine de la progression de la neurodégénérescence. Selon le National Institute on Aging-Alzheimer's Association (NIA-AA), l'identification de biomarqueurs facilement accessibles constitue un enjeu de taille dans le domaine des maladies neurodégénératives (Jack *et al.*, 2018).

Dans cette perspective, il est très important de viser les stades précoces de la MA pour identifier des biomarqueurs précédant l'installation de la maladie. En effet, la MA est généralement précédée par une phase pré-clinique caractérisée par une expérience subjective de détérioration cognitive mais tout en restant dans la plage normale de performances cognitives (Jack *et al.*, 2018). Cette altération de la fonction cognitive peut être aussi réversible. Plusieurs dénominations désignent les personnes affectées à ce stade y compris celle de « cognitivement déficient mais non dément » ou encore mieux connue sous le nom de CIND (*Cognitively Impaired Not Demented*). Des études prospectives effectuées chez des participants CIND montrent qu'après 2 ans, 34% des participants développent la démence, 14% retrouvent des facultés cognitives normales et 52% restent CIND (Hsiung *et al.*, 2006a). Cependant, les raisons de cette divergence ne sont pas documentées. D'autre part, il n'existe actuellement aucun marqueur qui permet de prédire l'évolution des CIND vers la démence de type Alzheimer.

Ainsi, l'identification de marqueurs pathologiques à ce stade de la maladie pourra nous renseigner sur l'évolution du déclin cognitif chez le groupe de personnes évoluant vers la MA et permettra d'établir un diagnostic précoce offrant la possibilité d'intervention rapide et plus efficace. Dans ce contexte, l'Étude sur la Santé et le Vieillissement au Canada (CSHA) a pu évaluer, après 5 ans, l'évolution d'un groupe de patients CIND vers un état de démence, stable ou normal. La cohorte de cette étude nationale offre une opportunité unique pour pouvoir identifier certains marqueurs périphériques précoces de la MA.

Cette étude a visé, dans un premier temps, à analyser au stade pré-clinique et chez des participants CIND convertis à la MA, une panoplie de marqueurs liés aux processus neurodégénératifs, oxydatifs, trophiques et inflammatoire au niveau plasmatique et vésiculaire, combinés aux données cliniques comme une empreinte d'identification moléculaire de la MA et de son évolution. Dans un deuxième temps, l'étude de la distribution et le rôle de l'empreinte surfacique des EVs permettra de mieux comprendre leur implication dans la physiopathologie de la MA.

1.1 La Démence

1.1.1 Définition

La démence est définie, selon les critères du DSM-5 Manuel Diagnostique et Statistique des troubles mentaux (DSM-5), comme un syndrome chronique et progressif caractérisé par une perte des facultés mentales qui réduisent la capacité d'une personne à s'occuper d'elle-même de façon autonome (Sachdev *et al.*, 2015). Selon les nouveaux critères DSM-5 la démence correspond à un trouble neurocognitif majeur (TNC) dans lequel on observe une diminution de la performance dans un ou plusieurs domaines cognitifs qui est plus importante que celle du vieillissement normal (Sanabria-Castro *et al.*, 2017).

1.1.2 Prévalence, incidence et facteurs de risque

Selon l'OMS la démence touche à l'heure actuelle près de 55 millions de personnes à travers le monde et il est prévu que ce nombre dépassera la barre de 154 millions aux alentours de 2050 (OMS, 2022) (**Figure 1.1**). D'après la Société d'Alzheimer au Canada, 564 000 Canadiens sont atteints de démences avec des prévisions d'une croissance de 66% (937 000) de ce nombre en 2031 (Duong *et al.*, 2017). Selon la même source, la prévalence de la démence chez les personnes de plus de 65 ans est de 7 à 8% alors que la prévalence de la MA est de 5,1%. Les femmes sont souvent plus touchées (environ 788 femmes et 561 hommes par 10,000 personnes) et le risque de la maladie double chaque 5 ans après 65 ans (Cao *et al.*, 2020).

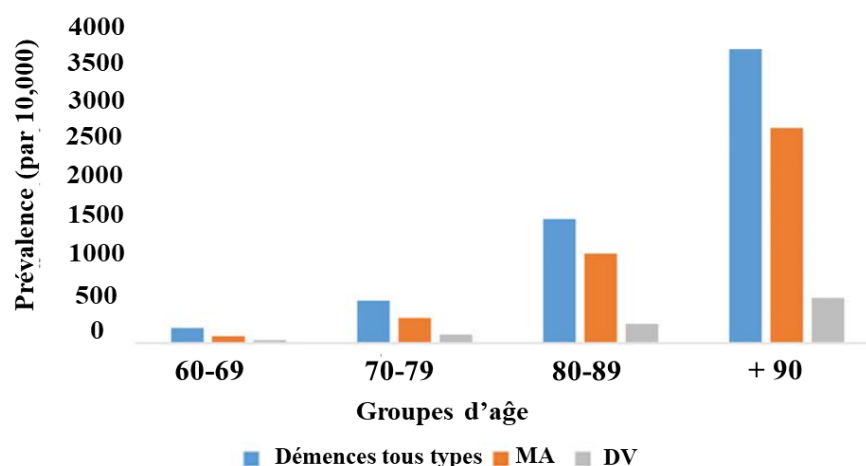


Figure 1.1 Prévalence mondiale de la démence de tous types, de la maladie d'Alzheimer et de la démence vasculaire selon les catégories d'âge modifiée de (Cao *et al.*, 2020). Abréviations : MA, maladie d'Alzheimer ; DV, Démence vasculaire. La prévalence la plus élevée est observée chez les personnes âgées de + 90 ans. Cette augmentation est progressive avec l'âge. Ceci démontre clairement que l'âge est un facteur de risque majeur des démences.

L'incidence globale de la démence est estimée à 52.85 / 1000 (personnes) chaque année alors que celle de la MA est de 34.1 / 1000 (Fiest *et al.*, 2016a; Fiest *et al.*, 2016b) (**Figure 1.2**).

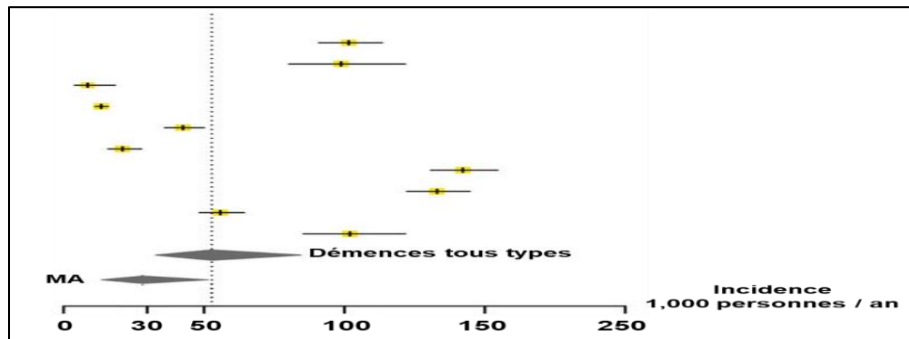


Figure 1.2 Incidence globale de la démence de tous types et de la maladie d'Alzheimer modifiée de (Fiest *et al.*, 2016). Abréviations : MA, maladie d'Alzheimer. Les traits avec point jaune indiquent l'incidence de la démence et la MA selon différentes études. La moyenne générale est représentée en losange gris.

Les facteurs de risque majeurs des démences sont : l'âge avancé, la prédisposition génétique (les gènes impliqués diffèrent selon le type de démence), la présence de désordres métaboliques et/ou vasculaires, un niveau d'éducation faible, une alimentation déséquilibrée (trop gras, trop sucrée, trop salée), la sédentarité et le manque d'activités sociales ou intellectuelles (OMS, 2022).

1.1.3 Classification

On distingue plusieurs types de démences : la MA, la démence vasculaire (DV), les formes mixtes et d'autres étiologies, à savoir la dégénérescence lobaire frontotemporale et la démence à corps de Lewy. Il existe d'autres types de démences moins fréquents à caractère neurodégénératif comme le Parkinson, la Chorée de Huntington ou la maladie de Pick (Gale *et al.*, 2018) (**Figure 1.3**). Étant donné que la MA représente 60 - 80% des cas de démences, la plupart des recherches cliniques se sont plus orientées vers l'étude de sa physiopathologie (diagnostic et traitement).

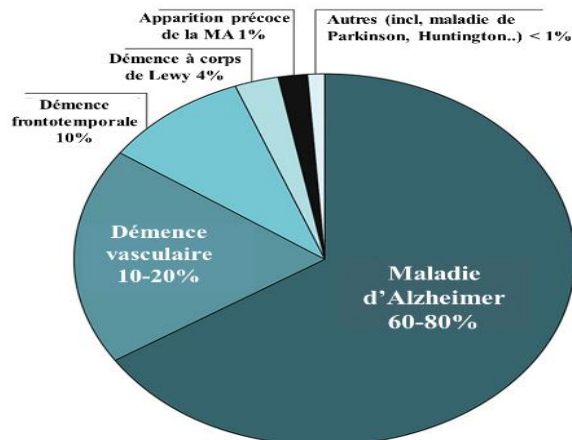


Figure 1.3 Les types de démences. Adaptée de (Cunningham *et al.*, 2015)

1.2 La maladie d'Alzheimer

1.2.1 Généralités

La maladie a été décrite pour la première fois en 1906 lors d'une conférence à Tübingen en Allemagne par Alois Alzheimer comme un « processus pathologique grave et particulier du cortex cérébral » (Alzheimer, 1906). Actuellement, la MA est considérée comme la principale cause de démence et l'un des grands problèmes de santé du 21^{ème} siècle (OMS, 2022). Il est estimé qu'aux alentours de 2050, plus de 115 millions de personnes dans le monde seront atteintes de MA (Wortmann, 2012). En 2013, le G8 a déclaré que la démence devrait devenir une priorité mondiale et qu'il fallait mettre en place un traitement préventif ou curatif de la maladie d'ici 2025 (Scheltens et al., 2016).

Il existe deux formes de la MA : la forme familiale (1-5%) et la forme sporadique (~95%). La forme familiale est principalement à transmission autosomique dominante et à pénétrance complète ce qui signifie que les porteurs de mutations développeront inexorablement la maladie vers l'âge de 55 ans ou avant. Trois gènes impliqués ont été déterminés : l'un codant pour la protéine précurseur d'amyloïde (APP) responsable de 15% des cas, les deux autres codant pour des protéines, les présénilines 1 (PSEN1 : 80% des cas génétiques) et les présénilines 2 (PSEN2 : 5% des cas génétiques) (Jiao et al., 2021). Parallèlement à cette forme de la MA dite « à début précoce », la forme sporadique regroupe les formes alléliques du gène de l'apolipoprotéine E (APOE) et des facteurs environnementaux qui prédisposent à la maladie mais qui ne l'imposent pas forcément. Parmi ces causes, il y a le vieillissement, le stress oxydatif, l'inflammation et les désordres métaboliques et vasculaires (diabète, hypertension artérielle) qui forment un terrain favorable à l'apparition et la progression de la maladie.

1.2.2 Stades de la maladie

La MA comporte principalement trois stades, une longue phase préclinique (~0-10 ans), un stade prodromal ou pré-démontiel caractérisé par un déficit cognitif léger (~4 ans) et le stade tardif de la MA (~6 ans) correspondant, quant à lui, à un état de démence en raison de la multiplicité et de la sévérité des déficiences cognitives (Vermunt et al., 2019) (**Figure 1.4**).

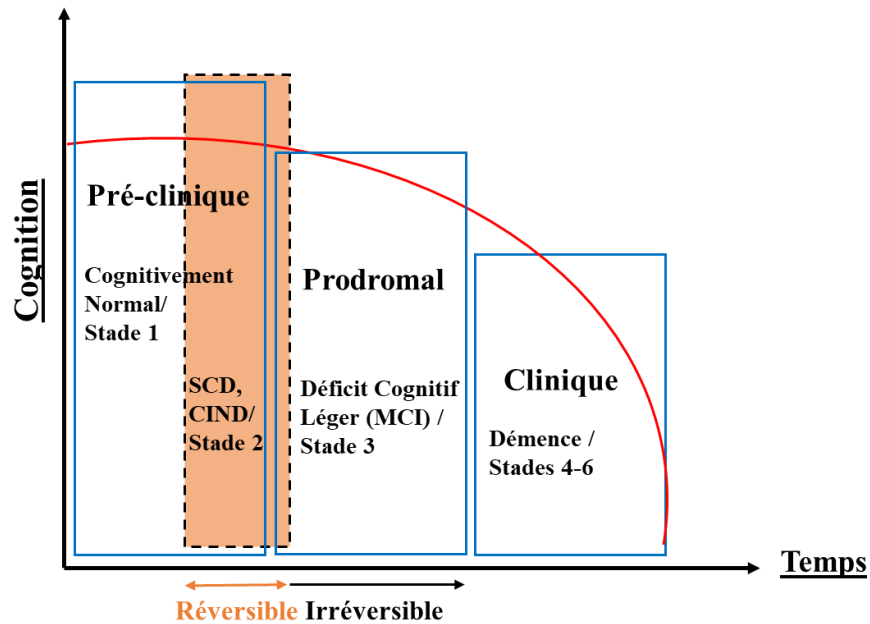


Figure 1.4 Progression de la maladie d'Alzheimer adaptée de (Jack et al., 2018). Il existe 3 stades différents de la MA : Un stade préclinique qui dure 5 à 10 ans (phase réversible), un stade MCI qui dure 5 à 7 ans (phase irréversible) et le stade purement clinique (phase irréversible).

1.2.2.1 Phase asymptomatique

L'installation de la MA est généralement précédée par une longue phase pré-symptomatique caractérisée par une altération de la fonction cognitive qui peut être parfois réversible. Récemment, les nouveaux critères de l'Institut national du vieillissement (NIA) et l'Association Alzheimer (AA) des États-Unis proposent un nouveau stade de transition intermédiaire entre le stade purement asymptomatique et le stade de troubles cognitifs légers (MCI) (Jack et al., 2018) (Figure 1.4).

Les individus présentant des troubles de mémoire sans pour autant être atteints de démence, autrement dit ceux qui ont une expérience subjective de détérioration cognitive mais tout en restant dans la plage normale de performances cognitives sont regroupés dans cette phase appelée « déclin cognitif subjectif » (SCD). Avant l'établissement d'un cadre conceptuel pour la recherche sur la phase SCD, divers termes étaient utilisés dans la littérature pour désigner les états intermédiaires entre la fonction cognitive normale et la démence comme, « déficient cognitivement mais non dément » (cognitively impaired not demented : CIND), troubles cognitifs subjectifs, plaintes de mémoire subjectives (Jessen et al., 2014; Lyketsos et al., 2005). Nous allons traiter dans notre travail le terme CIND tel qu'utilisé dans la cohorte à l'étude dans la présente thèse.

a) CIND : Définition

Le comité de rédaction de la conférence internationale Lancet sur les démences de 1996 considère le déclin cognitif de type CIND comme l'un des défis les plus importants de l'épidémiologie de la démence (Anonyme, 1996).

Le diagnostic de CIND a été défini en premier dans l'Étude sur la Santé et le Vieillessement au Canada (CSHA) ; il est basé principalement sur l'exclusion de la démence et la présence de différentes catégories de déficiences identifiées à la suite d'un examen clinique et d'une série de tests neuropsychologiques (Graham et al., 1997). On distingue ainsi des sous-catégories de CIND comme le délirium, la consommation chronique d'alcool et de médicaments, la dépression, les maladies psychiatriques et le retard mental. Les troubles de la mémoire circonscrits constituent une septième catégorie, appelée à l'origine troubles de la mémoire associés à l'âge (Graham et al., 1997). Selon l'étude CSHA, la prévalence de la démence dans la population âgée de 65 ans et plus était de 8% en 1991-1992 (dont 2,3% est attribuée à la démence légère), alors que la prévalence estimée du CIND était de 16,8% (Canadian Study of Health and Aging Working Group, 1994 ; Graham et al., 1997). La sous-catégorie de CIND la plus communément identifiée est la déficience de la mémoire circonscrite, représentant 31,7% de tous les cas de CIND suivi par la dépression avec 7,8% (Graham et al., 1997).

b) CIND : une phase potentiellement réversible

Il est important de noter que le CIND peut être un syndrome réversible à l'encontre des autres stades de la phase symptomatique, c'est-à-dire que les individus présentant ce trouble peuvent soit se convertir à un état psychiatrique et physiologique normal, soit développer un type de démence donné. Dans ce contexte, une étude prospective menée sur 21 sujets CIND, a montré que 10 personnes ont développé un type de démence incluant 9 cas de MA après 4 ans, suggérant que le risque moyen de développer une démence chez les CIND est de 48% (Bowen et al., 1997). Une autre étude rapporte que 23,6% des patients CIND évolueraient vers la MA (Tierney et al., 1996). Une étude prospective plus récente menée sur 146 patients CIND a montré qu'après 2 années, 49 (34%) ont évolué vers la démence, tandis que 20 (14%) ont retrouvé leur facultés cognitives normales (Hsiung et al., 2006b).

Par conséquent, l'identification des marqueurs biologiques pouvant prédire l'évolution des patients CIND vers la MA ou un autre type de démence sera la clé d'un diagnostic précoce permettant une prise en charge meilleure des personnes atteintes de ce genre de trouble.

1.2.2.2 Phase symptomatique

a) Stade trouble cognitif léger

L'évolution des conceptions cliniques de la MA a été dominée par la caractérisation de formes prédéméntielles, voire prodromales désignées par le terme trouble cognitif léger ou Mild Cognitive Impairment (MCI) (Petersen, 2000; Petersen, 2004). Une étude canadienne suggère que les individus diagnostiqués MCI représente une catégorie hétérogène, avec certains groupes plus susceptibles d'évoluer vers la démence de type Alzheimer, on parle ainsi de patients MCI amnésiques (Csukly et al., 2016). Des études cliniques montrent que 80% des sujets MCI développent une démence après 5 ans (Petersen, 2004) et que le taux de conversion est de 5 à 20% par année (Etgen et al., 2011).

b) Stades de la démence

Sur le plan histologique, la progression du dépôt de la protéine Tau et du peptide bêta-amyloïde (A β) au niveau des différents compartiments du cerveau permet de discriminer spécifiquement entre les différents stades cliniques de la MA (léger, modéré, sévère). Les travaux de Braak & Braak (1991) ont identifié six stades de la MA en fonction de dépôt de DNF : stades Braak I et II lorsque l'implication d'un DNF est confinée principalement à la région transentorhinale du cerveau, les stades III et IV lorsqu'il y a également une implication de régions limbiques telles que l'hippocampe et les stades V et VI en cas d'atteinte néocorticale (Braak and Braak, 1991). Cela ne doit pas être confondu avec le degré d'atteinte de la plaque sénile, qui évolue différemment avec cinq phases identifiées touchant d'autres compartiments (**Figure 1.5**).

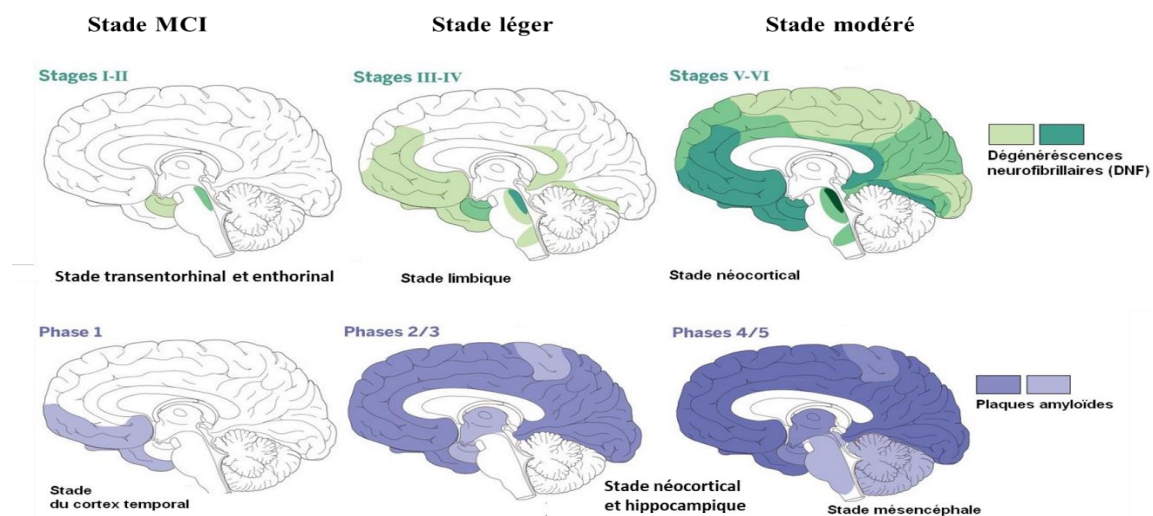


Figure 1.5 Progression spatiotemporelle des protéines clés de la MA adaptée de (Braak & Braak, 1991). Les couleurs indiquent l'intensité et la répartition des protéines toxiques dans le cerveau au cours de la MA.

1.2.2.3 Autres classifications de la maladie d'Alzheimer

Le National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) distingue trois niveaux de diagnostic de la MA : la MA probable, MA possible et MA certaine (**Annexe I**) (Habib and Poncet, 1998). Les critères NINCDS-ADRDA ne permettent pas un diagnostic précoce car ils se basent sur la description de traits cliniques et de symptômes déjà bien établis et bien visibles.

a) MA probable

Il s'agit du stade de MA débutant qui inclut une démence établie par un examen clinique documenté par le score du test Mini Mental State Examination (MMSE) (Folstein et al., 1975) et complété par une évaluation neuropsychologique, des déficits dans deux domaines cognitifs, une altération progressive de la mémoire et sans détérioration de la conscience (**Figure 1.6**).

b) MA possible

Le niveau de diagnostic de la MA possible correspond à un syndrome démentiel déjà bien établi avec une absence d'étiologie reconnue de démence non dégénérative en l'absence d'autres troubles neurologiques ou psychiatriques. Vu la similarité des caractéristiques de la MA probable et possible, les patients diagnostiqués sont souvent placés dans un seul groupe et considérés comme souffrant de démence de type Alzheimer.

c) MA certaine

Les critères de diagnostic de MA certaine ou définitive sont une MA possible consolidée par l'observation de dégénérescences neurofibrillaires et de plaques séniles en quantité anormalement élevée dans le cerveau (preuves histologiques en post-mortem).

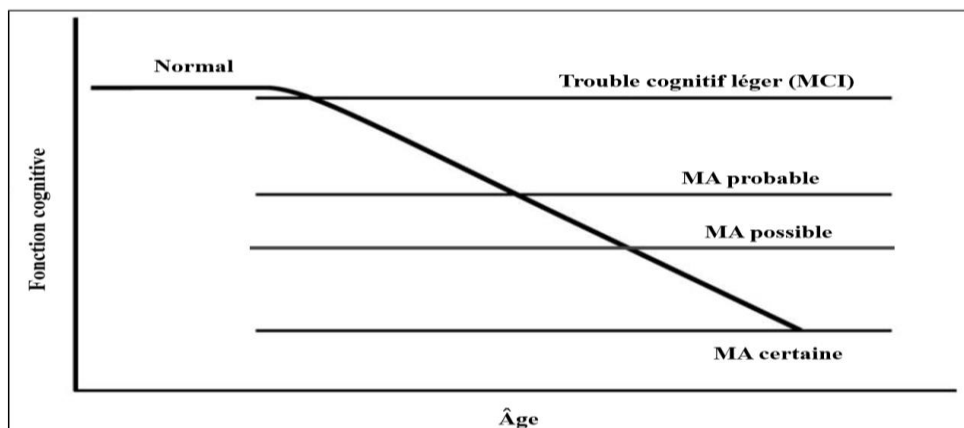


Figure 1.6 Évolution de la fonction cognitive de l'état normal à la MA adaptée de (Petersen, 2000).

1.2.3 Physiopathologie

Depuis sa première documentation il y a 116 ans, de nombreux aspects de la MA ont été découverts et compris mais la physiopathologie exacte de la maladie reste encore mal connue. Les approches les plus pertinentes pouvant expliquer les altérations décrites dans la MA sont : l'hypothèse de la cascade amyloïde, l'implication de la protéine tau, le rôle du stress oxydant, la théorie cholinergique et le défaut de la neurotransmission glutamatergique.

1.2.3.1 Le peptide β -amyloïde

Cette hypothèse repose sur le principe qu'une série d'anomalies touchant la biosynthèse et la sécrétion de l'APP, provoquent un déséquilibre entre la production et la clairance d'A β qui est responsable des lésions cérébrales observées dans la MA (Cummings *et al.*, 2007).

a) Métabolisme de l'APP

L'APP est une protéine transmembranaire qui peut subir plusieurs clivages par différentes sécrétases (α , β et γ), et donner lieu à différents peptides. Le clivage de l'APP par les α -sécrétases (voie non amyloïdogénique), qui sont des enzymes appartenant à la famille des désintégrines et métalloprotéases, conduit à la libération d'un peptide de la partie N-terminale (sAPP α) et d'un fragment de la partie C-terminale (CTF α). Ce dernier sous l'action de la γ -sécrétase donne naissance à un peptide (p3) et un fragment carboxy-terminal (AICD) (Wang *et al.*, 2017a) (**Figure 1.7**). Le sAPP α est associé à des fonctions trophiques et neuroprotectrices et joue un rôle important dans la plasticité et/ou la survie neuronale (Puzzo *et al.*, 2008).

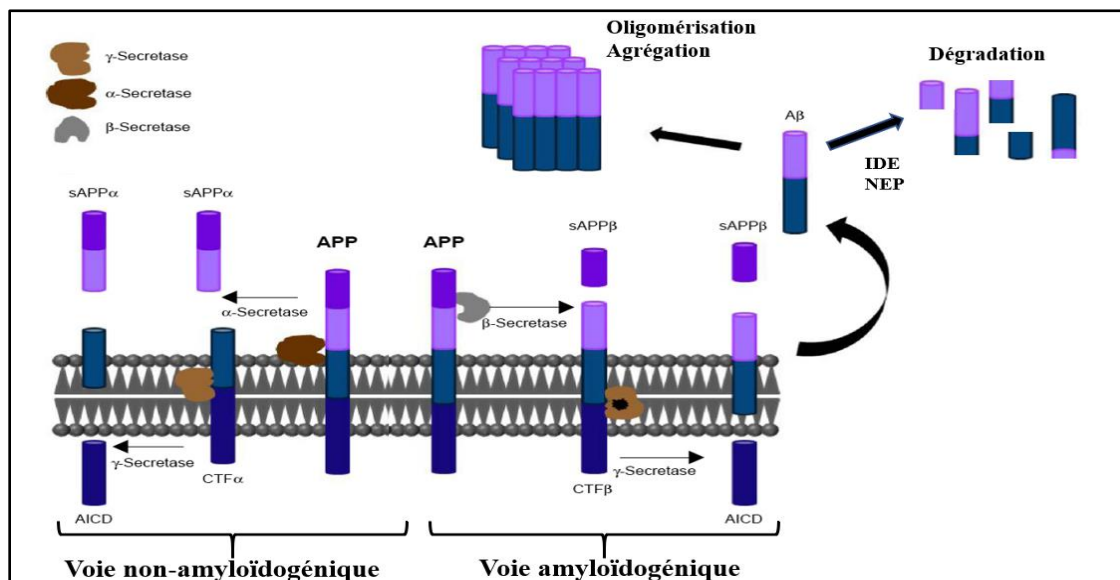


Figure 1.7 Métabolisme de l'APP, adaptée de (Cai *et al.*, 2015). Abréviations : APP, Protéine précurseur de l'amyloïde ; NEP, Néprilysine ; IDE, Enzyme de dégradation de l'insuline ; A β , Amyloïde bêta.

Lorsque le clivage de l'APP est opéré par la β -secrétase (voie amyloïdogénique), les peptides sAPP β et CTF β (ou C99) sont libérés. CTF β peut à son tour être clivé, cette fois par l'enzyme γ -secrétase et le peptide A β est ainsi libéré (**Figure 1.7**). L'A β est un peptide résistant à la dégradation protéolytique. En raison de ses caractéristiques physiques, l'A β acquiert souvent la configuration d'une feuille plissée β ce que lui confère une plus grande tendance à s'agréger avec d'autres peptides A β pour former des oligomères puis des fibrilles qui vont s'agglutiner sous forme de plaques séniles neurotoxiques (Jucker & Walker, 2015).

b) Conformation toxique de l'A β

Il est de plus en plus évident que la pathogenèse de la MA est plus étroitement liée aux assemblages oligomériques toxiques des peptides A β (oA β) plutôt que les plaques amyloïdes (Chen & Mobley, 2019). Les oA β peuvent altérer le transport axonal, stimuler la phosphorylation de la protéine tau, induire une neuro-inflammation, provoquer une insulino-résistance et causer la mort neuronale (Cline *et al.*, 2018).

Les effets neurotoxiques des oA β sont amplifiés à cause de leur capacité à se lier sur différents types de récepteurs dont certains sont abondants au niveau du cerveau comme les récepteurs: NMDARs, AMPARs, nAChR, GluR, RAGE, neuroligin 1, neurexin 2 α , p75NTR, les récepteurs d'insuline, LirB2, β 2-AR, frizzled, NKA α 3 et PrPC (Chen & Mobley, 2019) (**voir liste d'abréviations**). Par exemple, en se fixant sur les récepteurs nAChR, les oA β bloquent le signal des neurotransmetteurs acétylcholines (ACh), qui sont des médiateurs clés de la transmission du flux nerveux, provoquant ainsi la dysfonction synaptique (Jürgensen & Ferreira, 2010). Les oA β sont capables de se lier aux cellules neuronales et d'activer la Glycogène Synthétase Kinase 3 β (GSK3 β) responsable de la phosphorylation de la protéine Tau et favorisent la déstabilisation des microtubules nécessaires pour le transport axonal (DaRocha-Souto *et al.*, 2012). D'autre part, en se liant aux récepteurs RAGE présents au niveau de la barrière hémato-encéphalique (BHE), l'A β peut provoquer une baisse de la régulation des protéines des jonctions serrées (Occludine, ZO-1 et claudine-5) par l'activation de certaines métalloprotéinases matricielles (MMP-2 et MMP-9) ce qui augmente la perméabilité de la BHE (Kook *et al.*, 2012). L'activation des récepteurs RAGE, par l'A β , stimule aussi plusieurs voies de signalisation du stress oxydatif ce qui amplifie le risque de la MA (Carrano *et al.*, 2011).

Plusieurs études effectuées chez des individus atteints de MA (Cline *et al.*, 2018; Esparza *et al.*, 2013; Georganopoulou *et al.*, 2005; Lesné *et al.*, 2013; Lue *et al.*, 1999; Lyketsos *et al.*, 2005; McLean *et al.*, 1999; Näslund *et al.*, 2000; Pham *et al.*, 2010; Steinerman *et al.*, 2008) ou des modèles animaux de la MA (Billings *et al.*, 2005; Iulita *et al.*, 2014; Knobloch *et al.*, 2007; Kobro-

Flatmoen *et al.*, 2016; Leon *et al.*, 2010; Mucke *et al.*, 2000; Pham *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2013) sont en faveur d'un rôle central des $\text{A}\beta$ dans la pathogenèse de la MA.

Il existe plusieurs formes d' $\text{A}\beta$ ($\text{A}\beta_{43}$, $\text{A}\beta_{42}$, $\text{A}\beta_{40}$, $\text{A}\beta_{38}$) mais ce sont les isoformes 1–40 et 1–42 qui sont les plus couramment utilisés en diagnostic. L'isoforme du peptide amyloïde 1–42 étant le plus hydrophobe est considéré comme le plus toxique (Mohandas *et al.*, 2009). L' $\text{A}\beta_{40}$ ne semble pas aussi toxique que l' $\text{A}\beta_{42}$ et pourrait avoir des effets protecteurs contre la formation de plaques d' $\text{A}\beta$ (Molinuevo *et al.*, 2018). Dosés individuellement, ces formes présentent une faible spécificité diagnostique, cependant le ratio $\text{A}\beta_{42}/\text{A}\beta_{40}$ associé à la neuroimagerie par IRM ou la TEP scan (**voir section 1.2.4.2**) offre une bonne précision diagnostique (Molinuevo *et al.*, 2018).

c) Hypothèse de la cascade amyloïde

L'hypothèse de la cascade amyloïde propose qu'une surproduction des peptides amyloïdes, soit à cause de mutations au niveau des gènes de l'*APP*, *PSEN1* et *PSEN2* (forme monogénique), soit à cause de facteurs de risque intrinsèques (forme sporadique), mène à l'installation des lésions synaptiques, à une neuro-inflammation et à la formation des dépôts neurofibrillaires, ce qui entraîne la mort neuronale (Selkoe & Hardy, 2016) (**Figure 1.8**).

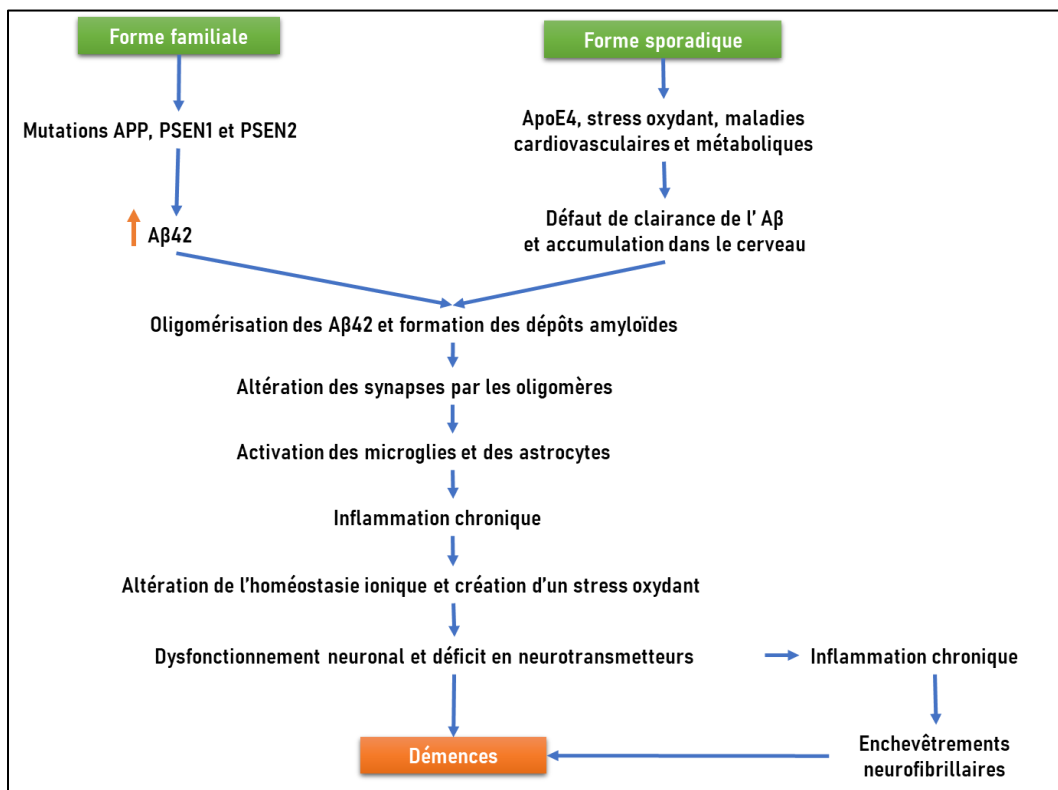


Figure 1.8 Hypothèse de la cascade amyloïde adaptée de (Selkoe & Hardy, 2016)

Selon le modèle hypothétique de biomarqueurs précliniques de la MA sporadique, l'accumulation d'A β est la première manifestation qui précède l'ensemble des changements pathologiques observés dans la MA à savoir, la dysfonction synaptique, la phosphorylation de Tau ou encore l'atrophie hippocampique (Sperling *et al.*, 2011). Les causes de cette augmentation restent cependant mal connues. Néanmoins, il y a un consensus sur la contribution de certains facteurs comme, l'augmentation du stress oxydatif, les maladies métaboliques ou encore la présence de l'allèle epsilon 4 ($\epsilon 4$) du gène *APOE*, dans le dépôt précoce et neurotoxique de l'A β . Au niveau moléculaire, ce changement s'accompagne par une diminution de l'expression et/ou du nombre des récepteurs LRP-1 (*Lipoprotein receptor-related protein-1*) qui jouent un rôle important dans le passage d'A β à travers la BHE vers la circulation sanguine (Sanabria-Castro *et al.*, 2017). Le transit du peptide β amyloïde de la périphérie vers le cerveau se produit, quant à lui, *via* les récepteurs RAGE (Chen *et al.*, 2007). Contrairement à la diminution de l'expression des récepteurs LRP-1 en réponse à l'élévation des niveaux d'A β dans le cerveau, l'expression des RAGE est augmentée sous ces mêmes conditions. L'interaction RAGE-A β provoque une diminution du flux sanguin cérébral, une apoptose des cellules endothéliales et des réponses inflammatoires aiguës (Aisen, 2009; Chen *et al.*, 2007).

Chez les patients atteints de la MA, une accumulation excessive de l'A β 42 est observée alors que dans les conditions physiologiques normales, il est produit à des niveaux faibles et il est efficacement éliminé (Morley & Farr, 2014). La dégradation protéolytique du peptide A β est réalisée entre autres par la néprilysine (NEP) et l'enzyme de dégradation de l'insuline (IDE) (**Figure 1.7**). La sécrétion de ces enzymes est régulée par les microglies. Il a été décrit que l'expression et l'activité de la NEP et de l'IDE diminue chez les patients atteints de MA et au cours du vieillissement normal (au niveau du cortex et l'hippocampe), provoquant une augmentation de la concentration de l'A β dans le cerveau (Wang *et al.*, 2006).

1.2.3.2 La protéine Tau (τ)

La protéine Tau (*Tubule-associated unit*) est une protéine hautement soluble qui joue un rôle majeur dans l'assemblage et la stabilisation des microtubules. Ces derniers sont des fibres constitutives du cytosquelette nécessaires à la croissance neuronale, le transport axonal et assurent le déroulement des changements structurels important au niveau des neurones (Goedert *et al.*, 2006). La fixation de Tau aux microtubules dépend principalement de son degré de phosphorylation qui est régulé par l'action coordonnée entre plusieurs kinases (qui ajoutent un groupement phosphate) et phosphatases (qui enlèvent un groupement phosphate).

Les principales kinases phosphorylant Tau sont la GSK3 β , le complexe Kinase dépendante des cyclines 5/p25 (Cdk5/p25) et la MAPK. Ces kinases phosphorylent Tau au niveau des acides aminés sérine (pS235), thréonine (pT181, pT217, pT231) et tyrosine (pY29) qui sont juxtaposés à une proline. La phosphorylation de Tau peut engager aussi des kinases indépendantes de la proline comme l'Akt, Fyn ou la PKA (**Figure 1.9**). Inversement, les phosphatases agissant sur tau sont : les phosphatases-1 (PP1), -2A (PP2A), -2B (PP2B) et -5 (PP5) (Martin *et al.*, 2013). La principale phosphatase semble être la PP2A dont l'expression et l'activité sont diminuées dans l'hippocampe de patients souffrant de la MA (Vogelsberg-Ragaglia *et al.*, 2001).

Dans la MA, le processus de phosphorylation de la protéine τ est affecté, entraînant une hyperphosphorylation de cette molécule. Cette hyperphosphorylation diminue l'interaction des protéines τ avec les microtubules ce qui favorise leurs détachements et conduit à une agrégation aberrante avec les protéines cytosquelettiques associée à une formation de neurofibrilles qui sont neurotoxiques (Clavaguera *et al.*, 2014) (**Figure 1.9**). Ces enchevêtrements sont observés initialement dans le cortex entorhinal et l'hippocampe puis s'étendent vers les zones amygdales et corticales (temporales/frontales) (Rafii & Aisen, 2009).

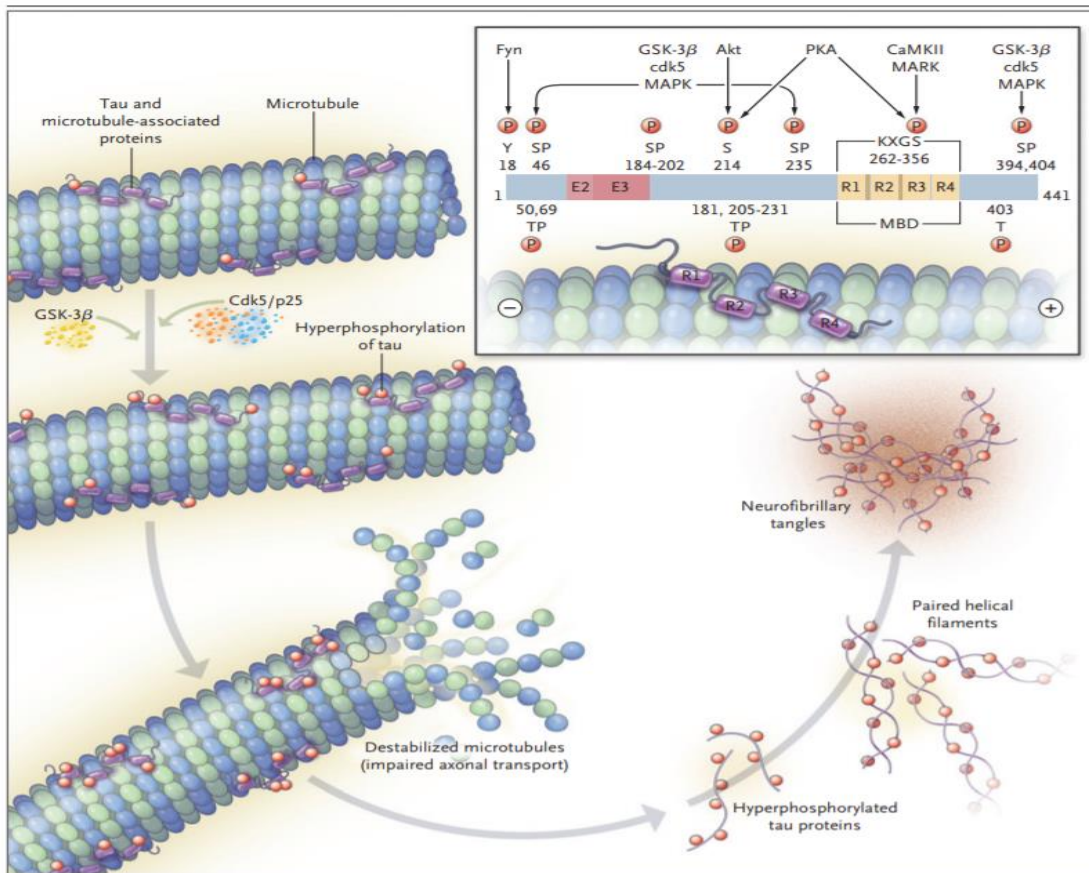


Figure 1.9 Formation d'enchevêtrements neurofibrillaires, tirée de (Querfurth & LaFerla, 2010)

Les DNF et le dépôt de plaques amyloïdes sont décrits dans la littérature scientifique comme les lésions caractéristiques et les facteurs clés responsables du dysfonctionnement neuronal conduisant à la pathogenèse de la MA (Sanabria-Castro *et al.*, 2017).

1.2.3.3 Le stress oxydant

Le stress oxydant (SO) est une condition dans laquelle l'équilibre entre les systèmes oxydants et les capacités anti-oxydantes est significativement perturbé (Gandhi & Abramov, 2012). De nombreuses études convergent actuellement pour faire du SO un mécanisme précoce voire inaugural de la MA, précédant notamment la formation des anomalies histologiques, ce qui ouvre le champ pour l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques. La théorie du SO englobe de près ou de loin toutes les hypothèses communément admises pour expliquer la perte neuronale dans la MA. Le cerveau est un organe sensible au SO du fait de sa richesse en métaux de transition et acides gras polyinsaturés (AGPI) potentiellement péroxydables, sa faible concentration en enzymes anti-oxydantes en comparaison à d'autres tissus et son oxygénation importante le rendant particulièrement exposé au SO (Gilbert *et al.*, 2013).

Dans les cellules neuronales, la majeure partie de l'oxygène subit des réactions de réduction tétravalentes, catalysée par le cytochrome c oxydase (complexe IV) de la chaîne respiratoire de transport d'électrons localisée dans la membrane interne mitochondriale, menant à la formation de H₂O. Toutefois, environ 2% de l'O₂ subit une réduction monoélectronique, au niveau des complexes I et III, menant à la formation du radical superoxyde (**Figure 1.10**).

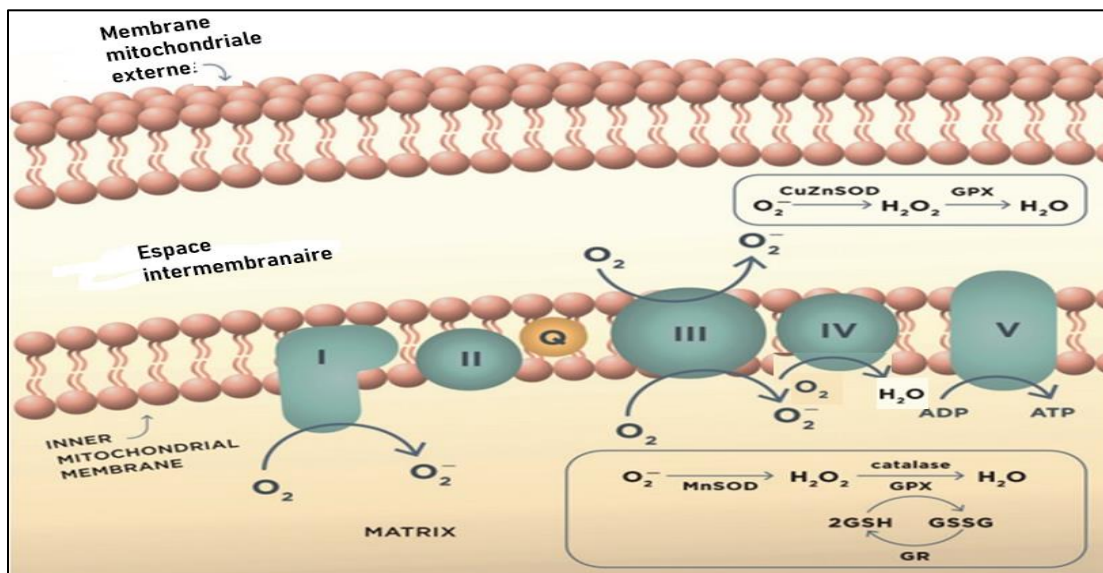


Figure 1.10 Production des ERO dans les mitochondries et mécanismes antioxydants, tirée de (Tonnie & Trushina, 2017).

Durant la phosphorylation oxydative, trois espèces réactives d'oxygène (ERO) sont formées : l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyl ($\cdot OH$). L' $O_2^{\cdot-}$ est le substrat des superoxydes dismutases (SOD), qui le transforment en H_2O_2 . Ce dernier est capable de donner naissance, *via* les réactions de « Fenton » et de « Haber-Weiss », à la plus délétère des espèces radicalaires du SO, le $\cdot OH$. Les ERO formées sont bien connues pour leurs effets néfastes sur les protéines, les lipides et les acides nucléiques. Cependant, les ERO peuvent subir des réactions de détoxication catalysées par le glutathion peroxydase (GPx), la catalase (CAT) ou les peroxyrédoxines (**Figure 1.10**).

a) Stress oxydant : un évènement précoce dans la MA

Plusieurs études ont montré un changement dans l'expression de marqueurs liés aux dommages oxydatifs et aux processus antioxydants chez des individus précliniques et MCI, ce qui suggère fortement que le SO est un phénomène précoce dans la MA (Butterfield *et al.*, 2007; Markesbery *et al.*, 2005; Markesbery & Lovell, 2007; Sultana *et al.*, 2008). Un panel comprenant dix biomarqueurs plasmatiques de peroxydation lipidique (isoprostanoïdes), analysés par chromatographie et spectrométrie de masse (UPLC-MS/MS), a permis de prédire le risque de conversion de participants précliniques à la MA (Peña-Bautista *et al.*, 2021). Chez des patients MCI, le taux sérique d'enzymes antioxydantes telles que la GPx et la CAT était fortement diminué (Padurariu *et al.*, 2010). La concentration du malondialdéhyde (MDA), un produit de la peroxydation lipidique causé par les ERO, était élevée dans le sérum de patients MCI (Padurariu *et al.*, 2010). Une étude récente de notre laboratoire a rapporté une diminution de la capacité antioxydante totale du plasma ainsi qu'une augmentation des taux plasmatiques de quelques protéines antioxydantes (apolipoprotéine J, klotho) chez des patients MCI (Perrotte *et al.*, 2019).

De plus, le cerveau des patients MCI est soumis à un stress nitrosatif et oxydatif important (Butterfield & Boyd-Kimball, 2019; Butterfield & Halliwell, 2019). Dans le lobule pariétal inférieur de patients MCI, les niveaux de protéines carbonyles résultant des dommages oxydatifs des ERO, comme l'anhydrase carbonique II (CA II), la protéine de choc thermique 70 (Hsp70), la protéine kinase I activée par un mitogène (MAPKI) et la protéine de liaison à la syntaxine I (SBP1) étaient significativement supérieurs comparés à des témoins sains (Sultana *et al.*, 2010). De même, une augmentation de la SOD cytoplasmique a été observé dans le lobule pariétal inférieur d'individus précliniques MA (Aluise *et al.*, 2010). Une diminution du glutathion, connu pour être l'antioxydant majeur des systèmes de défense cellulaires, a été détectée au niveau de l'hippocampe de patients MCI (Mandal *et al.*, 2015). D'autres marqueurs des dommages oxydatifs de l'ADN tels que la 8-hydroxydésoxyguanosine (8-OHdG) et le 8-OHG (pour l'ARN) étaient

élevés dans plusieurs régions du cerveau d'individus MA (hippocampe, cortex entorhinal, néocortex frontal, temporal et occipital) (Nunomura *et al.*, 1999). Fait intéressant, il a été démontré que quelques marqueurs oxydatifs mesurés à la fois dans le cerveau et la périphérie, étaient plus élevés dans le sang (Schrage *et al.*, 2013) et que certains étaient corrélés au déclin cognitif (Perrotte *et al.*, 2019) ou encore aux niveaux de p-tau et t-tau dans le LCR (Peña-Bautista *et al.*, 2021) suggérant l'utilité d'utiliser le sang pour identifier des nouveaux biomarqueurs oxydatifs dans le cadre de la MA.

b) Implication du stress oxydant dans l'étiologie de la MA

Le SO participe au développement de la MA en favorisant le dépôt d'A β (Cheignon *et al.*, 2018), l'hyperphosphorylation de tau (Kang *et al.*, 2017), la dysfonction synaptique (Tönnies & Trushina, 2017), la neuroinflammation (Agostinho *et al.*, 2010), le dysfonctionnement mitochondrial (Misrani *et al.*, 2021) et l'altération de l'homéostasie des métaux (Pu *et al.*, 2017). Dans ce contexte, les travaux du laboratoire du Pr. Ramassamy ont consolidé l'implication du SO dans la pathogenèse de la MA. Le traitement de cellules HT22 hippocampiques par l'acroléine (un des sous-produits les plus réactifs de la peroxydation lipidique) a augmenté la concentration de l'APP, la β -secrétase, les récepteurs RAGE et a diminué la concentration de l' α -secrétase tout en provoquant la mort cellulaire (Huang *et al.*, 2013). D'autre part, l'ajout de l'acroléine sur des cellules astrogliales primaires de rat a induit l'augmentation du taux de protéines carbonylées avec l'activation de la voie NF- κ B et la stimulation de la phosphorylation de p66shc et de ERK1/2 affectant ainsi les fonctions neuronales et l'homéostasie synaptique (Dang *et al.*, 2011). De même, le traitement des cellules neuronales de neuroblastome SK-N-SH avec l'acroléine, a augmenté le taux de protéines carbonylées et de 4-HNE. Dans le même travail, l'étude de la régulation de différentes voies de signalisation redox a montré l'activation de la voie NF- κ B et Nrf2 avec l'augmentation de l'expression de protéines impliquées dans la défense oxydative comme l'hème oxygénase-1 et Sirt-1 (Dang *et al.*, 2010). *In vivo*, l'exposition chronique de rats à l'acroléine (2.5 mg/kg/jour) a induit une déclinaison cognitive légère et une atrophie des neurones de l'hippocampe avec une hausse de la concentration de la β -secrétase (dans le cortex) et une baisse de l' α -secrétase (au niveau de l'hippocampe) (Huang *et al.*, 2013). Ces données démontrent clairement le rôle critique du SO dans l'avènement et la progression de la MA.

Les effets néfastes du SO seraient aussi associés au facteur de susceptibilité génétique de la MA à savoir l'APOE ϵ 4. Les dommages causés par le SO seraient amplifiés par la présence de l'APOE ϵ 4 (Butterfield & Mattson, 2020). Il a été démontré que la sévérité des lésions cérébrales induit par le SO était fortement associée à l'allèle ϵ 4 plutôt qu'aux isoformes ϵ 3 et ϵ 2 chez les

patients atteints de MA (Dose *et al.*, 2016). Les travaux du Pr. Ramassamy ont montré une augmentation de la peroxydation lipidique associée à des faibles niveaux de glutathion et à des activités altérées de la GPx et la CAT dans l'hippocampe et le cortex frontal des patients MA *APOE* ϵ 4 par rapport aux patients *APOE* ϵ 3 (Ramassamy *et al.*, 1999; Ramassamy *et al.*, 2000). De plus, les données des études sur des souris transgéniques knock-out pour l'*APOE* ϵ 4 suggèrent que la neurotoxicité médiée par *APOE* ϵ 4 est un événement précoce dans la pathologie de la MA (Butterfield & Mattson, 2020; Ramassamy *et al.*, 2001). En conclusion, le SO est un facteur clé de la pathogenèse de la MA.

1.2.3.4 Les apolipoprotéines

Les apolipoprotéines sont des protéines constitutives des lipoprotéines qui sont chargées de transporter les lipides (cholestérol) dans tous les fluides biologiques du corps humain. Le système nerveux central (SNC) représente un compartiment distinct en termes de métabolisme des apolipoprotéines vu que la BHE empêche le passage et donc l'échange de ces dernières avec la périphérie. Parmi les 22 apolipoprotéines connues, neuf ont été identifiées au niveau protéique dans le SNC à savoir l'apoE, l'apoJ, l'apoD et l'apoA1 qui sont les formes majeures et l'apoC1, l'apoC2, l'apoL2, l'apoL3, l'apoA4 qui sont faiblement exprimées (Elliott *et al.*, 2010b). Plusieurs mutations identifiées au niveau des apolipoprotéines ont été associées à un risque plus important de la MA comme l'apoE (Poirier *et al.*, 1993), l'apoJ (Woody & Zhao, 2016), l'apoD (Chen *et al.*, 2008) et l'apoA1 (Elliott *et al.*, 2010a; Vollbach *et al.*, 2005). De plus, des études récentes suggèrent l'utilisation de l'apoB (Picard *et al.*, 2022), l'apoJ (Koch *et al.*, 2018; Monllor *et al.*, 2021; Perrotte *et al.*, 2019) et l'apoE (Rasmussen *et al.*, 2015) pour le diagnostic de la MA. Dans ce travail, nous nous intéresserons particulièrement aux apoE, apoJ et apoD dont le rôle et l'implication dans la MA sont bien décrits, notamment dans la clairance d'A β .

a) Apolipoprotéine E

L'apoE, hautement exprimée dans le SNC, est produite principalement par les astrocytes mais également par les oligodendrocytes et la microglie (Xu *et al.*, 2006). L'apoE participe activement à la régulation de l'homéostasie lipidique dans le cerveau ainsi qu'à la clairance de l'A β (Jiang *et al.*, 2008). En effet, le promoteur du gène apoE contient des régions spécifiques pouvant lier divers facteurs de transcription comme les récepteurs X du foie (LXR) et les récepteurs X du rétinoïde (RXR) qui régulent à la hausse l'expression de l'apoE, généralement en réponse à l'augmentation des taux de cholestérol cellulaire ou de l'A β . Ensuite, l'apoE est lipidée par des protéines de transport des lipides situées à la membrane des astrocytes ou des microglies comme

l'ABCA1, ce qui lui confère une meilleure activité biologique (Kim *et al.*, 2007). Enfin, l'apoE lipidée fixe l'A β soluble grâce à sa région α -hélicoïdale amphipathique de liaison aux lipides et le complexe formé sera internalisé par les cellules neuronales *via* les récepteurs de surface cellulaire (LRP-1) en vue de son élimination (**Figure 1.11**).

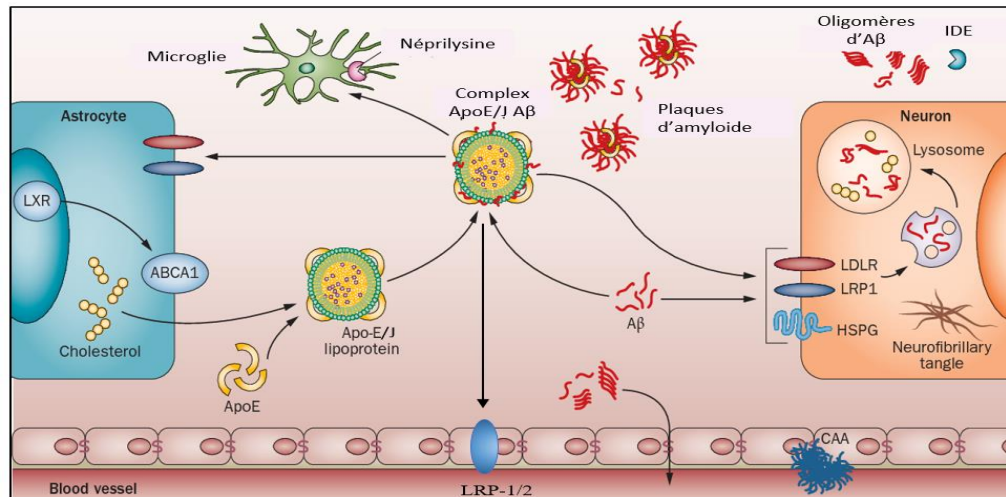


Figure 1.11 Mécanismes de la clairance d'A β par les apoE/J modifiée de (Liu *et al.*, 2013). L'A β est captée par les apoE et apoJ, qui assurent sa clairance *via* 3 mécanismes : 1) en se fixant sur les récepteurs neuronaux (LLDLR, LRP1) le complexe apoE/J-A β est internalisé et éliminé par les lysosomes, 2) en se fixant sur les récepteurs de la BHE (LRP1-2) le complexe est véhiculé en dehors du cerveau, 3) dans les microglies et astrocytes l'A β est éliminée *via* l'interaction avec les récepteurs TREM-2.

De même que les neurones, les microglies et les astrocytes sont également capables de dégrader le complexe apoE-A β *via* les récepteurs TREM-2 (Bell *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2008; Yeh *et al.*, 2016) (**Figure 1.11**). De par son rôle dans la clairance d'A β , l'apoE assure le transport d'acides gras essentiels à la formation et la réparation des membranes des cellules neuronales et elle contrôle la bonne intégrité structurale de la BHE (Bell *et al.*, 2012; Husain *et al.*, 2021).

Il est important de noter que l'apoE se présente sous la forme de trois allèles polymorphes : ϵ 2 (8,4%), ϵ 3 (77,9%) et ϵ 4 (13,7%), qui diffèrent par leur composition en Cys/Arg aux positions 112 et 158. C'est en 1993 que le Dr. Poirier a démontré, pour la première fois, que le variant ϵ 4 de l'APOE est un facteur de risque majeur de la forme sporadique de la MA. (Poirier *et al.*, 1993).

En fonction de l'isoforme, on aura un degré de la lipidation différent ($APOE \epsilon 2 > APOE \epsilon 3 > APOE \epsilon 4$) ainsi qu'un dépôt d'A β plus au moins important ($APOE \epsilon 2 < APOE \epsilon 3 < APOE \epsilon 4$) (Liu *et al.*, 2013). Par conséquent, la forme ϵ 4 effectue beaucoup moins efficacement les fonctions clés de l'apoE et plusieurs études associent la présence d'un allèle ou deux du variant APOE ϵ 4 à un risque élevé à très élevé de la MA (Reiman *et al.*, 2020) (**Figure 1.12**).

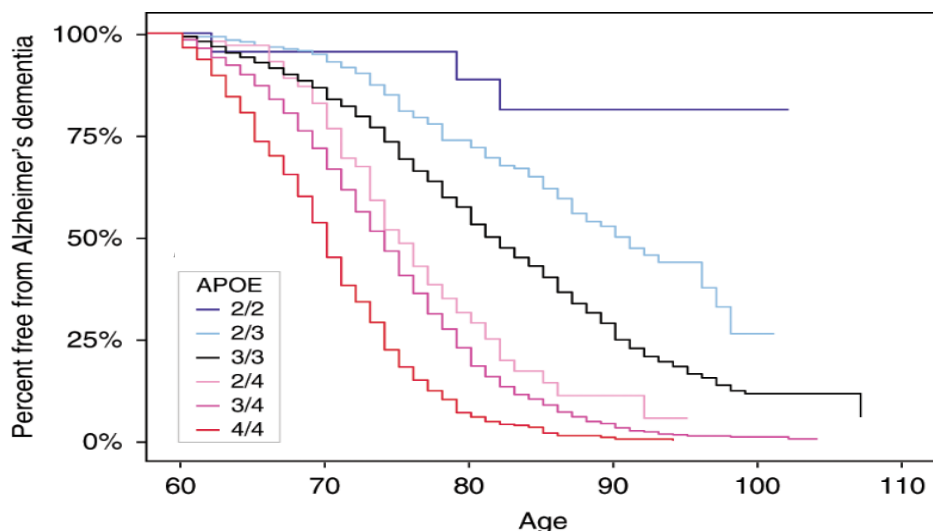


Figure 1.12 Risque de la MA en fonction du génotype de l'apoE (Reiman et al., 2020). Les courbes de Kaplan-Meier ont été générées à partir des données de participants (n = 5000). L'axe Y représente le pourcentage de personnes non malades avec chaque génotype APOE (Exemple : 100% = 0 cas de démence ; 25% = 75% des personnes à l'âge qui correspond au pourcentage indiqué sont atteintes de MA). L'axe des X indique l'âge au décès en fonction du génotype.

L'APOE $\epsilon 4$ est désormais le facteur de prédisposition génétique majeur à la MA sporadique. Les personnes homozygotes pour l'allèle APOE $\epsilon 2$ ont une probabilité exceptionnellement faible de développer la MA alors que les individus porteurs du double allèle APOE $\epsilon 4$ sont jusqu'à 15 fois plus susceptibles d'avoir la maladie et encore à un âge plus jeune (**Figure 1.12**). L'étendue des effets néfastes de l'APOE $\epsilon 4$ sur les processus pathologiques favorisant la MA reste peu connue. L'inclusion du génotypage dans les études visant à identifier des nouveaux marqueurs de la démence de type Alzheimer est ainsi fortement recommandé (Madrid *et al.*, 2021).

b) Apolipoprotéine J

L'apoJ (encore appelée Clusterine) est une protéine chaperon à activité antioxydante qui permet de stabiliser les protéines oxydées et mal repliées et participe à leur élimination (Foster *et al.*, 2019; Perrotte *et al.*, 2019). L'apoJ est aussi capable de se lier à des protéines impliquées dans la neurodégénérescence, telles que l'A β , les corps de Lewy et les dépôts de prions, en favorisant leur passage vers la périphérie à travers les LRP-2 ainsi que leur endocytose par les cellules phagocytaires *via* les récepteurs TREM-2 (Bell *et al.*, 2007; Yeh *et al.*, 2016) (**Figure 1.11**). L'apoJ favorise également la phagocytose des débris apoptotiques par ce même mécanisme. Il est important de noter qu'à des niveaux élevés mais toujours sous-stœchiométriques (c'est-à-dire un rapport molaire de apoJ:A β = 1:10), l'apoJ exerce des effets anti-amyloïdogènes mais en cas

d'excès molaire d'A β , les effets d'apoJ peuvent être pro-amyloïdogéniques (Yerbury *et al.*, 2007). En fait, une diminution du dépôt d'A β a été observé chez des souris hAPP transgéniques knock-out (KO) pour l'*APOJ* (-/-) alors que la double inactivation de l'*APOE* et l'*APOJ* chez le modèle de souris a conduit à une augmentation spectaculaire du dépôt d'A β (DeMattos *et al.*, 2004). Les mécanismes responsables de cette observation paradoxale ne sont pas bien compris mais cela suggère que certains processus sont régulés de manière coopérative entre l'apoJ et l'apoE (May *et al.*, 1990; Bertrand *et al.*, 1995). De plus, les études d'association à l'échelle du génome (GWAS : *genome-wide association studies*) ont identifié plusieurs polymorphismes génétiques associés à un risque élevé de la MA au niveau du gène *APOJ* (Harold *et al.*, 2009; Lambert *et al.*, 2009). En fait, l'*APOJ* est considéré comme le deuxième facteur de susceptibilité génétique à la MA juste après l'*APOE* ϵ 4 (Elliott *et al.*, 2010a).

c) Apolipoprotéine D

L'apoD se trouve uniquement au niveau des lipoprotéines de haute densité (HDL) ce que lui confère un rôle important dans la régulation et le transport du cholestérol et autres espèces lipidiques (Rassart *et al.*, 2020). Au niveau du cerveau, l'apoD est synthétisée et excrétée principalement par les oligodendrocytes et les astrocytes (Elliott *et al.*, 2010a). Dans la MA, l'expression de l'apoD est augmentée dans le LCR et les régions cérébrales affectées (y compris l'hippocampe, le cortex frontal et le cortex temporal) (Kalman *et al.*, 2000; Terrisse *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 2003), et corrélée à la densité des DNF (l'une des étiologies majeures de la MA) (Belloir *et al.*, 2001). L'élévation des niveaux d'apoD est probablement liée à ses activités antioxydantes (Dassati *et al.*, 2014). En fait, l'apoD exerce aussi un effet antioxydant important au niveau cérébral en inhibant la peroxydation lipidique (Ganfornina *et al.*, 2008). L'apoD semble jouer un rôle antioxydant similaire à l'apoE en redistribuant le cholestérol et les phospholipides lors de la régénération nerveuse et de la remyélinisation (Elliott *et al.*, 2010a).

L'apoD a été identifiée au niveau des plaques amyloïdes et des études suggèrent qu'elle contribue à l'élimination des agrégats toxiques d'A β (Desai *et al.*, 2005; Koldamova *et al.*, 2001). De plus, la sécrétion de l'apoD a été augmentée de 50 fois chez des souris KO pour le gène *APOE*, suggérant que l'apoD jouerait un rôle compensatoire (Jansen *et al.*, 2009). La relation entre l'apoD et l'apoE n'est pas très claire. Des études montrent que les variants ϵ 3 et ϵ 4 de l'*APOE* peuvent se fixer sur la région promotrice de l'apoD et réprimer son expression (Levros *et al.*, 2013). L'apoD serait ainsi régulée en fonction du génotype d'*APOE* (Glöckner & Ohm, 2003) mais indépendamment de la concentration de la protéine apoE (Terrisse *et al.*, 1998). En général,

les mécanismes d'interaction entre l'apoD, l'apoJ et l'apoE restent controversés même si les résultats de certaines études cités ci-dessus sont en faveur d'une relation de coopérativité et d'interdépendance entre ces apolipoprotéines. Ce processus est d'autant moins connu au stade préclinique de la MA.

1.2.3.5 Autres facteurs

a) Hypothèse cholinergique

L'hypothèse cholinergique est l'approche la plus étudiée qui décrit la physiopathologie de la MA au niveau moléculaire. Depuis plus de 40 ans, cette hypothèse définit la MA comme un processus dégénératif capable d'endommager de manière sélective le cortex frontal, des groupes spécifiques de neurones cholinergiques dans l'hippocampe, le septum médial, l'amygdale ainsi que d'autres structures et régions qui jouent des rôles fonctionnels importants dans la mémoire, l'apprentissage et l'attention (Perry *et al.*, 1977 ; Whitehouse *et al.*, 1981).

Cette altération sélective des neurones cholinergiques régule négativement certains marqueurs cholinergiques tels que l'acétylcholinestérase et l'acétyltransférase, dont la baisse va provoquer des altérations neurofibrillaires et favoriser l'apparition de troubles cognitifs (Schaeffer & Gattaz, 2008; Watanabe *et al.*, 2003). Cette hypothèse a été consolidée par la neuroimagerie, des analyses immunohistochimiques et d'autres méthodes de détections (Ellis *et al.*, 2006; Liskowsky & Schliebs, 2006; Wu *et al.*, 2010). D'autre part, cette altération provoquerait un défaut d'absorption de choline, des déficits d'expression des récepteurs muscariniques et nicotiques, une altération de la libération d'ACh et des déficits au niveau du transport axonal (Shen & Wu, 2015; Wenk, 2006). Récemment, il a été démontré que l'A β peut interagir avec les récepteurs cholinergiques et bloquer l'interaction avec les neurotransmetteurs ACh (Jürgensen & Ferreira, 2010; Ni *et al.*, 2013).

L'hypothèse cholinergique a servi de base à la majorité des stratégies de traitement et des approches de développement de médicaments pour le traitement symptomatique de la MA dont on cite les agonistes des récepteurs cholinergiques, précurseurs cholinergiques, les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase ou encore les activateurs allostériques des récepteurs cholinergiques (Sanabria-Castro *et al.*, 2017). Actuellement, il existe un consensus sur le fait que la relation observée entre le déclin cognitif et la diminution de la transmission cholinergique dans le cerveau joue un rôle important dans la MA mais en soi ne permet pas d'établir la cause définitive de la maladie.

b) Défaut de la neurotransmission glutamatergique

Au niveau de l'hippocampe, la neurotransmission glutamatergique stimule un signal calcique cytosolique, qui induit la prolongation de la potentialisation impliquée dans la régulation de la plasticité synaptique et favorisant la consolidation de la mémoire et l'apprentissage (Lynch, 2004). Cependant, une augmentation chronique des ions Na^+ , Ca^+ et Cl^- résultant de l'hyperactivation des récepteurs NMDA (N-Methyl-D-Aspartate) glutamatergique a été associée à une dépolarisation excessive de la membrane postsynaptique et à l'apparition des processus neurodégénératifs conduisant à la mort cellulaire (Beck *et al.*, 2003; Szado *et al.*, 2008).

De même, une augmentation du calcium intra-neuronal à la suite d'une dysfonction de la neurotransmission glutamatergique peut engendrer une activation de la synthèse de l'oxyde nitrique (ON), une génération de radicaux libres, avec une surcharge en calcium dans les mitochondries provoquant une dépression prolongée du cervelet menant à l'apoptose et la mort neuronale (Fan & Raymond, 2007; Ndountse & Chan, 2009). Des études ont montré que l'incubation des neurones avec le glutamate favorise un dépôt de filaments similaires aux enchevêtrements neurofibrillaires observés dans la MA. De même, l'exposition des cultures neuronales aux $\text{A}\beta$ a favorisé la neurotoxicité induite par le glutamate en modifiant l'expression des récepteurs NMDA (Parameshwaran *et al.*, 2008; Snyder *et al.*, 2005).

D'autre part, l'absence ou la baisse d'activité des enzymes responsables de la dégradation du glutamate (telle que la glutamine synthétase) au niveau synaptique, favorise la présence en excès de glutamate neuronal et donc la stimulation continue des récepteurs et l'excitotoxicité (Butterfield & Pocernich, 2003; Wenk, 2006). La mémantine est une molécule antagoniste des récepteurs NMDA glutamatergiques qui inhibe la fixation du glutamate et réduit ainsi la toxicité liée à la présence en excès du glutamate (Folch *et al.*, 2018). Il s'agit d'un bloqueur des récepteurs NMDA utilisé pour le traitement symptomatique de la MA.

c) Neuroinflammation

Il a été suggéré que l'inflammation cérébrale est associée à la dégénérescence neuronale (Kinney *et al.*, 2018; Stichel & Luebbert, 2007). L'activation des cellules microgliales, considérées comme les principales cellules immunitaires du cerveau et représentant 5 à 12% de l'ensemble des cellules neuronales, provoque une neuro-inflammation chronique par la sécrétion de nombreux médiateurs pro-inflammatoires comme les ERO, l'ON, ou encore des cytokines incluant le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) et l'interleukine (IL) -6 (Kinney *et al.*, 2018; Spangenberg & Green, 2017). Une augmentation de l'expression de cytokines au cours de

l'inflammation peut entraîner une neurotoxicité et une mort cellulaire favorisant la progression et l'aggravation de la MA (Holmes *et al.*, 2009). À titre d'exemple, l'IL-6 est capable d'activer la voie kinase cdk5/p25 connue pour causer la phosphorylation de tau et favorise donc la formation des DNF neurotoxiques (voir section 1.2.3.2) (Quintanilla *et al.*, 2004). D'autres part, le TNF- α se lie principalement aux récepteurs TNFR1 and TNFR2 dont la surexpression provoque la mort neuronale par apoptose suite à l'activation de la voie NF κ B.(Li *et al.*, 2004). Le TNF- α favorise aussi la production d'A β par la régulation à la hausse de l'activité des β - et γ - sécrétases (Liao *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2007). À son tour, l'A β induit l'activation chronique des microglies formant ainsi un cercle vicieux qui favorise la progression de la MA (Kinney *et al.*, 2018).

1.2.4 Critères diagnostiques des démences

En raison de l'hétérogénéité des symptômes et l'absence de paramètres cliniques objectifs, le diagnostic de la MA ne peut être établi avec certitude du vivant du patient. En consultation, le diagnostic de la MA est fondé sur des critères de présomption reposant sur des observations cliniques, paracliniques et sur l'exclusion de toutes autres formes de pathologie. Ainsi, seul un examen anatomo-pathologique du cerveau après le décès, basé sur la présence des plaques amyloïdes et des DNF, permettra de poser le diagnostic avec certitude. Ceci pose un certain nombre de problèmes quant à la réalisation des études épidémiologiques et des essais thérapeutiques.

1.2.4.1 Les tests neuropsychométriques

Il existe plusieurs tests neuropsychométriques qui sont utilisés pour évaluer la fonction cognitive globale et ainsi dépister la démence ou la dysfonction cognitive. Les principaux outils utilisés sont le MMSE (Folstein *et al.*, 1975), le Modified Mini Mental State examination (3MS) (Teng & Chui, 1987) et le Montreal Cognitive Assessment (MoCA) (Nasreddine *et al.*, 2005).

a) Modified Mini-Mental State (3MS) examination

L'échelle du 3MS est une version modifiée et bonifiée du MMSE. Elle permet d'apprécier plusieurs critères à l'aide d'une échelle de points au lieu d'une réponse correcte ou incorrecte, comme c'est le cas avec l'échelle MMSE. Le score total sur 100 points pour l'échelle 3MS, au lieu de 30 points pour l'échelle MMSE, présente une meilleure sensibilité et spécificité pour la dépister ou repérer des troubles cognitifs mineurs (CIND) et majeurs comme la démence (Li *et al.*, 2016). Un score entre 78 et 86 suggère généralement la présence d'un trouble des fonctions cognitives. Le 3MS

élargit le champ des fonctions cognitives appréciées par l'ajout de cinq items à savoir **a)** les fonctions exécutives **b)** la mémoire épisodique (deuxième rappel de 3 mots), **c)** la mémoire à long terme (date/lieu de naissance), **d)** la fluidité verbale et **e)** la mémoire sémantique (**Figure 1.13**) (Li *et al.*, 2016). Le 3MS doit être associé à d'autres examens cliniques, médicaux et neuropsychologiques pour établir un diagnostic des troubles neurocognitifs.

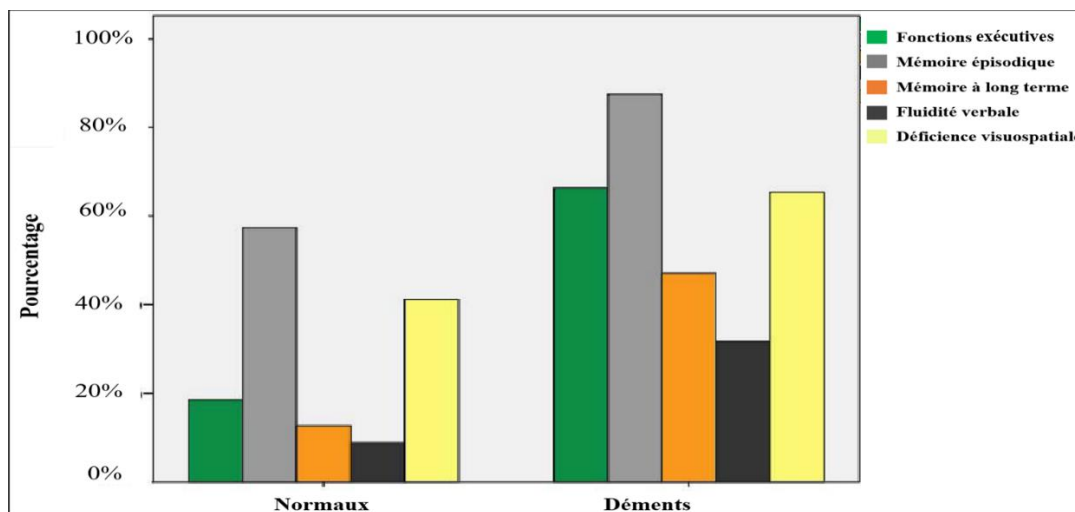


Figure 1.13 Pourcentage de dysfonctions cognitives ciblées par le test 3MS adaptée de (Li *et al.*, 2016).

b) Mini Mental State Examination (MMSE) et Montreal Cognitive Assessment (MoCA)

Le MMSE est un test allant jusqu'à un maximum de 30 points. Un individu ayant obtenu un score entre 24 et 30 est considéré comme ayant des fonctions cognitives intactes. Un individu ayant un score inférieur à 24 est, en général, considéré comme présentant des signes de démence à confirmer (Hudon *et al.*, 2009 ; Kalafat *et al.*, 2003) (**Annexe II**). Il est à noter qu'il est possible de convertir les scores du test 3MS pour s'adapter au test MMSE. Comme le MMSE, le MoCA est un bref test de 30 points qui évalue un large éventail de domaines cognitifs avec un seuil de score proposé de 26 (score \leq 25 indique une dysfonction cognitive (Ismail *et al.*, 2010).

c) Autres critères diagnostiques

Parmi les critères diagnostiques reconnus pour la démence et/ou ses sous-types, on retrouve le NINCDS-ADRDA (McKhann *et al.*, 2011), le DSM-5 (Sachdev *et al.*, 2015), la classification internationale des maladies (CIM-10) et les critères de l'Institut National des Troubles Neurologiques et des accidents cérébraux et de l'Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences (NINDS-AIREN) (Kalaria *et al.*, 2004). La CIM-10 et les critères NINDS-AIREN sont utilisés pour détecter la DV (Kalaria *et al.*, 2004).

1.2.4.2 Imagerie cérébrale

Les récents progrès en neuroimagerie ont permis la mise au point de techniques qui reflètent *in vivo* les changements neuropathologiques traditionnellement reconnus pour définir la MA à savoir : l'atrophie du cerveau, la formation de plaques amyloïdes et la dégénérescence neurofibrillaire. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est un examen d'imagerie qui emploie de puissantes forces magnétiques et des ondes radioélectriques pour produire des images détaillées à trois dimensions du cerveau. L'IRM se présente comme une technique solide pour l'évaluation des modifications morphologiques du cerveau.

La tomographie par émission de positrons (TEP) couplée au fluorodésoxyglucose (FDG) mesure l'absorption du glucose par les neurones et les cellules gliales reflétant l'activité métabolique cellulaire. Une TEP FDG normale exclut virtuellement le diagnostic d'une maladie neurodégénérative (Perani *et al.*, 2014). Le marqueur d'imagerie le plus novateur de la MA utilisé en milieu clinique est la TEP amyloïde qui consiste à utiliser des ligands (comme le florbétapir, le florbétabène et le fletmétamol) hautement spécifiques de l'A β (Herholz & Ebmeier, 2011). D'autre part, des ligands fluorés dirigés contre la protéine Tau ont montré une affinité de liaison remarquable aux enchevêtrements fibrillaires (Villemagne *et al.*, 2015) et ont affiché une meilleure corrélation avec l'hypométabolisme et l'atrophie que la TEP amyloïde (**Figure 1.14**). Actuellement, la TEP Tau est utilisée dans les essais cliniques visant à retarder la progression de la MA, mais son utilité pour le diagnostic clinique reste à confirmer. Les restrictions sont liées à son coût élevé et le manque de sa validité puisque des personnes pouvant être TEP A β + mais sans présenter des problèmes cognitifs et inversement, ce qui implique le développement de méthodes plus précises, moins invasives et moins coûteuses (Scheltens *et al.*, 2016).

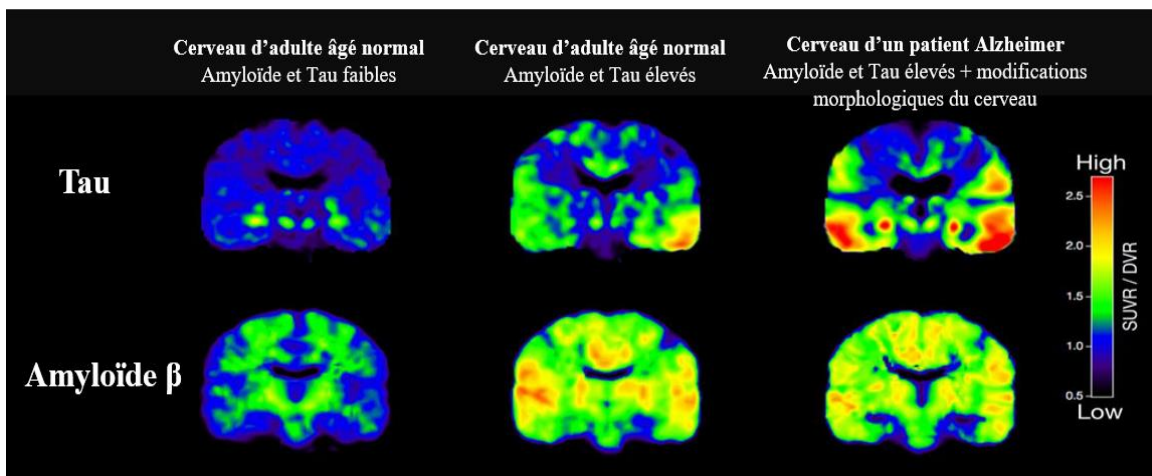


Figure 1.14 Comparaison de l'accumulation de Tau et de l'A β entre un patient MA et des individus sains âgés par TEP amyloïde et TEP Tau adaptée de (Scholl *et al.*, 2016). L'intensité et le changement (bleu vers rouge) de la couleur est corrélée à la concentration des protéines toxiques dans le cerveau.

1.2.4.3 Biomarqueurs des fluides biologiques

L'identification et la validation de biomarqueurs périphériques renforce davantage le diagnostic des démences. La *Food and Drug Administration* (FDA) définit un marqueur biologique comme un paramètre objectivement mesurable qui reflète la variation entre les processus biologiques normaux et pathogènes ou encore les réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique (Strimbu & Tavel, 2010). Selon le groupe de travail sur les marqueurs moléculaires et biochimiques de la MA, un biomarqueur idéal pour la MA devrait être précis (capable de la détecter et de distinguer la MA), capable de détecter une caractéristique fondamentale de la neuropathologie, être fiable, non invasif, simple à réaliser et peu coûteux (NIHBDW, 2001). Une source potentielle de biomarqueurs spécifiques est le LCR ou encore le sang périphérique.

a) Le liquide céphalo-rachidien (LCR)

Les biomarqueurs pouvant être mesurés dans le LCR pour la détection de la MA sont l'A β 42 et l'A β 40, la protéine tau totale (t-Tau) (l'intensité de la neurodégénérescence) et la tau phosphorylée (p-Tau) (qui corrèle avec les modifications pathologiques neurofibrillaires) (Blennow & Zetterberg, 2015a) (**Figure 1.15**). En 2011, le groupe de travail des NIA-AA ont publié de nouveaux critères pour le diagnostic de la MA de manière à pouvoir la diagnostiquer au niveau de ses trois stades : pré-clinique, MCI et démence (Sperling *et al.*, 2011). Ces critères se présentent sous une combinaison de plusieurs marqueurs regroupant le ratio de p-Tau/A β 42 ou encore celui de A β 42/A β 40 au niveau du LCR, la volumétrie hippocampique mesurée par IRM ainsi que la TEP FDG et la TEP amyloïde. L'association entre ces différents marqueurs a permis de diagnostiquer les différents stades de la MA avec une spécificité et une sensibilité élevée (> 90%) (Gupta *et al.*, 2019). Des études cliniques multicentriques et à grande échelle ont permis de valider ces critères diagnostiques (Mattsson *et al.*, 2014; Palmqvist *et al.*, 2014).

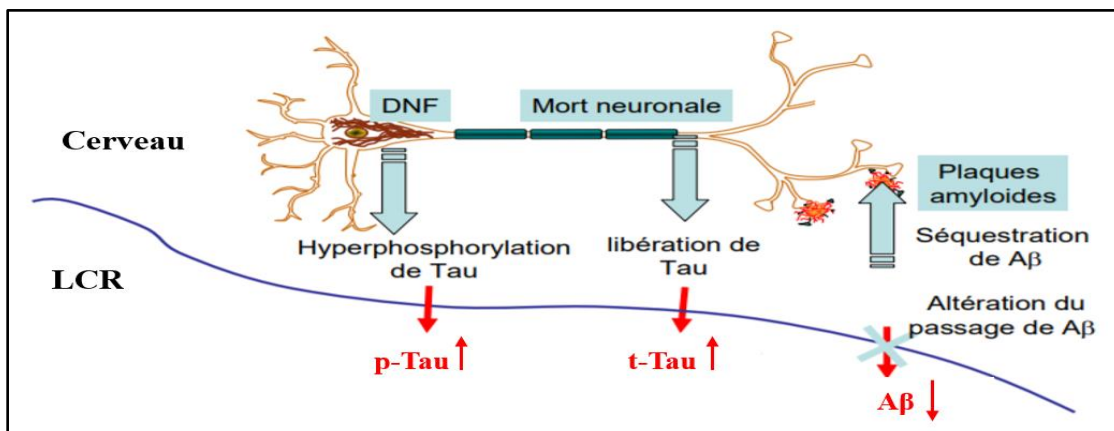


Figure 1.15 Variation des biomarqueurs de la MA mesurés dans le LCR (Shraen, 2014). Lors de la DNF, les taux de p-Tau et de t-Tau augmentent dans le LCR à la suite de la mort neuronale et la dissociation de la protéine tau des microtubules. L'A β quant à lui, est séquestré sous forme de plaques amyloïdes dans le cerveau, ce qui provoque la diminution de sa concentration dans le LCR.

D'autres études ont montré que des marqueurs reliés au stress oxydant, mesurés dans le LCR, permettent de discriminer entre des personnes atteintes de démence et d'autres saines. Une étude a rapporté que l'association entre les niveaux des isoprostanes F₂-iPs, de l'Aβ42 et de Tau mesurés au niveau du LCR, a permis de diagnostiquer la MA avec une sensibilité de 84% et une spécificité de 89% (Anoop *et al.*, 2010). De plus, les taux de 8-OHdG et 4-HNE étaient significativement élevés dans le LCR de patients atteints de MA par rapport à des témoins sains (Gackowski *et al.*, 2008). Il a été aussi démontré que la concentration de 3-nitrotyrosine (produit d'oxydation protéique) est augmentée dans le LCR des personnes atteintes de la MA et qu'elle était négativement corrélée aux scores du MMSE (Ahmed *et al.*, 2005).

Cependant, la variabilité des mesures entre les laboratoires cliniques a entravé l'identification de seuils uniformes pour les biomarqueurs mesurés dans le LCR. Ce problème provient des différences de procédures analytiques pour les méthodes ELISA manuelles employées par les laboratoires et de la variabilité de la qualité des réactifs et des procédures de fabrication qui entraînent des variations de lots à lots (Mattsson *et al.*, 2013). De plus, la ponction lombaire nécessaire pour prélever des échantillons de LCR est invasive et elle est mal supportée par les patients limitant ainsi l'utilisation de cette matrice biologique dans les prélèvements de routine et comme un outil diagnostique de premier choix (de Almeida *et al.*, 2011).

b) Biomarqueurs potentiels périphériques

La MA touche surtout les populations des pays à revenu faible ou intermédiaire qui représentent 60% des patients Alzheimer (OMS, 2022) et qui n'ont pas toujours accès à des techniques sophistiquées telles que l'IRM et/ou des scanners TEP. De même les prélèvements du LCR sont invasifs et mal supportés par les patients (Jeter *et al.*, 2013).

Le sang constitue donc une alternative pertinente car il est obtenu de manière relativement non invasive et il constitue une source d'informations riche reflétant l'état physique du corps, ce qui rend les biomarqueurs sanguins souhaitables pour les soins primaires et les échantillonnages multiples dans les essais cliniques (Khan & Alkon, 2015).

Un des grands défis actuels est l'identification d'un ou plusieurs marqueurs périphériques en relation avec le déclin cognitif. Bien que la MA soit associée à la neurodégénérescence cérébrale, de nombreuses études suggèrent que les modifications de certaines protéines plasmatiques peuvent être associées au déclin cognitif (Hye *et al.*, 2014). Ceci est probablement en lien avec les maladies systémiques qui augmentent le risque des problèmes cognitifs et par l'échange continu qui existe entre le cerveau et le sang (Kouvari *et al.*, 2022). Par conséquent, l'identification d'un panel de protéines sanguines dont l'expression varie entre les patients atteints de démences

et des témoins sains pourra représenter un outil diagnostique pratique et plus avantageux que les méthodes conventionnelles (Henriksen *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2018).

b1) Peptide amyloïde et protéine Tau

La mesure et la quantification avec précision dans la circulation systémique des protéines impliquées dans la neurodégénérescence comme t-Tau, p-Tau, A β 40 et A β 42, est difficile en raison de leurs faibles concentrations dans le sang, leur dégradation par les protéases plasmatiques et la quantité énorme de protéines au niveau du sang qui peuvent causer des interférences. Quelques études ont pu doser avec succès ces protéines dans le sang mais la corrélation des ratios de Tau/A β 42, t-Tau/A β 42 et A β 42/A β 40 avec la neuroimagerie et les tests cognitifs était inconsistante entre les différentes études (Mattsson *et al.*, 2016). Néanmoins, l'application de nouvelles techniques ultra-sensibles comme le *Single molecule array* (Simoa™), le *Enhanced immunoassay using multi-arrayed fiberoptics* (a-EIMAF) ou l'immunoprécipitation couplée à la spectrométrie de masse ont permis de fournir une meilleure sensibilité analytique pour mesurer la protéine Tau (Ding *et al.*, 2021), l'A β 40 et l'A β 42 (Nakamura *et al.*, 2018a; Thijssen *et al.*, 2021) et ont démontré de fortes associations avec les données d'imagerie cérébrale par IRM et TEP scan.

Vu le caractère multifactoriel de la MA et la contribution des désordres métaboliques dans la survenue des lésions neurodégénératives, il est important de ne pas se limiter à ces marqueurs classiques. D'autres marqueurs périphériques pourraient refléter les manifestations pathologiques de la MA à un stade plus précoce et refléter plus fidèlement les processus neurodégénératifs et le déclin cognitif. La recherche et l'identification d'autres biomarqueurs, est ainsi recommandée.

b2) Marqueurs reliés au stress oxydatif

i) Marqueurs des dommages oxydatifs

Comme précédemment décrit (**section 1.2.3.3.**), l'altération des protéines, des lipides et des acides nucléiques par l'action néfaste des radicaux libres a été associée à la pathogenèse de la démence. Ces altérations se traduisent par des formes modifiées qui peuvent être mesurées dans les fluides biologiques, notamment le plasma. Une étude de notre laboratoire, publiée récemment, a montré que le taux de protéines carbonylées était supérieur chez des patients MCI et MA et fortement corrélé aux scores des tests cognitifs du MoCA (R = -0,5041) et du MMSE (R = -0,3602) (Perrotte *et al.*, 2019). De même, des concentrations élevées de 4-HNE, MDA et 8-OHdG ont été rapportées chez des patients MCI et MA (Casado *et al.*, 2008; McGrath *et al.*, 2001;

Sinem *et al.*, 2010). Cependant, ces dernières études ne corrèlent pas leurs données avec le ratio de p-Tau/A β 42 dans le LCR, la neuroimagerie ou encore les tests cognitifs, ce qui pose un réel problème quant à la validité diagnostique de ces marqueurs.

ii) Systèmes de défense anti-oxydants

L'accumulation des dégâts oxydatifs peut être le signe d'un état de stress oxydatif important ou encore d'une altération des systèmes de défense antioxydants. Le plasma renferme des systèmes de défenses enzymatiques et non enzymatiques qui participent à la régulation de la balance oxydative. Le protéasome circulant, par exemple, contribue à l'élimination des protéines oxydées grâce à son activité protéolytique. L'activité de ce dernier a été diminuée chez des patients MA et positivement corrélée aux scores des tests du MoCA et du MMSE (Perrotte *et al.*, 2019). Dans la même étude, la capacité antioxydante totale à réduire le H₂O₂ dans le plasma qui reflète, entre autres, l'activité d'enzymes comme la CAT et la GPx, était plus faible chez des patients MCI et MA et corrélée positivement aux tests cognitifs.

D'autre part, la vitamine E est un antioxydant majeur qui empêche la peroxydation des AGPI dans les membranes biologiques y compris celles des neurones. De ce fait, elle est particulièrement importante pour le cerveau, compte tenu de la teneur élevée en lipides et de la forte concentration en AGPI (Skoumalova & Hort, 2012). Les vitamines A, B, C et D sont également impliquées dans la neuroprotection et leur utilisation comme adjuvant peut s'avérer utile dans le traitement de la MA (Bhatti *et al.*, 2016). Plusieurs études ont montré que les concentrations de la vitamine E (Schrag *et al.*, 2013), la vitamine A (Polidori *et al.*, 2004), la vitamine B (Mulder *et al.*, 2005), la vitamine C (Glaso *et al.*, 2004) et la vitamine D (Annweiler *et al.*, 2013) diminuent significativement dans le plasma des patients MA (Polidori *et al.*, 2004). Compte tenu de toutes ces données, les marqueurs du SO s'avèrent être utiles pour la discrimination entre des patients déments et des personnes cognitivement saines.

c) Limite des marqueurs périphériques

La fonction principale de la BHE est de protéger le cerveau des substances potentiellement dangereuses présentes dans le sang. La BHE réduit également la sortie des molécules du cerveau, une fonction qui a considérablement compliqué le processus de développement des biomarqueurs et qui était la principale limite pour l'identification de biomarqueurs périphériques à ce jour. Néanmoins, une perte de la perméabilité de la BHE peut se produire plus tard dans la maladie mais le diagnostic sera établi après l'installation de dommages irréversibles.

D'autre part, les molécules plasmatiques peuvent être dégradées par le foie et/ou des protéases, adhérer à d'autres molécules et cellules (effet de matrice), être significativement diluées dans le

grand volume sanguin et beaucoup sont éliminées par excrétion rénale (Hampel *et al.*, 2018). Par conséquent, le temps de demi-vie de ces molécules est hautement variable et non constant rendant difficile l'identification de candidats valides pour le diagnostic de la MA.

Un autre point important est la mise en évidence de la relation entre les biomarqueurs sanguins identifiés et la pathogénèse de la maladie. En effet, le taux plasmatique de la plupart des protéines, des peptides et des lipides reflète les contributions de différents tissus. Une corrélation entre les analytes ou les protéines candidats avec les scores de tests cognitifs doit être ainsi évaluée (Henriksen *et al.*, 2014). D'autres facteurs, dont la médication et l'apport alimentaire peuvent interférer de manière significative avec les analyses du protéome sanguin entraînant de fortes fluctuations et devraient être aussi pris en considération lors de l'identification de nouveaux biomarqueurs (Ghidoni *et al.*, 2013).

1.2.4.4 Nouvelles cibles

Compte tenu des limites liées aux marqueurs périphériques dans le cadre des maladies neurodégénératives incluant la MA, il était plus qu'urgent de trouver d'autres alternatives. Au cours des deux dernières décennies, il y a eu un intérêt croissant pour l'étude des vésicules extracellulaires (EVs) comme outils de diagnostic innovants. Grâce à leurs propriétés intrinsèques et extrinsèques, ces dernières pourraient révolutionner le dépistage de la MA et d'autres troubles neurologiques.

1.3 Les vésicules extracellulaires

1.3.1 Histoire des EVs

L'identification des vésicules membranaires extracellulaires a été réalisée pour la première fois par hasard en 1946 par Chargaff et West lors de leurs études sur la coagulation du sang (Chargaff & West, 1946). Ils décrivaient une fraction particulière qui a sédimenté à une vitesse élevée de centrifugation (31 000 g) et qui avait un potentiel d'agrégation élevé. Cette fraction était alors considérée comme des déchets excrétés par la cellule mais il s'agissait des EVs. En 1967, Wolf a publié des images de microscopie électronique de ces particules, qu'il a décrites comme de la "poussière plaquettaire" (Wolf, 1967). D'autres images de cette poussière décrite dès lors comme « microparticules » ont pu être obtenues par Crawford qui a également montré qu'elles contenaient des lipides et transportaient des protéines (Crawford, 1971). Ces expériences avec les plaquettes ont été les premières à décrire la présence de ces particules tout en faisant allusion à leur importance biologique potentielle (**Figure 1.16**).

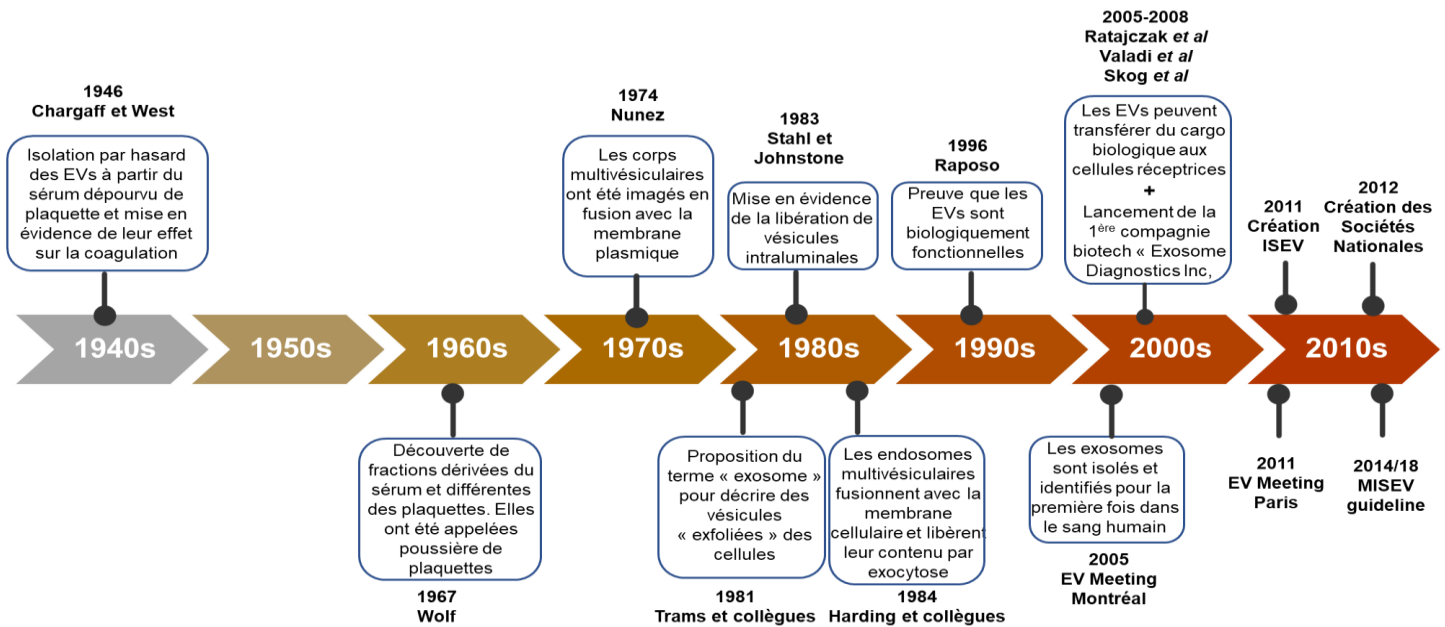


Figure 1.16 Chronologie des évènements les plus marquants depuis la découverte des vésicules extracellulaires. Illustration personnelle modifiée de (Couch *et al.*, 2021; Srivastava *et al.*, 2020)

La notion des corps multivésiculaires (MVB) a été introduite par Nunez en 1974 qui a montré que la fusion entre la membrane externe des MVB et la membrane plasmique pourrait conduire à la libération des vésicules contenues dans les MVB dans l'espace luminal. Cette description correspond à un type particulier des EVs connu aujourd'hui sous l'appellation d'exosomes (Nunez *et al.*, 1974). Entre temps d'autres chercheurs ont eu l'idée d'utiliser le terme « exosome » pour décrire les véhicules libérés de la surface de la cellule (Trams *et al.*, 1981). Un peu plus tard, Harding, encore étudiant au doctorat au laboratoire Stahl, a pu produire des images TEM démontrant que ces vésicules ont été libérées de la lumière des MVB lors de la fusion avec la membrane plasmique (Harding *et al.*, 1983). Ainsi, il a mis en évidence l'existence d'une nouvelle voie de tri et de trafic intracellulaire, qui est la voie de sécrétion des exosomes (**Figure 1.16**).

Dans les années 90s, les premiers articles décrivant les propriétés biologiques et caractéristiques physiques des EVs ont vu le jour. Il a été démontré que les exosomes renferment une multitude d'enzymes actives (Fourcade *et al.*, 1995; Johnstone *et al.*, 1989). Ces observations suggèrent que les EVs pourraient jouer des rôles fonctionnels dans les processus biologiques et ouvrent des perspectives sur la possibilité de les exploiter en tant que biomarqueurs ou dans les applications thérapeutiques. Au début du 21^e siècle et lors de la dernière décennie, une explosion d'articles traitant les différents aspects intrinsèques des EVs a vu le jour (Srivastava *et al.*, 2020).

1.3.2 Généralités

Les EVs sont des particules lipidiques infiniment petites de taille nanométrique qui sont libérées quasiment par tous les types de cellules, y compris celles du cerveau et qui à l'origine étaient suspectées de jouer un rôle d'élimination des déchets intracellulaires. Les recherches récentes sur les EVs, ont révélé que ces dernières sont capables de transporter une cargaison riche en molécules (protéines, lipides, acides nucléiques) qui sont bien protégées par une bicouche lipidique et qu'elles participent activement à la dissémination et à l'échange de ces composants avec les cellules adjacentes et distantes. Les EVs servent ainsi de vecteurs de signalisation dans les processus homéostatiques cellulaires et peuvent être secrétées en réponse à des événements pathologiques (Yates *et al.*, 2022a; Yates *et al.*, 2022b).

Des études suggèrent que les EVs peuvent passer à travers la BHE dans les deux sens (Kojima *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2014; Skog *et al.*, 2008; Wiklander *et al.*, 2015). Récemment, quelques études ont montré que certains marqueurs cérébraux pouvaient se retrouver au niveau des EVs provenant de la périphérie (Aharon *et al.*, 2020; Chai *et al.*, 2021; Haddad *et al.*, 2021; Haddad *et al.*, 2019b; Jia *et al.*, 2019b; Jia *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2020; Perrotte *et al.*, 2020). La nouvelle approche consiste donc à mesurer au niveau des EVs circulants les variations du taux de certains facteurs trophiques, inflammatoires, synaptiques ou encore des produits d'oxydation impliqués potentiellement dans la physiopathologie de la MA.

Il existe trois types d'EVs classées en fonction de leur site de biogenèse, leur morphologie et leur taille : les exosomes (30-150 nm) formés à partir de l'endosome tardive, les microvésicules (50-500 nm) formées à partir de la membrane plasmatique et les corps apoptotiques (~1000nm) formés lors de l'apoptose cellulaire (Vader *et al.*, 2014) (**Figure 1.17**).

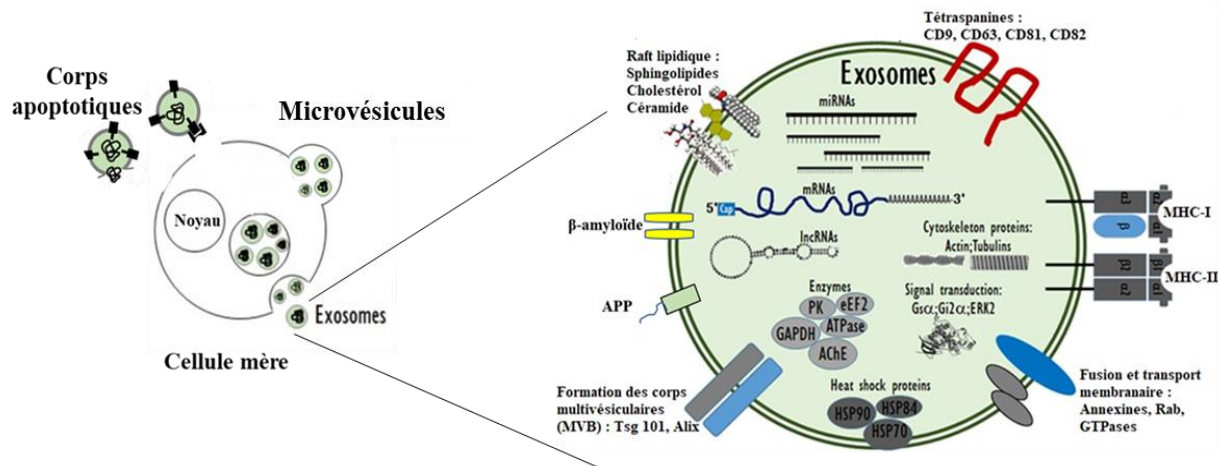


Figure 1.17 Les vésicules extracellulaires modifiée de (Bellingham *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2018). Selon le site de biogenèse et la taille on distingue 3 types de EVs : 1) Les exosomes, 2) les microvésicules et 3) les corps apoptotiques. Des nouveaux sous-types d'EVs libérées par des organelles sont nouvellement décrits.

1.3.3 Les corps apoptotiques

Considérés depuis longtemps comme des débris cellulaires ou des sous-produits formés à la suite de la mort programmée de cellule par apoptose, les corps apoptotiques (ApoEVs) ont regagné récemment un intérêt croissant après la description de leur implication dans la modulation de la réponse immunitaire. Les ApoEVs semblent jouer un rôle dans la communication paracrine mais leur action n'est pas encore bien déterminée. De plus, les résultats des études divergent quant à la caractérisation et l'isolement des ApoEV, ce qui complique davantage la détermination de leurs fonctions biologiques (Caruso & Poon, 2018).

1.3.4 Les microvésicules

L'ectocytose est un processus permettant la libération de vésicules à partir de la membrane plasmique. Les microvésicules (MVs) libérées jouent un rôle dans la communication cellule-cellule, y compris les cellules cancéreuses, où elles sont généralement appelées oncosomes. L'appellation des microvésicules varie ainsi en fonction du type cellulaire. On distingue les microparticules, les migrasomes ou encore les neurosphères (van Niel *et al.*, 2018). La formation des MVs est stimulée par le regroupement de lipides et de protéines associées à la membrane plasmique sous forme de microdomaines. Les microdomaines formés participent également au recrutement d'autres composants de la machinerie cellulaire ce qui favorise leur bourgeonnement au niveau de la membrane et leur libération dans le milieu extracellulaire.

Tableau 1.1 Différences entre microvésicules et exosomes (van Niel *et al.*, 2018)

	Exosomes	Microvésicules
Origine	Endosome	Membrane plasmique
Taille	30-150 nm	50-500 nm
Autres appellations	- Dexosomes - Nanovésicules - Tolérosomes - Prostrasomes	- Microparticules - Oncosomes - Migrasomes - Neurosphères
Organisateurs membranaires	Tétraspandines : CD9, CD37, CD53, CD63, CD81, CD151, TSPAN8, TSPAN6, Flotilin 1 & 2	Tétraspandines : CD9, CD81, CD82
Facteurs de biogenèse	ALIX, TSG101, synténine, ubiquitine, clathrine, VPS4, VPS32	ALIX, TSG101, VPS4, ERK, PLD
Trafic intracellulaire	Rab, GTPases, annexines	Rab, GTPases, annexines

Abréviations : ALIX, ALG-2 interacting protein X, TSG101, tumour susceptibility gene 101 protein; TSPAN, tétraspandine; VPS, vacuolar protein sorting-associated protein, PLD, phospholipase D, Rab, RAS-related protein

La génération de microvésicules fait appel à des mécanismes de tri intracellulaires communs avec ceux requis pour les exosomes (notamment les protéines ESCRT). Ces mécanismes communs empêchent de distinguer entre les différentes sous-populations de vésicules. Cependant, quelques exceptions ont été rapportées comme la présence des flotilines ou certaines tétraspanines au niveau des exosomes en formation, qui ne sont pas décrites dans le processus de bourgeonnement des MVs (**Tableau 1**).

1.3.5 Les exosomes

1.3.5.1 Généralités

Le terme « exosome » a été utilisé pour la première fois par Trams et al. (Trams et al., 1981) pour décrire des vésicules produites directement par bourgeonnement vers l'extérieur au niveau de la membrane plasmique. Plus tard, Rose Johnstone a utilisé le terme "exosome" pour décrire les vésicules libérées suite à la fusion des MVB, avec la membrane plasmique (Johnstone *et al.*, 1987) et c'est devenu plus tard le terme recommandé par l'association internationale des vésicules extracellulaires (ISEV) pour ce type de vésicule (Théry et al., 2018). Les exosomes ont une taille de 30 à 150 nm et possèdent une bicouche lipidique. Ils peuvent être isolés au niveau de tous les fluides biologiques (sang, LCR, urine, salive, lait maternel, liquide amniotique) et sont capables de transporter une variété de protéines, de lipides et d'acides nucléiques (**Figure 1.17**).

La cargaison des exosomes varie en fonction du type et de l'état physiologique ou pathologique des cellules. Grâce à leur membrane cellulaire, les exosomes peuvent être aussi utilisés comme des vecteurs de transfert pour la livraison des principes actifs ou de médicaments. Ces différentes propriétés ont stimulé l'intérêt de plusieurs équipes de recherche, au cours de la dernière décennie, pour l'exploitation thérapeutique et/ou diagnostiques des EVs (Srivastava *et al.*, 2020).

1.3.5.2 Biogenèse des exosomes

L'invagination de la membrane plasmique par endocytose conduit à la formation d'endosomes précoces puis tardifs donnant eux-mêmes naissance aux MVB. Ces derniers vont soit **a)** fusionner avec la membrane plasmique (ils vont libérer leur contenu en vésicules intraluminales ou « VIL » dans l'espace extracellulaire sous forme d'exosomes), **b)** soit fusionner avec des lysosomes (leur contenu sera dégradé et recyclé), **c)** soit contribuer à la génération des organites spécialisés, tels que les corps de Weibel-Palade (cellules endothéliales), les mélanosomes (dans les mélanocytes), les granules sécrétoires (dans les mastocytes) ou encore les granules azurophiles (dans les neutrophiles) (**Figure 1.18**) (Edgar, 2016).

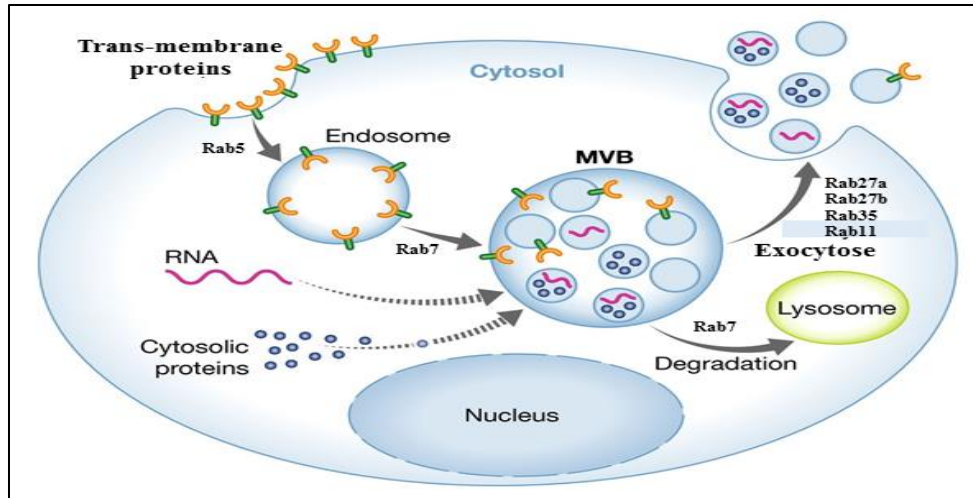


Figure 1.18 Biogenèse des exosomes modifiée de (Schorey et al., 2015). La biogenèse des exosomes fait intervenir deux voies d'invagination membranaire différentes : ESCRT-dépendante et ESCRT-indépendante. Dans les deux cas il y a formation d'endosomes précoces suivie des MVB qui vont être soit libérée dans l'espace extracellulaire (exocytose), soit dégradés dans la cellule au niveau des lysosomes. Ces phénomènes sont assurés par des protéines Rab de nature différentes qui vont décider du devenir des MVB.

a) Voie ESCRT-dépendante

La formation des VIL (qui donneront par la suite les exosomes) peut être induite par le complexe ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*) qui est constitué d'un ensemble de complexes protéiques cytosoliques (ESCRT-0, -I, -II et III). Ces derniers sont recrutés dans les endosomes par des protéines membranaires ubiquitinylées. La fixation du premier complexe ESCRT-0 au niveau de la membrane endosomale s'effectue par reconnaissance de l'ubiquitine, les complexes ESCRT-I et -II dirigent le bourgeonnement interne de la membrane, et le complexe ESCRT-III sert de « ciseaux moléculaires » séparant et libérant les vésicules formées dans la lumière de l'endosome tardif (Kim *et al.*, 2018).

b) Voie ESCRT-indépendante

La génération des VIL par voie ESCRT-indépendantes nécessite l'intervention d'une protéine spécifique : la tétraspanine qui est abondante au niveau des VIL mais dont le rôle est peu clair. Il est important de noter que la sous-unité TSG101 des complexes ESCRT-1 et les tétraspanines telles que CD9, CD63, CD81 et CD82 sont particulièrement nombreuses dans la membrane exosomale et sont utilisées comme biomarqueurs d'exosomes (Kim *et al.*, 2018).

Le chevauchement entre les MVs et les exosomes en termes de taille et de marqueurs spécifiques rend impossible la séparation entre ces deux groupes lors du processus d'extraction. Pour cette raison, la dénomination EVs sera utilisée dans notre travail.

1.3.6 Extraction et purification des EVs

Plusieurs méthodes et technologies d'extraction et de purification des EVs ont été développées à partir de fluides biologiques et tissus. Même si l'ultracentrifugation reste la méthode de choix, d'autres techniques regagnent du terrain (**Figure 1.19**). Selon le dernier guide méthodologique de l'étude des EVs (MISEV) il n'existe aucune méthode présentement capable d'isoler les EVs avec un rendement élevé et une haute spécificité (Coumans *et al.*, 2017).

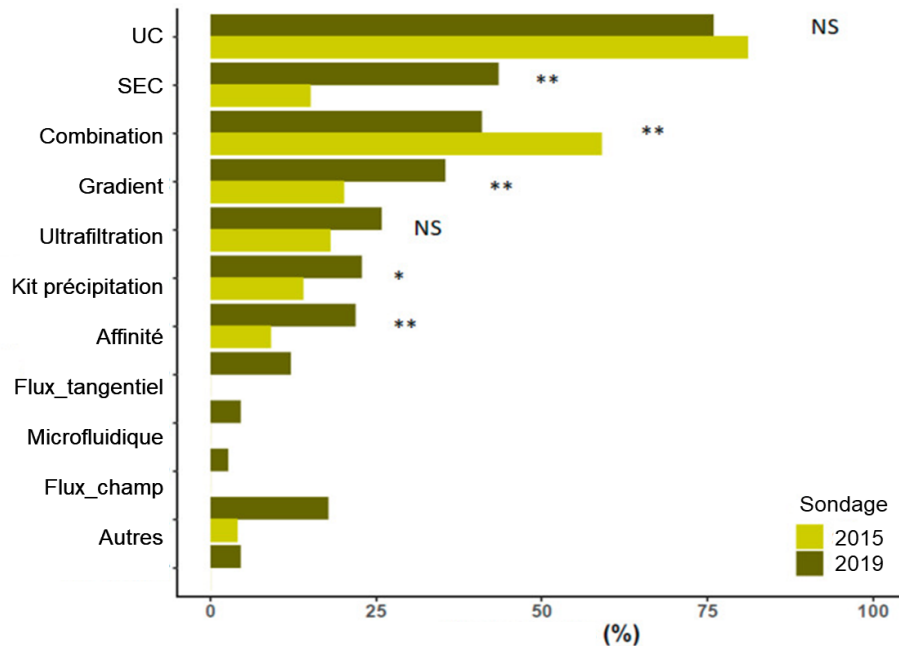


Figure 1.19 Liste des techniques d'isolement et de purification des EVs modifiée de (Royo *et al.*, 2020). Abréviations : UC, Ultracentrifugation ; SEC, Chromatographie d'exclusion sérique ; NS, non significatif.

Ces méthodes sont classées selon trois groupes comme suit (**Figure 1.20**) :

i) haute récupération, faible spécificité : il s'agit des méthodes qui récupèrent la plus grande quantité de matériel extracellulaire, quelle que soit sa nature : vésiculaire ou non vésiculaire. Parmi ces protocoles on trouve : les kits de précipitation/polymère (PEG ou autres), les filtres centrifuges à faible poids moléculaire (sans autre étape de séparation) ou encore l'ultracentrifugation longue ou à très grande vitesse non différentielle (sans étapes précédentes à plus faible vitesse) (Cocozza *et al.*, 2020; Coumans *et al.*, 2017).

ii) récupération intermédiaire, spécificité intermédiaire : ce sont des méthodes qui récupèrent les EVs avec une certaine contamination par des protéines libres, de ribonucléoprotéines et de lipoprotéines, qui varie en fonction de la matrice biologique. À titre d'exemples, on retrouve : la

chromatographie d'exclusion stérique (SEC), l'ultracentrifugation différentielle en temps/vitesse intermédiaires (avec ou sans lavage), les filtres centrifuges de haut poids moléculaire et les colonnes d'affinité membranaire.

iii) faible récupération, haute spécificité : ces méthodes visent généralement à récupérer un sous-type des EVs en particulier (en termes de taille, densité, charge, protéines spécifiques, origine tissulaire) avec le minimum de composants non vésiculaires. La filtration combinée à la SEC permet de séparer les EVs par leur taille (cependant elle n'élimine pas les composants non vésiculaires de taille similaire). L'immunoprécipitation et le gradient de densité font aussi partie de cette catégorie. À noter que ces techniques permettent une récupération élevée de sous-types spécifiques des EVs mais ne sont pas adaptées pour les EVs totales. Ainsi l'utilisation d'une technique dépend largement de l'analyse à effectuer sur les EVs.

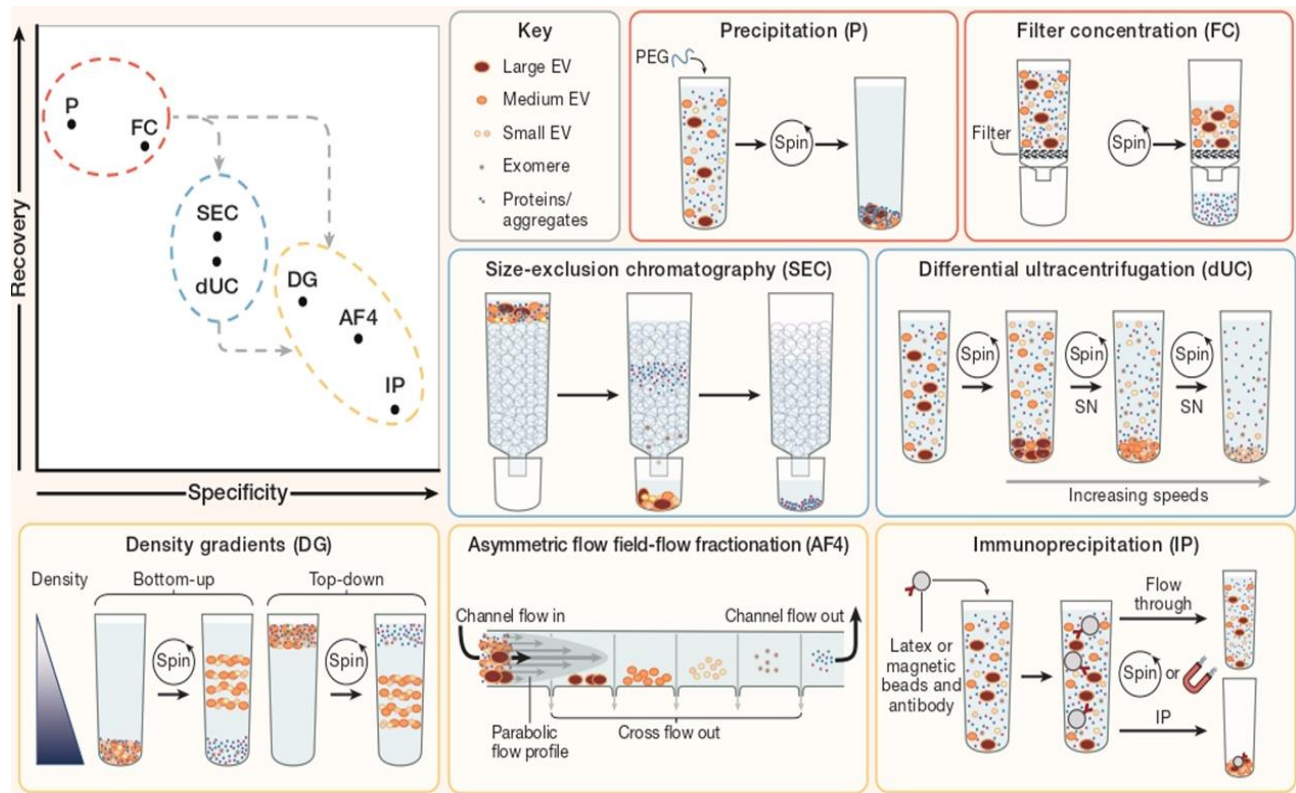


Figure 1.20 Spécificité et rendement des techniques d'extraction et purification des EVs modifiée de (Cocozza *et al.*, 2020). Abréviations : P, Précipitation ; FC, Concentration par filtre ; SEC, Chromatographie d'exclusion stérique ; dUC, Ultracentrifugation différentielle ; DG, Gradient de densité ; Flux asymétrique ; IP, Immunoprécipitation. Les méthodes de P et FC offrent une haute récupération mais une faible spécificité. Les méthodes de SEC et dUC offrent une récupération et spécificité intermédiaire. La méthode d'IP offre une haute spécificité mais une faible récupération. L'idéale serait de combiner 2 ou 3 méthodes pour un bon compromis entre récupération et spécificité.

1.3.7 Caractérisation des EVs

La caractérisation des EVs est une étape principale et essentielle dans l'étude des EVs. Plusieurs méthodes sont utilisées à cette fin (Royo *et al.*, 2020) (**Figure 1.21**). Toujours selon le guide MISEV, il faut effectuer un minimum de trois techniques pour s'assurer de la bonne isolation des EVs. Il est aussi conseillé de choisir des méthodes permettant l'analyse des EVs en vrac « bulk » mais aussi individuellement « single particle : SP ».

Selon des données récentes les techniques les plus utilisées pour caractériser les EVs sont :

- i) Western blot : détection des marqueurs spécifiques des EVs comme ALIX, TSG101, tétraspanines (analyse bulk),
- ii) Single particle tracking analysis : analyse de la taille et concentration des EVs (analyse SP),
- iii) Dosage protéique BCA/Bradford : mesure le contenu vésiculaire en protéines totales et évalue la contamination (analyse bulk),
- iv) Microscopie électronique en transmission: analyse de la morphologie et la taille (analyse SP)
- v) Cytométrie en flux : analyse bulk et/ou SP.

Ces cinq méthodes ont été ainsi sélectionnées pour être appliquées dans notre étude.

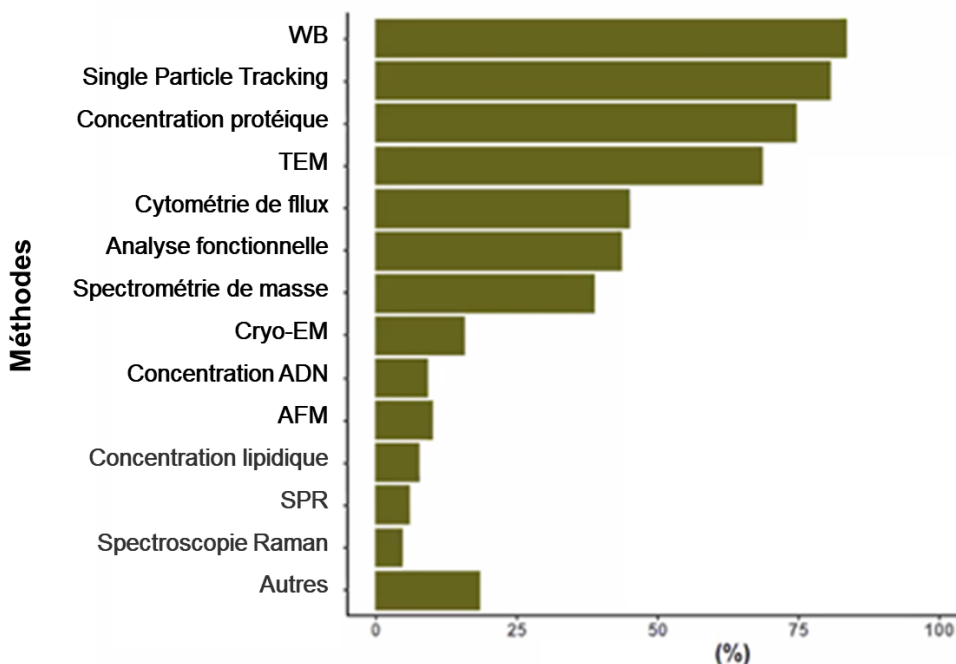


Figure 1.21 Liste des méthodes de caractérisation des EVs modifiée de (Royo *et al.*, 2020). Abréviations : WB, Western blot ; TEM, Microscopie électronique en transmission ; Cryo-EM, Microscopie électronique cryogénique ; AFM, Microscopie à force atomique ; SPR, Résonance plasmonique de surface

1.3.8 Rôle des EVs dans les processus physiologiques et pathologiques

Au cours de la dernière décennie, de nombreuses découvertes ont permis de mieux comprendre le rôle des EVs dans les processus physiologiques et pathologiques. Il est maintenant admis que les EVs jouent un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie des organes et des différents systèmes de l'organisme mais contribuent aussi à la pathogenèse de certaines maladies comme les troubles neurodégénératifs.

1.3.8.1 Les EVs dans les processus neurophysiologiques

Dans le SNC, les EVs sont libérés par tous les types de cellules, y compris les neurones, les astrocytes, la microglie, les oligodendrocytes et les cellules vasculaires. L'activité neuronale, qui est un processus vital pour le maintien efficace des synapses, serait associée à une libération accrue d'EVs (Lachenal et al., 2011) et ce phénomène est particulièrement important au cours du développement normal du cerveau (Paolicelli & Ferretti, 2017). D'autres études *in vivo* montrent un rôle crucial des EVs d'origine neuronale pendant le développement normal du SNC (Tanaka *et al.*, 2005; Vyas *et al.*, 2014).

Il a été démontré que les péricytes produisent des EVs qui sont pro-angiogéniques, ce qui suggère un rôle des EVs dans la régulation de la croissance et de la fonction normale au niveau de la BHE (Mayo & Bearden, 2015). Les EVs secrétées par les cellules astrogliales transportent des protéines antioxydantes (apolipoprotéine D) (Pascua-Maestro *et al.*, 2018) et impliquées dans la clairance d'A β (apolipoprotéine E) (Nikitidou *et al.*, 2017) vers les neurones et assurent la survie neuronale en cas de stress oxydatif ou d'exposition à des protéines toxiques. De plus, les EVs des cellules endothéliales expriment le CX3CL1 (fraktalkine) à leur surface (Brown *et al.*, 2018) et il a été décrit que l'interaction de fraktalkine avec son récepteur CX3CR1 sur la microglie assure un état de quiescence (**Figure 1.22**) (Paolicelli *et al.*, 2014).

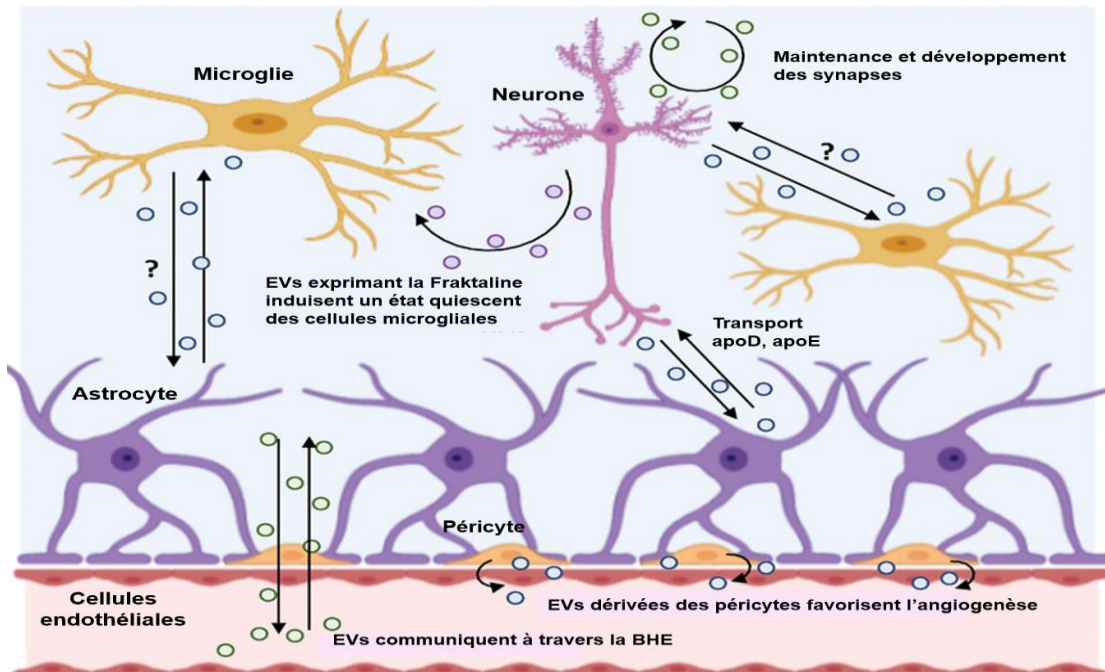


Figure 1.22 Voies de signalisations médiées par les EVs au niveau du SNC, modifiée de (Yates *et al.*, 2022b). Abréviations : BHE, barrière hémato-encéphalique ; apoD, apolipoprotéine D; apoE, apolipoprotéine E.

1.3.8.2 Les EVs dans les processus neuropathologiques

Il a été démontré, sur des cellules de neuroblastome, que les EVs peuvent renfermer des peptides qui sont impliqués dans la pathogenèse de la MA tels que l'A β (N2a) (Rajendran *et al.*, 2006), t-Tau et p-Tau T181 (cellules M1C) (Saman *et al.*, 2012), ou encore l' α -synucléine (cellules SH-SY5Y) (Emmanouilidou *et al.*, 2010) (**Figure 1.23**). Cela laisse penser que ces EVs participent à la dissémination de ces protéines toxiques et joueraient le rôle de vecteurs de propagation.

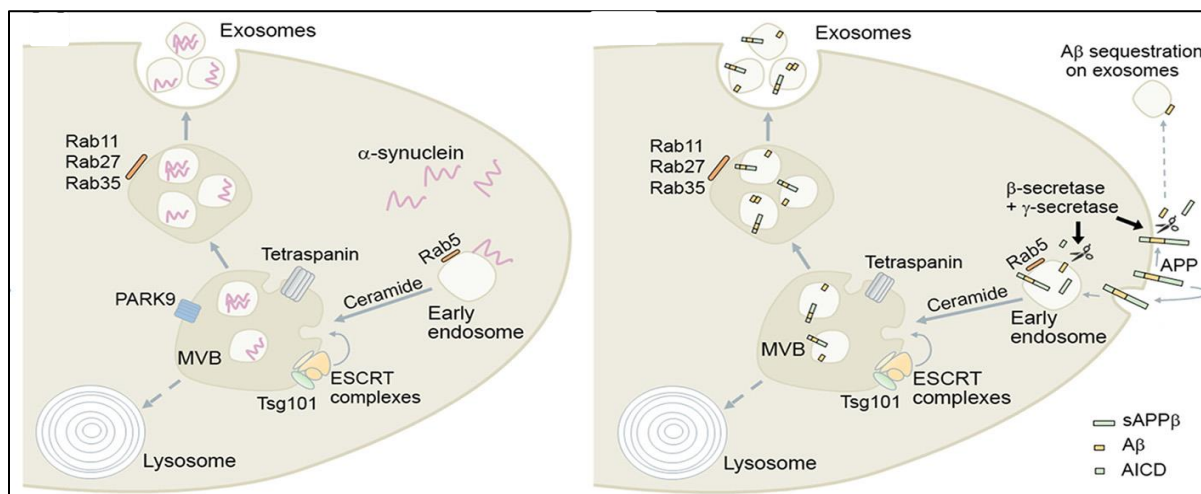


Figure 1.23 Formation des exosomes contenant des protéines associées à des maladies neurodégénératives (Howitt & Hill, 2016)

Dans ce contexte, il a été démontré que la propagation des fibrilles tau est médiée par les EVs dans des modèles murins transgéniques de la MA et d'autres modèles de vieillissement (Iba *et al.*, 2013; Ruan *et al.*, 2021). Des travaux effectués sur des EVs, dérivées de cellules IPSC isolées à partir des patients MA porteurs de la forme familiale de la maladie, ont montré que ces EVs étaient capables d'induire une pathologie tau chez des souris naïves (Aulston *et al.*, 2019). Le rôle des EVs dans la propagation d'autres protéines toxiques de la MA comme l'A β , a été aussi décrit (Eitan *et al.*, 2016; Sardar Sinha *et al.*, 2018). Le profil de miRNA des EVs permettrait aussi de distinguer entre différents types de troubles neurodégénératifs (Sproviero *et al.*, 2021).

Il est important de noter que malgré le nombre croissant des études associant les EVs aux maladies neurodégénératives (ou autres pathologies), les explications mécanistes restent encore largement à l'échelle *in vitro*. Néanmoins, les EVs seraient un réservoir de marqueurs neuropathologiques intéressants qui peuvent être utiles dans le diagnostic de la MA.

1.3.9 Les EVs : un outil de diagnostic innovant pour la MA

L'implication des EVs dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques a suscité un intérêt grandissant quant à leur utilisation comme outil diagnostique dans diverses maladies, y compris la MA. Plusieurs études cliniques, réalisées auprès de patients MCI et MA, ont rapporté la présence au niveau d'EVs périphériques de quelques marqueurs neuronaux comme l'A β 42, t-Tau, p-Tau T181, p-Tau S396 et l'APP (Jia *et al.*, 2019a; Perrotte *et al.*, 2020), des produits avancés de glycation (AGEs) comme RAGE, GLO-1, CML, méthylglyoxal et glyoxal (Haddad *et al.*, 2021; Haddad *et al.*, 2019a; Haddad *et al.*, 2019b) ou encore de marqueurs synaptiques comme GAP43, SNAP25, la synaptophysine, la synaptotagmine la synaptopodine et la neurogranine (Goetzl *et al.*, 2016; Jia *et al.*, 2021).

D'autres études menées chez des patients atteints de démence, ont pu isoler des EVs enrichies d'origine neuronale grâce à l'immunoprécipitation avec une tétraspanine dite "spécifique" aux cellules neuronales : la CD171 ou L1CAM (L1 Cell Adhesion Molecule) (Goetzl *et al.*, 2015a). Une étude réalisée sur des volontaires sains a montré que la mesure de la concentration de quelques marqueurs neuronaux (p-Tau, t-Tau, BDNF, NSE, NFL) au niveau de cette sous population d'EVs (L1CAM) donne une meilleure sensibilité par rapport aux mêmes marqueurs mesurés dans les EVs totales, le plasma ou le sérum (Mustapic *et al.*, 2017). D'autres molécules ont été utilisées pour capter les EVs provenant du cerveau comme, GLAST (astrocytes) (Goetzl *et al.*, 2018b; Noguera-Ortiz *et al.*, 2020), CSPG4 (neurones) (Goetzl *et al.*, 2019), ou encore NCAM (neurones et cellules gliales) (Jia *et al.*, 2019a). Cependant, il a été démontré que L1CAM est hautement exprimée dans d'autres tissus comme l'appareil urinaire et la peau, la CSPG4 est

présente aussi fortement dans le foie, le pancréas et le système respiratoire, GLAST est exprimée au niveau de l'oreille interne et la rétine (Lawton *et al.*, 2000) et NCAM se trouve également dans la moelle osseuse, les tissus lymphoïdes et le tractus gastrointestinal (The Human Protein Atlas, 2022). Ces données remettent en question la spécificité de ces protéines et les EVs isolées par le biais de ces protéines vis-à-vis du système nerveux.

Le **tableau 1.2** donne un aperçu général des marqueurs vésiculaires analysés au sein de plusieurs cohortes cliniques tout en précisant la nature des fluides biologiques, les techniques d'extraction utilisées ainsi que les méthodes de caractérisation.

Tableau 1.2 Liste de biomarqueurs dérivés des EVs dans le cadre de la maladie d'Alzheimer modifié de (Vandendriessche *et al.*, 2020)

Source	Cohorte	Isolation EVs	NTA	TEM	WB	Biomarqueurs	Statistique	Références
LCR	MA : 10 CTR : 10	Centrifugation différentielle	X	X	X	p-Tau	n.s.	(Wang <i>et al.</i> , 2017b)
	MA : 21 CTR : 9	UC + gradient sucrose			X	p-Tau _{T181} /t-Tau	$p = 0.04$ ↑	(Saman <i>et al.</i> , 2012)
	MA : 7 CTR : 7	Total Exosome isolation kit				miR-193b	$p < 0.05$ ↓	(Liu <i>et al.</i> , 2014)
Sérum	MA : 36 MCI : 12 CTR : 12	Total Exosome isolation kit	X	X	X	APP pT181 Tau/T-tau CTR vs MCI CTR vs. MA	AUC=0.923 ↑ AUC=1 ↑ AUC=0.823 ↑	(Perrotte <i>et al.</i> , 2020)
	MA : 30 MCI : 10 CTR : 10	Total Exosome isolation kit	X	X	X	RAGE GLO-1	n.s. AUC=0.82 ↓	(Haddad <i>et al.</i> , 2021)
	MA : 107 MCI : 101 CTR : 7	Total Exosome isolation kit	X		X	MiR-135a miR-384 miR-193b	Sens : 94-97% Spec : 86-99%	(Yang <i>et al.</i> , 2018)
	MA : 25 CTR : 17	ExoQuick + L1CAM immunoprécipitation			X	SNAP25	AUC=0.826 ↓	(Agliardi <i>et al.</i> , 2019)
Sérum/ Plasma	MA : 57 CTR : 57 FU-MA : 24	ExoQuick + L1CAM immunoprécipitation	X		X	t-Tau pS396 Tau pT181 Tau Aβ1-42	n.s. AUC=0.999 ↑	(Fiandaca <i>et al.</i> , 2015)
Plasma	MA : 10 FU-MA : 20 MCI : 20 CTR : 10	ExoQuick + L1CAM immunoprécipitation	X	X	X	pT181 Tau	AUC=1 ↑	(Winston <i>et al.</i> , 2016a)
						pS396 Tau	AUC=0.98 ↑	
						Aβ1-42	AUC=0.98 ↑	
						Neurogranine	AUC=1 ↓	
						REST	AUC=1 ↓	

	MA : 20 MCI : 20 CTR : 10	ExoQuick + L1CAM immunoprécipitation	X	X	t-Tau pT181 Tau	n.s.	(Guix <i>et al.</i> , 2018)
	MA : 12 CTR : 12 FU-MA : 9	ExoQuick + L1CAM immunoprécipitation		X	Synaptotagmine Synaptophysine Synaptopodine Neurogranine GAP43	AUC=0.99 ↓ AUC=1 ↓ AUC=0.97 ↓ AUC=0.99 ↓ AUC=0.79 ↓	(Goetzl <i>et al.</i> , 2016)
	MA : 26 CTR : 16 FU-MA : 20	ExoQuick + L1CAM immunoprécipitation		X	LAMP-1 Cathepsine D Protéines ubiquitinyllées HSP70	$p < 0.001$ ↑ AUC=1 ↑ AUC=1 ↑ AUC=1 ↓	(Goetzl <i>et al.</i> , 2015b)
	MA : 24 CTR : 14 FU-MA : 16	ExoQuick + L1CAM immunoprécipitation		X	LRP6 HSF1 REST	AUC=0.924 ↓ AUC=0.944 ↓ AUC=0.944 ↓	(Goetzl <i>et al.</i> , 2015a)
	MA : 28 CTR : 28 FU-MA : 18	ExoQuick + L1CAM immunoprécipitation		X	AMPA4 NLGN1 NRXN2 NPTX2	$P < 0.001$ ↓ $P < 0.01$ ↓	(Goetzl <i>et al.</i> , 2018a)
Plasma	MA :106 CTR :106	Immunoprécipitation avec L1CAM	X		Tau	n.s.	(Shi <i>et al.</i> , 2016)
	MA :24 CTR :24 FU-MA :15	ExoQuick + immunoprécipitation avec CSPG4	X	X	HGF FGF2 IGF1 FGF13	$p < 0.001$ ↓ $p < 0.01$ ↓	(Goetzl <i>et al.</i> , 2019)
	MA :101 MCI:96 CTR :101	ExoQuick + immunoprécipitation avec NCAM		X X	t-Tau pT181 Tau Aβ1-42	AUC=0.89 ↑ AUC=0.88 ↑ AUC=0.93 ↑	(Jia <i>et al.</i> , 2019b)
	MA : 28 CTR : 28 FU-MA : 16	ExoQuick + immunoprécipitation avec GLAST	X	X X	IL-6, IL1-β, TNFα C1q, C3b, C3d, C4b, C5b, C9, Facteur B, D, à CR1, CD46 CD59, DAF	$p < 0.01$ ↑ $p < 0.001$ ↑ $p < 0.01$ ↑ $p < 0.001$ ↓	(Goetzl <i>et al.</i> , 2018b; Nogueras- Ortiz <i>et al.</i> , 2020)

Plasma	MA :31 MCI:16 CTR :16	ExoQuick + L1CAM immunoprécipitation	X	miR-212	AUC=0.77 ↓	(Cha <i>et al.</i> , 2019)
			miR-132	AUC=0.84 ↓		
	MA :40 CTR :40		X	X	miR-100-3p	$p = 0.008$ ↓
				miR-23a-3p	$p = 0.008$ ↑	
				miR-223-3p	$p = 0.016$ ↑	
					miR-190a-5p	$p = 0.003$ ↑

Abréviations : NTA, nanoparticules tracking analysis, TEM, transmission electron microscopy; WB, western blot; MA, maladie d'Alzheimer; FU-MA, suivi des patients Alzheimer, MCI, troubles cognitifs légers; CTR, témoins, ↑ augmentation; ↓ diminution; L1CAM, L1 Cell Adhesion Molecule; GLAST, glutamate/aspartate transporter; n.s. non significatif

Les marqueurs identifiés regroupent des miRNA, des facteurs de croissance, des protéines synaptiques, des facteurs neurotrophiques, des AGEs et leurs précurseurs ou encore des protéines toxiques. Selon les différentes études rapportées dans le tableau, le plasma s'avère la source de choix pour l'identification des biomarqueurs dérivés des EVs pour la détection de la MA. D'autre part, la sensibilité des EVs enrichies d'origine neuronale semble être similaire à celle des EVs totales ouvrant le débat sur la méthodologie employée pour isoler les EVs neuronales (nEVs). Selon certaines études, nEVs ne représentent que 9.6% des EVs totaux circulant dans le sang (Mustapic *et al.*, 2017) ce qui rendrait difficile l'identification et la quantification des marqueurs potentiels.

1.4 Mise en situation

La MA est un trouble neurodégénératif, progressif et irréversible. Il s'agit d'une maladie multifactorielle causée principalement par la présence du variant *APOE* $\epsilon 4$, l'âge avancé (> 65 ans), les désordres métaboliques ainsi que d'autres facteurs environnementaux.

Actuellement, il n'existe aucun traitement curatif ni de test de dépistage entièrement fiable pour détecter la MA. L'élaboration d'un diagnostic précoce et de routine est parmi les défis majeurs de la recherche sur la MA.

Les variations pathologiques de certaines protéines au niveau de la périphérie peuvent refléter et renseigner sur les changements précoces au cours de la MA. Ces variations sont d'autant plus importantes et mieux « conservées » dans les EVs périphériques (pEVs), comme en témoigne un grand nombre d'études récentes (**voir Tableau 1.2**).

L'association entre l'utilisation des pEVs pour identifier des nouveaux biomarqueurs chez des personnes précliniques avant leur conversion à la MA tout en incluant le génotypage du variant *APOE* $\epsilon 4$, semble être une stratégie efficace pour la mise en place d'un diagnostic précoce, fiable et non invasif pour le suivi de l'apparition et la progression de la MA.

1.5 Hypothèse et objectifs

- **Hypothèse**

Notre hypothèse est que la variation d'un profil de biomarqueurs plasmatiques reliés au stress oxydant et aux processus neurotrophiques et neurodégénératifs contenus dans les pEVs permettrait de prédire l'évolution des individus CIND porteurs de l'allèle *APOE* ϵ 4 vers la démence du type Alzheimer.

- **Objectif 1**

Isoler, caractériser et analyser la distribution des pEVs dans la population d'étude.

- **Objectif 2**

Obj 2a. Étude de l'effet de l'allèle *APOE* ϵ 4 sur le contenu plasmatique et vésiculaire en protéines neurotrophiques, neuroinflammatoires et neurodégénératifs chez des individus CIND convertis à la MA (**Article 1**).

Obj 2b. Rechercher et identifier des marqueurs plasmatiques et vésiculaires liés au stress oxydatif pouvant prédire la conversion des individus CIND à la MA (**Article 2**).

- **Objectif 3**

i) Étude du rôle physiologique potentiel des EVs isolées à partir de participants sains dans la fixation et l'élimination des $\alpha\beta$, ii) identification du cargo moléculaire impliqué dans ce processus et iii) étude de l'impact des changements potentiels au niveau de ce cargo sur le développement de la MA (**Article 3**).

2 PREMIER ARTICLE

Apolipoprotein E4-driven effects on inflammatory and neurotrophic factors in peripheral extracellular vesicles from cognitively impaired not demented participants converted to Alzheimer's disease

Effets de l'apolipoprotéine E4 sur les niveaux de facteurs inflammatoires et neurotrophiques contenus dans des vésicules extracellulaires périphériques provenant de participants déficients cognitivement mais non déments convertis à la maladie d'Alzheimer

Auteurs :

Mohamed Raâfet Ben Khedher^{1,2}, Mohamed Haddad^{1,2}, Danielle Laurin^{2,3,4} Charles Ramassamy^{1,2}

¹ INRS-Centre Armand-Frappier Santé-Biotechnologie, Laval, QC, Canada,

² Institute of Nutrition and Functional Foods, Québec, QC, Canada,

³ Centre d'excellence sur le vieillissement de Québec, CHU de Québec-Université Laval Research Centre, VITAM-Centre de recherche en santé durable, Québec, QC, Canada,

⁴ Faculty of pharmacy, Laval University, Québec, QC, Canada,

Titre de la revue ou de l'ouvrage :

Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions (TRCI)

Date de soumission : 6 Juillet 2020, acceptation ou publication : 15 Novembre 2020

DOI: 10.1002/dad2.12231

Contribution des auteurs :

MRBK : Rédaction article, préparation des figures, analyses expérimentales et statistiques (50%), **MH** : Design de l'étude, analyses expérimentales (20%), **DL** : Mise à disposition du matériel biologique, correction de l'article (10%), **CR** : Correction de l'article, supervision générale de l'étude (20%).

2.1 Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the predominant form of dementia and the most common neurodegenerative disorder.¹ Advanced age and the presence of the $\epsilon 4$ allele of the apolipoprotein E gene (*APOE*) are the most relevant late-onset sporadic AD-promoting factors as they interact with the core mechanisms of this neurologic disorder.^{2,3}

ApoE is essential to modulate cerebral lipid homeostasis and neurogenesis with the apoE4 isoform promoting less efficiently the transport of essential lipids to neurons. In addition, proteolytic degradation of the amyloid beta ($A\beta$) peptide is compromised in *APOE* $\epsilon 4$ carriers, thus increasing amyloidosis and the risk of progression to AD.⁴ However, other mechanisms involving *APOE* $\epsilon 4$ in brain malfunction related to AD pathology remain to be explored.

With the lack of efficient pharmacotherapeutic options and early AD diagnosis, the challenge is now to identify preclinical AD biomarkers. In this context, subjective cognitive decline (SCD) was defined as a stage preceding mild cognitive impairment (MCI) and probably the earliest clinical sign of AD.⁵ Before the establishment of a conceptual framework for research on SCD, various terms were used in the literature to refer to intermediate states between normal cognition and dementia such as "cognitive impairment, no dementia (CIND)," "subjective cognitive concerns," "subjective cognitive impairment," "subjective memory complaint," and others.^{6,7} In addition, common techniques for AD diagnosis such as neuroimaging (magnetic resonance imaging [MRI] and positron emission tomography [PET] scan) and cerebrospinal fluid (CSF) collection are expensive, invasive, and relatively accurate, which entails the development of more cost effectiveness and valid procedures. Therefore, identification of early and novel candidate blood-based biomarkers emerges as one of the current major challenges.

Extracellular vesicles (EVs) are membrane-shedding nanoparticles that are released from different cell types as mediators of cell-to cell communication. EVs form a heterogeneous group with varying composition and metabolic fates and can transport and transfer various molecular components (eg, nucleic acids, proteins, and lipids) involved in the regulation of active signaling pathways.⁸ In brain, EVs are involved in neuron-glia interface, in neuroprotection, as well as in the dissemination of neuropathologic components (such as $A\beta$, tau) notably between the brain and periphery.^{9–11} Recently, we demonstrated an early reduction of t-tau and the amyloid precursor protein (APP) in plasma-derived EVs (pEVs) isolated from patients with MCI and found that p-tau181 and APP concentrations in pEVs were correlated to cognitive performances.¹²

Cumulative evidence suggests that the dysfunctional endosomallysosomal pathway is a prominent pathogenic mechanism in AD.^{13,14} Neuronal endosomal changes were associated with the expression of the *APOE* $\epsilon 4$ allele in humanized mouse models as well as in humans. In transgenic *APOE* $\epsilon 4$ mice brain, the analysis of the endosomallysosomal system revealed an age-dependent increase in the number and size of early endosomes with an overexpression of genes involved in the normal processing of the endocytic pathway.¹⁵ Another study reported that *APOE* $\epsilon 4$ impairs the insulin receptor trafficking by trapping it in the endosomes, leading to pathogenic cerebral insulin resistance associated with AD risk.¹⁶ Moreover, it was described that *APOE* $\epsilon 4$ expression decreases EVs production in *APOE* $\epsilon 4$ mice and in post-mortem tissue of neuropathologically healthy people.¹⁷ These data strongly suggest that *APOE* $\epsilon 4$ may alter the endosomal trafficking and affect EVs composition and production from the endosomal pathway. In this context, targeting EVs-derived biomarkers in pre-clinical AD patients carrying *APOE* $\epsilon 4$ would be an innovative strategy to disclose the increased incidence of AD among *APOE* $\epsilon 4$ carriers and could eventually be used for early AD diagnosis.

The aim of this study was to determine whether changes in plasma and in pEVs of proteins involved in a variety of functions including neuroprotection, synaptic transmission, neuroinflammation, and neurovascular homeostasis, can predict the evolution of CIND patients to AD in *APOE* $\epsilon 4$ carriers.

2.2 Méthodes

2.2.1 Study cohort

The present work was realized using data from the Canadian Study of Health and Aging (CSHA), a three-phase, 10-year multicenter longitudinal study. In CSHA-1 (1991-1992), participants were selected according to the Modified Mini-Mental State (3MS) Examination followed by a self-administered baseline risk factor questionnaire outlining the eligibility criteria (Table S1). A nurse, a physician, and a psychometrist clinically evaluated the participants. The physician and a neuropsychologist made independent preliminary diagnoses. A consensus diagnostic was thereafter reached between the two, according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Third Edition, Revised (DSM)-III-R for dementia,¹⁸ the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association criteria (NINCDS-ADRDA) for AD,¹⁹ the World Health Organization International Classification of Diseases, 10th Revision criteria (ICD-10) for vascular dementia

(VaD),²⁰ and operational criteria for Lewy body dementia.²¹ Similar recruitment and diagnostic processes were realized 5 and 10 years later in CSHA-2 (1996-97) and CSHA-3 (2001-02) respectively, according to new criteria such as the DSM, Fourth Edition, (DSM-IV) for the diagnosis of dementia and AD,²² and the National Institute of Neurological Disorders and Stroke-Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences (NINDS-AIREN) criteria to define VaD.²³ Participants who did not meet the criteria for dementia or for cognitively healthy older people were classified as CIND.

Accordingly, our study includes a convenience subsample of 24 CIND participants from CSHA-2 who were genotyped for the presence of the *APOE* ϵ 4 allele and prospectively evaluated for AD at CSHA-3. A subgroup of CIND- *APOE* ϵ 4+ participants who developed AD (CIND-AD *APOE* ϵ 4+) was further compared to age-matched healthy controls who were selected with respect to inclusion and exclusion criteria (Table S1).

All participants gave consent for use of their blood sample for subsequent analyses. This study was approved by the ethical committee at INRS (CER19-532).

2.2.1 Blood sampling

Blood samples were obtained from participants, only at CSHA-2, on the same day of the clinical assessment in EDTA collection tubes and immediately centrifuged. Plasma samples were stored at -20°C at the National Laboratory for Prion Diseases in Winnipeg and then transferred in dry ice Styrofoam boxes to Saint-Sacrement Hospital in Quebec City where they were placed at -80°C until analysis.

2.2.2 Isolation and characterization of extracellular vesicles

pEVs were extracted according to 12,24,25 and were characterized following the directive of the methodological guidelines to study EVs.²⁶

2.2.2.1 Nanoparticles tracking analysis

The Nanosight NS300 system (Malvern Panalytical instruments, Inc., UK) allows the simultaneous exploitation of absolute pEVs concentration and size range. Various pEVs suspensions were diluted in ultra-pure filtered water (1:1000) and injected under the same operating conditions: syringe flow (100), camera level (14), detection threshold (5), capture duration (60s), number of capture (3), particles per frame (30 to 80) and temperature (23.5°C). The videos were stored and analyzed by an appropriate software (NTA 3.2) that tracks and relates the rate of Brownian motion to particle size and concentration.

2.2.2.2 Transmission Electron Microscopy

EVs suspensions were fixed with 2% paraformaldehyde prior to transfer on a cast film of Formvar strengthened with a layer of evaporated carbon prepared on copper grids. Uranyl acetate (2%) was added as a negative staining reagent. Grids were washed and then analyzed using the Hitachi H-7100 TEM instruments.

2.2.2.3 Western Blot analysis

Blocked PVDF membranes containing equivalent amount of pEVs proteins (10 µg) were incubated 16 h at 4 °C with the following primary antibodies: mouse anti-tetraspanin CD63 and anti-calnexin (1:500) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) and rabbit anti-TSG101 (1:2000) (MyBiosource., USA). Membranes were then washed by 0.1% TBS-Tween and incubated 1h at room temperature with the secondary antibodies HRP-conjugated anti-mouse (1:1000) and anti-rabbit (1:2000) (Cell Signaling., Inc). Finally, membranes were stained with the enhanced chemiluminescence kit (Bio-Rad) and visualized using the ChemiDoc imaging system.

2.2.2.4 Dual immune-labeling of pEVs

Double-labeling of pEVs with the lipophilic PKH67 dye (PKH67GL-1KT, Millipore) and rabbit recombinant monoclonal TSG101 antibody conjugated to Alexa Fluor® 594 was conducted as per manufacturer's instructions. Concisely, 100 µg of pEVs were pooled with 0.25 ml of PKH67 dissolved in dilution buffer and gently mixed at room temperature for 10 min. Staining was then blocked using exosomes-depleted FBS (1/4 V/V) (Life Technologies, USA) and the reaction mixture was placed into 100 KDa filter tube (Amicon® UFC810024, Millipore) followed by centrifugation at 3000 g for 15 min. The obtained pellet was washed with PBS (1X) and supernatant was collected. The labeled pEVs fraction was further stained with fluorescent anti-rabbit TSG101 coupled with Alexa Fluor® 594 (1:500) (Cell Signaling., USA) for 1 h at 25°C. Fluorescence excess was removed by filtration and by washing with PBS. Image analysis was performed using the Zeiss LSM780 laser scanning confocal microscope.

2.2.3 Luminex assay

The pEVs protein content of BDNF, APP, NSE, NPTX-2, α-Syn, DJ-1, MMP-9, S100B, PrGN, LCN-2 and ANGPTL-4 was determined by the multiplex Luminex assay (LXSAHM-11, R&D Systems, Inc.). Similarly, the accumulation of the protein fragments Aβ₁₋₄₀, Aβ₁₋₄₂ and different forms of the protein tau (t-Tau and p-Tau₁₈₁) were evaluated by another Luminex assay (HNABTMAG-68K, Millipore-Sigma). Data were processed using an analytical software coupled

to the Luminex 100/200 machine (Xponent 4.2, USA) and results were normalized according to the total pEVs protein amount. Some values were below the limit detection which reduced the average number of participants per group but maintained adequate statistical analysis. Limit detection sensibility for the analytes is described (Supplementary Table 2).

2.2.1 Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests were used to verify normal distribution. Statistical analysis was performed by Student's unpaired t-test using the GraphPad Prism software version 6.0. Clinical and sociodemographic characteristics and correlation parameters analysis were carried out using the SPSS software (SPSS v18.0, Inc., IL, USA). The cognitive Mini-Mental State Exam (MMSE) scores derived from the 3MS examination were used to compare cognitive performance of the participants. All results were given as means \pm S.E.M and the difference was considered significant at $p < 0.05$.

2.3 Résultats

The main clinical features of the study participants are summarized in the Table S3. As a critical risk factor for AD, age was matched between groups. There were no statistical differences in terms of sex distribution, education, and MMSE scores. To refine the heterogeneity of the disease, we have stratified patients according to the absence (*APOE* $\epsilon 4^-$) and the presence (*APOE* $\epsilon 4^+$) of the *APOE* $\epsilon 4$ allele. Following the screening for dementia over a 5-year period, a subgroup of *APOE* $\epsilon 4^+$ CIND-AD participants was compared to cognitively healthy older people. The main outcome clearly demonstrates a significant difference in cognitive scores. Meanwhile, similar records were obtained for education, age, and sex ratio (Table S4).

Different methods were employed to reflect the full spectrum of EVs properties (Figure 2.1 A-G). The morphology of pEVs was cup-shaped (Figure 2.1 A) and NTA analysis showed a distribution of particles sizes ranging from 30 to 260 nm (Figure 2.1 B). Immunoblotting was used to detect specific EVs-associated proteins (CD63 and TSG101), whereas calnexin was absent (Figure 2.1 C). These results were further supported by confocal microscope imaging that clearly confirms the presence of the TSG101 marker as revealed by the merging with PKH67 fluorophore (green) and the specific TSG101 fluorescent antibody (red) (Figure 2.1 D-G).

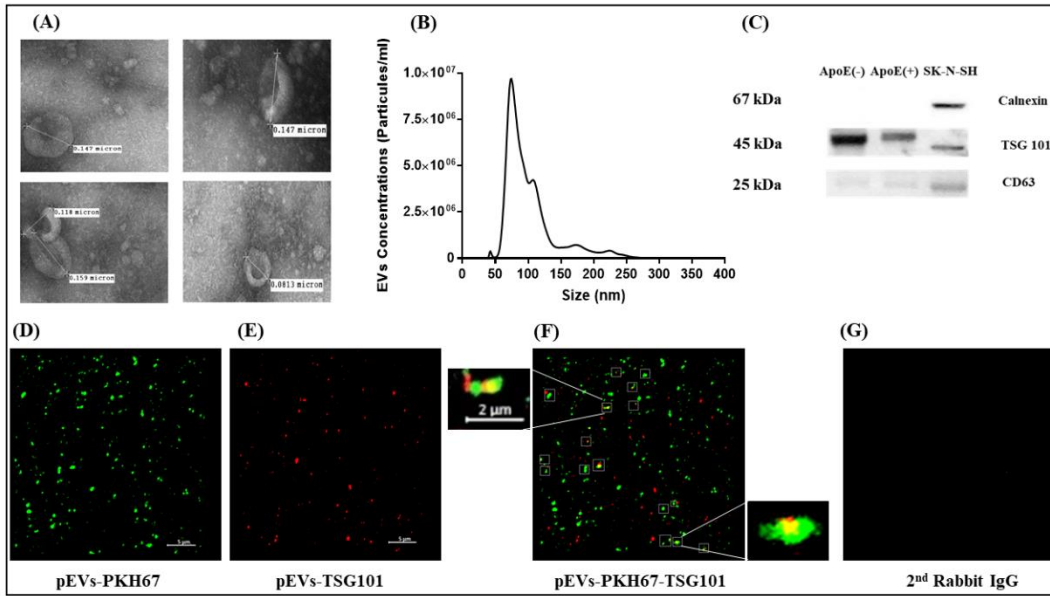


Figure 2.1 Characterization and visualization of pEVs. (A) TEM images of pEVs; magnification 40,000 (B) Analysis of the size distribution and concentration. (C) Western blotting for exosomal proteins TSG101 and CD63. (D) Confocal imaging of EVs labeled with PKH67. (E) TSG101 antibodies using Alexa Fluor 594. (F) Co-localization of PKH67 and TSG101. (G) Anti-rabbit antibodies with pEVs

An equal number of pEVs was reported between CIND- *APOE* ϵ 4- and CIND- *APOE* ϵ 4+ participants (Figure 2.2 A). Of interest, in pEVs subpopulations, the mean size was lower in *APOE* ϵ 4+ carriers than noncarriers (Figure 2.2 B). The total protein concentration in pEVs and in plasma was similar (Figure 2.2 C-D) and will be used to normalize the analyzed proteins levels.

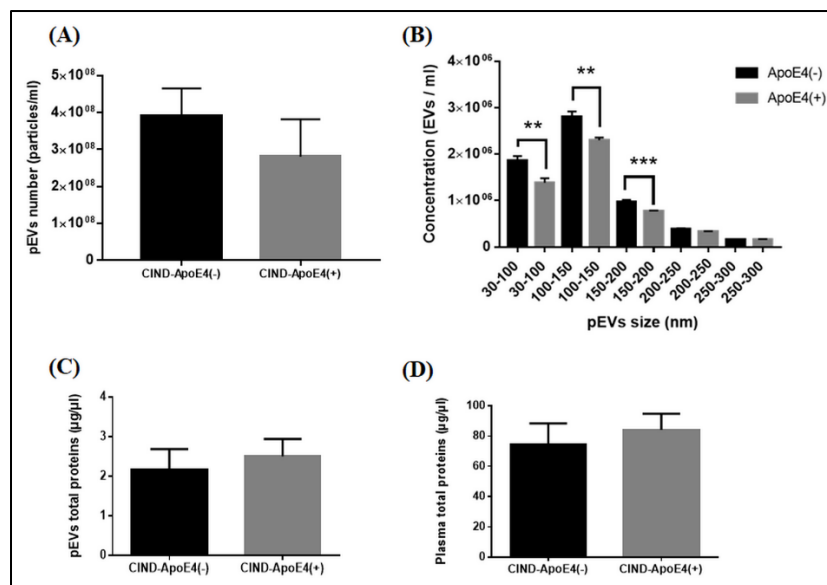


Figure 2.2 Effects of *APOE* ϵ 4 variant on pEVs and plasma characteristics. (A) Effect on pEVs number. (B) Effect on pEVs size distribution. (C) Effect on pEVs protein content. (D) Effect on plasma protein content. **P < .01, ***P < .001

The presence of APOE $\epsilon 4$ does not impact on the levels of A β 1-42, tau, and p-tau181, and the ratio A β 1-42/p-tau181 in pEVs (Figure S2.1 A-D). In addition, pEVs A β 1-40 and plasma levels were not detectable in most samples (data not shown).

The profile of inflammatory and trophic factors measured in CIND patients showed that APOE $\epsilon 4$ is associated with lower levels of neurotrophic markers such as DJ-1, PrGN, and α -Syn, with a higher discriminating capacity in pEVs compared to plasma except for α -Syn (Figure 2.3 A-F). However, there was no difference between CIND-APOE $\epsilon 4$ - and APOE $\epsilon 4$ + in pEVs and plasma levels of NSE, APP, MMP-9, and BDNF (Figure S2.2 A-D). Of note, the concentrations of DJ-1, PrGN, and NSE were lower, whereas α -Syn and APP were higher in pEVs as compared to their plasma levels.

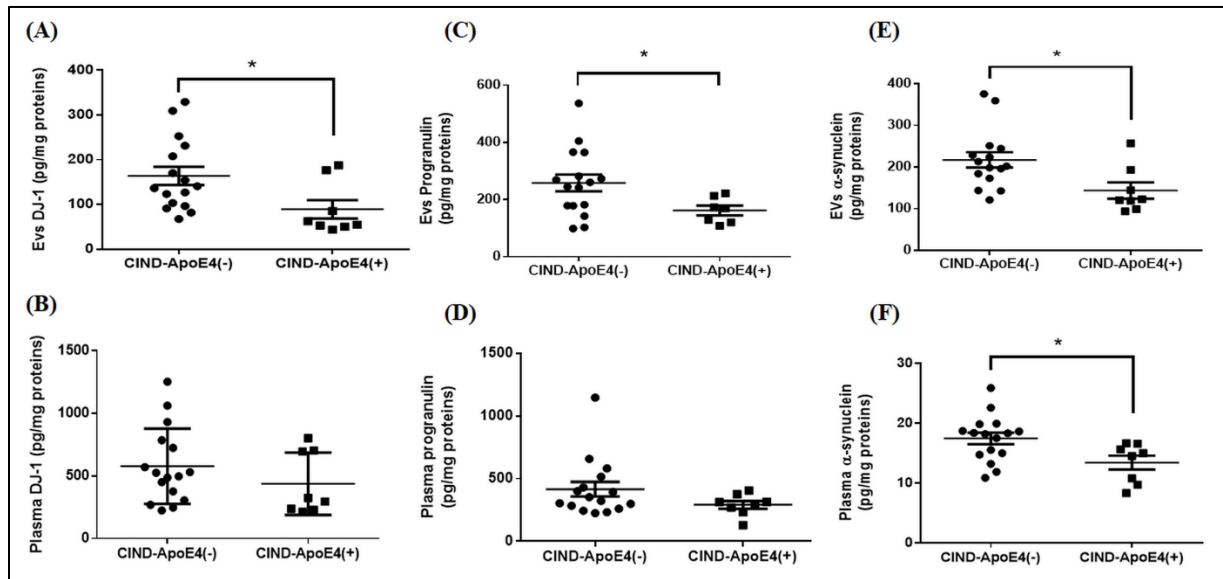


Figure 2.3 Levels of neurotrophic factors in pEVs and in plasma. Levels of DJ-1, progranulin, and α -synuclein measured in pEVs (A, C, E) and in plasma (B, D, F). Graph points indicate individual values for each participant. (-), $\epsilon 4$ non-carriers; (+), $\epsilon 4$ carriers; apoE, apolipoprotein E; CIND, cognitively impaired, no dementia; EVs, extracellular vesicles. Statistical analysis was performed using the Student's t-test for DJ-1 (EVs and plasma) and plasma α -synuclein. For progranulin (EVs and plasma) and EV α -synuclein, the Mann-Whitney test was used. Values are mean \pm SEM with * $P < 0.05$ versus CIND-ApoE4(-)

For the first time, neuroinflammatory markers (LCN-2, S100B, NPTX-2, and ANGPTL-4) were evidenced in pEVs, with the same range levels in pEVs and in plasma except for S100B, which was 100-fold higher in pEVs (Figure 2.4 A-D). In CIND-APOE $\epsilon 4$ +, LCN-2 levels were lower in plasma and in pEVs, whereas S100B, NPTX-2, and ANGPTL-4 were selectively lower in pEVs as compared to plasma (Figure 2.4 A-D).

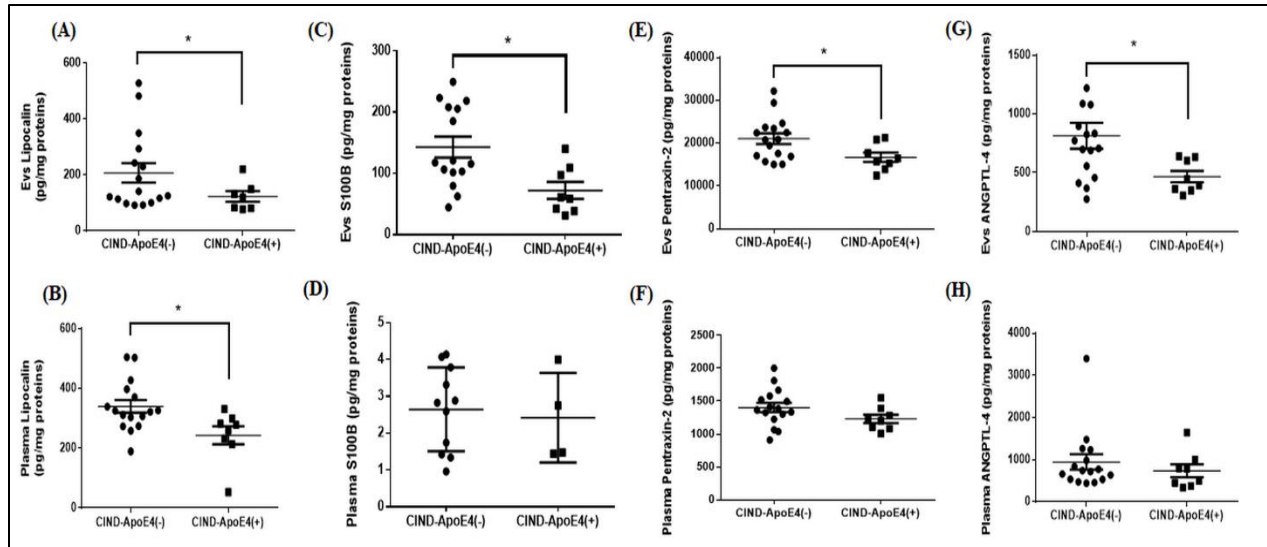


Figure 2.4 Levels of inflammatory factors in pEVs and in plasma. Levels of lipocalin, S100B, pentraxin-2, and ANGPTL-4 measured in pEVs (A, C, E, G) and in plasma (B, D, F, H). Graph points indicate individual values for every participant. (-), $\epsilon 4$ non-carriers; (+), $\epsilon 4$ carriers; apoE, apolipoprotein E; CIND, cognitively impaired, no dementia; EVs, extracellular vesicles. Statistical analysis was performed using the Student's t-test for S100B and pentraxin-2 (EVs and plasma) and plasma lipocalin and the Mann-Whitney test for ANGPTL-4 (EVs and plasma) and EVs lipocalin. Values are mean \pm SEM with *P < 0.05 versus CIND-ApoE4(-)

To further characterize the influence of the *APOE* $\epsilon 4$ variant on the changes of vesicular and plasma protein concentration, we have determined the linear regression causal relationship between the $\epsilon 4$ allele (as dependent variable), and the studied proteins (as independent variables). Accordingly, the presence of the *APOE* $\epsilon 4$ allele was negatively associated with the pEVs levels of NPTX-2, ANGPTL-4, DJ-1, S100B, and PrGN as well as the plasma level of α -Syn and LCN-2 (Table 2.1).

Table 2.1 Univariate correlation of plasma and EVs studied factors with ApoE genotype among the study population

		NPTX-2 EVs	ANGPTL-4 EVs	DJ-1 EVs	S100B EVs	PrGN EVs	α -syn Plasma	LCN-2 Plasma
ApoE	r	-0.431	-0.415	-0.444	-0.518	-0.414	-0.475	-0.487
	p	0.035*	0.044*	0.030*	0.011*	0.049*	0.019*	0.016*
	N	24	24	24	23	23	24	24

Abbreviations: EVs, extracellular vesicles; NPTX-2, pentraxin-2; ANGPTL-4, angiotensin-like 4; PrGN, progranulin; α -syn, α -synuclein; LCN-2, lipocalin-2; r, pearson correlation coefficient; p, significance (2-tailed); N, number of participants; *, p < 0.05.

Our prospective follow-up assessment revealed that among the eight CIND-*APOE* $\epsilon 4+$ individuals, five developed AD, two developed VaD, and one remained CIND 5 years later. Concerning the CIND-*APOE* $\epsilon 4-$ group, six developed mixed type of dementia, five remained CIND, four developed VaD, and one developed AD 5 years later. The same protein profile was compared between the subgroup of five CIND -AD *APOE* $\epsilon 4+$ patients and cognitively healthy older people. α -Syn level in pEVs was lower in the CIND -AD *APOE* $\epsilon 4+$ group (Figure 5A), whereas no differences were observed for other proteins (Fig. S3). Of interest, a strong correlation was observed between NPTX-2 and α -Syn levels (Figure 2.5 B) with the NPTX-2/ α -Syn ratio being higher in the CIND-AD *APOE* $\epsilon 4+$ group and negatively correlated with the MMSE scores (Figure 2.5 C-D).

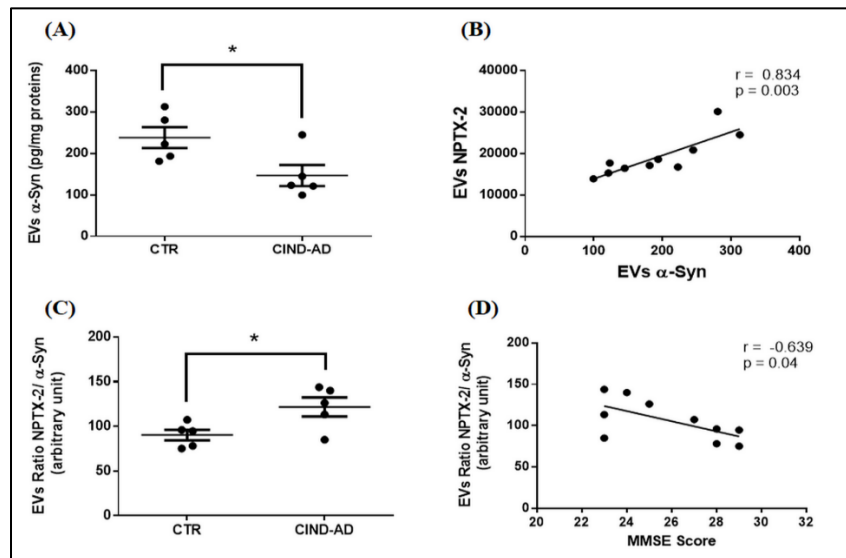


Figure 2.5 Levels and statistical correlation of pentraxin-2 and α -synuclein in pEVs with cognitive performance. (A) EVs levels of α -Syn between controls and CIND-AD patients. (B) Correlation between NPTX-2 and α -Syn levels in EVs. (C) EVs NPTX-2/ α -Syn ratio between controls and CIND-AD patients. (D) Correlation between EVs NPTX-2/ α -Syn ratio and MMSE score. Graph points indicate individual values for every participant. CIND-AD, cognitively impaired, no dementia-Alzheimer's disease; CTR, controls; EVs, extracellular vesicles; NPTX-2, pentraxin-2; p, significance (Student t test); r, Pearson correlation coefficient; α -Syn, α -synuclein. The correlation coefficient (r) and P values were determined using Pearson correlation. Statistical analysis was performed using the student's t-test. Values are mean \pm SEM.

2.4 Discussion

The inheritance of the *APOE* $\epsilon 4$ is the most important genetic risk factor associated with late-onset AD and the major genetic predictor of sporadic AD progression, especially in patients with amnesic MCI.²⁷ To gain a thorough understanding of the role of *APOE* $\epsilon 4$ in AD susceptibility, we sought to determine its effects on the pEVs' cargo proteins and in plasma from CIND participants.

We found that the presence of *APOE* $\epsilon 4$ did not affect the total density of pEVs. However, CIND-*APOE* $\epsilon 4$ participants released fewer pEVs in the range of 30 to 200 nm, which typically corresponds to EVs formed by an endosomal route.²⁸ The endocytic pathway plays an important role in $A\beta$ production, apoE function, and exosomes biogenesis. In brain, Cataldo et al. demonstrated that alteration of the endocytic pathway occurs very early intraneuronally, preceding $A\beta$ deposition and AD neuropathological hallmarks.²⁹ In line with these intraneuronal changes, alteration of the endocytic pathway leads to decreased release of EVs in AD brain from *APOE* $\epsilon 4$ carriers.¹⁷ Our results demonstrated that in periphery, pEVs release was lower up to 5 years before the clinical onset of AD, before changes in neuropathogenic proteins ($A\beta$ and tau) in pEVs. Altogether these results demonstrated that in *APOE* $\epsilon 4$ carriers, EVs production was compromised very early in brain and in the periphery.

The impact of *APOE* $\epsilon 4$ on both pEVs number and protein cargo could be explained by pEVs enrichment in lipids.³⁰ EVs biogenesis depends largely on the interaction between the endosomal sorting complex required for the transport (ESCRT) and the membrane-associated lipids (mainly cholesterol, sphingolipids, and ceramides).⁸ Considering that the primary function of apoE is to transport cholesterol laden lipids that are essential to cell membrane structure and that *APOE* $\epsilon 4$ functions less efficiently than the *APOE* $\epsilon 3$ and *APOE* $\epsilon 2$ variants in this process,³¹ suggest that *APOE* $\epsilon 4$ affect EVs formation and budding. Therefore, the pathophysiological crosstalk between *APOE* $\epsilon 4$ and the endosomal system could result in abnormal changes such as small particle size formation and selective protein processing in pre-AD *APOE* $\epsilon 4$ carriers.

In CIND- *APOE* $\epsilon 4+$ participants, we found significant differences in trophic and inflammatory proteins in pEVs, which indicates early alteration of the pEVs cargo proteins and suggests an early reduction of cells to disseminate components by the endosomal-lysosomal mechanism. Recently, we demonstrated that these proteins are released from neuronal-derived EVs under stress conditions.²⁴ Because EVs were suggested to shuttle from the brain to the bloodstream by crossing the multiple layers of the blood-brain barrier,³² the pattern of these proteins in pEVs could be an indicator of the modifications of the inflammatory and neurotrophic status in the brain from CIND participants. In this context, a growing number of studies are focusing on isolating and analyzing the protein signature of plasma EVs enriched from brain origin. Of interest, some synaptic and neurotrophic proteins, as in our pEVs, were found to be altered in neuronal-derived EVs.^{32,33} However, the brain specificity of these EVs was based on the immunoreactivity of EVs surface marker proteins (specifically L1CAM), which are highly expressed in the CNS but also present in other peripheral cell types. Additional research efforts are needed to optimize methods

that enable high-yield capture of enriched brain EVs. Moreover, cumulative evidence now relates metabolic disorders to sporadic AD onset and can promote disease progression.³⁴ Hence, pEVs content might be relevant to disclose the role of systemic disorders in cerebral pathologies.

Our results revealed that some selected proteins (α -Syn, NPTX-2, S100B) were enriched in pEVs as compared to plasma and that pEVs displayed higher sensibility to detect protein variations, which suggest their use instead of plasma to reflect systemic changes. This is probably due to the presence of lipid bilayer membrane that surrounds and protects pEVs contents from the degradation by enzymes (ie, proteases), red blood cells, or liver and thus preserves them as a source of pathological and physiological information.

It was reported that NPTX-1 was increased in plasma from MCI, which progressed to early AD as well as in brain and plasma from E4FAD mice (*APOE* $\epsilon 4/\epsilon 4$ / FAD+/-) following an infusion of A β oligomers.³⁵ In pEVs, we did not observe any difference in NPTX-2 level between healthy participants and CIND-AD, which confirms that NPTX-2 is increased only in the presence of an overexpression of A β ,³⁶ which was not observed in CIND-AD participants.

Misfolded proteins such as α -Syn may spread through exosomes in the brain.³⁷ However, these pathological features are not limited to the brain; they can also be found in CSF. CSF α -Syn levels were also associated with AD risk in preclinical and MCI individuals ^{38,39} and were increased in *APOE* $\epsilon 4$ MCI patients who progressed to AD.⁴⁰ pEVs α -Syn could also be released by red blood cells, which highly expressed α -Syn ⁴¹ and was found to be lower in *APOE* $\epsilon 4$ Adpatients.⁴² For the first time, we have evidence of the presence of α -Syn in pEVs. In contrast to its CSF level, it is reduced in pEVs from CIND-*APOE* $\epsilon 4+$ and from CIND-AD*APOE* $\epsilon 4+$, indicating that its reduction in pEVs is observed up to 5 years before the clinical onset of AD. The observed decrease of the soluble form (monomers) could be related to an intracellular accumulation of α -Syn in form of aggregates (polymeric forms). This finding is relevant, since experimental evidence has further linked α -Syn accumulation to intracellular aggregation and hyperphosphorylation of tau ⁴³ and also to the over production of A β via specific molecular interactions with presenilin 1.⁴⁴ Moreover, it has been suggested that apoE may be involved in the distribution of α -Syn between the extracellular and intracellular matrix and that the *APOE* $\epsilon 4$ variant specifically reduces α -Syn uptake.⁴⁵ These results underlie some biological processes that could explain the conversion of CIND patients to AD among *APOE* $\epsilon 4$ carriers.

A-Syn is a presynaptic protein that controls exocytosis at various neurotransmitter systems in the brain by managing synaptic vesicles fusion, release, and recycling.⁴⁶ NPTX-2 binds and induces clustering of postsynaptic ionotropic AMPA-type glutamatergic receptors to regulate synaptic

plasticity and to maintain long-term potentiation.^{47,48} Thus both synaptic proteins work simultaneously to ensure enhanced neuronal flux transmission. Our results suggest also that the NPTX-2/ α -Syn ratio measured in pEVs allows an accurate classification of CIND participants that convert to AD. This ratio was related to the presence of the *APOE* ϵ 4 allele and correlated with the MMSE scores. Taking into consideration that early memory decline in AD is attributed to synaptic loss,^{49,50} this ratio may therefore be indicative of altered synaptic function and may reflect the extent of cognitive impairment between preclinical and clinical AD stages. Because it is broadly recommended in biomarker analysis to consider a combination of markers to obtain more informative data, the present ratio could provide a better sensibility assessment for early AD diagnosis.

2.5 Conclusion

This study provides comprehensive insight and enhances our knowledge of the emerging role of *APOE* ϵ 4 in abnormal pEVs cargo proteins processing and the identification of blood-based biomarkers. The measurement of ratio between NPTX-2 and α -Syn in pEVs might be an innovative strategy for monitoring the conversion of CIND patients to AD. However, it is important to note that the assessment of these markers only at the CIND stage might be insufficient to establish a solid pathological linkage. This implies the need to explore this ratio also in CIND patients after their conversion to AD in order to validate a cause-and-effect relationship. Another potential limitation of this study is the time span between plasma provision and marker assessment. In fact, plasma storage conditions can affect the level of some proteins, which tend to change when samples are frozen or exposed to different storage temperatures. However, the fluctuation of protein levels between different groups due to storage is limited because all of our plasma samples were kept in the same conditions. In addition, the sample size is adequate for statistical analysis but not large enough for epidemiological considerations. Therefore, these results require additional studies with larger samples of participants selected from the general population to establish this novel synapse-derived ratio as a reliable biomarker to anticipate AD and an extensive analysis of pEV protein content with regard to the role of the *APOE* ϵ 4 variant.

3 BIBLIOGRAPHIE 1^{ER} ARTICLE

1. 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2020;16(3):391-460.
2. Edwards Iii GA, Gamez N, Escobedo G Jr, Calderon O, Moreno- Gonzalez I. Modifiable risk factors for Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.* 2019;11:146-146.
3. Mattsson N, Groot C, JansenWJ, et al. Prevalence of the apolipoprotein E ϵ 4 allele in amyloid β positive subjects across the spectrum of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2018;14(7):913-924.
4. de Oliveira FF, Chen ES, Smith MC, Bertolucci PHF. Selected LDLR and APOE polymorphisms affect cognitive and functional response to lipophilic statins in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci.*2020;70(10):1574-1588.
5. Jessen F, Amariglio RE, Buckley RF, et al. The characterisation of subjective cognitive decline. *Lancet Neurol.* 2020;19(3):271-278.
6. Jessen F, Amariglio RE, van Boxtel M, et al. A conceptual framework for research on subjective cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2014;10(6) :844-852.
7. Lyketsos CG, Toone L, Tschanz JA, et al. Population-based study of medical comorbidity in early dementia and "Cognitive Impairment, No Dementia (CIND)": association with functional and cognitive impairment: the cache county study. *Am J Geriat Psychiat.* 2005;13(8):656-664.
8. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(4):213-228.
9. Sardar Sinha M, Ansell-Schultz A, Civitelli L, et al. Alzheimer's disease pathology propagation by exosomes containing toxic amyloidbeta oligomers. *Acta Neuropathol.* 2018;136(1):41-56.
10. Skog J, Würdinger T, vanRijn S, et al. Glioblastomamicrovesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.* 2008;10(12):1470-1476.
11. You Y, Ikezu T. Emerging roles of extracellular vesicles in neurodegenerative disorders. *Neurobiology of Disease.* 2019;130:104512.
12. Perrotte M, Haddad M, Le Page A, Frost EH, Fulöp T, Ramassamy C. Profile of pathogenic proteins in total circulating extracellular vesicles in mild cognitive impairment and during the progression of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2020;86:102-111.
13. de la Monte SM, Tong M. Brain metabolic dysfunction at the core of Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol.* 2014;88(4):548-559.
14. Mathews PM, Levy E. Exosome production is key to neuronal endosomal pathway integrity in neurodegenerative diseases. *Front Neurosci.* 2019;13 :1347.
15. Nuriel T, Peng KY, Ashok A, et al. The Endosomal-lysosomal pathway is dysregulated by APOE4 expression in vivo. *Front Neurosci.* 2017;11 :702-702.
16. Zhao N, Liu C-C, Van IngelgomAJ, et al. Apolipoprotein E4 impairs neuronal insulin signaling by trapping insulin receptor in the endosomes. *Neuron.* 2017;96(1) :115-129 e5.
17. Peng KY, Pérez-González R, Alldred MJ, et al. Apolipoprotein E4 genotype compromises brain exosome production. *Brain.* 2018;142(1):163-175.9.
18. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-III-R.* 3rd ed. Washington DC: American Psychiatric Association; 1987.
19. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDSADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology.* 1984;34(7):939-944.
20. World Health Organization. Tenth revision of the International Classification of Diseases, draft of chapter V, categories F00-F99, mental, behavioural and developmental disorders. In: *Clinical Descriptions and Diagnostic Guidelines.* Geneva:World Health Organization; 1987.

21. McKeith IG, Perry RH, Fairbairn AF, Jabeen S, Perry EK. Operational criteria for senile dementia of Lewy body type (SDLT). *Psychol Med.* 1992;22(4):911-922.
22. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-IV.* 4th ed. Washington DC: American Psychiatric Association; 1994.
23. Román GC, Tatemichi TK, Erkinjuntti T, et al. Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies. Report of the NINDS-AIREN International Workshop. *Neurology.* 1993;43(2):250-260.
24. Haddad M, Perrotte M, Khedher MRB, et al. Methylglyoxal and glyoxal as potential peripheral markers for MCI diagnosis and their effects on the expression of neurotrophic, inflammatory and neurodegenerative factors in neurons and in neuronal derived-extracellular vesicles. *Int J Mol Sci.* 2019;20(19):4906.
25. Haddad M, Perrotte M, Landri S, Lepage A, Fulop T, Ramassamy C. Circulating and extracellular vesicles levels of N-(1-Carboxymethyl)-L-lysine (CML) differentiate early to moderate Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2019;69(3):751-762.
26. Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, et al. Methodological guidelines to study extracellular vesicles. *Circ Res.* 2017;120(10):1632-1648.
27. Scarabino D, Broggio E, Gambina G, Maida C, Gaudio MR, Corbo RM. Apolipoprotein E genotypes and plasma levels in mild cognitive impairment conversion to Alzheimer's disease: a follow-up study. *Am J Med Genet.* 2016;171(8):1131-1138.
28. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013;200(4):373-383.
29. Cataldo AM, Peterhoff CM, Troncoso JC, Gomez-Isla T, Hyman BT, Nixon RA. Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. *Am J Pathol.* 2000;157(1):277-286.
30. Dinkins MB, Wang G, Bieberich E. Sphingolipid-enriched extracellular vesicles and Alzheimer's disease: a decade of research. *J Alzheimers Dis.* 2017;60(3):757-768.
31. Bu G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10(5) :333-344.
32. Mustapic M, Eitan E, Werner JK Jr, et al. Plasma extracellular vesicles enriched for neuronal origin: a potential window into brain pathologic processes. *Front Neurosci.* 2017;11 :278.
33. Goetzl EJ, Kapogiannis D, Schwartz JB, et al. Decreased synaptic proteins in neuronal exosomes of frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *FASEB J.* 2016;30(12):4141-4148.
34. Wang J, Gu BJ, Masters CL, Wang YJ. A systemic view of Alzheimer disease—insights from amyloid- β metabolism beyond the brain. *Nat Rev Neurol.* 2017;13(10) :612-623.
35. Ma QL, Teng E, Zuo X, et al. Neuronal pentraxin 1: a synaptic-derived plasma biomarker in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 2018;114:120-128.
36. Abad MA, Enguita M, DeGregorio-Rocasolano N, Ferrer I, Trullas R. Neuronal pentraxin 1 contributes to the neuronal damage evoked by amyloid- β and is overexpressed in dystrophic neurites in Alzheimer's brain. *J Neurosci.* 2006;26(49) :12735-12747.
37. Zheng T, Pu J, Chen Y, et al. Plasma exosomes spread and cluster around β -Amyloid plaques in an animal model of Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.* 2017;9:12.
38. Berge G, Sando SB, Albrektsen G, et al. Alpha-synuclein measured in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, or healthy controls: a two year follow-up study. *BMC Neurol.* 2016;16(1):180.
39. Vergallo A, Bun R-S, Toschi N, et al. Association of cerebrospinal fluid alpha-synuclein with total and phospho-tau181 protein concentrations and brain amyloid load in cognitively normal subjective memory complainers stratified by Alzheimer's disease biomarkers. *Alzheimers Dement.* 2018;14(12) :1623-1631.

40. Twohig D, Rodriguez-Vieitez E, Sando SB, et al. The relevance of cerebrospinal fluid alpha-synuclein levels to sporadic and familial Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2018;6(1) :130.
41. Barbour R, Kling K, Anderson JP, et al. Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood. *Neurodegener Dis.* 2008;5(2): 55-59.
42. Baldacci F, Daniele S, Piccarducci R, et al. Potential diagnostic value of red blood cells α -synuclein heteroaggregates in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* 2019;56(9):6451-6459.
43. Waxman EA, Giasson BI. Induction of intracellular tau aggregation is promoted by α -synuclein seeds and provides novel insights into the hyperphosphorylation of tau. *J Neurosci.* 2011;31(21):7604-7618.
44. Winslow AR, Moussaud S, Zhu L, et al. Convergence of pathology in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease: a role for the novel interaction of alpha-synuclein and presenilin 1 in disease. *Brain.* 2014;137(Pt 7):1958-1970.
45. Ogaki K, Martens YA, Heckman MG, et al. Multiple system atrophy and apolipoprotein E. *Mov Disord.* 2018;33(4):647-650.
46. Ghiglieri V, Calabrese V, Calabresi P. Alpha-synuclein: from early synaptic dysfunction to neurodegeneration. *Front Neurol.* 2018;9:295.
47. Dong Z, Han H, Li H, et al. Long-term potentiation decay and memory loss are mediated by AMPAR endocytosis. *J Clin Invest.* 2015;125(1):234-247.
48. Elbaz I, Lerer-Goldshtein T, Okamoto H, Appelbaum L. Reduced synaptic density and deficient locomotor response in neuronal activity-regulated pentraxin 2a mutant zebrafish. *FASEB J.* 2015;29(4):1220-1234.
49. Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science.* 2002;298(5594) :789-791.
50. Xiao M-F, Xu D, Craig MT, et al. NPTX2 and cognitive dysfunction in Alzheimer's Disease. *eLife.* 2017;6 :e23798.

Lien entre l'article précédent et le suivant :

Dans les études visant à identifier des biomarqueurs, il est largement recommandé d'envisager une combinaison de marqueurs pour obtenir des données plus informatives. Ainsi, on a décidé d'élargir le spectre de recherche sur les biomarqueurs potentiels de la MA afin d'établir un profil qui reflètera mieux la progression de la maladie.

Dans cette perspective, nous nous sommes intéressés aux marqueurs liés au stress oxydatif, un phénomène qui se produit très tôt dans la MA. D'autre part, le SO est un dénominateur commun aux différentes hypothèses établies autour de la MA ce qui fait de lui un candidat solide pour l'exploration de nouveaux biomarqueurs (**Figure 2.6**). L'effet de la présence du variant *APOE ε4* sur la régulation des marqueurs oxydatifs sera aussi traité et nous donnera une idée sur l'étendue des effets de ce variant sur les mécanismes susceptibles d'augmenter le risque de la MA (autres que ceux décrits dans le 1^{er} article).

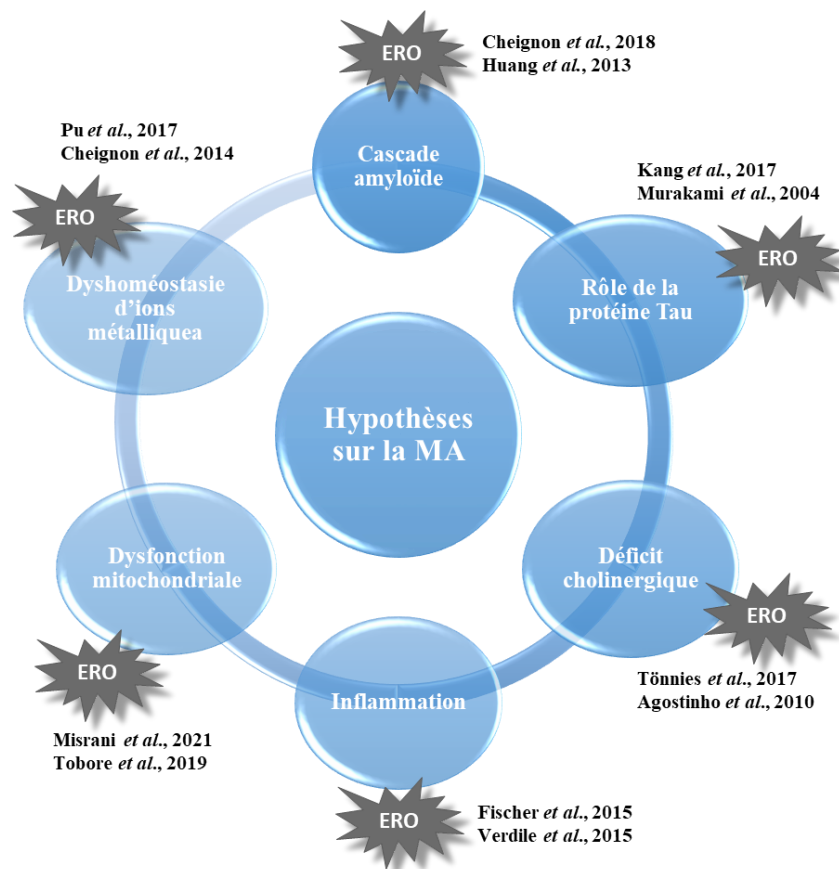


Figure 2.6 Association entre le stress oxydatif et les différentes composantes impliquées dans le risque de la maladie d'Alzheimer. MA, maladie d'Alzheimer; ERO, espèces réactives d'oxygène. Illustration personnelle.

4 DEUXIÈME ARTICLE

Effect of APOE ϵ 4 allele on levels of apolipoproteins E, J, and D, and redox signature in circulating extracellular vesicles from cognitively impaired with no dementia participants converted to Alzheimer's disease

Effets de l'allèle APOE ϵ 4 sur les niveaux des apolipoprotéines E, J et D et la signature oxydative contenus dans des vésicules extracellulaires périphériques provenant de participants déficients cognitivement mais non déments convertis à la maladie d'Alzheimer

Mohamed Raâfet Ben Khedher^{1,2}, Mohamed Haddad^{1,2}, Danielle Laurin^{2,3,4} Charles Ramassamy^{1,2}

¹ INRS-Centre Armand-Frappier Santé-Biotechnologie, Laval, QC, Canada,

² Institute of Nutrition and Functional Foods, Québec, QC, Canada,

³ Centre d'excellence sur le vieillissement de Québec, CHU de Québec-Université Laval Research Centre, VITAM-Centre de recherche en santé durable, Québec, QC, Canada,

⁴ Faculty of pharmacy, Laval University, Québec, QC, Canada,

Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring (DADM)

Date de soumission : 3 May 2021, acceptation ou publication : 15 Juillet 2021

DOI: 10.1002/dad2.12231

Contribution des auteurs :

MRBK : Rédaction article, préparation des figures, analyses expérimentales et statistiques (50%), **MH** : Design de l'étude, analyses expérimentales (20%), **DL** : Mise à disposition du matériel biologique, correction de l'article (10%), **CR** : Correction de l'article, supervision générale de l'étude (20%).

4.1 Introduction

Alzheimer's disease (AD) is an age-related brain disorder and the leading cause of dementia worldwide. People with AD display an altered cognitive performance associated with gradual memory loss.¹ Despite remarkable breakthroughs in the understanding of the disease and globalized research efforts, no early evidence-based diagnosis or effective treatment therapies are yet available.²

Apolipoprotein E (*APOE*) ϵ 4 allele is the most important predictor factor, besides age, of subsequent progression to AD.³ Remarkable ethnicity-specific effects of *APOE* ϵ 4 on AD risk were reported and it is suggested that *APOE* ϵ 4-related cognitive impairment is racial dependent.^{4,5} The apoE protein, mainly produced by liver parenchymal cells, is fundamental to maintain lipoproteins' structural integrity and to promote their solubilization in blood circulation.⁶ However, other tissues and organs synthesize significant amounts of apoE, most prominently the brain where apoE is essential to modulate cerebral homeostasis by managing lipid transport and the efflux of key moieties through the blood-brain barrier (BBB).⁷ Among the nine apolipoproteins synthesized in the central nervous system (CNS), apoE, apoJ, and apoD are the most abundant and there is evidence that some of the key neuroprotective processes including the clearance of neurotoxic amyloid beta peptide and the management of oxidative stress are regulated in a cooperative manner among these apolipoproteins.^{8,9} Although the relationships among apoE, J, and D proteins and brain function is well documented, the precise pathological implication of *APOE* ϵ 4 in apolipoprotein regulation and AD risk remains elusive.

The complex pathophysiology of AD prevents the establishment of well-defined and clear causes of the disease. Nonetheless, there is a broad recognition of the role of oxidative stress in AD etiopathogenesis because it is associated with cellular and molecular abnormalities observed in AD such as senile plaque formation,¹⁰ hyperphosphorylation of tau protein,¹¹ decreased synaptic plasticity,¹² neuroinflammation,¹³ and loss of mitochondrial function.¹⁴

Mounting evidence from studies in cell lines, transgenic animals, and humans now relate *APOE* ϵ 4 to higher oxidative insults in AD. The degree of oxidative brain damage was strongly associated with the ϵ 4 allele rather than the ϵ 3 and ϵ 2 isoforms in AD patients.⁶ Our previous work showed increased lipid peroxidation associated with lower glutathione levels and reduced activities of glutathione peroxidase and catalase in the hippocampus and frontal cortex of *APOE* ϵ 4 AD patients compared to *APOE* ϵ 3 patients, further suggesting a higher impact of the *APOE* ϵ 4 variant on redox-mediated brain damage.^{15,16} Moreover, data from *APOE* knock-out and human *APOE*

targeted replacement mice studies suggest that *APOE* $\epsilon 4$ -mediated neurotoxicity is an early event in AD pathology.^{17,18}

Interestingly, several studies showed that many blood-based oxidative stress biomarkers are consistent with oxidative brain changes and AD risk.^{19,20} Given that oxidative stress is one of the earliest pathological manifestations in AD and that brain oxidative damage could be extended to the blood compartment, the analysis of circulating oxidative stress markers among pre-AD *APOE* $\epsilon 4$ carriers could be a useful strategy in early AD diagnosis and monitoring.

Extracellular vesicles (EVs) form a heterogeneous group of nanoparticles that differ in size, biogenesis process, cellular origin, and biophysical properties.²¹ Exosomes (50 to 150 nm) and microvesicles (50 to 500 nm) are released from healthy or experimentally induced cells, whereas apoptotic bodies (up to 1 μM) are generated after cell death.²¹ EVs produced from normal cell processing are loaded with a variety of molecular constituents that are believed to maintain vital processes such as cell-to-cell communication.²² Also, it is suggested that EVs could cross the BBB from the bloodstream to the CNS and vice versa,^{23,24} which implies that circulating EVs (cEVs) may cause and/or reflect a possible alteration in the CNS. In this regard, cumulative clinical evidence supports the reliability of blood EV-based biomarkers in AD diagnosis.^{22,25,26} Our previous works have shown that cEVs' protein cargo provided a fair classification between mild cognitive impairment (MCI) and AD patients,²⁷ predicted the conversion of cognitively impaired-not demented (CIND) patients to AD,²⁸ and was able to differentiate early and moderate AD stages.²⁹ Moreover, we have demonstrated that some neurotrophic and inflammatory factors measured in cell neuronal-derived EVs (nEVs) are regulated differently under stress treatment.³⁰ To provide a comprehensive insight into the potential interaction between *APOE* $\epsilon 4$ variant and oxidative stress state in early AD development, our study aims to (1) determine a profile of redox factors measured in plasma and in cEVs that can predict the progression of participants in preclinical stages of dementia to AD, and (2) evaluate the impact of the presence of *APOE* $\epsilon 4$ on stress regulation and AD risk.

4.2 Methods

4.2.1 Participants and data source

Data were taken from the Canadian Study of Health and Aging (CSHA), a multiphase, longitudinal, population-based cohort study of the epidemiology of dementia in Canada. Women and men aged 65 years and over were randomly selected from urban and surrounding rural areas

in all Canadian provinces. Information on risk factors was collected using a self-administered questionnaire (see Table S1 in supporting information).

Participants were clinically evaluated in CSHA-1 (1991–1992) by a nurse, a physician, and a neuropsychologist, and a consensus diagnosis was reached between the physician and the neuropsychologist according to the published criteria of Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 3rd Edition, Revised (DSM-III-R) for dementia, the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke–Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) for AD, and the International Classification of Disease, 10th Edition (ICD-10) for vascular dementia (VaD).²⁸ Updated diagnostic criteria were used in CSHA-2 (1996–1997) and CSHA-3 (2001–2002) for dementia and AD (DSM-IV) and VaD (National Institute of Neurological Disorders and Stroke–Association Internationale pour la Recherche et l’Enseignement en Neurosciences).²⁸ Participants with cognitive impairment, but who failed to meet the standardized criteria for dementia, were classified as CIND. In CSHA, CIND was a clinical entity referring to a potentially reversible condition between normal cognition and dementia, which accordingly, differs from the MCI state and tends to describe the pre-dementia stages and the preclinical aspects of the disease.^{28,31}

In the present nested case-control study, we selected from the CSHA-2 blood bank 15 participants clinically diagnosed with CIND who converted 5 years later in CSHA-3 to AD-dementia (CIND-AD). These CIND-AD cases were age-matched with 21 controls clinically evaluated with no cognitive impairment at CSHA-2 and who remained as such in CSHA-3, with respect to inclusion and exclusion criteria (see Table S1). All participants were genotyped for the presence of *APOE* $\epsilon 4$ allele based on the method of Zivelin et al. (see Table S2 in supporting information).³² Plasma samples collected at CSHA-2 were used for cEVs isolation and all parameters analysis.

An informed written consent was filled out by participants prior to enrollment to the study. All procedures were approved by the INRS-IAFSB ethics committee (CER19-532).

4.2.2 Isolation and characterization of extracellular vesicles

The isolation of cEVs was assessed as described in our previous works,^{27,29,30} and characterized according to the last methodological guidelines to study EVs.³³

4.2.2.1 Nanoparticles tracking analysis

The NanoSight NS300 system (Malvern Panalytical Inc.) was used to determine the concentration and size distribution of cEV preparations. Isolated non-lysed cEVs were diluted (1/1000) in filtered milli-Q® water before injection. All measurements were conducted under uniform and synchronized conditions. The video images were analyzed using the NanoSight NTA 3.2 analytical software.

4.2.2.2 Transmission electron microscope

The morphology of isolated cEVs was analyzed using the Hitachi H-7100 transmission electron microscope. To ensure minimal spectral changes, samples were fixed with 2% paraformaldehyde for 5 minutes and then placed on a copper grid with carbon-coated formvar film. The grid was incubated with 2% uranyl acetate (w/v) and excess solution was removed by blotting. Finally, cEVs were observed using a 40000X magnification at 75 kV.

4.2.2.3 Western blot analysis of EVs markers

To analyze vesicular cargo, isolated cEVs were lysed with RIPA buffer (5mMEDTA, 50mMTris buffer, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 150mM sodium chloride, 1% sodium deoxycholate, and 1% Igepal) mixed with phosphatase and protease inhibitors (1:100% v/v). cEV lysate proteins were then transferred into polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes and incubated with the following label primary antibodies: mouse anti-calnexin (1/500; Sc-23954, Santa Cruz Biotechnology, SCBT), mouse anti-tetraspanin CD63 (1/500; Sc-5275, SCBT), mouse anti-Iba1 (1/500; sc-32725, SCBT), mouse anti-GFAP (1/1000; HPA056030, Sigma), and rabbit anti-TSG101 (1/2000; MBS7605273, MyBiosource). Membranes were then washed and incubated with respective immunoglobulin G (IgG) horseradish peroxidase (HRP)-linked secondary antibodies: anti-mouse (1/1000; 7076S, Cell Signaling Technology, SCT) and anti-rabbit (1/2000; 7074S, SCT). The enhanced chemiluminescence (ECL) substrate kit (Bio-Rad) was used for immunoblot detection and signal analysis was carried out using the ChemiDoc imaging system.

4.2.3 Plasma total antioxidant capacity

Plasma total antioxidant capacity (TAC) was measured by the free radical analyzer Apollo 4000 (World Precision Instruments). The hydrogen peroxide (H₂O₂) sensor was used to estimate the real-time and direct quantitative measurement of degraded H₂O₂ by plasma samples. A calibration

curve was generated according to a linear response of the H₂O₂ electrode upon the addition of different amounts of H₂O₂ (H1009, Millipore). Sample analysis was preceded by adding 255 µg of plasma proteins to 2 mL of PBS (1X, pH7.4) followed by the injection of 2 µmol of H₂O₂ once the sensor was stabilized. The picoampere variations in the reaction mixture were measured to assess the plasma's ability to reduce H₂O₂.

4.2.4 Proteasome activity assay

Plasma 20S proteasome lytic activity was evaluated using the fluorogenic Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-methylcoumarin (Suc-LLVYAMC) substrate that targets the chymotrypsin-like activity of the proteasome.¹⁹ Briefly, 10 µl of each plasma sample was incubated at room temperature for 15 minutes with 10% sodium dodecyl sulfate (SDS). Nonactivated and activated plasma samples (10 µl) were placed with 30 µl of assay buffer and 10 µl of the fluorogenic peptide at a final concentration of 100 µM with and without the irreversible inhibitor Marizomib (250 nM). Finally, samples were incubated at 37°C for 30 minutes and the released fluorescent AMC was measured at 350/440 nm using a Hitachi F-2000 spectrofluorometer. Results were expressed in AMC/min/µl of plasma.

4.2.5 Immunoblotting analysis of protein carbonyls and apolipoproteins

Plasma and cEV levels of protein carbonyls, apoE, apoJ, and apoD were measured by immunoblotting. Briefly, 20 µg of plasma and cEV proteins were loaded on 10% polyacrylamide gels and separated by electrophoresis. Gels were electroblotted onto PVDF membranes that were incubated at 4°C overnight with the following primary antibodies: clusterin polyclonal rabbit antibody (1/2500; MyBiosource), monoclonal 2B9 mouse anti-apoD (1/5000),³⁴ and anti-rabbit apoE (1/500; sc-390925, SCBT). Concerning protein carbonyls, blotted PVDF membranes were incubate dwith 1mMof di-nitrophenol hydrazine (DNPH) derivative for 1 hour and then blocked with 5% skim milk overnight at 4°C before the addition of the primary anti-mouse DNP antibody (1/2000; D9656, Sigma). After removing excess primary antibodies, membranes were incubated with HRP-conjugated secondary IgG: antirabbit (1:2000; 7074S, SCT) or anti-mouse (1/1000; 7076S, SCT). The immunoreactive signals were visualized by adding the ECL reagent (Bio-Rad) and their intensities were quantified by densitometric scanning of blots using the FluorChem luminescent system. Total proteins were stained with Coomassie blue as controls to normalize the loading.

4.2.1 Statistical analysis

The Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests were used to assess normal distribution. Statistical analysis of the clinical, biochemical, and specific study parameters was performed using the Student's *t* test and the one-way analysis of variance (ANOVA) on the SPSS v18.0 software. The nonparametric Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests followed by Dunn test were applied for data that are not normally distributed. A statistical correlation was performed by a linear regression analysis using the Pearson correlation coefficient. Areas under the receiver operating characteristic (ROC) curves (AUC) were calculated using GraphPad Prism v7.0 software. The Mini-Mental State Examination (MMSE) scores derived from the Modified Mini-Mental State (3MS) examination were used to evaluate the global cognitive function between the study participants. Data from chemiluminescence analysis are expressed as arbitrary units. An arbitrary unit represents the ratio between the marker band intensity and the corresponding total protein intensity stained with the Coomassie blue. Results are considered significant at $P < 0.05$.

4.3 Results

4.3.1 Baseline and specific cohort characteristics

Demographic, clinical, and biochemical data of the study population are displayed in Table 4.1. The sex ratio and age were well balanced between the two groups. The levels of lipid and inflammatory parameters, as well as minerals and vitamins, were similar between cases and controls. Meanwhile, MMSE scores and body mass index (BMI) were significantly lower among CIND-AD cases compared to controls.

4.3.2 Characterization of isolated cEVs

The collected transmission electron microscopy (TEM) images revealed the presence of cup-shaped structures with high contrast, which reflects the presence of a lipid-rich layer compatible with cEV morphological features (Figure 4.1 A). NTA analysis showed similar curves distribution of cEV concentration between control and CIND-AD cases (Figure 4.1 B). The cEVs associated markers (TSG-101 and CD63), as well as astrocytic glial proteins (Iba1 and GFAP), were detected by immunoblotting (Figure 4.1 C and D). Calnexin was only found in SK-NSH neuroblastoma lysate, which validates isolated cEV purity. The total protein amount in cEVs ($3.24 \pm 0.11 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) is 22-fold lower than in plasma ($72.16 \pm 0.73 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) and it is not different between the two studied groups. This finding suggests the use of total protein load to normalize the data.

Table 4.1 Clinical and biochemical characteristics of the study participants

	Controls (n = 21)	CIND-AD (n = 15)
Clinical profile		
Age (y)	79.0 ± 5.2	81.4 ± 4.5
Sex ratio (M/F)	10/11	6/9
BMI (Kg/m ²)	26.5 ± 4.3	22.7 ± 4.4*
Education (y)	10.9 ± 3.7	8.8 ± 2.5
Score MMSE	27.7 ± 1.5	23.0 ± 1.9*
Genotype (<i>APOE</i> ε4-/ <i>APOE</i> ε4+)	21/0	5/10
Lipid profile		
Total cholesterol (mmol/L)	4.4 ± 0.9	4.2 ± 0.8
Triglycerides (mmol/L)	1.5 ± 0.6	1.3 ± 0.5
oxLDL (U/L)	41.7 ± 11.4	38.8 ± 10.9
Inflammation profile		
TNF-α (pg/mL)	2.0 ± 0.9	2.3 ± 1.3
IL-6 (pg/mL)	1.8 ± 0.8	1.7 ± 1.2
CRP (mg/L)	3.2 ± 4.3	3.1 ± 3.4
Minerals & Vitamin		
Cu (μmol/L)	13.0 ± 1.9	12.9 ± 1.5
Zn (μmol/L)	319 ± 114.9	333.3 ± 91.8
Pb (μmol/L)	0.14 ± 0.6	0.22 ± 0.22
Vitamin D (nmol/L)	39.6 ± 22.7	35.9 ± 17.8

Values are given as mean ± standard error mean. Abbreviations: CIND, cognitively impaired, no dementia; AD, Alzheimer's Disease; M, male; F, female; BMI, Body Mass Index; y, years; MMSE, Mini-Mental State Examination; *APOE*, apolipoprotein E; (-), ε4 non-carriers; (+), ε4 carriers; oxLDL, oxidized low-density lipoprotein; TNF-α, tumor necrosis factor-alpha; IL-6, interleukin 6; CRP, c-reactive protein; Cu, copper, Zn, zinc; Pb, lead. Student's t-test was used for statistical analysis with *, $p < 0.05$ compared to controls.

4.3.3 Plasma and cEV levels of oxidative markers

A significant decrease in TAC was observed for the CIND-AD group (Figure 4.2 A). Plasma and cEV levels of apoD were higher in CIND-AD participants compared to controls (Figure 4.2 C and D). Interestingly, protein carbonyls content and apoJ/D ratio were statistically different in cEVs (Figure 4.2 B and E) but not in plasma from CIND-AD (see Figure S4.1 F-G in supporting information). Meanwhile, circulating-proteasome activity, apoJ, and apoE levels measured in both compartments were similar between the studied groups (see Figure S4.1 A-E). Because BMI and sex could interfere with the regulation of the studied factors as confounders, the possible correlation was tested and found to be inconclusive (see Table S4.3 in supporting information). Our data indicate that TAC, cEV protein carbonyls, and cEV apoJ/D levels were correlated with the MMSE scores (Figure 4.3 A, B, and E). Meanwhile, plasma and cEVs apoD were not associated with cognitive performance (Figure 4.3 C and D).

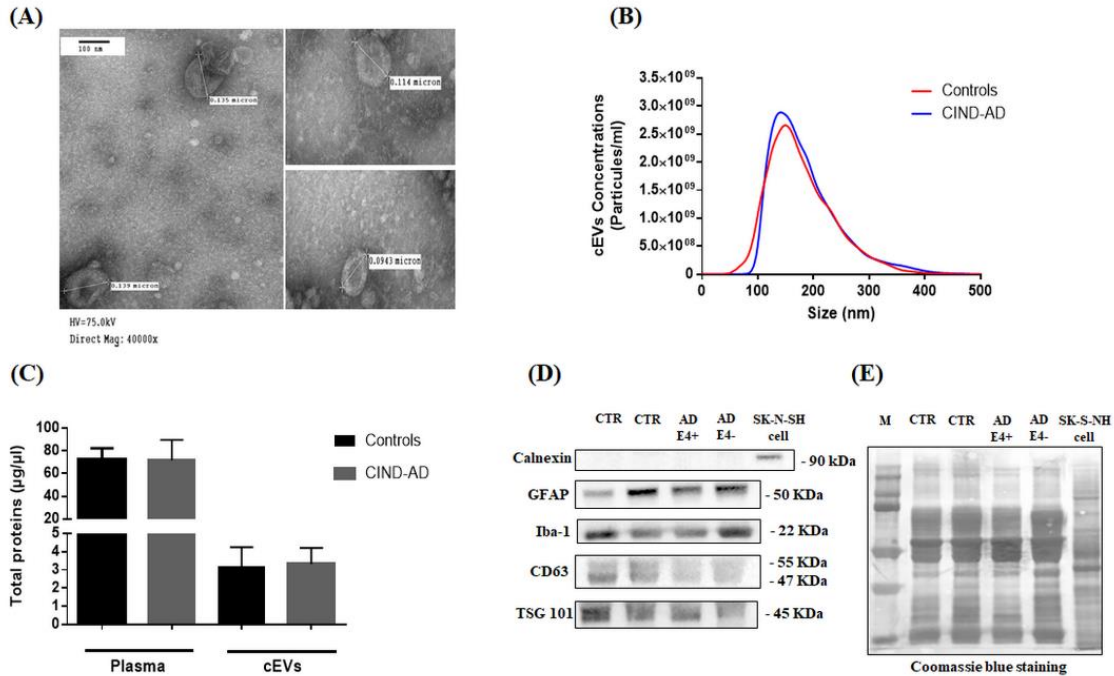


Figure 4.1 Visualization and characterization of cEVs isolated from plasma. (A) cEVs images as acquired by TEM, bar represents 100 nm, (B) Size distribution and concentration of cEVs examined by NTA using the Nanosight-NS300, (C) Amount of total protein load in plasma and cEVs, (D) Immunoblot detection of EVs protein markers and non-associated proteins, (E) Total cEVs protein profile revealed by coomassie blue staining.

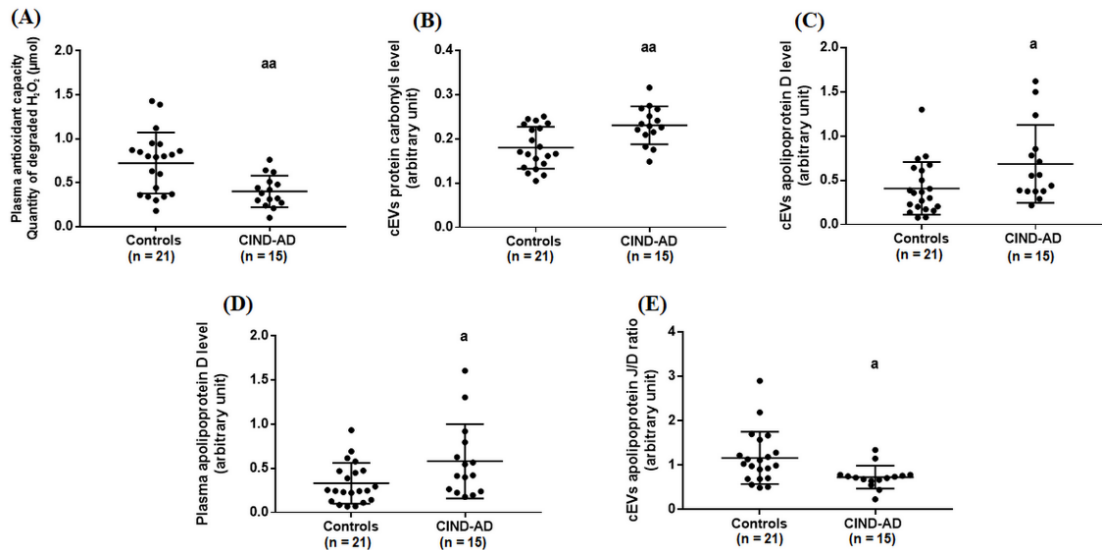


Figure 4.2 Plasma and cEVs levels of oxidative factors. (A) plasma TAC, (B) cEVs protein carbonyls, (C) cEVs apolipoprotein D, (D) plasma apolipoprotein D, (E) cEVs apolipoprotein J/D ratio (N = 36, including 21 controls and 15 CIND-AD). Arbitrary unit means that each point represents the ratio of each marker band intensity and the corresponding total proteins intensity stained with the Coomassie Blue. Statistical analysis was performed using the nonparametric Mann-Whitney test for (A), (C), (D) and (E) parameters and parametric Student's t-test for (B) with a, $p < 0.05$ and aa, $p < 0.01$ versus controls.

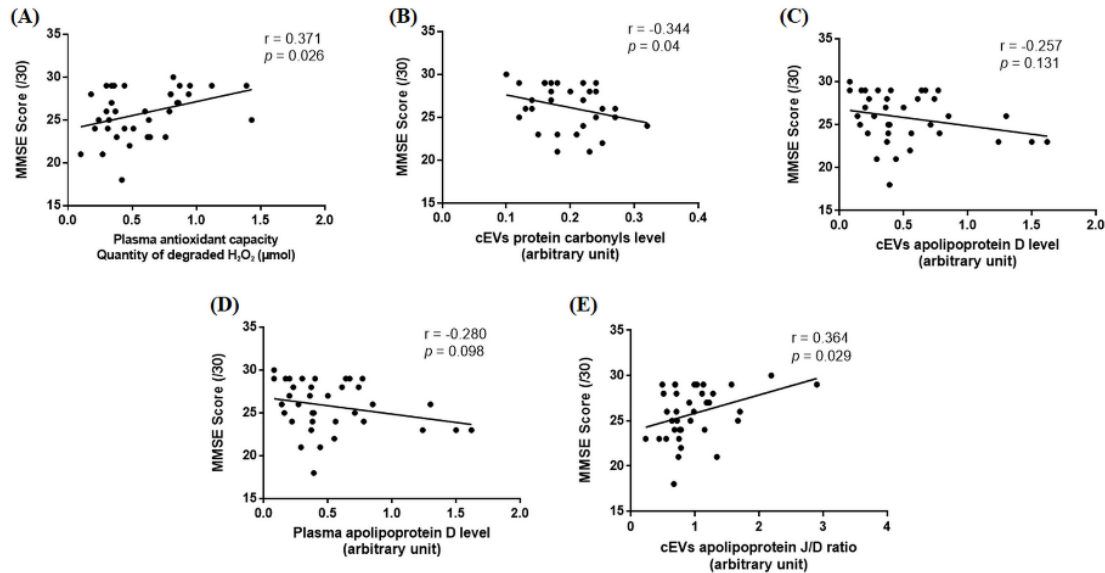


Figure 4.3 Linear regression analysis between the cognitive performances and the studied markers. (A) plasma TAC, (B) cEVs protein carbonyls, (C) cEVs apolipoprotein D, (D) plasma apolipoprotein D, (E) cEVs apolipoprotein J/D ratio (N = 36, including 21 controls and 15 CIND-AD). Abbreviations: MMSE, Mini-Mental State Examination; r, correlation coefficient; p, significance. Statistical analysis was performed using the correlation coefficient (Pearson r) and p values were determined using Pearson correlation.

4.3.4 *APOE* ϵ 4-driven effects on oxidative factors regulation

To study to which extent redox dysregulation is related to *APOE* ϵ 4, CIND-AD participants were dichotomized according to the presence of the ϵ 4 allele (*APOE* ϵ 4+; n = 10) or not (*APOE* ϵ 4-; n = 5). As shown in our previous work,²⁸ in cEV subpopulations, the mean size was lower in *APOE* ϵ 4+ carriers than noncarriers (data not shown). Our findings demonstrate that the observed changes in TAC levels, cEV apoD, and cEV apoJ/D ratio is *APOE* ϵ 4-dependant (Figure 4.4 A, C, and E). However, the presence of *APOE* ϵ 4 variant did not affect cEVs protein carbonyls and plasma apoD levels (Figure 4.4 B and D). To further confirm the influence of *APOE* ϵ 4 variant we performed a linear regression analysis (Table 4.2).

Table 4.2 Univariate correlation of oxidative stress factors and *APOE* ϵ 4 isoform in the study population

		Plasma TAC	cEVs PCs	cEVs apoD	Plasma apoD	cEVs apoJ/D
<i>APOE</i> ϵ 4	<u>r</u>	-.420	.312	.542	.166	-.347
	<u>p</u>	.011*	.068	.001**	.333	.038*
	<u>N</u>	36	36	36	36	36

Abbreviations: *APOE*, apolipoprotein E; ϵ 4, *APOE* isoform; TAC, total antioxidant capacity; cEVs, circulating extracellular vesicles; PCs, protein carbonyls; apoD, apolipoprotein D; apoJ/D, apolipoprotein J/apolipoprotein D; r, pearson correlation coefficient; p, significance (2-tailed); N, number of participants; *, $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

The univariate analysis supports a causal relationship between the studied parameters (as independent variables) and *APOE* $\epsilon 4$ variant (as dependent variable). Our results show a strong positive correlation between the $\epsilon 4$ allele and cEV apoD concentration whereas TAC and cEV apoJ/D ratio levels were negatively associated with *APOE* $\epsilon 4$ presence.

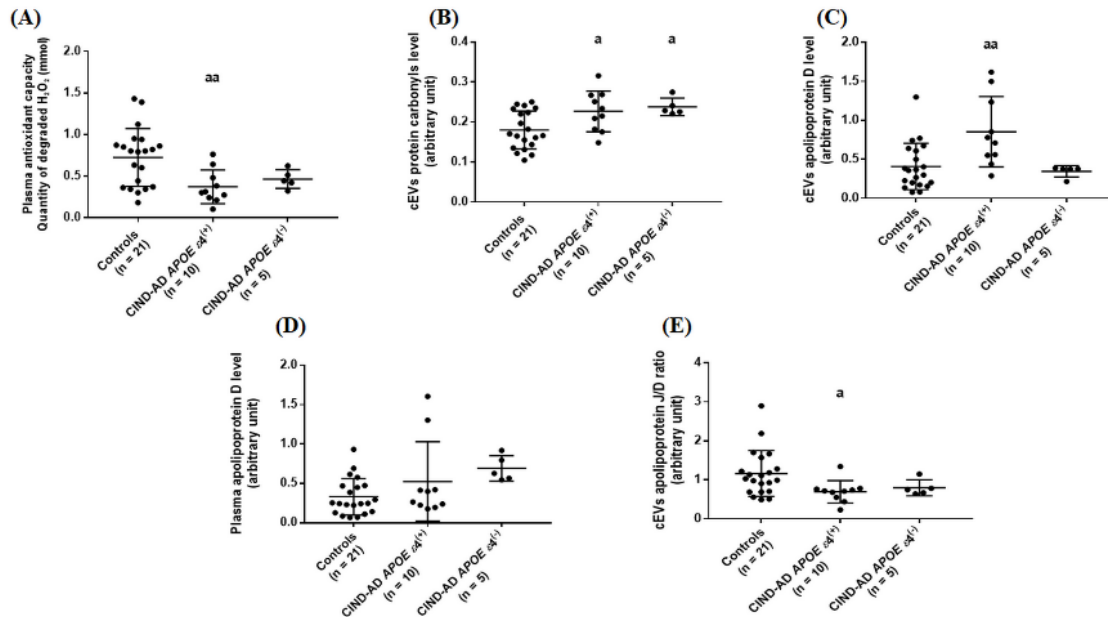


Figure 4.4 Plasma and cEVs levels of oxidative factors according to *APOE* isoform. (A) plasma TAC, (B) cEVs protein carbonyls, (C) cEVs apolipoprotein D, (D) plasma apolipoprotein D, (E) cEVs apolipoprotein J/D ratio (N = 36, including 21 controls, 10 CIND-AD *APOE* $\epsilon 4+$ and 5 CIND-AD *APOE* $\epsilon 4-$). Abbreviations: CIND, cognitively impaired, no dementia; AD, Alzheimer's Disease; *APOE*, apolipoprotein E; (+), $\epsilon 4$ carriers; (-), $\epsilon 4$ non-carriers. Arbitrary unit means that each point represents the ratio of each marker band intensity and the corresponding total proteins intensity stained with the Coomassie Blue. Statistical analysis was performed using the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test for (A), (C), (D) and (E) parameters and the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett's post hoc test for (B). a, $p < 0.05$ and aa, $p < 0.01$ versus controls.

The areas under the ROC curves were measured to evaluate the discrimination capacity of the *APOE* $\epsilon 4$ variant (Figure 4.5 and Table S4.4 in supporting information). When *APOE* $\epsilon 4+$ participants were compared to controls, ROC analysis revealed excellent AUC values for TAC (0.8214 ± 0.0043 ; $P = .0043$) and cEV apoD levels (0.8238 ± 0.076 ; $P = .0041$; Figure 4.5 B and E), whereas moderate diagnostic accuracy was noted for apoJ/D ratio (0.7571 ± 0.091 ; $P = .022$) and cEV protein carbonyls (0.75 ± 0.094 ; $P = .027$; Figure 5H and K). In contrast, differentiation power did not reach statistical significance when *APOE* $\epsilon 4-$ participants were compared to controls, except for cEVs protein carbonyls (Figure 4.5 C, F, I, and L). Similarly, poor discrimination capacity was noted when *APOE* $\epsilon 4+$ and $\epsilon 4-$ participants were merged and compared to controls (Figure 4.5 A, D, G and J).

4.4 Discussion

Oxidative stress is a unifying paradigm of functional and structural brain changes observed in AD. In conjunction with a state of oxidative stress, *APOE* $\epsilon 4$ is assumed to stimulate oxidative damage compared to other apoE isoforms.^{15,16,35} Considering that oxidative stress is one of the early events in the pathophysiology of AD, the present paper aimed to identify a redox signature that can predict the progression of pre-demented people to AD and to investigate the role of *APOE* $\epsilon 4$ in impaired redox homeostasis.

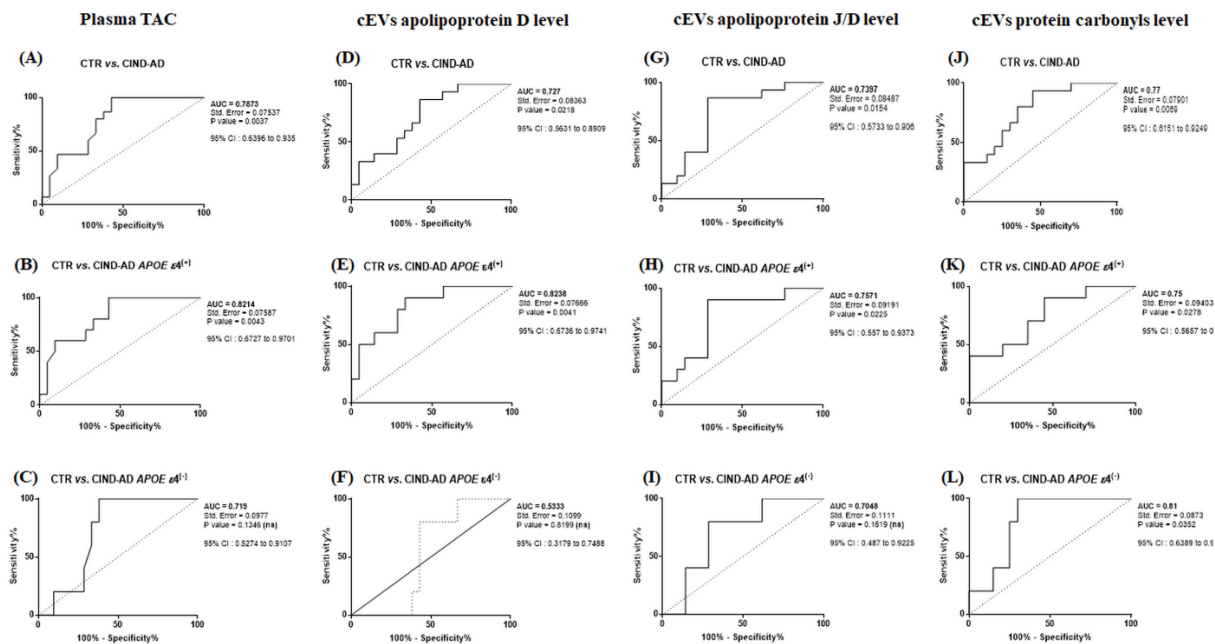


Figure 4.5 Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis according to *APOE* isoform. The plot represents the performance of plasma and cEVs oxidative factors to discriminate controls from total CIND-AD, CIND-AD *APOE* $\epsilon 4^+$ and CIND-AD *APOE* $\epsilon 4^-$ participants. (A, B, C) plasma total antioxidant capacity, (D, E, F) cEVs apolipoprotein D, (G, H, I) cEVs apolipoprotein J/D ratio, (J, K, L) cEVs protein carbonyls level. AUC, Area under the curve; Std, standard; 95% CI, 95% confidence intervals; ns, not significant.

There is currently great interest in the use of peripheral EVs as a reliable screening tool in AD diagnosis. Most clinical research studies investigated inflammatory and pathogenic proteins, neurotrophic factors, glycation products, and their precursors as well as miRNA pool contained in cEVs.^{26–30} However, no study has targeted oxidative stress markers in cEV cargo or compared their diagnostic sensitivity to plasma. In this context, our study analyzed a profile of several antioxidant defense systems in cEVs and in plasma that could predict the conversion of CIND participants to AD.

Apolipoproteins are closely linked to neurodegenerative pathologies and recent reports support their use as novel biomarkers for AD.^{19,36,37} In the brain, apoE, apoJ, and apoD are the most abundant apolipoproteins and the most studied in the normal aging process as well as in AD. Our study evidences the presence of apoE, apoJ, and apoD in cEVs but only cEVs apoD and to a lesser extent plasma apoD levels were higher in CIND-AD cases compared to controls.

Several studies have demonstrated higher apoD levels in the cortex, hippocampus, and cerebrospinal fluid of AD patients^{34,38} as well as in brain tissue of AD transgenic mice.³⁹ Previous *in vitro* and *post mortem* studies indicated that apoD acts as an antioxidant and neuroprotective molecule in age-related degeneration and neurodegenerative disease.⁴⁰ For instance, apoD levels were increased under stressful conditions such as brain injury.⁴¹ Moreover, the protection of SH-SY5Y neuron from paraquat-triggered oxidative stress was attributed to the presence of apoD in astroglial-derived EVs.⁴² Furthermore, during AD, increased apoD expression in multiple brain compartments is believed to counteract oxidative stress induced–damage.⁴³ In the present study, the increase of apoD levels was consistent with reduced TAC capacity and increased cEV protein carbonyls content suggesting that its upregulation during early-AD stages is an active mechanism to overcome a gradual decline in antioxidant systems efficiency and escalating oxidative stress burden.

Several studies evaluated the total antioxidant status using similar analytical methods that differ sometimes in terms of reaction mechanisms. In line with our findings, a reduction in serum and plasma TAC was observed in MCI and AD patients.^{19,44} Previous studies also reported impaired protein carbonyls levels in both plasma and brain of patients with early- and late-AD stages.^{19,45,46} However, it is important to note that our study is the first to detect protein carbonyls and apolipoproteins in cEVs, along with plasma, and to analyze their content in preclinical AD patients.

Because peripheral oxidative stress markers could reflect systemic variations rather than CNS-related disorders, we assessed the relationship between the studied factors and cognitive performance. Interestingly, TAC and cEV apoJ/D ratio were positively correlated to MMSE cognitive scores suggesting that these antioxidant systems are important to sustain adequate brain function and normal cognitive abilities. Meanwhile, elevated cEV protein carbonyls levels were associated with altered neurocognitive performance. As cEVs can shuttle from CNS to peripheral circulation through the BBB,^{24,47} it is suggested that they might reflect the brain pathological processes. Interestingly, astrocytes and glial cell markers were detected in our isolated cEVs providing further evidence that some cEVs are of brain origin. To date, few techniques were developed to isolate plasma CNS-enriched EVs, essentially by targeting

neuronal-EV surface marker proteins. Nonetheless, poor fractions were obtained due to the lack of neural tissue-specificity of these markers (such as L1CAM).⁴⁸ Moreover, the study of total cEV cargo might be more reliable than nEVs considering the complex pathophysiology of AD and the critical role of metabolic disorders in increased AD risk. Altogether, our data support the utility of cEVs in AD diagnosis and demonstrate their higher sensibility to detect systemic variations compared to plasma, which is likely due to the efficient protection of cEVs' molecular components by their rich lipid membrane layer acting as an efficient biological shield.

The pathological linkage between *APOE* ϵ 4-induced oxidative stress and AD risk is well established.^{6,15–17} When CIND-AD cases were classified by their *APOE* genotype, the significant differences were more pronounced in the *APOE* ϵ 4+ group. ROC and linear regression analysis showed that the observed changes in TAC, cEV apoD, and cEV apoJ/D levels were assigned to the presence of *APOE* ϵ 4 isoform, whereas cEV protein carbonyls content was slightly affected by the ϵ 4 allele. Similarly, reduced serum and plasma levels of TAC were reported to exacerbate the risk of AD in *APOE* ϵ 4 individuals.^{44,49}

Besides, the toxic features of apoE4 protein appear to trigger a variety of oxidative pathways leading to carbonylation of protein and apolipoprotein dysregulation.⁵⁰ Consequently, the reduced antioxidant defense in *APOE* ϵ 4 carriers may contribute to the early pathological cascade of neurodegeneration. Our study is the first to establish this relationship in cEVs, which may help to explain the *APOE* ϵ 4-induced increase of oxidative stress over the course of the disease.

Overall, the present work shows that CIND-AD *APOE* ϵ 4 carriers display differential regulation of several oxidative markers that impact brain homeostasis and illustrate the extended effect of this allele on multiple oxidative patterns beyond its influence on the clinical phenotype of AD.

The limitations of the present study should be regarded. Future investigations should include correlations with neuroimaging and/or cerebrospinal fluid data, besides cognitive tests, to confirm the exclusive relationship with brain malfunction. In addition, the analyzed parameters do not reflect the full spectrum of oxidative markers, which entails a thorough screening of other stress candidates in upcoming research. The sample size is adequate for statistical analysis in case control studies but not large enough for epidemiological considerations, which implies future larger sample size cohorts to validate our findings. It is also important to note the susceptibility of the analyses to confounders and to some unobserved variables that could affect the observed signals. Another potential limitation of this study is the lack of multiple test correction and the possible impact of specific genetic ancestries. Future studies should also explore these interactions across similar and various biomarkers, which may increase the specificity of their predictive values.

4.5 Conclusion

Taking together, our results demonstrate that, (1) cEVs' redox signature is more relevant than plasma for reflecting specific brain and systemic changes in early AD onset, (2) the pathological implication of APOE ϵ 4 allele is mainly due to a gain of toxic functions combined with a loss of protective ones, (3) future studies should consider integrating APOE genotyping in oxidative stress biomarkers identification, and (4) the heterogeneity of preclinical patients calls for a shift in paradigm where targeted diagnosis should be developed for specific AD subpopulations that share similar pathological or genetic properties.

5 BIBLIOGRAPHIE 2^E ARTICLE

1. 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2020;16(3):391-460.
2. Weller J, Budson A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Res*. 2018;7. F1000 Faculty Rev-1161.
3. Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P, Gauthier S, Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet*. 1993;342(8873):697-699.
4. Belloy ME, Napolioni V, Greicius MD. A quarter century of APOE and Alzheimer's disease: progress to date and the path forward. *Neuron*. 2019;101(5):820-838.
5. Turney IC, Chesebro AG, Rentería MA, et al. APOE ϵ 4 and restingstate functional connectivity in racially/ethnically diverse older adults. *Alzheimers Dement*. 2020;12(1):e12094-e12094.
6. Dose J, Huebbe P, Nebel A, Rimbach G. APOE genotype and stress response - amini review. *Lipids Health Dis*. 2016;15(1):121.
7. Muñoz SS, Garner B, Ooi L. Understanding the role of ApoE fragments in Alzheimer's disease. *Neurochem Res*. 2019;44(6):1297- 1305.
8. Elliott DA, Weickert CS, Garner B. Apolipoproteins in the brain: implications for neurological and psychiatric disorders. *Clin Lipidol*. 2010;51(4):555-573.
9. DelValle E, Navarro A, Martinez-Pinilla E, Torices S, Tolvía J. Apo J and Apo D: complementary or antagonistic roles in Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis*. 2016;53(2):639-650.
10. Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, Faller P, Hureau C, Collin F. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biol*. 2018;14:450-464.
11. Kang SW, Kim SJ, Kim MS. Oxidative stress with tau hyperphosphorylation in memory impaired 1,2-diacetylbenzene-treated mice. *Toxicol Lett*. 2017;279:53-59.
12. Tonnes E, Trushina E. Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2017;57(4):1105-1121.
13. Agostinho P, Cunha RA, Oliveira C. Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des*. 2010;16(25):2766-2778.
14. Misrani A, Tabassum S, Yang L. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease. Review. *Front Aging Neurosci*. 2021;13(57).
15. Ramassamy C, Averill D, Beffert U, et al. 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*. 1999;27(5):544-553.
16. Ramassamy C, Averill D, Beffert U, et al. Oxidative insults are associated with apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Dis*. 2000;7(1):23-37.
17. Butterfield DA, Mattson MP. Apolipoprotein E and oxidative stress in brain with relevance to Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2020;138:104795.
18. Ramassamy C, Krzykowski P, Averill D, et al. Impact of apoE deficiency on oxidative insults and antioxidant levels in the brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001;86(1-2):76-83.
19. Perrotte M, Le Page A, Fournet M, et al. Blood-based redox-signature and their association to the cognitive scores in MCI and Alzheimer's disease patients. *Free Radic Biol Med*. 2019;130:499-511.
20. Schrag M, Mueller C, Zabel M, et al. Oxidative stress in blood in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a meta-analysis. *Neurobiol Dis*. 2013;59:100-110.
21. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(4):213-228.
22. Lee S, Mankhong S, Kang J-H. Extracellular vesicle as a source of Alzheimer's biomarkers: opportunities and challenges. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7):1728.

23. Kojima R, Bojar D, Rizzi G, et al. Designer exosomes produced by implanted cells intracerebrally deliver therapeutic cargo for Parkinson's disease treatment. *Nat Commun.* 2018;9(1):1305.
24. Shi M, Liu C, Cook TJ, et al. Plasma exosomal α -synuclein is likely CNS-derived and increased in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 2014;128(5):639-650.
25. Jia L, Qiu Q, Zhang H, et al. Concordance between the assessment of Abeta42, T-tau, and P-T181-tau in peripheral blood neuronal derived exosomes and cerebrospinal fluid. *Alzheimers Dement.* 2019;15(8):1071-1080.
26. Li F, Xie X-Y, Sui X-F, Wang P, Chen Z, Zhang J-B. Profile of pathogenic proteins and microRNAs in plasma-derived extracellular vesicles in Alzheimer's disease: a pilot study. *Neuroscience.* 2020;432:240-246.
27. Perrotte M, Haddad M, Le Page A, Frost EH, Fulop T, Ramassamy C. Profile of pathogenic proteins in total circulating extracellular vesicles in mild cognitive impairment and during the progression of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2020;86:102-111.
28. Ben Khedher MR, Haddad M, Laurin D, Ramassamy C. Apolipoprotein E4-driven effects on inflammatory and neurotrophic factors in peripheral extracellular vesicles from cognitively impaired, no dementia participants who converted to Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2021;7(1):e12124.
29. Haddad M, Perrotte M, Landri S, Lepage A, Fulop T, Ramassamy C. Circulating and extracellular vesicles levels of N-(1-Carboxymethyl)- L-Lysine (CML) differentiate early to moderate Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2019;69(3):751-762.
30. Haddad M, Perrotte M, Khedher MRB, et al. Methylglyoxal and glyoxal as potential peripheral markers for MCI diagnosis and their effects on the expression of neurotrophic, inflammatory and neurodegenerative factors in neurons and in neuronal derived-extracellular vesicles. *Int J Mol Sci.* 2019;20(19).
31. Chai YL, Chong JR, Raquib AR, et al. Plasma osteopontin as a biomarker of Alzheimer's disease and vascular cognitive impairment. *Sci Rep.* 2021;11(1):4010.
32. Zivelin A, Rosenberg N, Peretz H, Amit Y, Kornbrot N, Seligsohn U. Improved method for genotyping apolipoprotein E polymorphisms by a PCR-based assay simultaneously utilizing two distinct restriction enzymes. *Clin Chem.* 1997;43(9):1657-1659.
33. Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, et al. Methodological guidelines to study extracellular vesicles. *Circ Res.* 2017;120(10):1632-1648.
34. Terrisse L, Poirier J, Bertrand P, et al. Increased levels of apolipoprotein D in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer's patients. *J Neurochem.* 1998;71(4):1643-1650.
35. Miyata M, Smith JD. Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nat Genet.* 1996;14(1):55-61.
36. Koch M, DeKosky ST, Fitzpatrick AL, et al. Apolipoproteins and Alzheimer's pathophysiology. *Alzheimers Dement.* 2018;10:545-553.
37. Monllor P, Giraldo E, Badia MC, et al. Serum levels of clusterin, PKR, and RAGE correlate with amyloid burden in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2021;80(3):1067-1077.
38. Thomas EA, Laws SM, Sutcliffe JG, et al. Apolipoprotein D levels are elevated in prefrontal cortex of subjects with Alzheimer's disease: no relation to apolipoprotein E expression or genotype. *Biol Psychiatry.* 2003;54(2):136-141.
39. Thomas EA, Sautkulis LN, Criado JR, Games D, Sutcliffe JG. Apolipoprotein D mRNA expression is elevated in PDAPP transgenic mice. *J Neurochem.* 2001;79(5):1059-1064.
40. Navarro A, Mendez E, Diaz C, et al. Lifelong expression of apolipoprotein D in the human brainstem: correlation with reduced age-related neurodegeneration. *PLoS One.* 2013;8(10):e77852.
41. Franz G, Reindl M, Patel SC, et al. Increased expression of apolipoprotein D following experimental traumatic brain injury. *J Neurochem.* 1999;73(4):1615-1625.

42. Pascua-Maestro R, González E, Lillo C, Ganfornina MD, Falcón-Pérez JM, Sanchez D. Extracellular vesicles secreted by astroglial cells transport apolipoprotein D to neurons and mediate neuronal survival upon oxidative stress. Original Research. *Front Cell Neurosci.* 2019;12(526).
43. Bhatia S, Kim WS, Shepherd CE, Halliday GM. Apolipoprotein D upregulation in Alzheimer's disease but not frontotemporal dementia. *J Mol Neurosci.* 2019;67(1):125-132.
44. 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(12):932-936.
45. Sharma A, Weber D, Raupbach J, et al. Advanced glycation end products and protein carbonyl levels in plasma reveal sex-specific differences in Parkinson's and Alzheimer's disease. *Redox Biol.* 2020;34:101546-101546.
46. Sultana R, Perluigi M, Newman SF, et al. Redox proteomic analysis of carbonylated brain proteins in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Antioxid Redox Signal.* 2010;12(3):327-336.
47. Skog J, Würdinger T, vanRijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.* 2008;10(12):1470-1476.
48. Mustapic M, Eitan E. Plasma extracellular vesicles enriched for neuronal origin: a potential window into brain pathologic processes. *Front Neurosci.* 2017;11:278-278.
49. Pulido R, Jiménez-Escrig A, Orensanz L, Saura-Calixto F, Jiménez-Escrig A. Study of plasma antioxidant status in Alzheimer's disease. *Eur J Neurol.* 2005;12(7):531-535.
50. Safieh M, Korczyn AD, Michaelson DM. ApoE4: an emerging therapeutic target for Alzheimer's disease. *BMC Med.* 2019;17(1):64-64.

Lien entre les articles précédents et le suivant :

Les résultats du 1^e et 2^{ème} article montrent une dérégulation de la sécrétion des EVs chez les participants porteurs de l'allèle *APOE* ϵ 4 convertis à la MA, cinq ans après. Les conséquences et l'implication de cette diminution sur la progression et/ou le développement de la MA ne sont pas connus. Cette observation est importante car depuis les années 1990, quelques études ont rapporté une modification du nombre des EVs dans certaines pathologies. Une augmentation du nombre de particules (EVs) a été observée dans la maladie de Crohn (Powell *et al.*, 1996), l'angine de poitrine (Singh *et al.*, 1995), l'ischémie cérébrale transitoire et les démences à infarctus multiples (Lee *et al.*, 1993). Plus récemment, des expérimentations animales et des études cliniques ont montré une altération du nombre d'EVs chez des souris *APOE* ϵ 4 et dans des tissus post-mortem d'individus neuropathologiquement sains porteurs de l'allèle *APOE* ϵ 4 (Peng *et al.*, 2019) ainsi qu'au niveau du plasma de patients MA (Perrotte *et al.*, 2020).

Une découverte récente a montré que les EVs d'origine neuronale étaient capables, *in vitro*, de lier le peptide amyloïde et seraient préférablement dirigés vers la microglie pour éliminer l'excès de ce dernier dans le SNC (Yuyama *et al.*, 2012; Yuyama *et al.*, 2015). Cependant, aucune étude ne s'est intéressée à analyser cette propriété chez les EVs d'origine périphérique et à élucider les mécanismes moléculaires par lesquelles ces derniers seraient capables de contribuer à la clairance de la forme la plus toxique (oligomères) de l'A β .

Les observations qui découlent de nos deux publications associées aux données (très limitées) de la littérature, laisse à penser que les EVs circulants, dans les conditions physiologiques, peuvent jouer un rôle protecteur dans le cadre de la maladie d'Alzheimer. Ce rôle serait compromis chez les patients *APOE* ϵ 4 atteints de MA due à l'altération du nombre de cEVs libérées dans la circulation.

L'objectif de ce 3^{ème} article est d'étudier le rôle physiologique potentiel de cEVs isolées de participants sains dans la fixation et l'élimination des oA β et de déterminer les composantes moléculaires impliquées dans cette fonction protectrice. L'analyse du contenu des cEVs en lien étroit avec le « management » d'oA β sera effectué sur une cohorte incluant des participants normaux et précliniques convertis à la MA. L'ensemble de ces analyses nous aidera à mieux comprendre l'implication pathologique de la dérégulation des EVs dans l'augmentation du risque de la MA.

6 TROISIÈME ARTICLE

Circulating Extracellular Vesicles-dependent Beta-Amyloid Oligomers clearance: Potential Implication in the Conversion of Preclinical participants to Alzheimer's Disease

La clairance des oligomères bêta-amyloïdes est dépendante des vésicules extracellulaires circulantes : Implication potentielle dans la conversion des participants précliniques à la maladie d'Alzheimer

Mohamed Raâfet Ben Khedher †^{1,2}, Mohamed Haddad †^{1,2}, Tamás Fülöp³, Danielle Laurin^{2,4,5}, Charles Ramassamy^{1,2}

¹ INRS-Centre Armand-Frappier Santé-Biotechnologie, Laval, QC, Canada,

² Institute of Nutrition and Functional Foods, Québec, QC, Canada,

³ Department of Medicine, Geriatric Division, Research Center on Aging, Sherbrooke University, Sherbrooke, QC J1H 4C4, Canada

⁴ Faculty of pharmacy, Laval University, Québec, QC, Canada,

⁵ Centre d'excellence sur le vieillissement de Québec, CHU de Québec-Université Laval Research Centre, VITAM-Centre de recherche en santé durable, Québec, QC, Canada,

† These authors contributed equally to this work

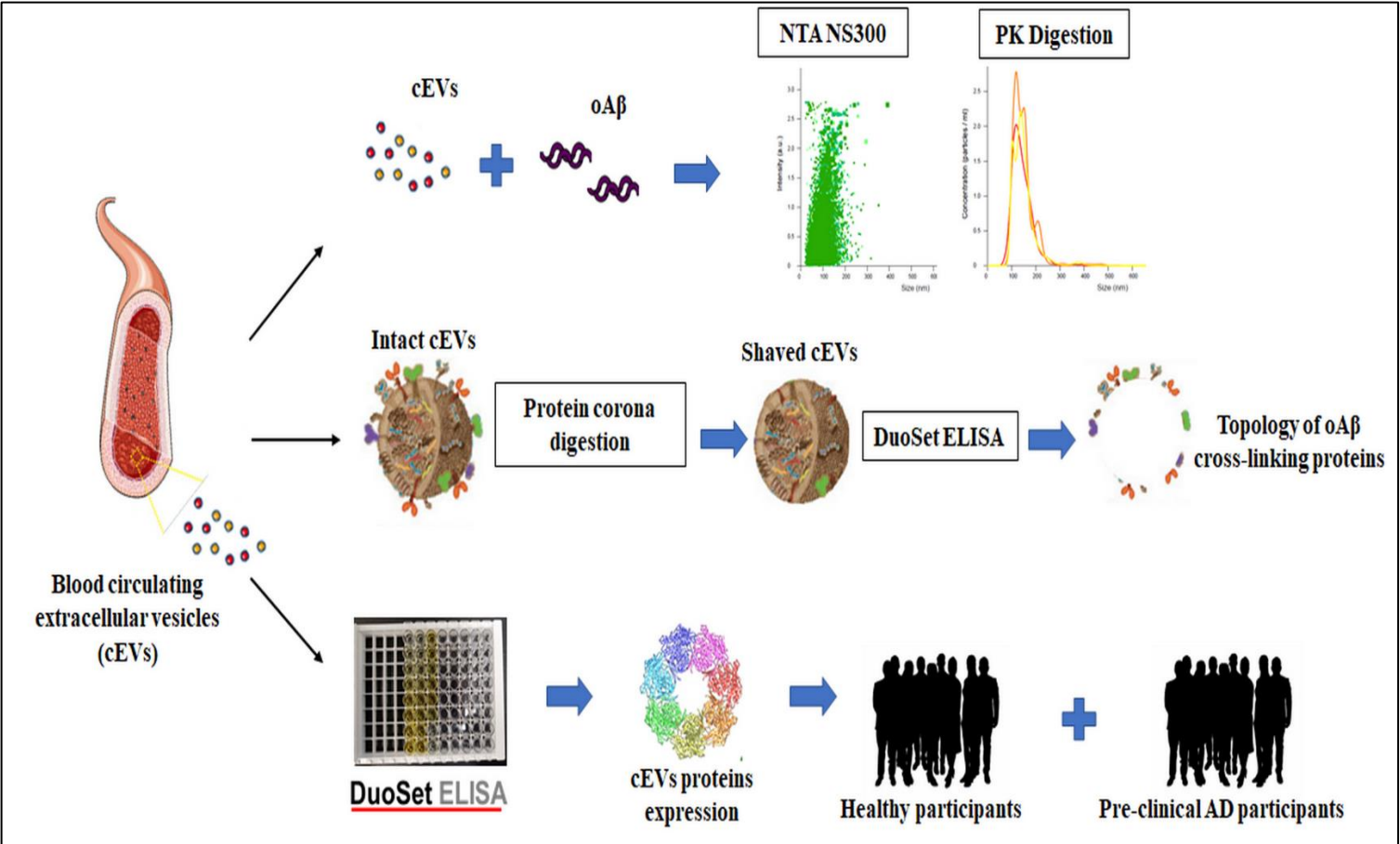
Cells (MDPI)

Date de soumission : Octobre 2022

Contribution des auteurs :

MRBK : Rédaction article, préparation des figures et tableaux, analyses expérimentales et statistiques (35%), **MH** : Rédaction article, Design de l'étude, analyses expérimentales (35%), **TF** : Correction de l'article (5%), **DL** : Mise à disposition du matériel biologique, Correction de l'article (10%), **CR** : Correction de l'article, supervision générale de l'étude (15%).

GRAPHICAL ABSTRACT



6.1 Introduction

Extracellular vesicles (EVs) are a plethora of nanosized particles that are presumably secreted by all cell types and actively involved in short- and long-distance dissemination of proteins, lipids and genetic material [1]. During the last decade, numerous discoveries led to a better comprehension of the pivotal role of EVs in cellular physiology and pathology [1,2]. This advanced knowledge allowed the development of potential various diagnostic and therapeutic applications of EVs, especially in Alzheimer's disease (AD) [3].

AD is an insidious neurodegenerative disorder with irreversible neuronal damage associated with severe cognitive impairments [4]. The extracellular accumulation of the beta-amyloid (A β) peptide and the intracellular twisted strands of tau protein are the hallmarks of AD pathology [4]. Nonetheless, the role of A β was recently criticized in the context of AD which prompt further investigations and validations on the causal link between A β and AD [5, 6].

Few studies have investigated the enigmatic relationship between EVs and A β . EVs have been shown to be implicated in A β oligomers dissemination [7]. In EVs-associated biomarker AD studies, the detection of A β in enriched EVs from neuronal origin (nEVs) [8], cerebrospinal fluid (cfEVs) [9] and blood circulation (cEVs) [10], suggests a potential role of EVs in A β dissemination and/or clearance. In brain, the abundance of the ALIX protein, a highly specific-EVs marker, in A β senile plaques suggests that exosome-associated A β may be involved in plaque formation [11]. In contrast, several *in vivo* studies also support a potential beneficial role of nEVs in reducing A β toxicity. Indeed, the administration of nEVs following A β oligomers (oA β) infusion in rats restored impaired long-term potentiation and decreased A β pathology [12]. Moreover, the continuous intracerebral infusion of nEVs in APP transgenic mice alleviated A β burden and limited the loss of synaptic densities [13,14]. Mechanistically, these studies strongly suggest an improvement of A β clearance by EVs exclusively isolated from primary neuronal cells in culture or transgenic cell models. To date, no study focused on human cEVs despite their vital contribution to brain function. In this context, some studies have demonstrated that cEVs can readily cross the blood brain barrier (BBB) to reach different brain regions [15-19]. For instance, it has been shown that functional mRNA can be directly transferred from peripheral blood to neurons via cEVs after LPS-induced inflammation [16]. Similarly, the intracranial injection of kainate, a neuroexcitatory agonist for neuronal glutamatergic receptors, in transgenic mice triggered peripheral cEVs uptake into the brain [16]. Interestingly, the placement of novel objects into mice cages has led to a selective gene expression in the hippocampus mediated by peripheral cEVs which supports a role of cEVs signaling going beyond the pathological state [16]. These data clearly demonstrate that cEVs ensure a constant role during regular cognitive tasks as well

as under stressful environment. Within this framework, the impact of peripheral blood-derived cEVs on AD-related pathological features, in particular A β management has not been assessed yet.

In this context, it is also important to note that no study has investigated the potential involvement of the outer leaflet proteins pattern of nEVs or cEVs in A β binding. Our recent studies demonstrated the presence of A β -linking proteins in cEVs such as apolipoproteins J (apoJ), E (apoE) and RAGE [20,21]. Meanwhile, their localization has yet to be determined.

The present work aims to determine the association of A β on cEVs along with the underlying mechanisms and the extent to which the changes in cEVs distribution and microenvironment may influence the progression of asymptomatic preclinical individuals to AD pathology.

6.2 Methods

6.2.1 Participants and data source

In the current investigation we used plasma samples from the Canadian Study of Health and Aging (CSHA), a multicenter longitudinal cohort study of dementia. A self-administered questionnaire on risk factors was filled by non-cognitively impaired participants (see Table S1 in supporting information). A clinical evaluation was performed at CSHA-1 (1991-1992) in a subgroup of participants by a group of professionals including a nurse, a physician, and a neuropsychologist. Following independent preliminary diagnosis made by the neuropsychologist and the physician, a final diagnosis was attained between them in agreement with the published criteria of the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association criteria (NINCDS-ADRDA) for AD, the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 3rd Edition, Revised (DSM-III-R) for dementia, the World Health Organization International Classification of Diseases, 10th Revision criteria (ICD-10) for vascular dementia (VaD) and operational criteria for Lewy body dementia [10]. A new version of the diagnostic criteria was introduced in CSHA-2 (1996–1997) and CSHA-3 (2001–2002) for dementia and AD (DSM-IV) and VaD (National Institute of Neurological Disorders and Stroke–Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences; NINDS-AIREN) [10].

In the present case-control study, we selected from the CSHA-2 blood bank 15 healthy people who developed AD-dementia 5 years later in CSHA-3. These cases were compared to 15 controls evaluated with no cognitive impairment at CSHA-2 and who remained clinically healthy in CSHA-3, with respect to exclusion and inclusion criteria (see Table S1).

All participants gave consent for use of their blood sample for subsequent analysis and the present study received approval from the institutional ethic committee of INRS-AFSB (CER19-532).

6.2.2 Isolation and characterization of extracellular vesicles

Blood samples were collected from healthy participants in EDTA-containing vacuum tubes [10,20]. The isolation of cEVs from plasma was assessed according to our previous studies [10,20,22-24]. The characterization of cEVs was based on the last methodological guidelines to study EVs [25], and included the analysis of cEVs morphology by transmission electron microscopy (TEM), their sizes distribution by nanoparticle tracking analysis (NTA) and the presence, by Western blot, of two or more EVs markers such as the tumour susceptibility gene 101 (TSG101), the tetraspanin protein CD63, the ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1) while the endoplasmic reticulum marker (calnexin) was used as an isolation purity control.

6.2.2.1 EVs Isolation procedure

Plasma was clarified by differential centrifugation at 300 g for 10 min to separate contaminants (debris, dead cells) and then at 2000 g during 20 min to remove large vesicles (apoptotic bodies). The collected supernatant ($\approx 300 \mu\text{l}$) was mixed with 0.2X of the Total Exosome Isolation reagent (Invitrogen by Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA) and incubated during 30 min at 4 °C according to manufacture instructions. After centrifugation at 10,000 \times g for 5 minutes, cEVs pellets were re-suspended in filtered PBS (0.1 μm) and purified by three series of filtrations/precipitations at 3000 \times g for 15 min using the 100KDa Amicon® Ultra-4 Filter Units (Millipore, UFC810024) to discard impurities and maximize recovery. Final suspension of cEVs was conserved in filtered PBS and kept at -80°C until analysis.

6.2.2.2 Transmission electron microscopy (TEM)

The morphology of cEVs was examined using TEM. Briefly, isolated cEVs were treated with 2% paraformaldehyde. A 10 μL drop of the cEVs suspension was incubated for 5 minutes on a Formvar-carbon-coated grid. The grid was contrasted in a 2 percent uranyl acetate solution for 1 minute before drying. Each cEVs sample was examined using a HITACHI H-7100 transmission electron microscope (75 kV) at magnifications ranging from 15000 to 40000 X.

6.2.2.3 Nanoparticle tracking analysis (NTA)

The NTA NanoSight NS300 equipment was used to assess the size distribution and concentration of isolated cEVs. The camera level and the detection threshold were fixed at 12 and 5, respectively. For each sample, recordings were made for 60 seconds and measurements were taken at least three times. The recorded videos were then processed automatically with the NanoSight NTA 3.2 analytical software (Malvern Instruments Company, United Kingdom).

6.2.2.4 Western blot analysis (WB)

To validate the presence of cEVs markers, several immunoblotting, detections were performed. cEVs proteins were separated using a polyacrylamide gel electrophoresis containing 10% sodium dodecyl sulphate and transferred to polyvinylidene fluoride membranes. Before immunodetection, the membranes were blocked with 5% non-fat dried milk in Tris-buffered saline with 0.1 percent Tween 20 (TBS-T). Calnexin (Santa Cruz, Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA); TSG101 (MyBioSource, Inc, San Diego, CA, USA); CD63 (Santa Cruz, Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA); and Iba1 (Santa Cruz, Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA) were incubated overnight at 4°C. The membranes were then rinsed with TBS-T and incubated with HRP-conjugated secondary antibodies for 1 hour at room temperature (Anti-mouse IgG HRP-linked Antibody or Anti-rabbit HRP-linked Antibody from Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA). Each membrane blot was detected by chemiluminescence using ECL substrate (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) and the FluorChem HD2 system. The total EV proteins were quantified by staining with Coomassie Brilliant blue.

6.2.3 A β 1-42 oligomers preparation and characterization

Currently, soluble oligomeric assemblies of A β are considered as the proximate cause of the neuropathology that defines AD. A β 1-42 oligomers (oA β 1-42) were formed according to Stine [26]. Briefly, recombinant A β 1-42 peptides were dissolved in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP, Sigma-Aldrich) and vacuum dried overnight. Tubes were placed in a SpeedVac and allowed to dry for 1 hour without being heated to eliminate any lingering traces of HFIP and moisture. A β 1-42 was first re-suspended in DMSO (Sigma-Aldrich), vortexed, and sonicated for 10 minutes. The solution was then diluted to a final concentration of 100 μ M in cold phenol-free F-12 cell culture medium (Sigma-Aldrich) and maintained at 4 °C for 24 hours.

TEM and NTA were used to characterize the produced oA β 1-42. For TEM, 50 μ L of the oA β suspension was deposited on the copper grid for 5 minutes and air-dried. The grid was then immersed in water for 1 minute, air-dried, and dyed with 3 percent (w/v) phosphotungstic acid (PTA). After 3 min, the excess of PTA was removed using filter paper, and the grid was air-dried again before being loaded into the microscope and photographed. Morphology was seen at 40.000x magnification using a Hitachi H-7100 microscope. The size distribution of oA β 1-42 was determined by NTA NanoSight NS300 system and analyzed using the NanoSight NTA 3.2 Analytical Software (Malvern Instruments Company, United Kingdom). The camera level and detection threshold were set at 14 and 5, respectively. The NTA was injected with 10 μ M of oA β 1-42 suspension, and recordings were made for 60 seconds. The measurement was repeated at least three times.

6.2.4 Crosstalk between cEVs and oA β 1-42

The possible interaction between oA β 1-42 and cEVs from healthy participants was verified by NTA analysis. Proteinase K (PK) digestion was applied to verify the topside linkage of oA β 1-42 to cEVs. Briefly, 10 μ M of oA β 1-42 were incubated with a known concentration of cEVs for 1 h at room temperature. The mixture, digested or not by 20 g/ml of PK (Invitrogen) at 37 °C for 15 min, was injected in the NanoSight NS300 system and measurements were performed in triplicate and repeated twice.

6.2.5 Detection and localization of proteins related to cEVs-oA β 1-42 interaction

6.2.5.1 Shaved cEVs preparation

To eliminate surface-anchored proteins, isolated cEVs were treated for 15 minutes at 37 °C in PBS with 20 g/ml of PK and 5 mM CaCl₂ [27]. Proteinase activity was then stopped by adding 0.5 mM MeOSuc-AAPF-CMK (Sigma Millipore, Canada) for 10 minutes at room temperature. To eliminate degraded proteins, cEVs were filtrated by centrifugation at 3000 rpm during 10 min using the Amicon® Ultra-4 Filter Units (Millipore, UFC810024).

6.2.5.2 ELISA assay

We applied the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on intact cEVs and cEVs deprived of their protein corona, ELISA kits from (R&D systems and Boster Bio) were selected to quantify the expression of cEVs proteins involved in oA β 1-42 clearance such as apoJ, apoE, RAGE, haptoglobin, and klotho. The assays were carried out in accordance with the

manufacturer's instructions. Briefly, to summarize, ELISA plates were coated with the capture antibody and incubated at room temperature overnight. The plates were then washed and wells were blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS. After rigorous washing, serially diluted standards and samples were loaded and incubated at room temperature for 2 h. Plates were cleaned before being loaded with detection antibody and incubated for another 2 h. Following the washing operation, each well received diluted peroxidase-conjugated streptavidin. Each well was then filled with chromogenic substrate solution and incubated at 37 °C for an additional 30 minutes. The enzymatic reaction was stopped by 50 µl of H₂SO₄ (2N) solution and the absorbance was measured at 450 nm.

6.2.6 Measurement of cEVs proteins levels

The levels of cEVs proteins potentially involved in cEVs-oA β 1-42 interaction such as, apoJ, apoE, RAGE haptoglobin and klotho were determined in the study population by ELISA assay as previously described (see section 2.5.2). cEVs total protein levels were determined by bicinchoninic acid assay (BCA, ThermoFisher) and used to normalize the amounts of the measured proteins.

6.2.7 Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SD using the SPSS or GraphPad Prism program. The normal distribution was verified by Shapiro-Wilk test. Statistical analysis of the cEVs sizes distribution and clinical study parameters were performed using the Student's t test or the nonparametric Mann-Whitney U test. A statistical correlation was performed by a linear regression analysis using the Pearson or Spearman correlation coefficient. A p value less than 0.05 was considered statistically significant.

6.3 Results

6.3.1 Characterization of A β oligomers and human circulating EVs

TEM reveals that the oA β consist of globular oligomers (**Figure 6.1 A**). Even after 4 weeks of conservation, no fibrils or elongated protofibrils were found or formed (**Figure S6.1**). According to the NTA data, most of synthesized oA β displayed a diameter between 50 and 350 nm with a peak around 100 nm (**Figure 6.1 B**). Different approaches were used to characterize cEVs. TEM images revealed that the isolated cEVs present a cup-shaped morphology (**Figure 6.1 C**) with a size distribution of cEVs ranged between 50 and 350 nm (**Figure 6.1 D**). Furthermore, Western

blot analysis confirmed the presence of cEVs markers (TSG101 and CD63). In addition, the presence of the microglial protein Iba1 demonstrates that some cEVs are brain-derived. Meanwhile, calnexin was not detected in cEVs but only in SK-N-SH cell lysate, providing further evidence of cEVs enrichment (**Figure 6.1 E**). Full-sized images and detailed information of cEVs specific markers are given (Figure S2).

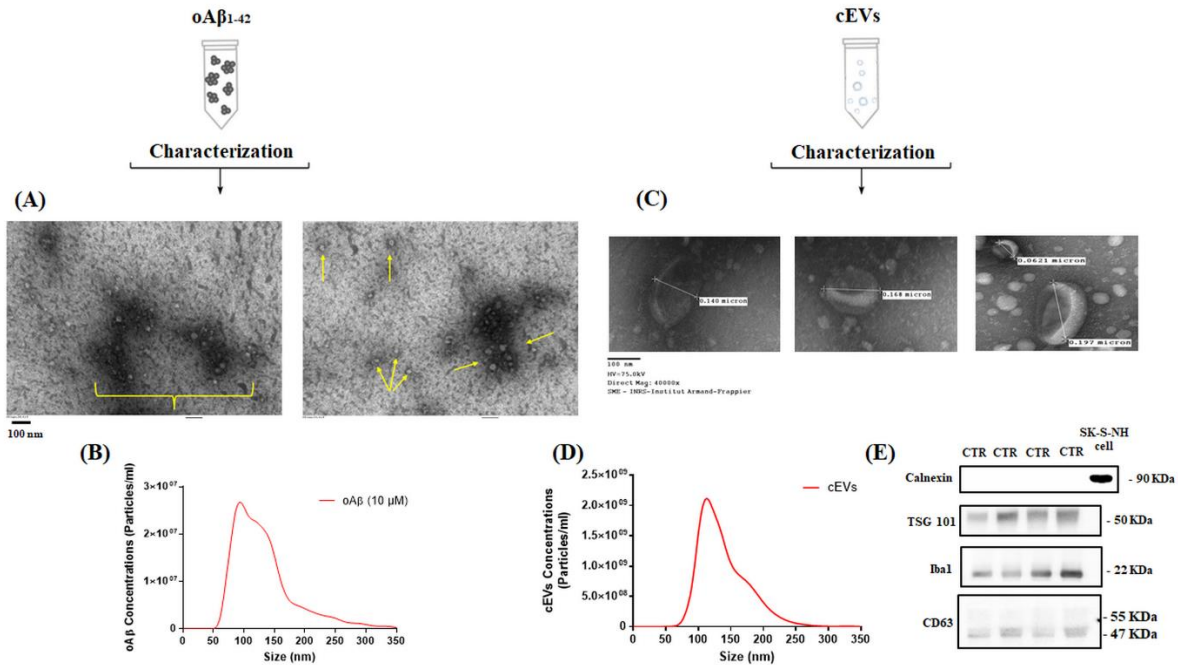


Figure 6.1 Characterization and visualization of oAβ₁₋₄₂ and cEVs. Transmission electron microscopy images of (A) oAβ and (C) cEVs, bar represents 100 nm. Size distribution and concentration of (B) oAβ and (D) cEVs examined by NTA using the Nanosight-NS300 system. (E) Immunoblot detection of cEVs protein markers and non-associated proteins (N=4 healthy controls). Abbreviations: oAβ, amyloid-beta oligomers; cEVs, circulating extracellular vesicles; CTR, controls. Measurement performed on NTA with freshly prepared oAβ₁₋₄₂.

6.3.2 cEVs-oAβ interaction

We employed NTA analysis to investigate the potential interaction between oAβ and cEVs before and following PK digestion. Our findings reveal an increase of particles size following oAβ incubation with cEVs (**Figure 6.2 A-B**), particularly in the range of 100-150, 150-200, and 200-250 nm, which correspond to small cEVs. (**Figure 6.2 C**). PK application allowed the external removal of oAβ and resulted in reduced particles number in all cEVs population except for 50-100 nm (**Figure 6.2 D**), which typically represent the detached, free oAβ particles (**Figure 6.1 B**).

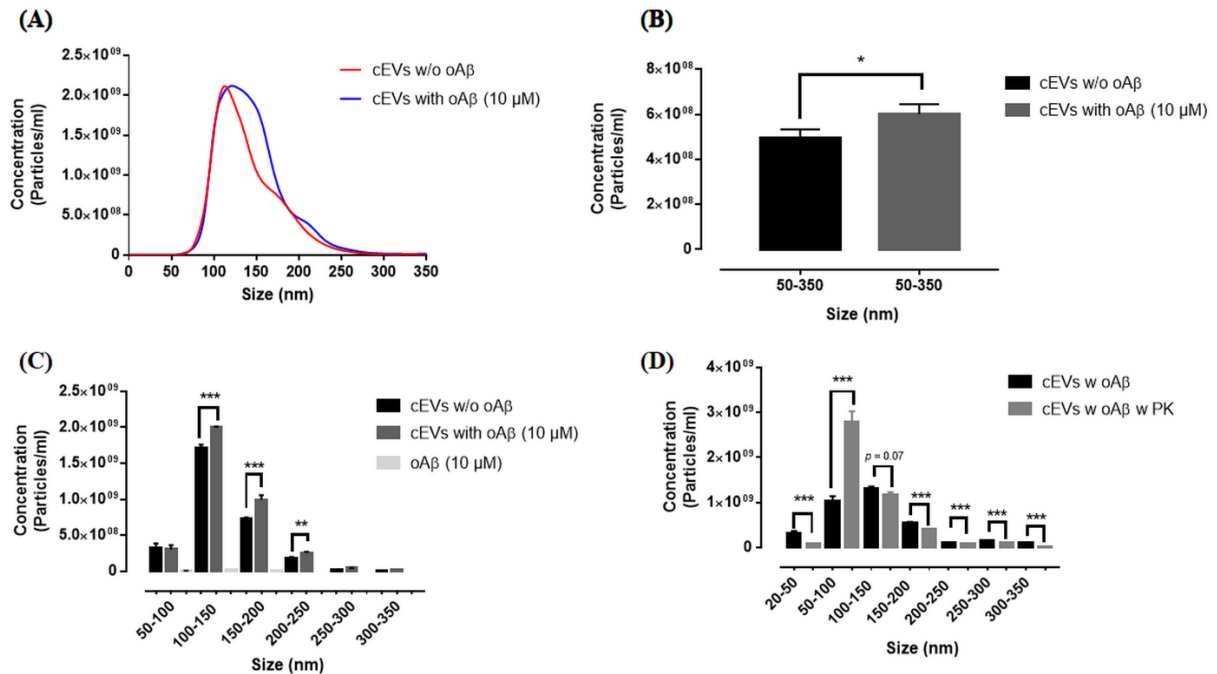


Figure 6.2 Cross-talk between oAβ1-42 and cEVs. (A) NTA analysis of oAβ and cEVs association, (B) Graph bar representation of oAβ and cEVs association according to NTA analysis, (C) Stratification showing higher association in specific cEVs sub-populations, (D) Incubation of cEVs- oAβ mixture with PK and effect on particles distribution. Abbreviations: oAβ, amyloid-beta oligomers; cEVs, circulating extracellular vesicles; w/o, without; nm, nanometers; PK, proteinase K. Statistical analysis was performed using the nonparametric Mann-Whitney test for (B), (C) and (D) with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ and ***, $p < 0.001$ versus cEVs w/o oAβ. Bar graphs are presented as mean \pm SD.

6.3.3 cEVs corona proteins are implicated in cEVs-oAβ interaction

To investigate the role of cEVs corona proteins in oAβ fixation, cEVs were treated with PK to remove surface-accessible proteins because PK cannot penetrate the lipid bilayer. TEM images indicated that non-treated and PK-treated cEVs were encased in a lipid layer, resulting in a cup-shaped morphology (**Figure S6.2 A**). The size distribution of PK-treated cEVs was between 50 and 350 nm, which was similar to the size distribution of non-treated cEVs (**Figure S6.2 B**). There was no significant change in total protein levels in both cEVs conditions (**Figure S6.2 C**).

Non-treated and PK-treated cEVs were analyzed for the presence of apoJ, apoE, and RAGE, which are all highly involved in oAβ attachment and clearance [28-30]. All of these proteins were detected in non-treated cEVs but were missing in PK-treated cEVs (**Figure 6.3 A-C**). This finding suggests that these proteins are present on the surface of cEVs. Incubation of oAβ and PK-treated cEVs resulted also in an apparent linkage as demonstrated by the higher number of particles with sizes ranging from 50 to 150 nm (**Figure S6.3**).

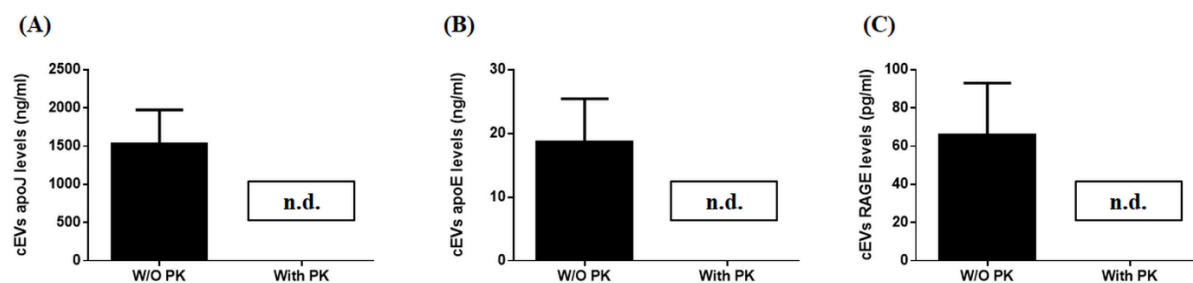


Figure 6.3 Localization of the studied proteins on cEVs. (A) apoJ expression in cEVs w and w/o PK, (B) apoE expression in cEVs w and w/o PK, (C) RAGE expression in cEVs w and w/o PK (N=2 for cEVs w PK and N=2 for cEVs w/o PK for each protein). Abbreviations: cEVs, circulating extracellular vesicles; apoJ, apolipoprotein J; apoE, apolipoprotein E; PK, proteinase K; w/o, without; w, with; n.d., not detected.

6.3.4 Cohort characteristics

Clinical, biochemical and demographic information of the study sample are shown in **Table 6.1**. The levels of lipids and inflammatory markers, as well as minerals and vitamins, were not different between cases and controls. Meanwhile, the mean age was statistically higher for pre-AD compared to controls.

Table 6.1 Clinical and biochemical characteristics of the study participants.

	Controls (n = 15)	Pre-AD (n = 15)
Clinical profile		
Age (y)	78.2 ± 5.4	83.5 ± 6.2*
Sex ratio (M/F)	7/8	5/10
BMI (Kg/m ²)	27.1 ± 4.4	25.5 ± 9.3
Education (y)	12.6 ± 1.8	13.2 ± 1.5
Score MMSE	27.5 ± 1.6	25.8 ± 2.8
Genotype (APOE4/APOE4 ⁺)	15/0	10/5
Lipid profile		
Total cholesterol (mmol/L)	4.6 ± 0.9	4.4 ± 0.8
Triglycerides (mmol/L)	1.6 ± 0.6	1.4 ± 0.3
LDLox (U/L)	43.5 ± 12.1	39.6 ± 8.4
Inflammation profile		
TNF-α (pg/mL)	1.9 ± 0.8	2.1 ± 0.9
IL-6 (pg/mL)	1.8 ± 0.8	2.3 ± 2.2
CRP (mg/L)	2.5 ± 2.5	4.3 ± 6.2
Minerals & Vitamins		
Cu (μmol/L)	12.6 ± 1.8	13.2 ± 1.5
Zn (μmol/L)	323.3 ± 130.8	277.8 ± 68.2
Pb (μmol/L)	0.13 ± 0.06	0.14 ± 0.07
25-OHD (nmol/L)	41.9 ± 24.6	56.1 ± 20.9

Values are given as mean \pm standard deviation. Abbreviations: Pre-AD, controls converted to Alzheimer's disease; AD, Alzheimer's Disease; M, male; F, female; BMI, Body Mass Index; y, years; MMSE, Mini-Mental State Examination; APOE, apolipoprotein E; (-), ϵ 4 non-carriers; (+), ϵ 4 carriers; LDLox, oxidized low density lipoprotein; TNF- α , tumor necrosis factor-alpha; IL-6, interleukin 6; CRP, C-reactive protein; Cu, copper, Zn, zinc; Pb, lead; 25-OHD, vitamin D. Student-t test was used for statistical analysis with *, $p < 0.05$ compared to controls.

The distribution of isolated cEVs was different between the two groups with a higher concentration recorded for pre-AD (**Figure 6.4 A**). This increase concerned mostly small cEVs subpopulations with mean size ranging from 100-200 nm (**Figure 6.4 B**). The total protein content in cEVs was comparable in both groups and were used to standardize the amounts of the measured proteins (data not shown).

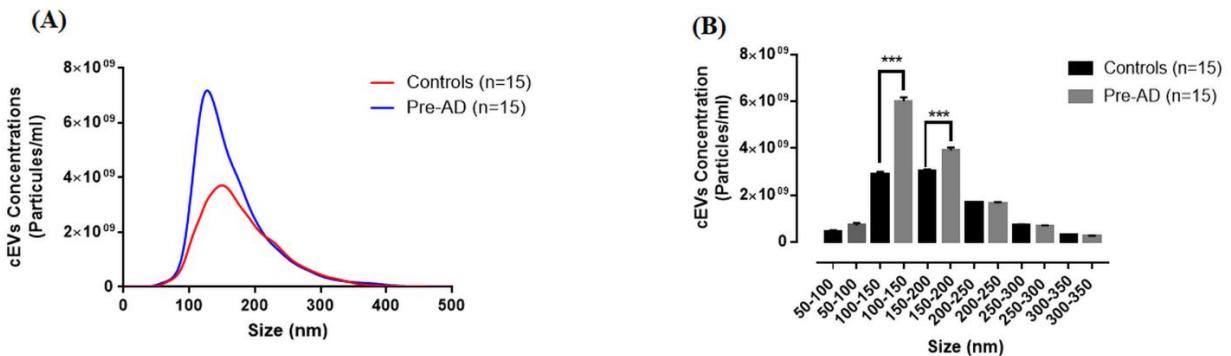


Figure 6.4 cEVs distribution in the study sample. (A) Nanoparticle tracking analysis of cEVs, (B) stratification of cEVs according to size. Abbreviations: Pre-AD, controls converted to Alzheimer's disease; cEVs, circulating extracellular vesicles; nm, nanometers. Statistical analysis was performed using the nonparametric Mann-Whitney test was used with ***, $p < 0.001$ versus controls. Bar graph are presented as mean \pm SD.

6.3.5 cEVs levels of proteins involved in EVs-oA β interaction

ELISA assay was used to evaluate the amounts of cEVs proteins implicated in oA β removal (apoJ, apoE, RAGE, haptoglobin, and klotho). Our findings revealed that apoJ cEVs levels were lower in pre-AD patients as compared to healthy controls (**Figure 6.5 A**). The levels of apoE, RAGE, haptoglobin, and klotho were not different between both groups (Figure S4). Interestingly, apoJ cEVs levels were age-independent (**Figure 6.5 B**) and were positively correlated with apoE cEVs (**Figure 6.5 C**). ApoJ and haptoglobin levels in cEVs, both extracellular chaperones proteins [31], were also positively correlated (**Figure 6.5 D**), whereas klotho levels were inversely associated with apoE in cEVs (**Figure 6.5 E**).

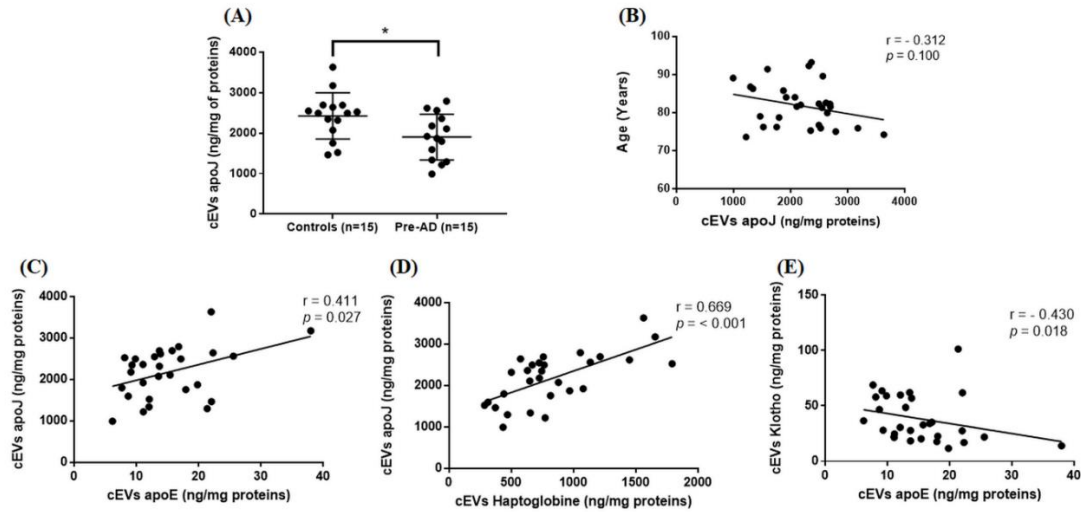


Figure 6.5 cEVs levels of clusterine and linear regression analysis between the studied proteins. (A) cEVs apoJ levels, (B) correlation between age and cEVs apoJ, (C) correlation between cEVs apoJ and cEVs apoE, (D) correlation between cEVs apoJ and cEVs haptoglobine, (E) correlation between cEVs apoE and cEVs klotho. Abbreviations: cEVs, circulating extracellular vesicles; apoJ, apolipoprotein J; apoE, apolipoprotein E. Parametric Student's t-test was used for apoJ with *, $p < 0.05$ compared to controls. Statistical analysis was performed using the correlation coefficient (r) and p values were determined using Pearson coefficient for (B) and (C) and spearman coefficient for (D) and (E). Bar graph are presented as mean \pm SD.

6.4 Discussion

A growing body of evidence supports the dynamic role of cEVs in AD. We [10,22] and others [32-33] have demonstrated that cEVs are loaded with A β , t-tau, p-tau and inflammatory markers. However, it remains unclear whether cEVs cargo is detrimental or beneficial to neurons and whether cEVs dysregulation might contribute to the early manifestation of AD. Here, we aim to disclose the relationship between cEVs and the toxic oA β forms and to investigate the changes in some proteins involved in the clearance of oA β in cEVs. from preclinical participants converted to AD.

After recent scandal on amyloid research [5-6], it is highly recommended to follow strict guideline in the preparation of A β and to provide clear technical approaches. The neurotoxic effects of oA β are well documented in the literature. oA β can bind to neuronal cells and activates glycogen synthetase kinase 3 β (GSK3 β) that stimulates tau protein phosphorylation and impairs axonal transport [34]. By interacting with nAChR receptors, oA β blocks the signal of acetylcholine neurotransmitters, thus causing synaptic dysfunction [35]. RAGE-oA β interaction at the BBB leads to reduced expression of tight junction proteins (such as occludin, ZO-1 and claudin-5), inflammatory response and oxidative stress which disturb the permeability of the BBB [36]. Accordingly, reducing circulating oA β is highly considered in AD drug discovery. Yet, physiological mechanisms to stop oA β -induced damage are poorly understood.

It has been reported that the brain EVs populations are not only derived from the CNS but could also include peripheral blood derived-EVs [37,38]. In this context, stimuli from the brain were shown to trigger the uptake of peripheral cEVs [16]. Thus, the idea that cEVs could bind oA β may have two consequences: (1) cEVs may be recruited to decrease A β burden by trapping oA β ; (2) cEVs can transport A β from the periphery to the brain. To date, only nEVs were described to bind A β in experimental conditions [39]. N2a-derived exosomes incubated with different synthetic A β fragments (A β 1–38, A β 1–40 and A β 1–42) were able to externally bind A β as determined by surface plasma resonance analysis [13]. Besides, Rajendran et al revealed that A β peptides were localized in the surface of APP N2a neuronal cells-derived exosomes using immunoelectron microscopy [11]. These studies have investigated the monomer conformational variant of A β and the analysis were limited to EVs from neuronal origin. Here we demonstrate, for the first time, that cEVs isolated from healthy participants were able to bind to oA β . Interestingly, the cEVs ranging from 50 to 200 nm, predominantly considered as small EVs [40], were the subtypes implicated in this process which suggests that larger cEVs populations (> 200 nm) display different properties with variable affinities to oA β . In this regard, differential compositional and functional properties were reported for larger EVs compared to the small-sized vesicles and novel research approaches are trying to refine EVs overlap in size by studying specific EVs subpopulations separately [41,42].

Nonetheless, it is still unclear whether oA β were internalized by cEVs or topologically bound to their surface membrane. By using the NTA, we revealed that cEVs- oA β mixture treated with PK exhibited significant decrease in the size of the majority of cEVs populations. These results suggest that oA β assemblies were bound to the surface membrane and were dissociated from cEVs by PK. This was further confirmed by the significant accumulation of particles around 100 nm which could be assigned to the detached oA β and thus, indicating that oA β interact with the topside of cEVs.

This study is the first to demonstrate the surface interaction between oA β and cEVs isolated from the periphery using oA β 1-42, the main neurotoxic A β conformation capable of inducing neuronal and synaptic damages. However, the molecular mechanism for the binding of oA β to cEVs remains elusive. Our recent works have reported the presence in cEVs of proteins highly involved in oA β sequestration such as apoE, apoJ and RAGE [20,21]. However, it is unknown whether they are expressed in the lumen or on cEVs surface. Accordingly, PK was used to completely digest the cEVs topside corona and targeted-protein analysis was carried out in non-treated and PK-treated cEVs. Our findings unveiled that apoE, apoJ and RAGE, functionally able to fix oA β [28-30], are localized on the exterior part of cEVs with apoJ being the main

expressed protein. This topology fundamentally defines the pleiotropic effects of cEVs and suggests a leading role of membrane-anchored proteins regarding the binding of the intrinsically disordered A β peptide in its oligomeric, soluble state.

However, cEVs depleted protein corona were also able to fix oA β (Figure S5) with the small cEVs population (50-150 nm) being mostly involved in this process. This is likely due to the high enrichment of small cEVs membranes in lipid species, especially sphingolipids, sphingomyelin, and cholesterol [43]. A β binding to nEVs was assigned to the presence of glycosphingolipids (GSLs) [14]. In fact, it was described that gangliosides, a subgroup of GSLs, are likely responsible of fixing A β to the external layer of nEVs [14]. Previous studies showed that only neuron-derived EVs are enriched in sphingolipids compared to glial cells and suggest that A β linkage is exclusive to nEVs [14]. Our results suggest that cEVs also exhibit this characteristic along with nEVs. However, we cannot exclude the possibility that our enriched population of cEVs include a fraction of nEVs.

It is still a matter of debate whether cEVs-oA β complexes promote and induce cell damage or whether they are efficiently cleared through elimination pathways. A recent study reported that 86% of mouse serum cEVs injected intravenously in recipient mice were taken up by microglia [44]. The intracerebral injection of cultured nEVs and mouse plasma EVs in animal models of AD resulted in an almost entirely internalization of EVs-A β clusters into microglia [13,45]. Similarly, it has been shown that nEVs are preferentially taken up by microglia following their incubation in a multicell in vitro model containing mixed cultures from brain predominant cell types [46]. The process of nEVs internalization by microglia was assigned to the presence of phosphatidylserine (PS), a glycerophospholipid (GP) entity embedded in the membrane lipid bilayer of nEVs. The PS receptors on the microglia membrane facilitate specific recognition of nEVs and trigger their phagocytosis. Other studies have shown that A β removal can be achieved by EVs through other mechanisms including the proteolytically-active EVs membrane associated-insulin-degrading enzyme (IDE) [47,48]. Hence, our work provides a new insight of cEVs properties related to A β binding and clearance and future studies should undercover mechanistically the finding herein reported using appropriate cell and animal models combined to lipidomic analysis.

To better understand the intertwined relationship between cEVs dysregulation and AD risk, we investigated the distribution and content of cEVs from healthy participants converted, 5 years later, to AD. According to our data, Pre-AD patients displayed higher cEVs number in the range of 100 to 200 nm. In line with the present finding, our previous studies demonstrated an abnormal regulation of cEVs in terms of size and number during early and late stages of AD [10,22]. According to the size range, the elevated cEVs subclasses observed among Pre-AD

patients, tend to reflect the subpopulations involved in $\text{oA}\beta$ linkage as evidenced by data described above. It is widely recognized that $\text{A}\beta$ accumulation is an early epiphenomenon in AD pathology and here we demonstrate a higher production of specific cEVs subpopulation, probably to overcome gradual $\text{A}\beta$ deposit. Likewise, increased cfEVs secretion in response to the intracerebroventricular injection of $\text{oA}\beta$ was described in wild-type mice, signifying that the presence of $\text{oA}\beta$ is sufficient to induce increased EVs release [49]. Moreover, the upregulated cEVs subpopulation corresponds more likely to EVs released by the endosomal route and more specifically, exosomes. The endocytic pathway plays an essential role in exosomes biogenesis and $\text{A}\beta$ production and it has been reported that endocytic alteration occurs at the early stage of AD, simultaneously with elevated $\text{A}\beta$ levels [50].

We should carefully consider that cEVs might paradoxically play a detrimental role during clinical AD stages. Continuous brain exposure to large quantities of cEVs associated with the chronic activation of microglia might result in progressive and irreversible neurotoxic consequences. The critical contribution of cEVs to delay the spread of AD, or other neurological $\text{A}\beta$ -induced disorders, should be balanced at costs of undesirable countereffects [11,13,14,19,39] (Figure 6.6).

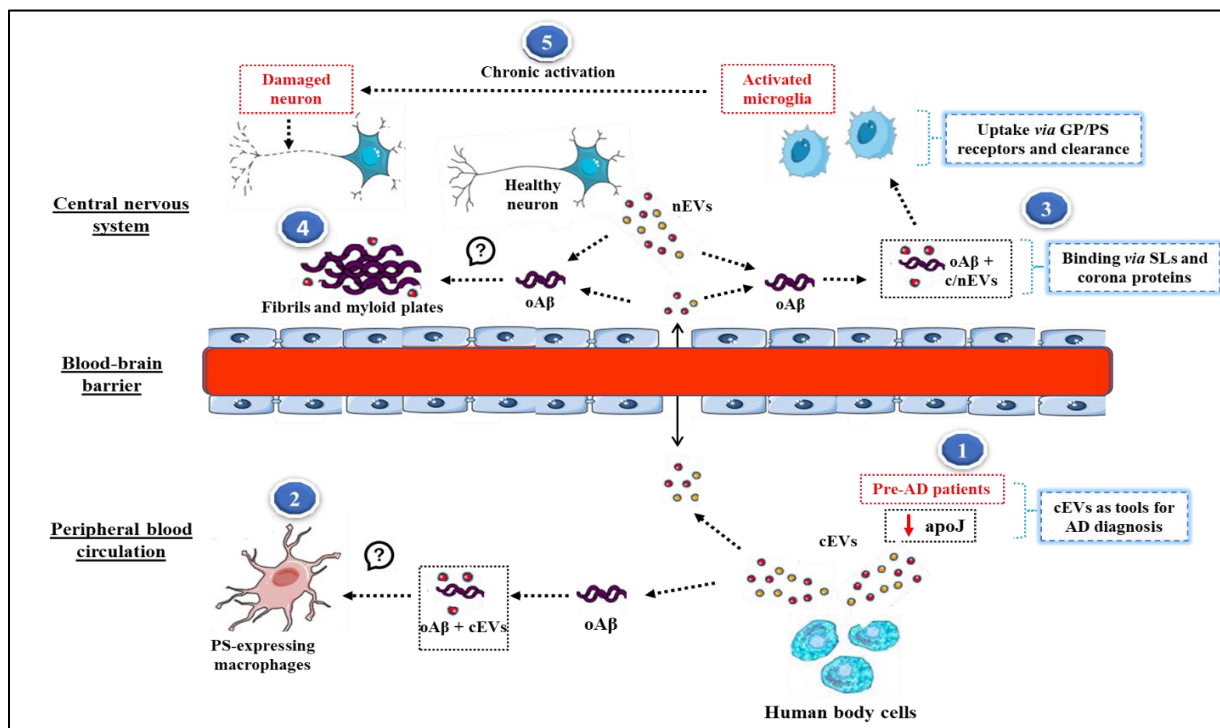


Figure 6.6 Hypothetical pathways of $\text{A}\beta$ oligomers clearance in brain and in periphery by EVs and possible countereffects. (1) The molecular signature of cEVs from preclinical AD patients might be informative of a greater risk to develop AD, 5 years before the disease onset and can be used as an innovative tool for AD diagnosis and monitoring. **(2)** cEVs might associate with $\text{oA}\beta$ in the periphery and cEVs- $\text{oA}\beta$ complex are directed to glycerophospholipids (GP)-expressing macrophage for clearance. **(3)**

cEVs are able to cross the blood-brain barrier and bind, along with nEVs, to oA β via sphingolipids and specific membrane-anchored protein. The cEVs associated with oA β are preferentially taken up by microglia for elimination. **(4)** nEVs drive A β to form amyloid fibrils and Alix, a specific EVs marker, was remarkably found at A β senile plaques suggesting a potential role of EVs in A β sequestration of under a less toxic conformation. **(5)** Chronic activation of microglia by continuous EVs uptake (alone or associated with oA β) result in damaging neuronal cells. Produced with reference to [11,13,14,19,39].

Altogether, these observations support a compromised EVs production during asymptomatic and clinical AD stages which trigger the attention toward the regulation of specific EVs molecular cargo directly (apoE, apoJ and RAGE), or indirectly (Klotho, haptoglobine) involved in A β removal. Our finding indicates that apoJ, the major protein detected in cEVs protein corona, is significantly altered in Pre-AD patients. This phenomenon could reflect a reduced effectiveness of cEVs released from Pre-AD to fix and clear A β and could explain, in part, their conversion to AD. However, the higher release of cEVs might be a support mechanism to balance the reduced apoJ presence in cEVs lipid membrane. Continuous cEVs production and uptake by the brain might induce harmful effects through glial cell activation [19] (**Figure 6.6**).

The regression analysis revealed that apoJ levels were strongly correlated with haptoglobin, both extracellular chaperones proteins, an acute-phase proteins exhibiting antioxidant and anti-inflammatory activities that are found at elevated levels in MCI and AD patients [51]. Besides, klotho protein was inversely correlated with apoE levels in cEVs. Recent research work suggest that klotho improves A β clearance in the brain of APP/PS1 mice and protected against cognitive deficits [52]. The inversed regulation of Klotho regarding apolipoproteins might then explain the convergence between the continuous generation of A β and cEVs failure to efficiently suppress A β deposition.

6.5 Conclusion

In conclusion, the versatile capacity of cEVs to trap and eliminate oA β , mediated by combined surface-attached proteins seems to endorse routine defense mechanisms against A β pathology. The disruption of cEVs number and content from preclinical AD participants should be endorsed with comparative analysis to healthy controls on their ability to bind oA β . Future studies should consider this aspect to confirm that this role is compromised early in AD. Besides, the proteomic and lipidomic analysis of cEVs remains an important input to understand AD onset. Hence, it is highly recommended to assess cEVs lipid species composition and concentration from asymptomatic and symptomatic AD patients since it could reveal novel targets for AD therapy and could potentially be applied to monitor the disease risk and progression.

7 BIBLIOGRAPHIE 3^E ARTICLE

1. Yates, A.G.; Pink, R.C.; Erdbrügger, U.; Siljander, P.R.; Dellar, E.R.; Pantazi, P.; Akbar, N.; Cooke, W.R.; Vatish, M.; Dias-Neto, E.; et al. In sickness and in health: The functional role of extracellular vesicles in physiology and pathology in vivo: Part I: Health and Normal Physiology: Part I: Health and Normal Physiology. *J. Extracell. Vesicles* **2022**, *11*, e12151, doi:10.1002/jev2.12151.
2. Yates, A.G.; Pink, R.C.; Erdbrügger, U.; Siljander, P.R.; Dellar, E.R.; Pantazi, P.; Akbar, N.; Cooke, W.R.; Vatish, M.; Dias-Neto, E.; et al. In sickness and in health: The functional role of extracellular vesicles in physiology and pathology in vivo: Part II: Pathology: Part II: Pathology. *J. Extracell. Vesicles* **2022**, *11*, e12190, doi:10.1002/jev2.12190.
3. Sharma, S. Role of Extracellular Vesicles in Alzheimer's Disease: Current Advances. *Curr. Mol. Med.* **2022**, *22*, 85-97, doi:10.2174/1566524021666210406121807.
4. 2021 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* **2021**, *17*, 327-406, doi:10.1002/alz.12328.
5. Piller, C. Blots on a field?. *Science* **2022**, *377*, 358-363, doi:10.1126/science.add9993.
6. Selokoe, D.; Cummings, J. News story miscasts Alzheimer's science. *Science* **2022**, *377*, 934-935, doi: 10.1126/science.ade1872
7. Sardar Sinha, M.; Ansell-Schultz, A.; Civitelli, L.; Hildesjö, C.; Larsson, M.; Lannfelt, L.; Ingelsson, M.; Hallbeck, M. Alzheimer's disease pathology propagation by exosomes containing toxic amyloid-beta oligomers. *Acta Neuropathol.* **2018**, *136*, 41-56, doi:10.1007/s00401-018-1868-1.
8. Jia, L.; Qiu, Q.; Zhang, H.; Chu, L.; Du, Y.; Zhang, J.; Zhou, C.; Liang, F.; Shi, S.; Wang, S.; et al. Concordance between the assessment of A β 42, T-tau, and P-T181-tau in peripheral blood neuronal-derived exosomes and cerebrospinal fluid. *Alzheimers Dement.* **2019**, *15*, 1071-1080, doi:10.1016/j.jalz.2019.05.002.
9. Spitzer, P.; Mulzer, L.-M.; Oberstein, T.J.; Munoz, L.E.; Lewczuk, P.; Kornhuber, J.; Herrmann, M.; Maler, J.M. Microvesicles from cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease display reduced concentrations of tau and APP protein. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 7089, doi:10.1038/s41598-019-43607-7.
10. Ben Khedher, M.R.; Haddad, M.; Laurin, D.; Ramassamy, C. Apolipoprotein E4-driven effects on inflammatory and neurotrophic factors in peripheral extracellular vesicles from cognitively impaired, no dementia participants who converted to Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. (N Y)* **2021**, *7*, e12124, doi:10.1002/trc2.12124.
11. Rajendran, L.; Honsho, M.; Zahn, T.R.; Keller, P.; Geiger, K.D.; Verkade, P.; Simons, K. Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 11172-11177, doi:10.1073/pnas.0603838103.
12. An, K.; Klyubin, I.; Kim, Y.; Jung, J.H.; Mably, A.J.; O'Dowd, S.T.; Lynch, T.; Kanmert, D.; Lemere, C.A.; Finan, G.M.; et al. Exosomes neutralize synaptic-plasticity-disrupting activity of A β assemblies in vivo. *Mol. Brain* **2013**, *6*, 47-47, doi:10.1186/1756-6606-6-47.
13. Yuyama, K.; Sun, H.; Sakai, S.; Mitsutake, S.; Okada, M.; Tahara, H.; Furukawa, J.-i.; Fujitani, N.; Shinohara, Y.; Igarashi, Y. Decreased Amyloid- β Pathologies by Intracerebral Loading of Glycosphingolipid-enriched Exosomes in Alzheimer Model Mice*. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 24488-24498, doi:https://doi.org/10.1074/jbc.M114.577213.
14. Yuyama, K.; Sun, H.; Usuki, S.; Sakai, S.; Hanamatsu, H.; Mioka, T.; Kimura, N.; Okada, M.; Tahara, H.; Furukawa, J.-i.; et al. A potential function for neuronal exosomes: Sequestering intracerebral amyloid- β peptide. *FEBS Lett.* **2015**, *589*, 84-88, doi:https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.11.027.
15. Kojima, R.; Bojar, D.; Rizzi, G.; Hamri, G.C.-E.; El-Baba, M.D.; Saxena, P.; Ausländer, S.; Tan, K.R.; Fussenegger, M. Designer exosomes produced by implanted cells intracerebrally deliver therapeutic cargo for Parkinson's disease treatment. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1305, doi:10.1038/s41467-018-03733-8.
16. Kur, I.M.; Prouvot, P.H.; Fu, T.; Fan, W.; Müller-Braun, F.; Das, A.; Das, S.; Deller, T.; Roeper, J.; Strohm, A.; et al. Neuronal activity triggers uptake of hematopoietic extracellular vesicles in vivo. *PLoS Biol.* **2020**, *18*, e3000643, doi:10.1371/journal.pbio.3000643.

17. Morad, G.; Carman, C.V.; Hagedorn, E.J.; Perlin, J.R.; Zon, L.I.; Mustafaoglu, N.; Park, T.-E.; Ingber, D.E.; Daisy, C.C.; Moses, M.A. Tumor-Derived Extracellular Vesicles Breach the Intact Blood–Brain Barrier via Transcytosis. *ACS Nano*. **2019**, *13*, 13853-13865, doi:10.1021/acsnano.9b04397.
18. Wiklander, O.P.; Nordin, J.Z.; O'Loughlin, A.; Gustafsson, Y.; Corso, G.; Mäger, I.; Vader, P.; Lee, Y.; Sork, H.; Seow, Y.; et al. Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *J. Extracell. Vesicles* **2015**, *4*, 26316, doi:10.3402/jev.v4.26316.
19. Morales-Prieto, D.M.; Murrieta-Coxca, J.M.; Stojiljkovic, M.; Diezel, C.; Streicher, P.E.; Henao-Restrepo, J.A.; Röstel, F.; Lindner, J.; Witte, O.W.; Weis, S.; et al. Small Extracellular Vesicles from Peripheral Blood of Aged Mice Pass the Blood-Brain Barrier and Induce Glial Cell Activation. *Cells* **2022**, *11*, doi:10.3390/cells11040625.
20. Ben Khedher, M.R.; Haddad, M.; Laurin, D.; Ramassamy, C. Effect of APOE ϵ 4 allele on levels of apolipoproteins E, J, and D, and redox signature in circulating extracellular vesicles from cognitively impaired with no dementia participants converted to Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. (Amst)* **2021**, *13*, e12231, doi:10.1002/dad2.12231.
21. Haddad, M.; Perrotte, M.; Ben Khedher, M.R.; Madec, E.; Lepage, A.; Fülöp, T.; Ramassamy, C. Levels of Receptor for Advanced Glycation End Products and Glyoxalase-1 in the Total Circulating Extracellular Vesicles from Mild Cognitive Impairment and Different Stages of Alzheimer's Disease Patients. *J. Alzheimer's Dis.* **2021**, *84*, 227-237, doi:10.3233/jad-210441.
22. Perrotte, M.; Haddad, M.; Le Page, A.; Frost, E.H.; Fülöp, T.; Ramassamy, C. Profile of pathogenic proteins in total circulating extracellular vesicles in mild cognitive impairment and during the progression of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **2020**, *86*, 102-111, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2019.10.010.
23. Haddad, M.; Perrotte, M.; Landri, S.; Lepage, A.; Fülöp, T.; Ramassamy, C. Circulating and Extracellular Vesicles Levels of N-(1-Carboxymethyl)-L-Lysine (CML) Differentiate Early to Moderate Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2019**, *69*, 751-762, doi:10.3233/jad-181272.
24. Haddad, M.; Perrotte, M.; Khedher, M.R.B.; Demongin, C.; Lepage, A.; Fülöp, T.; Ramassamy, C. Methylglyoxal and Glyoxal as Potential Peripheral Markers for MCI Diagnosis and Their Effects on the Expression of Neurotrophic, Inflammatory and Neurodegenerative Factors in Neurons and in Neuronal Derived-Extracellular Vesicles. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20194906.
25. Coumans, F.A.W.; Brisson, A.R.; Buzas, E.I.; Dignat-George, F.; Drees, E.E.E.; El-Andaloussi, S.; Emanuelli, C.; Gasecka, A.; Hendrix, A.; Hill, A.F.; et al. Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circ. Res.* **2017**, *120*, 1632-1648, doi:10.1161/circresaha.117.309417.
26. Stine, W.B.; Jungbauer, L.; Yu, C.; LaDu, M.J. Preparing synthetic A β in different aggregation states. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *670*, 13-32, doi:10.1007/978-1-60761-744-0_2.
27. Cvjetkovic, A.; Jang, S.C.; Konečná, B.; Höög, J.L.; Sihlbom, C.; Lässer, C.; Lötvall, J. Detailed Analysis of Protein Topology of Extracellular Vesicles—Evidence of Unconventional Membrane Protein Orientation. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 36338, doi:10.1038/srep36338.
28. Zandi-Lang, M.; Fanaee-Danesh, E.; Sun, Y.; Albrecher, N.M.; Gali, C.C.; Čančar, I.; Kober, A.; Tam-Amersdorfer, C.; Stracke, A.; Storck, S.M.; et al. Regulatory effects of simvastatin and apoJ on APP processing and amyloid- β clearance in blood-brain barrier endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Biol. Lipids* **2018**, *1863*, 40-60, doi:https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.09.008.
29. Ghosh, S.; Sil, T.B.; Dolai, S.; Garai, K. High-affinity multivalent interactions between apolipoprotein E and the oligomers of amyloid- β . *FEBS J* **2019**, *286*, 4737-4753, doi:10.1111/febs.14988.
30. Bongarzone, S.; Savickas, V.; Luzi, F.; Gee, A.D. Targeting the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): A Medicinal Chemistry Perspective. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 7213-7232, doi:10.1021/acs.jmedchem.7b00058.
31. Yerbury, J.J.; Rybchyn, M.S.; Easterbrook-Smith, S.B.; Henriques, C.; Wilson, M.R. The Acute Phase Protein Haptoglobin Is a Mammalian Extracellular Chaperone with an Action Similar to Clusterin. *Biochemistry* **2005**, *44*, 10914-10925, doi:10.1021/bi050764x.

32. Aharon, A.; Spector, P.; Ahmad, R.S.; Horry, N.; Sabbach, A.; Brenner, B.; Aharon-Peretz, J. Extracellular Vesicles of Alzheimer's Disease Patients as a Biomarker for Disease Progression. *Mol. Neurobiol.* **2020**, *57*, 4156-4169, doi:10.1007/s12035-020-02013-1.
33. Li, F.; Xie, X.Y.; Sui, X.F.; Wang, P.; Chen, Z.; Zhang, J.B. Profile of Pathogenic Proteins and MicroRNAs in Plasma-derived Extracellular Vesicles in Alzheimer's Disease: A Pilot Study. *Neuroscience* **2020**, *432*, 240-246, doi:10.1016/j.neuroscience.2020.02.044.
34. DaRocha-Souto, B.; Coma M, Pérez-Nievas, B.G.; Scotton, T.C.; Siao, M.; Sánchez-Ferrer, P.; Hashimoto, T.; Fan, Z.; Hudry, E.; Barroeta, I.; et al. Activation of glycogen synthase kinase-3 beta mediates β -amyloid induced neuritic damage in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* **2012**, *45*, 425-437, doi:10.1016/j.nbd.2011.09.002.
35. Jürgensen, S.; Ferreira, S.T. Nicotinic receptors, amyloid-beta, and synaptic failure in Alzheimer's disease. *J. Mol. Neurosci.* **2010**, *40*, 221-229 doi:10.1007/s12031-009-9237-0.
36. Kook, S.Y.; Hong, H.S.; Moon, M.; Ha, C.M.; Chang, S.; Mook-Jung, I. $A\beta_{1-42}$ -RAGE interaction disrupts tight junctions of the blood-brain barrier via Ca^{2+} -calcineurin signaling. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 8845-8854, doi:10.1523/JNEUROSCI.6102-11.2012.
37. Chen, C.C.; Liu, L.; Ma, F.; Wong, C.W.; Guo, X.E.; Chacko, J.V.; Farhoodi, H.P.; Zhang, S.X.; Zimak, J.; Ségaliny, A.; et al. Elucidation of Exosome Migration across the Blood-Brain Barrier Model In Vitro. *Cell. Mol. Bioeng.* **2016**, *9*, 509-529, doi:10.1007/s12195-016-0458-3.
38. Jakubec, M.; Maple-Grødem, J.; Akbari, S.; Nesse, S.; Halskau, Ø.; Mork-Jansson, A.E. Plasma-derived exosome-like vesicles are enriched in lyso-phospholipids and pass the blood-brain barrier. *PLoS One* **2020**, *15*, e0232442, doi:10.1371/journal.pone.0232442.
39. Yuyama, K.; Igarashi, Y. Exosomes as Carriers of Alzheimer's Amyloid- β . *Front. Neurosci.* **2017**, *11*, 229-229, doi:10.3389/fnins.2017.00229.
40. Zhao, B.; Chen, Q.; Zhao, L.; Mao, J.; Huang, W.; Han, X.; Liu, Y. Periodontal Ligament Stem Cell-Derived Small Extracellular Vesicles Embedded in Matrigel Enhance Bone Repair Through the Adenosine Receptor Signaling Pathway. *Int. J. Nanomedicine* **2022**, *17*, 519-536, doi:10.2147/IJN.S346755.
41. Kowal, J.; Arras, G.; Colombo, M.; Jouve, M.; Morath, J.P.; Primdal-Bengtson, B.; Dingli, F.; Loew, D.; Tkach, M.; Théry, C. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2016**, *113*, E968-977, doi:10.1073/pnas.1521230113.
42. Vagner, T.; Chin, A.; Mariscal, J.; Bannykh, S.; Engman, D.M.; Di Vizio, D. Protein Composition Reflects Extracellular Vesicle Heterogeneity. *Proteomics* **2019**, *19*, e1800167, doi:10.1002/pmic.201800167.
43. Llorente, A.; Skotland, T.; Sylvänne, T.; Kauhanen, D.; Róg, T.; Orłowski, A.; Vattulainen, I.; Ekroos, K.; Sandvig, K. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1831*, 1302-1309, doi:10.1016/j.bbali.2013.04.011.
44. Li, J.J.; Wang, B.; Kodali, M.C.; Chen, C.; Kim, E.; Patters, B.J.; Lan, L.; Kumar, S.; Wang, X.; Yue, J.; et al. In vivo evidence for the contribution of peripheral circulating inflammatory exosomes to neuroinflammation. *J. Neuroinflammation* **2018**, *15*, 8, doi:10.1186/s12974-017-1038-8.
45. Zheng, T.; Pu, J.; Chen, Y.; Mao, Y.; Guo, Z.; Pan, H.; Zhang, L.; Zhang, H.; Sun, B.; Zhang, B. Plasma Exosomes Spread and Cluster Around β -Amyloid Plaques in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* **2017**, *9*, 12, doi:10.3389/fnagi.2017.00012.
46. Fitzner, D.; Schnaars, M.; van Rossum, D.; Krishnamoorthy, G.; Dibaj, P.; Bakhti, M.; Regen, T.; Hanisch, U.K.; Simons, M. Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J. Cell. Sci.* **2011**, *124*, 447-458, doi:10.1242/jcs.074088.
47. Bulloj, A.; Leal, M.C.; Xu, H.; Castaño, E.M.; Morelli, L. Insulin-Degrading Enzyme Sorting in Exosomes: A Secretory Pathway for a Key Brain Amyloid- β Degrading Protease. *J. Alzheimer's Dis.* **2010**, *19*, 79-95, doi:10.3233/JAD-2010-1206.
48. Tamboli, I.Y.; Barth, E.; Christian, L.; Siepmann, M.; Kumar, S.; Singh, S.; Tolksdorf, K.; Heneka, M.T.; Lütjohann, D.; Wunderlich, P.; et al. Statins Promote the Degradation of Extracellular Amyloid β -Peptide by Microglia via Stimulation of Exosome-associated Insulin-degrading Enzyme

- (IDE) Secretion*. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 37405-37414, doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.149468>.
49. Vandendriessche, C.; Balusu, S.; Van Cauwenberghe, C.; Brkic, M.; Pauwels, M.; Plehiers, N.; Bruggeman, A.; Dujardin, P.; Van Imschoot, G.; Van Wonterghem, E.; et al. Importance of extracellular vesicle secretion at the blood–cerebrospinal fluid interface in the pathogenesis of Alzheimer’s disease. *Acta Neuropathol. Commun.* **2021**, 9, 143, doi:10.1186/s40478-021-01245-Z.
50. Cataldo, A.M.; Peterhoff, C.M.; Troncoso, J.C.; Gomez-Isla, T.; Hyman, B.T.; Nixon, R.A. Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. *Am. J. Pathol.* **2000**, 157, 277-286, doi:10.1016/s0002-9440(10)64538-5.
51. Zhu, C.J.; Jiang, G.X.; Chen, J.M.; Zhou, Z.M.; Cheng, Q. Serum haptoglobin in Chinese patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: A case-control study. *Brain Res. Bull.* **2018**, 137, 301-305, doi:10.1016/j.brainresbull.2018.01.005.
52. Zhao, Y.; Zeng, C.-Y.; Li, X.-H.; Yang, T.-T.; Kuang, X.; Du, J.-R. Klotho overexpression improves amyloid- β clearance and cognition in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Aging Cell.* **2020**, 19, e13239, doi:<https://doi.org/10.1111/acer.13239>.

8 DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

8.1 Aperçu général

La MA est un problème de santé publique qui touche un nombre de plus en plus croissant d'individus à travers le monde. L'installation irréversible des lésions neurodégénératives (dépôt d'A β , dépôt de neurofibrilles, atrophie du cerveau) et leur détection tardive, complique les efforts visant à prévenir l'apparition et la progression de la MA. De plus, les techniques diagnostiques par neuroimagerie et par le LCR (calcul des ratios entre A β et Tau) sont coûteuses, invasives et relativement fiables. La recherche de biomarqueurs précoces au niveau de la périphérie s'impose ainsi comme l'un des défis majeurs actuels et les buts de ce doctorat étaient **(1)** d'identifier des marqueurs périphériques non invasifs et applicables en routine permettant de diagnostiquer et de suivre l'évolution de la MA, en complément avec les autres tests et; **(2)** d'identifier des marqueurs précoces permettant de prédire la MA au stade préclinique afin d'appliquer tôt et maximiser l'efficacité des mesures préventives et des interventions thérapeutiques.

Dans cette perspective, une étude pancanadienne qui regroupait à l'origine 10 263 participants âgés de 65 ans et plus (Étude CSHA) a pu évaluer, après 5 ans, l'évolution d'un groupe d'individus présentant des troubles cognitifs sans rencontrer les critères de démence (CIND : phase pré-clinique) vers la démence. La force de l'étude CSHA est que la sélection des sujets était faite de façon aléatoire et représentative de la population générale âgée de 65 ans et plus au Canada. La cohorte de cette étude offrait une opportunité très intéressante d'identifier des marqueurs périphériques précoces de la MA. Les individus CIND peuvent évoluer vers d'autres sous-types de démence autre que la MA comme la DV ou les démences mixtes (Murr *et al.*, 2014). Ainsi, il est important de définir une classification rigoureuse des individus CIND présentant un risque plus élevé de développer la MA plutôt que d'autres sous-types de démence. Connaissant le rôle majeur du variant *APOE* ϵ 4 dans la prédisposition à la MA (**voir section 1.2.3.4-a**), nous avons choisi de stratifier les participants CIND en fonction de la présence ou non de l'allèle ϵ 4 et de comparer ceux qui ont évolué vers la MA (CIND-*APOE*- ϵ 4+-AD) à des individus cognitivement normaux aux deux temps.

8.2 Partie I : Caractérisation des EVs et impact du variant *APOE* ϵ 4

Bien que la MA soit associée à la neurodégénérescence cérébrale, de nombreuses études ont montré que les modifications de certaines protéines plasmatiques pouvaient être associées au déclin cognitif (Henriksen *et al.*, 2014; Hye *et al.*, 2014; Perrotte *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2018). Des

études plus récentes ont montré que les EVs, des vésicules nanométriques libérées par divers types de cellules notamment celles du cerveau, renferment un bon nombre de ces protéines périphériques ainsi que d'autres composés moléculaires et qu'elles seraient un excellent outil de diagnostic pour certaines pathologies et surtout pour la MA (Cai *et al.*, 2018) (**voir tableau 1.2**).

Dans un premier temps, il était essentiel de caractériser les EVs isolées à partir des participants cognitivement normaux et CIND, stratifiés selon la présence ou non du variant *APOE* ϵ 4. Cette étape est nécessaire pour s'assurer de la bonne qualité du matériel biologique extrait. Notre caractérisation a été effectuée selon cinq techniques différentes et complémentaires à savoir la TEM (morphologie), le NTA (concentration et taille), la microscopie confocale (double marquage), Western Blot (marqueurs spécifiques) et l'analyse BCA (contenu vésiculaire en protéines). Selon le guide méthodologique pour l'étude des EVs (Coumans *et al.*, 2017), il est recommandé d'utiliser au moins trois techniques pour caractériser les EVs. Dans la présente étude, on a utilisé un nombre supérieur avec des techniques permettant la caractérisation des EVs en vrac « bulk » (WB, BCA) mais aussi à l'échelle d'une simple particule (NTA, TEM, FACS) (**Figures 3.1 & 5.1**). Il est à préciser que la concentration totale en protéines dans les EVs et dans le plasma était similaire entre les groupes ce qui suggère son utilisation pour normaliser les niveaux des marqueurs étudiés.

On a remarqué que les participants CIND porteurs de l'allèle *APOE* ϵ 4 libèrent moins d'EVs dans la fraction 30 à 200 nm (**Figure 3.2B**). Les EVs de cette taille sont connues sous l'appellation de small (ou petit) EVs (sEVs) (Zhao *et al.*, 2022) et correspondent généralement aux exosomes qui sont formés par la voie endosomale. Dans une étude récente, il a été décrit que l'altération de la voie endocytaire entraîne une diminution de la libération des EVs dans le cerveau de patients MA porteurs de l'*APOE* ϵ 4 (Peng *et al.*, 2019). Il s'avère aussi que l'altération de la voie endocytaire se produit très tôt, précédant même le dépôt d'A β et les signes neuropathologiques de la MA et qu'elle est liée au génotype d'*APOE* (Cataldo *et al.*, 2000). Ceci suggère que la présence de l'*APOE* ϵ 4 affecte la biogenèse et/ou la libération des exosomes mais les explications mécanistiques à ce sujet restent à découvrir.

L'impact d'*APOE* ϵ 4 à la fois sur le nombre et le contenu d'EVs pourrait s'expliquer par l'enrichissement d'EVs en lipides (Dinkins *et al.*, 2017). En effet, la biogenèse d'EVs fait appel à l'interaction entre le complexe de tri endosomal nécessaire au transport (ESCRT) et aux lipides associés à la membrane plasmique, principalement le cholestérol, les sphingolipides et les céramides (van Niel *et al.*, 2018). Sachant que la fonction principale de l'apoE consiste à transporter les lipides chargés de cholestérol qui sont essentiels à la structure de la membrane

cellulaire et que l'*APOE* $\epsilon 4$ effectue moins efficacement cette tâche que les variants *APOE* $\epsilon 3$ et *APOE* $\epsilon 2$ (Bu, 2009), suggère que l'*APOE* $\epsilon 4$ affecte la formation et la libération des EVs. Par conséquent, le lien physiopathologique entre l'*APOE* $\epsilon 4$ et le système endosomal pourrait entraîner des changements anormaux tels que la formation de vésicules de petites tailles et un tri sélectif des protéines au sein de ces vésicules chez les porteurs d'*APOE* $\epsilon 4$. Comme l'indique notre étude, ce phénomène se produit jusqu'à 5 ans avant l'installation de la MA.

8.3 Partie II : Identification des marqueurs précoces de la MA

8.3.1 Étude des marqueurs liés à la neurodégénérescence et la survie neuronale

Après avoir caractérisé les EVs, nous avons quantifié une quinzaine de protéines (synaptiques, toxiques, inflammatoires, trophiques) qui seraient liées à la pathogenèse de la MA et dont certaines sont testées pour la première fois au niveau des EVs et du plasma (**Figure 8.1**).

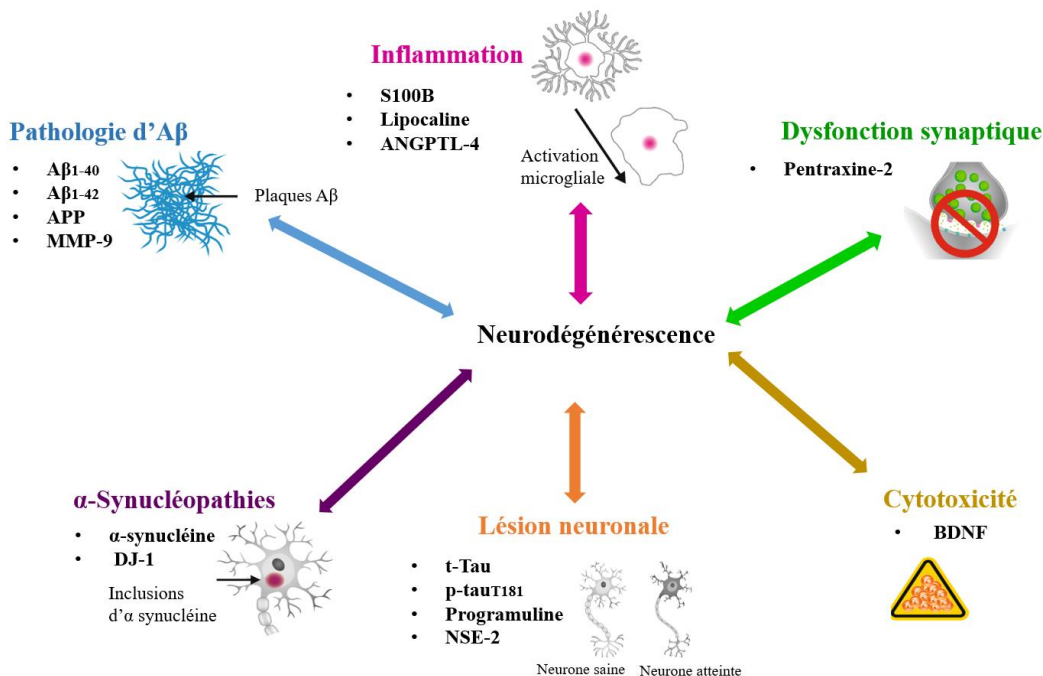


Figure 8.1 Liste des protéines analysées dans l'échantillon à l'étude. Illustration personnelle. Abréviations : Aβ, amyloïde bêta ; APP, protéine précurseur d'amyloïde ; MMP-9, Métallopeptidase matricielle 9 ; ANGPTL-4, angiopoïétine like 4 ; BDNF, Facteur neurotrophique dérivé du cerveau ; NSE-2, émolase spécifique des neurones ; DJ-1, Protéine déglycose

Les marqueurs sélectionnés ont été dosés dans le plasma et les EVs par la technique de Luminex avec une sensibilité de détection élevée allant jusqu'au picogramme (**voir Annexe IV**).

On a remarqué que les marqueurs pathologiques de la MA ($A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$, t-Tau, pTau T81) ne changeaient pas alors que des différences significatives ont pu être observées sur un nombre de protéines trophiques et inflammatoires analysées chez les CIND-*APOE*- $\epsilon 4^+$. Cela indique que des changements précoces dans la régulation de certaines protéines cellulaires peuvent précéder le dépôt amyloïde et neurofibrillaire ce qui ouvre de nouvelles perspectives quant au choix des marqueurs les plus adaptés pour la détection précoce de la MA.

Ces variations ont été enregistrées surtout au niveau de sept protéines : lipocaline, S100B, ANGPTL-4, pentraxine-2, DJ-1, progranuline et α -synucléine. Ces changements étaient observés en majeure partie dans les EVs (n=7) par rapport au plasma (n=2). Ces données indiquent un pouvoir discriminatif supérieur des EVs et une meilleure capacité à refléter les changements pathologiques précoces que le plasma. De plus, certains marqueurs étaient 10 à 100 fois (NPTX-2 et S100B, respectivement) plus concentrés dans les EVs que le plasma. Cela peut être expliqué par les propriétés biologiques des EVs qui permettraient de mieux conserver l'information biologique. En fait, les EVs possèdent une bicouche lipidique imperméable qui protège leurs contenus (cargo moléculaire) des dégradations potentielles du système circulatoire causées généralement par des protéases ou le foie. Ainsi, le temps de demi-vie de molécules cibles encapsulées dans les EVs est supérieur comparé à celui présent dans le sang sous forme libre. Certaines molécules d'intérêt en libre circulation peuvent adhérer aussi à d'autres protéines plasmatiques ou cellules sanguines (effet de matrice) ce qui diminuerait davantage leur détection. Un autre point très important en faveur des EVs, c'est qu'elles pourraient passer à travers la BHE du cerveau vers le sang et *vice versa*, ce qui veut dire qu'elles peuvent refléter et/ou causer des processus neurodégénératifs (Kojima *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2014; Skog *et al.*, 2008; Wiklander *et al.*, 2015).

Pour affiner davantage notre recherche, nous avons comparé les participants CIND-*APOE* $\epsilon 4^+$ convertis à la MA (CIND-*APOE* $\epsilon 4^+$ -MA) à des participants cognitivement normaux recrutés dans les mêmes conditions. Nous avons trouvé que les niveaux d' α -Syn (monomères) étaient significativement plus faibles chez les CIND-*APOE* $\epsilon 4^+$ convertis à la MA. Cette diminution de la forme soluble d' α -Syn pourrait être liée à une accumulation intracellulaire sous forme d'agrégats (formes polymériques). Cette observation est importante car des études expérimentales ont lié l'accumulation de l' α -Syn à l'agrégation intracellulaire et à l'hyperphosphorylation de tau (Waxman & Giasson, 2011) ainsi qu'à la surproduction d' $A\beta$ via des interactions moléculaires spécifiques avec la préséniline 1 (Winslow *et al.*, 2014). De plus, il a été suggéré que l'apoE pourrait être impliquée dans la distribution d' α -Syn entre la matrice extracellulaire et intracellulaire et que le

variant *APOE* $\epsilon 4$ affecte considérablement l'internalisation d' α -Syn (Ogaki *et al.*, 2018). Ces données soulignent certains processus biologiques qui pourraient expliquer la conversion des patients CIND porteurs d'*APOE* $\epsilon 4$ vers la MA. En accord avec nos résultats, d'autres études ont montré que les niveaux d' α -Syn dans le LCR étaient également associés au risque de la MA chez les individus précliniques et MCI (Berge *et al.*, 2016; Vergallo *et al.*, 2018) et qu'ils étaient augmentés chez des patients *APOE* $\epsilon 4$ MCI qui ont progressé vers la MA (Twohig *et al.*, 2018). L' α -Syn analysée au niveau des globules rouges s'est avérée aussi plus faibles chez des patients MA *APOE* $\epsilon 4$ comparés à des témoins sains (Baldacci *et al.*, 2019). Néanmoins, il est à noter que notre étude montre, pour la première fois, la présence d' α -Syn dans les EVs périphériques.

Sachant que dans l'analyse des biomarqueurs, une combinaison de marqueurs pourrait être plus informative avec un pouvoir discriminatif plus puissant. Dans cet esprit, nous avons trouvé que l' α -Syn et la pentraxine-2 (NPTX-2) étaient fortement corrélées entre elles et que le ratio entre ces deux protéines synaptiques NPTX-2/ α -syn a permis de discriminer entre les participants CIND convertis à la MA à des participants qui sont restés cognitivement sains. Leur ratio était inversement corrélé au score du MMSE et associé à la présence du variant *APOE* $\epsilon 4$ +. L'implication pathologique de la variation du ratio entre ces protéines dans le développement de la MA serait liée à leurs fonctions respectives. L' α -Syn joue aussi le rôle d'une protéine présynaptique qui contrôle l'exocytose à divers systèmes de neurotransmetteurs dans le cerveau en coordonnant la fusion, la libération et le recyclage des vésicules synaptiques (Ghiglieri *et al.*, 2018). De l'autre côté de la fente synaptique, la NPTX-2 se lie et induit le regroupement des récepteurs glutamatergiques postsynaptiques ionotropes de type AMPA pour réguler la plasticité synaptique et maintenir la potentialisation à long terme (Dong *et al.*, 2015; Elbaz *et al.*, 2015). Ainsi, chacune des deux protéines synaptiques agit simultanément et en parfaite harmonie pour assurer la bonne transmission du flux neuronal et tout dysfonctionnement de l'une ou l'autre portera atteinte à la transmission synaptique. En tenant compte que la perte synaptique est à l'origine du déclin précoce de la mémoire chez les patients Alzheimer (Selkoe, 2002; Xiao *et al.*, 2017), ce rapport peut être indicatif d'une altération de la fonction synaptique ou de la dégénérescence synaptique précoce l'installation même de la maladie. Nos résultats suggèrent que le rapport NPTX-2/ α -Syn, analysé au niveau des EVs, permet de prédire jusqu'à 5 ans à l'avance, l'évolution des participants CIND vers la MA. La force de ce ratio réside dans le reflet de sa fonction biologique, sa corrélation inverse aux scores du MMSE, son association à la présence de l'allèle *APOE* $\epsilon 4$ et sa détection chez des individus précliniques avant leur conversion à la MA.

8.3.2 Étude des marqueurs liés au stress oxydant

Dans la deuxième partie de notre travail, nous nous sommes intéressés aux marqueurs liés au stress oxydant. Le SO est un élément clé dans la physiopathologie de la MA puisqu'il est associé à de nombreuses anomalies cellulaires et moléculaires impliquées dans l'incidence de cette maladie telles que l'hyperphosphorylation de la protéine tau (Kang *et al.*, 2017), la formation de plaques séniles (Cheignon *et al.*, 2018), la neuroinflammation (Agostinho *et al.*, 2010), la diminution de la plasticité synaptique (Tönnies & Trushina, 2017) et le dysfonctionnement mitochondrial (Misrani *et al.*, 2021). Des études *in vitro* (Dang *et al.*, 2011; Dang *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2013) et *in vivo* (Huang *et al.*, 2013) ont également analysé l'effet néfaste du SO sur la régulation et la survie des cellules neuronales.

Fait intéressant, les dommages causés par le SO seraient amplifiés chez les patients atteints de MA en présence du variant *APOE* $\epsilon 4$ plutôt que les isoformes $\epsilon 3$ et $\epsilon 2$ (Dose *et al.*, 2016). Dans ce contexte, les travaux de Ramassamy *et al.* ont montré une augmentation de la peroxydation lipidique associée à des niveaux de glutathion plus faibles et à des activités réduites de la glutathion peroxydase et de la catalase dans l'hippocampe et le cortex frontal de patients MA porteurs d'*APOE* $\epsilon 4$ par rapport à des patients *APOE* $\epsilon 3$ (Ramassamy *et al.*, 1999; Ramassamy *et al.*, 2000). Nos travaux récents ont démontré aussi sur des patients MCI et à différents stades de la MA, que certains marqueurs reliés au SO étaient associés au déclin cognitif et qu'ils pouvaient être utilisés pour le suivi de l'évolution et la progression de la MA (Perrotte *et al.*, 2019). De plus, des résultats obtenus sur des modèles de souris transgéniques et *APOE* knock-out suggèrent que la neurotoxicité médiée par l'*APOE* $\epsilon 4$ est un événement précoce dans la pathologie de la MA (Butterfield & Mattson, 2020; Ramassamy *et al.*, 2001).

L'ensemble de ces données montre clairement un impact plus élevé du variant *APOE* $\epsilon 4$ sur les lésions cérébrales médiées par le SO. Ainsi, le but de cette partie de l'étude est d'analyser l'effet de la présence du variant *APOE* $\epsilon 4$ sur la modulation de marqueurs du SO (exp., apolipoprotéines, protéines carbonylées, protéasome circulant, capacité antioxydante totale) au niveau du plasma et des EVs isolées à partir de participants CIND avant leur progression vers le stade clinique de la MA. Dans un premier temps ces marqueurs étaient analysés chez des individus CIND porteurs ou pas d'*APOE* $\epsilon 4$ par rapport à des témoins cognitivement normaux. Ensuite, les participants CIND étaient subdivisés en deux sous-groupes selon la présence ou non d'*APOE* $\epsilon 4$ et les mêmes marqueurs étaient retestés pour déterminer l'influence potentielle de l'isoforme $\epsilon 4$ sur leur régulation.

Les apolipoprotéines E, J et D jouent un rôle antioxydant important dans l'homéostasie cérébrale (**voir section 1.2.3.4**) et leur dérégulation est étroitement liée à l'apparition de pathologies neurodégénératives. Dans ce sens, un nombre croissant d'études récentes soutiennent leur utilisation en tant que nouveaux biomarqueurs de la MA (Koch *et al.*, 2018; Monllor *et al.*, 2021; Perrotte *et al.*, 2019). Au niveau du cerveau, l'apoE, l'apoJ et l'apoD sont les apolipoprotéines les plus abondantes et les plus étudiées dans le processus de vieillissement normal ainsi que dans le cadre de la MA. Ces apolipoprotéines ont été ainsi sélectionnées et analysées par chimiluminescence dans la cohorte d'étude. Nos résultats montrent que les niveaux d'apoD vésiculaires et plasmatiques étaient plus élevés chez le groupe CIND APOE $\epsilon 4^+$ comparé au groupe témoin alors que les niveaux d'apoE et d'apoJ étaient similaires dans les deux groupes de participants. Il est à noter que notre étude est la première à mettre en évidence la présence d'apoE, d'apoJ et d'apoD dans les EVs circulants. En accord avec notre étude, d'autres équipes ont trouvé des niveaux d'apoD plus élevés dans le cortex, l'hippocampe et le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de la MA (Terrisse *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 2003), ainsi qu'une augmentation de l'expression d'ARNm d'apoD dans les tissus du cerveau de souris MA transgéniques (Thomas *et al.*, 2001).

L'augmentation des niveaux d'apoD très tôt dans la MA, comme le montre notre étude, peut être indicatif de son action antioxydante en réponse à une augmentation de SO. À titre d'exemple, les niveaux d'apoD augmentent dans des conditions stressantes telles que les lésions cérébrales (Franz *et al.*, 1999). De plus, dans un modèle de coculture cellulaire, la protection des cellules neuronales contre le SO, induit par le paraquat, a été attribuée à l'apoD vésiculaire libérée par les cellules astrocytaires (Pascua-Maestro *et al.*, 2018). L'action antioxydante et neuroprotectrice de l'apoD dans le vieillissement normal et les maladies neurodégénératives a été décrite aussi en *post mortem* (Navarro *et al.*, 2013). Dans la MA, l'augmentation de l'expression de l'apoD dans plusieurs compartiments cérébraux serait un mécanisme de défense contre les dommages induits par le SO (Bhatia *et al.*, 2019). Dans la présente étude, on montre que ce phénomène se produit dans la périphérie, jusqu'à 5 ans avant l'installation de la MA.

Afin d'appuyer davantage ces observations sur l'apoD, on a testé sa corrélation avec les autres marqueurs sélectionnés. On a trouvé que l'augmentation des niveaux d'apoD était inversement corrélée avec la capacité antioxydante totale (TAC) et positivement corrélée avec l'élévation de la concentration en protéines carbonylées (PCs) dans les EVs. La TAC reflète l'activité antioxydante des systèmes de défense enzymatiques (CAT, GPx) et non enzymatiques alors que les PCs indiquent des dommages oxydatifs au niveau protéique. Ces données impliquent que la

régulation à la hausse d'apoD au cours des premiers stades de la MA est un mécanisme actif pour contrecarrer d'une part, la diminution progressive de l'efficacité des systèmes antioxydants et d'autre part, l'augmentation des dommages oxydatifs. Conformément à notre explication, les valeurs de la TAC et du ratio apoJ/D dans les EVs étaient positivement corrélées aux scores du MMSE suggérant que ces systèmes antioxydants sont importants pour maintenir une fonction cérébrale adéquate et des capacités cognitives normales. Cependant, les niveaux élevés des PCs contenues dans les EVs étaient associés à des performances cognitives altérées comme l'indique l'analyse univariée avec les scores au MMSE.

De manière similaire, d'autres études ont rapporté une réduction de la TAC sérique et plasmatique chez les patients MCI et MA (Kharrazi *et al.*, 2008; Perrotte *et al.*, 2019), ainsi qu'une altération des taux de PCs dans le plasma et le cerveau des patients MA à des stades précoces et tardifs de la maladie (Perrotte *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2020; Sultana *et al.*, 2010). Néanmoins, il est important de noter que notre étude est la première à détecter les PCs et les apolipoprotéines dans les EVs périphériques, à comparer leurs concentrations vésiculaires et plasmatiques, et à les analyser chez des patients au stade préclinique de la MA.

Sachant le rôle d'*APOE* $\epsilon 4$ dans le déséquilibre de l'homéostasie redox, les participants CIND ont été classés selon le génotype d'*APOE*. L'analyse des mêmes marqueurs a montré que les différences significatives observées auparavant proviendraient plutôt du groupe CIND porteur du variant *APOE* $\epsilon 4^+$. Afin de confirmer la relation entre la présence d'*APOE* $\epsilon 4^+$ et la dérégulation des marqueurs oxydatifs, nous avons appliqué l'analyse ROC et la régression linéaire. Les données de ces tests ont montré également que les changements observés dans les niveaux de TAC, EVs apoD et EVs apoJ/D étaient attribués à la présence du variant *APOE* $\epsilon 4$, tandis que la teneur en PCs dans les EVs était légèrement affectée par l'isoforme $\epsilon 4$. D'autres études menées chez des patients Alzheimer *APOE* $\epsilon 4$ ont rapporté aussi une diminution des taux sériques et plasmatiques de TAC qui serait causé en partie par la présence de l'isoforme $\epsilon 4$ (Kharrazi *et al.*, 2008; Pulido *et al.*, 2005). De même, il a été suggéré que les propriétés « toxiques » de la protéine apoE4 semblent déclencher une variété de voies oxydatives conduisant à l'oxydation des protéines et la dysrégulation des apolipoprotéines (Safieh *et al.*, 2019). Ainsi, l'allèle *APOE* $\epsilon 4$ intervient dans la modulation de la balance oxydative en favorisant la perte des fonctions protectrices et l'augmentation des dommages oxydatifs.

Les résultats de notre deuxième papier soutiennent le rôle néfaste du variant *APOE* $\epsilon 4$ et soulignent son impact négatif sur la régulation des systèmes pro/antioxydants ainsi que sa contribution au déclenchement précoce de la cascade pathologique de neurodégénérescence,

médiée par le SO. D'autre part, nos résultats supportent l'apport alimentaire en antioxydants chez les individus CIND à risque de développer la MA. La consommation des antioxydants exogènes, telle que recommandée dans le Brain Health Food Guide, peut être une piste intéressante pour les stratégies de prévention thérapeutiques dans la MA en particulier chez les porteurs du variant *APOE* ϵ 4.

8.4 Partie III : Étude du rôle physiologique des EVs dans la clairance des $\alpha\beta$

Le rôle des EVs dans les processus physiologiques et pathologiques est décrit mais n'est pas complètement élucidé (Yates *et al.*, 2022a; Yates *et al.*, 2022b). Les données de nos deux premières publications montrent une altération du nombre d'EVs chez les participants CIND avant leur conversion à la MA. Plusieurs études ont montré que la modification du nombre d'EVs est associée à certaines pathologies comme l'infarctus du myocarde (Gasecka *et al.*, 2020), l'hypertension artérielle pulmonaire (Gasecka *et al.*, 2021) ainsi que la MA (Peng *et al.*, 2019; Perrotte *et al.*, 2020). Cependant, le ou les mécanismes par lesquels cette modification affecte l'avènement de la MA n'est pas encore clair.

Pour conduire cette recherche, nous avons analysé dans un premier temps la capacité d'EVs périphériques, isolées à partir d'individus sains, à fixer les $\alpha\beta$. Ensuite, nous avons identifié les protéines de surface des EVs qui sont potentiellement impliquées dans l'association et la clairance des $\alpha\beta$. Enfin, nous avons testé et comparé la distribution d'EVs et la concentration de ces protéines de surface entre des participants précliniques asymptomatiques MA et des participants cognitivement normaux recrutés dans le cadre de l'étude CSHA.

Les assemblages oligomères d' $\alpha\beta$ sont considérés comme la cause majeure de la neuropathologie qui définit la MA. Notre étude *in vitro* par NTA a montré que les EVs périphériques étaient capables de lier les $\alpha\beta$. Fait intéressant, les EVs ayant une taille allant de 50 à 200 nm (sEVs) étaient les sous-types impliqués dans ce processus, ce qui suggère que les populations d'EVs de taille supérieure (> 200 nm) ne présentent pas les mêmes propriétés fonctionnelles que les sEVs. Dans ce sens, des différences dans la composition des EVs de taille différente a été mise en évidence. À titre d'exemple, une nouvelle étude a démontré, sur trois lignées de cellules, que les EVs larges (IEVs) étaient enrichies en protéines ribosomiques, mitochondriales, nucléaires et de cytokinèse alors que sEVs étaient riches en tétraspanines, les protéines ADAM (a disintegrin and metalloproteinase), ESCRT, SNARE (oluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) et Rab (Lischinig *et al.*, 2022). Dans une autre étude récente, l'analyse protéomique des sEVs et des IEVs d'origine humaine a

révélé un profil de protéines ayant des fonctions biologiques distincte et suggère qu'il existe une divergence au cours de l'évolution qui a permis de conserver sélectivement certaines protéines pour chaque sous-type d'EVs (Lim *et al.*, 2021). Ces résultats suggèrent que le pool protéique peut différer entre les EVs de différentes tailles et cela peut avoir des conséquences sur le rôle éventuel de chaque sous-population (Kowal *et al.*, 2016; Vagner *et al.*, 2019). Actuellement, les nouvelles approches de recherche tentent d'affiner le chevauchement de la taille en étudiant séparément chaque sous-population d'EVs (Muraoka *et al.*, 2022; Turner *et al.*, 2022).

On a émis l'hypothèse que les EVs périphériques peuvent être impliquées dans la clairance des oA β au niveau central. En fait, le cerveau ne contient pas seulement des EVs d'origine neuronale (nEVs) mais aussi des EVs d'origine périphérique (pEVs) (Chen *et al.*, 2016; Jakubec *et al.*, 2020). De plus, il a été démontré que certains stimuli du cerveau déclenchent l'influx des pEVs vers les compartiments cérébraux (Kur *et al.*, 2020). Ainsi, l'idée que les pEVs pourraient être recrutés pour contrer l'élévation pathologique d'A β au niveau central est possible. À ce jour, seuls les nEVs étaient capables de lier l'A β dans des conditions expérimentales (Yuyama & Igarashi, 2017). Ici, nous démontrons, pour la première fois, que les pEVs isolées de participants sains étaient aussi capables de lier l'A β , et plus précisément sa conformation toxique oligomérique, ce qui n'a pas été évalué auparavant même sur les nEVs.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la liaison entre les oA β et les pEVs restent méconnus. Nos travaux récents ainsi que les résultats de notre deuxième article (Ben Khedher *et al.*, 2021; Haddad *et al.*, 2021) prouvent la présence dans les pEVs de protéines fortement impliquées dans le binding des oA β telles que l'apoE (Ghosh *et al.*, 2019), l'apoJ (Zandi-Lang *et al.*, 2018) et RAGE (Bongarzone *et al.*, 2017). Cependant, il n'est pas clair si ces protéines sont exprimées dans la lumière des pEVs ou à leur surface. Cette information est cruciale pour déterminer leur implication ou non dans la liaison aux oA β . Pour répondre à cette question, on a utilisé la protéinase K (PK) pour digérer complètement la couronne protéique des pEVs et analysé ensuite, par ELISA, la présence des protéines cibles. La PK ne peut pas pénétrer la bicouche lipidique et élimine seulement les protéines surfaciques des pEVs. Nos résultats ont révélé que l'apoE, l'apoJ et RAGE étaient détectés seulement au niveau des pEVs non traitées par PK et que l'apoJ étant la protéine la plus fortement exprimée (jusqu'à 20X plus que RAGE et 80X plus que l'apoE). Ces résultats montrent que ces protéines sont localisées sur la partie extérieure des pEVs tout en précisant que certaines protéines (apoJ) seraient plus impliquées dans la captation des oA β . Cette topologie définit les effets des pEVs vis-à-vis de leur microenvironnement et suggère un rôle clé des protéines d'ancrage surfacique dans le processus de liaison du peptide

A β dans son état oligomère soluble. Ces résultats sont décrits pour la première fois et aucune autre étude n'a rapporté de données similaires.

Nos analyses ont démontré aussi que les pEVs dépourvues de protéines surfaciques (traitées avec la PK) étaient capables de lier les oA β et que la population de pEVs de taille entre 50 et 150 nm était principalement impliquée dans ce processus. Cela est probablement dû à l'enrichissement élevé des membranes des sEVs en lipides et plus particulièrement les glycosphingolipides (GSL), la sphingomyéline et le cholestérol (Llorente *et al.*, 2013). En effet, la fixation d'A β sur la couche externe de nEVs (isolées à partir des cellules N2a) a été attribuée à la présence de gangliosides, un sous-type de GSL (Yuyama & Igarashi, 2017). D'ailleurs, l'élimination de ces GSL, par une endoglycocéramidase a entravé l'association entre les peptides A β et les nEVs, ce qui suggère un rôle clé de ces entités lipidiques dans la reconnaissance et la liaison des A β (Yuyama *et al.*, 2014). Il est à noter que notre fraction de pEVs pourrait renfermer des nEVs ce qui pourrait aussi expliquer la liaison observée entre les pEVs traitées avec PK et les oA β . L'analyse lipidomique des pEVs est ainsi nécessaire pour confirmer la présence des GSL et plus précisément des gangliosides. Nos données suggèrent que les pEVs sont capables de lier les oA β à travers leurs composés membranaires lipidiques qui serait une caractéristique commune avec les nEVs tout en dévoilant que cette interaction ne se limite pas uniquement aux monomères d'A β mais englobe aussi les formes oligomères toxiques.

Il restait à déterminer si le complexe pEVs-oA β était dirigé pour infecter d'autres cellules ou pour être éliminé ailleurs. Les résultats d'études *in vitro* et *in vivo* sont en faveur d'un rôle plutôt protecteur des EVs. Dans ce contexte, 86% des pEVs d'origine murine injectées par voie intraveineuse chez des souris receveuses étaient captées par la microglie (Li *et al.*, 2018). L'injection intracérébrale de nEVs et pEVs de souris dans des modèles animaux de MA surexprimant l'A β , a entraîné une internalisation presque entièrement des clusters EVs-A β par les microglies (Yuyama *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2017). De même, il a été démontré que l'administration de nEVs, après la perfusion d'oA β chez des rats a restauré la potentialisation à long terme et a diminué la concentration d'A β toxique (An *et al.*, 2013). De plus, la perfusion intracérébrale continue de nEVs chez des souris transgéniques APP, a réduit la charge amyloïde en excès et a limité la perte synaptique (Yuyama *et al.*, 2014; Yuyama *et al.*, 2015). Une seule étude a pu donner une explication mécanistique et ce, en attribuant le processus d'internalisation des nEVs par la microglie à la présence d'une espèce lipidique en particulier, les phosphatidylsérines (PS) faisant partie des glycérophospholipides (GP) (Yuyama *et al.*, 2012). Les récepteurs des PS (RPS) sont exprimés sur la membrane microgliale et faciliteraient ainsi la

reconnaissance et la phagocytose des nEVs. Dans ce sens, une étude a montré que le blocage des RPS avec l'annexine V, une toxine analogue des RPS, a entraîné une inhibition significative de l'internalisation des nEVs par les cellules microgliales (Yuyama et al., 2012). D'autre part, des études ont montré que l'élimination de l'A β par les EVs peut s'effectuer par le biais d'autres mécanismes, notamment à travers l'IDE associée à la membrane des EVs (Bullock et al., 2010; Tamboli et al., 2010). Ces travaux suggèrent que les nEVs contribuent à la phagocytose d'A β dans le cerveau *via* la microglie et probablement dans la périphérie par les macrophages exprimant les RPS. Notre travail fournit un nouvel aperçu des propriétés des pEVs liées à la liaison et ouvre des perspectives intéressantes quant à leur capacité à éliminer l'A β . Les études futures devraient analyser de manière exhaustive le profil lipidique des pEVs et utiliser des modèles cellulaires et animaux appropriés afin de mieux comprendre l'interaction entre les pEVs et l'A β sous ses différentes formes.

Afin de mieux comprendre les conséquences d'une perturbation de la distribution et de la composition des pEVs sur le développement de la MA, on a analysé et comparé le pool des pEVs isolées à partir de participants asymptomatiques avant leur conversion à la MA (Pré-MA) par rapport à des individus sains. Nos données montrent que les patients pré-MA ont un nombre de pEVs plus élevé dont les tailles se situent entre 100 à 200 nm. Fait intéressant, ces EVs font partie des sEVs impliquées dans la liaison oA β , comme mis en évidence précédemment dans ce travail. Il est à noter que l'accumulation d'A β est un phénomène précoce dans la pathologie de la MA et nous démontrons ici une libération plus élevée de sous-populations de pEVs impliquées dans la fixation d'A β , probablement pour contrer le dépôt progressif d'A β au début du développement de la maladie. De même, il a été rapporté, chez un modèle animal, que la présence d'oA β était suffisante pour stimuler la libération des EVs (Vandendriessche *et al.*, 2021). Nous nous sommes intéressés ensuite à l'analyse de la cargaison moléculaire des pEVs (apoE, apoJ et RAGE) impliquée dans l'élimination de l'A β . Nos résultats indiquent que l'apoJ, la principale protéine exprimée au niveau de la couronne protéique des pEVs par rapport aux trois protéines testées, est significativement diminuée chez les patients pré-MA. Cette observation remet en question l'efficacité des pEVs à fixer et éliminer les oA β et peut expliquer, au moins en partie, la conversion des individus pré-MA vers la MA. D'autre part, l'élévation de la libération des pEVs pourrait être un mécanisme de soutien pour compenser l'expression réduite d'apoJ sur la membrane lipidique de pEVs. Cependant, la production continue et anormale de pEVs pour contrer le dépôt d'A β pourrait induire des effets nocifs dans le cerveau par l'activation des cellules gliales (Morales-Prieto *et al.*, 2022). Cela peut aussi causer une neuroinflammation et conduire à des processus neurotoxiques progressives et irréversibles favorisant l'installation de la maladie.

La capacité des pEVs à piéger et à éliminer les $\alpha\text{A}\beta$, médiée par les lipides et les protéines membranaires, semble consolider les mécanismes de défense contre le dépôt graduel de l' $\text{A}\beta$ au début de la maladie. Ce rôle est compromis chez les individus précliniques pré-MA, à en juger par la perturbation du nombre et du contenu des pEVs. Notre étude est la première à décrire ce mécanisme en lien avec la physiopathologie de la MA et supporte un rôle clé des pEVs dans la modulation du risque de la maladie.

8.5 Limites de l'étude

Notre étude est parmi les toutes premières études à divulguer les interactions pathologiques entre la présence du variant *APOE* $\epsilon 4$ et la régulation altérée des pEVs (distribution et contenu) et à proposer des nouveaux biomarqueurs périphériques précoces chez des individus précliniques prédisposés à développer la MA. Cependant, il y a certaines limites à noter.

8.5.1 Conservation des échantillons biologiques

Les échantillons de plasma ont été recueillis avant plusieurs années de la date à laquelle les analyses biologiques ont été effectuées. Ce laps de temps entre la collecte de plasma et l'évaluation des marqueurs n'est pas optimal. De plus, les échantillons biologiques ont été gardés à -20°C pendant des années avant d'être conservés à -80°C . En fait, les conditions de stockage du plasma ainsi que les EVs isolées à partir du plasma peuvent affecter le niveau de certaines protéines plasmatique ou encore le nombre des EVs. La conservation à long terme (entre 1988 et 2014) à une température de -80°C a diminué le taux plasmatique de 18 protéines sur un total de 108 protéines testées (Enroth *et al.*, 2016). L'influence de la température et la durée de stockage ont été aussi évaluées sur les EVs par quelques études mais les résultats étaient divergents. À une température de 37°C (durant 24h), on observe une augmentation du nombre des EVs (Cheng *et al.*, 2019), alors qu'à 4°C ou 20°C on observe plutôt une diminution de leur nombre (Lőrincz *et al.*, 2014). Cette diminution pourra être expliquée par l'augmentation de taille moyenne des EVs et ce, après 4 jours de conservation à 4°C reflétant une possible agrégation de ces derniers (Maroto *et al.*, 2017). Contrairement à ces résultats, une autre étude a montré une diminution de la taille moyenne des EVs qui étaient conservées à 4°C (Sokolova *et al.*, 2011). Dans ce sens, il a été convenu que la température de -80°C semble être la condition la plus favorable au stockage des fluides biologiques et des EVs (Yuan *et al.*, 2021). Dans notre étude, la fluctuation des taux de protéines entre les différents groupes due au stockage est très limitée,

puisque tous nos échantillons ont été conservés dans les mêmes conditions, à la même température de - 80°C et sans cycle de décongélation.

Un autre facteur important affectant la stabilité des EVs lors de la conservation est le tampon de stockage. Il a été convenu que le PBS est le meilleur tampon du stockage pour les EVs (Witwer *et al.*, 2013) et la plupart des études, y compris la nôtre, l'ont utilisé (Kusuma *et al.*, 2018).

8.5.2 Validation des marqueurs étudiés

D'autre part, l'évaluation des marqueurs dérivés des pEVs identifiés dans notre travail a été faite uniquement au stade CIND, ce qui pourrait être insuffisant pour établir un lien pathologique solide entre la variation de ces marqueurs et l'incidence de la MA. Cela implique la nécessité d'explorer ces mêmes marqueurs également chez les patients CIND après leur conversion à la MA afin de valider une relation de cause à effet. De plus, le profil des marqueurs testés ne reflète pas le spectre complet des marqueurs synaptiques, inflammatoires ou oxydatifs, ce qui implique un criblage approfondi d'autres candidats dans les recherches à venir. Les recherches futures devraient inclure aussi des corrélations avec les données de neuroimagerie et/ou de LCR, en plus des tests cognitifs, pour confirmer le lien avec les défauts de fonctionnement au niveau central.

8.5.3 Ethnicité et sexe

La cohorte d'étude comporte uniquement des participants de race blanche canadiens. Ainsi, l'impact possible d'ascendances génétiques spécifiques n'a pas été pris en considération. En fait, les effets de l'*APOE* $\epsilon 4$ sur le risque de MA peut varier selon l'origine ethnique des individus et il est suggéré que la déficience cognitive liée à l'*APOE* $\epsilon 4$ est dépendante de la race (Belloy *et al.*, 2019; Turney *et al.*, 2020). Dans ce contexte, il a été rapporté que l'effet du variant *APOE* $\epsilon 4$ sur le développement de la MA était faible pour les populations africaines et hispaniques (même ceux porteurs la forme homozygote $\epsilon 4/\epsilon 4$) et élevée pour les populations caucasiennes ou asiatiques (Japon en particulier), malgré une fréquence d'allèle *APOE* $\epsilon 4$ plus élevée chez les africains et les hispaniques (Pericak-Vance *et al.*, 2017 ; Belloy *et al.*, 2019 ; Tang *et al.*, 1996). Ceci pourra être expliqué par la présence d'autres facteurs génétiques, habitudes alimentaires ou style de vie qui pourraient freiner voire arrêter l'effet indésirable du variant *APOE* $\epsilon 4$ sur le développement de la MA. Une autre explication, est que le variant ancestral d'*APOE* $\epsilon 4$, porté majoritairement par les populations africaines et hispaniques, n'aurait pas les mêmes effets néfastes que celui présent chez les populations caucasiennes ou asiatiques. Ce dernier aurait subi de légères

modifications au cours du temps (Belloy et al., 2019). Néanmoins, le mécanisme exact reste à déterminer. Nos résultats restent vrais uniquement pour la population testée et d'autres investigations devront répliquer nos résultats sur des populations d'origines différentes. L'effet du sexe sur les marqueurs identifiés n'a pas été étudié dû au nombre réduit des participants. Même si la taille de notre échantillon semblait adéquate puisque certains de nos résultats étaient statistiquement significatifs, ceux-ci devront être validés dans de plus grands échantillons, permettant aussi leur évaluation selon le sexe biologique.

8.6 Conclusion générale

Notre étude a pu établir des nouveaux biomarqueurs qui peuvent prédire jusqu'à 5 ans à l'avance le risque de développer la MA. La détection précoce de la MA permettrait d'appliquer plus tôt les traitements appropriés ainsi que tous les conseils préconisés en matière de prévention. Cette démarche permettra une meilleure prise en charge des personnes à risque. Les marqueurs identifiés étaient associés à la présence de l'*APOE* ϵ 4 connue pour être le facteur de risque majeur de la MA sporadique. Nos résultats démontrent l'étendue des effets néfastes du variant *APOE* ϵ 4 au-delà de ces fonctions toxiques connues et soulignent l'importance de l'inclure dans la mise en place et l'identification des nouveaux biomarqueurs liés à la MA.

De plus, notre travail dévoile le rôle émergent des EVs comme outil innovant dans le diagnostic de la MA et soutient leur utilisation dans les stratégies de recherche futures. La combinaison entre les marqueurs vésiculaires s'avère être une approche intéressante dans le but ultime d'établir un panel de biomarqueurs précoces qui refléterait mieux les processus pathologiques liés à la MA.

De par leur utilité diagnostique, les EVs seraient aussi des acteurs prépondérants dans la cascade de neurodégénérescence comme le laissent suggérer les résultats de notre troisième article. Dans ce sens, on considère que les EVs pourraient jouer un rôle paradoxal, qui serait bénéfique dans le stade préclinique mais portera préjudice au cours des stades cliniques de la MA due à l'exposition continue du cerveau aux EVs. Enfin, l'analyse protéomique et lipidomique des EVs reste un atout important pour mieux comprendre l'installation et la progression de la MA.

9 PERSPECTIVES

Afin de confirmer la validité diagnostique de nos marqueurs, il est primordial de répliquer nos résultats, obtenus sur la cohorte CSHA, sur d'autres cohortes tout en gardant les mêmes techniques d'extraction des pEVs et de dosage (Luminex) afin limiter les variables analytiques. Ainsi, grâce à nos projets multilatéraux de collaboration scientifique, nous disposons actuellement dans notre laboratoire de recherche de trois cohortes à savoir, la CIMA-Q (Consortium pour l'identification précoce de la maladie d'Alzheimer), PREVENT-AD (Pre-symptomatic Evaluation of Experimental or Novel Treatments for Alzheimer Disease), et une cohorte de l'hôpital de Sherbrooke à Québec. Ces cohortes comportent toutes le stade préclinique de la MA et certaines les différents stades de la MA, ce qui nous permettra de suivre le comportement de ces marqueurs au cours de la maladie et déduire, ou pas, une relation cause/effet. D'autres part, ces cohortes offrent la possibilité de corrélérer nos analyses avec les données de neuroimagerie (IRM, TEP) mais aussi les dosages des protéines toxiques ($A\beta$ et Tau) dans le LCR, ce qui est un atout majeur pour les études visant à établir des biomarqueurs fiables pour le diagnostic de la MA. Un autre point important est le nombre des participants (témoins et patients) qui va être élargi afin d'augmenter la puissance statistique et se conformer aux exigences des protocoles standards des études épidémiologiques.

Notre travail s'est intéressé à l'effet de la présence du variant *APOE* $\epsilon 4$ sur la régulation des marqueurs étudiés. Des études récentes montrent des effets ethniques remarquables du variant *APOE* $\epsilon 4$ sur le risque de MA et il est suggéré que les troubles cognitifs liés à l'*APOE* $\epsilon 4$ sont dépendants de la race (Belloy *et al.*, 2019; Turney *et al.*, 2020). Dans une perspective à moyen terme, on vise à répliquer nos résultats sur des cohortes d'ethnicité différente notamment en Afrique (Tunisie) et en Amérique Latine (Brésil), ce qui permettra de vérifier la validité de nos marqueurs sur une échelle beaucoup plus grande et ce, dans le but de mettre en place un test diagnostique fiable à l'ensemble des malades au risque de développer la MA.

Les résultats de notre troisième article ont suscité l'intérêt pour conduire une analyse lipidomique ciblée et approfondie sur certaines entités lipidiques suspectées d'être présentes au niveau des EVs. La révélation de ces composés ouvrira des nouvelles perspectives quant au rôle des EVs dans la physiopathologie de la MA et pourrait servir de base pour des nouveaux modèles de traitement de la MA. Dans ce contexte, on a commencé une double collaboration avec l'Institut de cardiologie de Montréal (Plateforme métabolomique / LC-QToF-MS) et le laboratoire de neuroprotéomique à l'Université UNICAMP au Brésil qui a une renommée internationale dans les analyses lipidomiques. On dispose actuellement de résultats préliminaires fort encourageants qui

devront se confirmer sur un nombre plus grand d'échantillons et qui permettront d'ouvrir les portes vers des nouvelles applications des EVs.

On se propose aussi d'élargir le nombre de biomarqueurs potentiels, surtout au niveau du stade préclinique de la MA, en ciblant à titre d'exemple des miRNA, des facteurs de croissance ou encore des marqueurs d'inflammation. Ces marqueurs vont être dosés simultanément dans les EVs (corona et lumière) et le plasma pour comparer la pertinence diagnostique de chaque compartiment. Ces données devront aussi être corrélées aux différents génotypes du gène *APOE* pour déduire l'effet potentiel de l'empreinte génétique sur la régulation de ces biomarqueurs.

Enfin, les résultats de notre projet ont permis de montrer que les pEVs représentent un outil de diagnostic innovant au stade précoce de la MA et ouvrent des nouveaux espoirs pour l'élaboration d'un test diagnostique rapide, sensible, à faible coût et de routine qui permettra de prédire assez tôt le risque de développer la MA. Le champ d'application des EVs comme outil diagnostique ne devrait pas se limiter à la MA et d'autres maladies neurodégénératives devront bénéficier des avancées majeures sur les EVs.

10 BIBLIOGRAPHIE (INTRODUCTION & DISCUSSION)

- Agliardi C, Guerini FR, Zanzottera M, Bianchi A, Nemni R & Clerici M (2019) SNAP-25 in Serum Is Carried by Exosomes of Neuronal Origin and Is a Potential Biomarker of Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* 56(8):5792-5798.
- Agostinho P, Cunha RA & Oliveira C (2010) Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 16(25):2766-2778.
- Aharon A, Spector P, Ahmad RS, Horrany N, Sabbach A, Brenner B & Aharon-Peretz J (2020) Extracellular Vesicles of Alzheimer's Disease Patients as a Biomarker for Disease Progression. *Mol Neurobiol* 57(10):4156-4169.
- Ahmed N, Ahmed U, Thornalley PJ, Hager K, Fleischer G & Munch G (2005) Protein glycation, oxidation and nitration adduct residues and free adducts of cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease and link to cognitive impairment. *J Neurochem* 92(2):255-263.
- Aisen PS (2009) Alzheimer's disease therapeutic research: the path forward. *Alzheimer's research & therapy* 1(1):2-2.
- Aluise CD, Robinson RA, Beckett TL, Murphy MP, Cai J, Pierce WM, Markesbery WR & Butterfield DA (2010) Preclinical Alzheimer disease: brain oxidative stress, Abeta peptide and proteomics. *Neurobiol Dis* 39(2):221-228.
- An K, Klyubin I, Kim Y, Jung JH, Mably AJ, O'Dowd ST, Lynch T, Kanmert D, Lemere CA, Finan GM, Park JW, Kim TW, Walsh DM, Rowan MJ & Kim JH (2013) Exosomes neutralize synaptic-plasticity-disrupting activity of A β assemblies in vivo. *Mol Brain* 6:47.
- Annweiler C, Llewellyn DJ & Beauchet O (2013) Low serum vitamin D in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *J Alzheimers Dis* 33(3):659-674.
- Anonyme (1996) The challenge of the dementias. Writing Committee, Lancet Conference 1996. *Lancet* 347(9011):1303-1307.
- Anoop A, Singh PK, Jacob RS & Maji SK (2010) CSF Biomarkers for Alzheimer's Disease Diagnosis. *Int J Alzheimers Dis* 2010.
- Ashton NJ, Pascoal TA, Karikari TK, Benedet AL, Lantero-Rodriguez J, Brinkmalm G, Snellman A, Schöll M, Troakes C, Hye A, Gauthier S, Vanmechelen E, Zetterberg H, Rosa-Neto P & Blennow K (2021) Plasma p-tau₂₃₁: a new biomarker for incipient Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathol* 141(5):709-724.
- Aulston B, Liu Q, Mante M, Florio J, Rissman RA & Yuan SH (2019) Extracellular Vesicles Isolated from Familial Alzheimer's Disease Neuronal Cultures Induce Aberrant Tau Phosphorylation in the Wild-Type Mouse Brain. *J Alzheimers Dis* 72(2):575-585.
- Baldacci F, Daniele S, Piccarducci R, Giampietri L, Pietrobono D, Giorgi FS, Nicoletti V, Frosini D, Libertini P, Lo Gerfo A, Petrozzi L, Donadio E, Betti L, Trincavelli ML, Siciliano G, Ceravolo R, Tognoni G, Bonuccelli U & Martini C (2019) Potential Diagnostic Value of Red Blood Cells α -Synuclein Heteroaggregates in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* 56(9):6451-6459.
- Barthel H & Sabri O (2017) Clinical Use and Utility of Amyloid Imaging. *Journal of Nuclear Medicine* 58(11):1711.
- Beck J, Lenart B, Kintner DB & Sun D (2003) Na-K-Cl cotransporter contributes to glutamate-mediated excitotoxicity. *J Neurosci* 23(12):5061-5068.

- Bell RD, Sagare AP, Friedman AE, Bedi GS, Holtzman DM, Deane R & Zlokovic BV (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.
- Bell RD, Winkler EA, Singh I, Sagare AP, Deane R, Wu Z, Holtzman DM, Betsholtz C, Armulik A, Sallstrom J, Berk BC & Zlokovic BV (2012) Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature* 485(7399):512-516.
- Bellenguez C, Küçükali F, Jansen IE, Kleindam L, Moreno-Grau S, Amin N, Naj AC, Campos-Martin R, Grenier-Boley B, Andrade V, Holmans PA, Boland A, Damotte V, van der Lee SJ, Costa MR, Kuulasmaa T, Yang Q, de Rojas I, Bis JC, Yaqub A, Prokic I, Chapuis J, Ahmad S, Giedraitis V, Aarsland D, Garcia-Gonzalez P, Abdelnour C, Alarcón-Martín E, Alcolea D, Alegret M, Alvarez I, Álvarez V, Armstrong NJ, Tsolaki A, Antúnez C, Appollonio I, Arcaro M, Archetti S, Pastor AA, Arosio B, Athanasiu L, Bailly H, Banaj N, Baquero M, Barral S, Beiser A, Pastor AB, Below JE, Bencheq P, Benussi L, Berr C, Besse C, Bessi V, Binetti G, Bizarro A, Blesa R, Boada M, Boerwinkle E, Borroni B, Boschi S, Bossù P, Bråthen G, Bressler J, Bresner C, Brodaty H, Brookes KJ, Brusco LI, Buiza-Rueda D, Bürger K, Burholt V, Bush WS, Calero M, Cantwell LB, Chene G, Chung J, Cuccaro ML, Carracedo Á, Cecchetti R, Cervera-Carles L, Charbonnier C, Chen H-H, Chillotti C, Ciccone S, Claassen JAHR, Clark C, Conti E, Corma-Gómez A, Costantini E, Custodero C, Daian D, Dalmaso MC, Daniele A, Dardiotis E, Dartigues J-F, de Deyn PP, de Paiva Lopes K, de Witte LD, Debette S, Deckert J, del Ser T, Denning N, DeStefano A, Dichgans M, Diehl-Schmid J, Diez-Fairen M, Rossi PD, Djurovic S, Duron E, Düzel E, Dufouil C, Eiriksdottir G, Engelborghs S, Escott-Price V, Espinosa A, Ewers M, Faber KM, Fabrizio T, Nielsen SF, Fardo DW, Farotti L, Fenoglio C, Fernández-Fuertes M, Ferrari R, Ferreira CB, Ferri E, Fin B, Fischer P, Fladby T, Fließbach K, Fongang B, Fornage M, Fortea J, Foroud TM, Fostinelli S, Fox NC, Franco-Macías E, Bullido MJ, Frank-García A, Froelich L, Fulton-Howard B, Galimberti D, García-Alberca JM, García-González P, Garcia-Madrona S, Garcia-Ribas G, Ghidoni R, Giegling I, Giorgio G, Goate AM, Goldhardt O, Gomez-Fonseca D, González-Pérez A, Graff C, Grande G, Green E, Grimmer T, Grünblatt E, Grunin M, Gudnason V, Guetta-Baranes T, Haapasalo A, Hadjigeorgiou G, Haines JL, Hamilton-Nelson KL, Hampel H, Hanon O, Hardy J, Hartmann AM, Hausner L, Harwood J, Heilmann-Heimbach S, Helisalmi S, Heneka MT, Hernández I, Herrmann MJ, Hoffmann P, Holmes C, Holstege H, Vilas RH, Hulsman M, Humphrey J, Biessels GJ, Jian X, Johansson C, Jun GR, Kastumata Y, Kauwe J, Kehoe PG, Kilander L, Ståhlbom AK, Kivipelto M, Koivisto A, Kornhuber J, Kosmidis MH, Kukull WA, Kuksa PP, Kunkle BW, Kuzma AB, Lage C, Laukka EJ, Launer L, Lauria A, Lee C-Y, Lehtisalo J, Lerch O, Lleó A, Longstreth W, Lopez O, de Munain AL, Love S, Löwemark M, Luckcuck L, Lunetta KL, Ma Y, Macías J, MacLeod CA, Maier W, Mangialasche F, Spallazzi M, Marquié M, Marshall R, Martin ER, Montes AM, Rodríguez CM, Masullo C, Mayeux R, Mead S, Mecocci P, Medina M, Meggy A, Mehrabian S, Mendoza S, Menéndez-González M, Mir P, Moebus S, Mol M, Molina-Porcel L, Montreal L, Morelli L, Moreno F, Morgan K, Mosley T, Nöthen MM, Muchnik C, Mukherjee S, Nacmias B, Ngandu T, Nicolas G, Nordestgaard BG, Olaso R, Orellana A, Orsini M, Ortega G, Padovani A, Paolo C, Papenberg G, Parnetti L, Pasquier F, Pastor P, Peloso G, Pérez-Cordón A, Pérez-Tur J, Pericard P, Peters O, Pijnenburg YAL, Pineda JA, Piñol-Ripoll G, Pisanu C, Polak T, Popp J, Posthuma D, Priller J, Puerta R, Quenez O, Quintela I, Thomassen JQ, Rábano A, Rainero I, Rajabli F, Ramakers I, Real LM, Reinders MJT, Reitz C, Reyes-Dumeyer D, Ridge P, Riedel-Heller S, Riederer P, Roberto N, Rodriguez-Rodriguez E, Rongve A, Allende IR, Rosende-Roca M, Royo JL, Rubino E, Rujescu D, Sáez ME, Sakka P, Saltvedt I, Sanabria Á & Sánchez-

- Arjona MB (2022) New insights into the genetic etiology of Alzheimer's disease and related dementias. *Nature Genetics* 54(4):412-436.
- Bellingham SA, Guo BB, Coleman BM & Hill AF (2012) Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Front Physiol* 3:124.
- Belloir B, Kövari E, Surini-Demiri M & Savioz A (2001) Altered apolipoprotein D expression in the brain of patients with Alzheimer disease. *J Neurosci Res* 64(1):61-69.
- Belloy ME, Napolioni V & Greicius MD (2019) A Quarter Century of APOE and Alzheimer's Disease: Progress to Date and the Path Forward. *Neuron* 101(5):820-838.
- Ben Khedher MR, Haddad M, Laurin D & Ramassamy C (2021) Effect of APOE ϵ 4 allele on levels of apolipoproteins E, J, and D, and redox signature in circulating extracellular vesicles from cognitively impaired with no dementia participants converted to Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (Amst)* 13(1):e12231.
- Berge G, Sando SB, Albrektsen G, Lauridsen C, Møller I, Grøntvedt GR, Bråthen G & White LR (2016) Alpha-synuclein measured in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, or healthy controls: a two year follow-up study. *BMC Neurol* 16(1):180.
- Bertrand P, Poirier J, Oda T, Finch CE, Pasinetti GM (1995) Association of apolipoprotein E genotype with brain levels of apolipoprotein E and apolipoprotein J (clusterin) in Alzheimer disease. *Mol Brain Res* 33(1):174-178.
- Bhatia S, Kim WS, Shepherd CE & Halliday GM (2019) Apolipoprotein D Upregulation in Alzheimer's Disease but Not Frontotemporal Dementia. *J Mol Neurosci* 67(1):125-132.
- Bhatti AB, Usman M, Ali F & Satti SA (2016) Vitamin Supplementation as an Adjuvant Treatment for Alzheimer's Disease. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* 10(8):OE07-OE11.
- Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL & LaFerla FM (2005) Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 45(5):675-688.
- Blennow K & Zetterberg H (2015a) The past and the future of Alzheimer's disease CSF biomarkers—a journey toward validated biochemical tests covering the whole spectrum of molecular events. *Frontiers in neuroscience* 9:345-345.
- Blennow K & Zetterberg H (2015b) The past and the future of Alzheimer's disease CSF biomarkers—a journey toward validated biochemical tests covering the whole spectrum of molecular events. *Frontiers in Neuroscience* 9.
- Bongarzone S, Savickas V, Luzi F & Gee AD (2017) Targeting the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): A Medicinal Chemistry Perspective. *J Med Chem* 60(17):7213-7232.
- Bowen J, Teri L, Kukull W, McCormick W, McCurry SM & Larson EB (1997) Progression to dementia in patients with isolated memory loss. *Lancet* 349(9054):763-765.
- Braak H & Braak E (1991) Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82(4):239-259.
- Brown M, Johnson LA, Leone DA, Majek P, Vaahtomeri K, Senfter D, Bukosza N, Schachner H, Asfour G, Langer B, Hauschild R, Parapatits K, Hong YK, Bennett KL, Kain R, Detmar M, Sixt M, Jackson DG & Kerjaschki D (2018) Lymphatic exosomes promote dendritic cell migration along guidance cues. *J Cell Biol* 217(6):2205-2221.

- Bu G (2009) Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci* 10(5):333-344.
- Bulloj A, Leal MC, Xu H, Castaño EM & Morelli L (2010) Insulin-Degrading Enzyme Sorting in Exosomes: A Secretory Pathway for a Key Brain Amyloid- β Degrading Protease. *Journal of Alzheimer's Disease* 19:79-95.
- Butterfield DA & Boyd-Kimball D (2019) Redox proteomics and amyloid β -peptide: insights into Alzheimer disease. *J Neurochem* 151(4):459-487.
- Butterfield DA & Halliwell B (2019) Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience* 20(3):148-160.
- Butterfield DA & Mattson MP (2020) Apolipoprotein E and oxidative stress in brain with relevance to Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* 138:104795.
- Butterfield DA & Pocernich CB (2003) The glutamatergic system and Alzheimer's disease: therapeutic implications. *CNS Drugs* 17(9):641-652.
- Butterfield DA, Reed TT, Perluigi M, De Marco C, Coccia R, Keller JN, Markesbery WR & Sultana R (2007) Elevated levels of 3-nitrotyrosine in brain from subjects with amnesic mild cognitive impairment: implications for the role of nitration in the progression of Alzheimer's disease. *Brain Res* 1148:243-248.
- Cai Y, An SS & Kim S (2015) Mutations in presenilin 2 and its implications in Alzheimer's disease and other dementia-associated disorders. *Clin Interv Aging* 10:1163-1172.
- Cai ZY, Xiao M, Quazi SH & Ke ZY (2018) Exosomes: a novel therapeutic target for Alzheimer's disease? *Neural Regen Res* 13(5):930-935.
- Cao Q, Tan CC, Xu W, Hu H, Cao XP, Dong Q, Tan L & Yu JT (2020) The Prevalence of Dementia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Alzheimers Dis* 73(3):1157-1166.
- Carrano A, Hoozemans JJ, van der Vies SM, Rozemuller AJ, van Horssen J & de Vries HE (2011) Amyloid Beta induces oxidative stress-mediated blood-brain barrier changes in capillary amyloid angiopathy. *Antioxid Redox Signal* 15(5):1167-1178.
- Caruso S & Poon IKH (2018) Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles: More Than Just Debris. *Frontiers in Immunology* 9.
- Casado A, Encarnacion Lopez-Fernandez M, Concepcion Casado M & de La Torre R (2008) Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in vascular and Alzheimer dementias. *Neurochem Res* 33(3):450-458.
- Cataldo AM, Peterhoff CM, Troncoso JC, Gomez-Isla T, Hyman BT & Nixon RA (2000) Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. *Am J Pathol* 157(1):277-286.
- Cha DJ, Mengel D, Mustapic M, Liu W, Selkoe DJ, Kapogiannis D, Galasko D, Rissman RA, Bennett DA & Walsh DM (2019) miR-212 and miR-132 Are Downregulated in Neurally Derived Plasma Exosomes of Alzheimer's Patients. *Front Neurosci* 13:1208.
- Chai YL, Chong JR, Raquib AR, Xu X, Hilal S, Venketasubramanian N, Tan BY, Kumar AP, Sethi G, Chen CP & Lai MKP (2021) Plasma osteopontin as a biomarker of Alzheimer's disease and vascular cognitive impairment. *Scientific Reports* 11(1):4010.
- Chargaff E & West R (1946) The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem* 166(1):189-197.

- Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, Faller P, Hureau C & Collin F (2018) Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biol* 14:450-464.
- Chen CC, Liu L, Ma F, Wong CW, Guo XE, Chacko JV, Farhoodi HP, Zhang SX, Zimak J, Ségaliny A, Riazifar M, Pham V, Digman MA, Pone EJ & Zhao W (2016) Elucidation of Exosome Migration across the Blood-Brain Barrier Model In Vitro. *Cell Mol Bioeng* 9(4):509-529.
- Chen X, Walker DG, Schmidt AM, Arancio O, Lue LF & Yan SD (2007) RAGE: a potential target for Abeta-mediated cellular perturbation in Alzheimer's disease. *Curr Mol Med* 7(8):735-742.
- Chen XQ & Mobley WC (2019) Alzheimer Disease Pathogenesis: Insights From Molecular and Cellular Biology Studies of Oligomeric A β and Tau Species. *Front Neurosci* 13:659.
- Chen Y, Jia L, Wei C, Wang F, Lv H & Jia J (2008) Association between polymorphisms in the apolipoprotein D gene and sporadic Alzheimer's disease. *Brain Res* 1233:196-202.
- Cheng Y, Zeng Q, Han Q, Xia W. (2019) Effect of pH, temperature and freezing-thawing on quantity changes and cellular uptake of exosomes. *Protein Cell* 10:295–299.
- Clark C, Lewczuk P, Kornhuber J, Richiardi J, Maréchal B, Karikari TK, Blennow K, Zetterberg H & Popp J (2021) Plasma neurofilament light and phosphorylated tau 181 as biomarkers of Alzheimer's disease pathology and clinical disease progression. *Alzheimers Res Ther* 13(1):65.
- Clavaguera F, Grueninger F & Tolnay M (2014) Intercellular transfer of tau aggregates and spreading of tau pathology: Implications for therapeutic strategies. *Neuropharmacology* 76 Pt A:9-15.
- Cline EN, Bicca MA, Viola KL & Klein WL (2018) The Amyloid- β Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade. *J Alzheimers Dis* 64(s1):S567-S610.
- Cocozza F, Grisard E, Martin-Jaular L, Mathieu M & Théry C (2020) SnapShot: Extracellular Vesicles. *Cell* 182(1):262-262 e261.
- Couch Y, Buzàs EI, Di Vizio D, Gho YS, Harrison P, Hill AF, Lötval J, Raposo G, Stahl PD, Théry C, Witwer KW & Carter DRF (2021) A brief history of nearly EV-erything - The rise and rise of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 10(14):e12144.
- Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, Dignat-George F, Drees EEE, El-Andaloussi S, Emanuelli C, Gasecka A, Hendrix A, Hill AF, Lacroix R, Lee Y, van Leeuwen TG, Mackman N, Mäger I, Nolan JP, van der Pol E, Pegtel DM, Sahoo S, Siljander PRM, Sturk G, de Wever O & Nieuwland R (2017) Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circ Res* 120(10):1632-1648.
- Crawford N (1971) The presence of contractile proteins in platelet microparticles isolated from human and animal platelet-free plasma. *Br J Haematol* 21(1):53-69.
- Csukly G, Sirály E, Fodor Z, Horváth A, Salacz P, Hidas Z, Csibri É, Rudas G & Szabó Á (2016) The Differentiation of Amnesic Type MCI from the Non-Amnesic Types by Structural MRI. *Front Aging Neurosci* 8:52-52.
- Cummings JL, Doody R & Clark C (2007) Disease-modifying therapies for Alzheimer disease: challenges to early intervention. *Neurology* 69(16):1622-1634.
- Cunningham EL, McGuinness B, Herron B & Passmore AP (2015) Dementia. *Ulster Med J* 84(2):79-87.

- Dang TN, Arseneault M & Ramassamy C (2011) Regulation of redox-sensitive signaling pathways in rat primary astrocytes following acrolein exposure. *J Alzheimers Dis* 25(2):263-277.
- Dang TN, Arseneault M, Zarkovic N, Waeg G & Ramassamy C (2010) Molecular regulations induced by acrolein in neuroblastoma SK-N-SH cells: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 21(4):1197-1216.
- DaRocha-Souto B, Coma M, Pérez-Nievas BG, Scotton TC, Siao M, Sánchez-Ferrer P, Hashimoto T, Fan Z, Hudry E, Barroeta I, Serenó L, Rodríguez M, Sánchez MB, Hyman BT & Gómez-Isla T (2012) Activation of glycogen synthase kinase-3 beta mediates β -amyloid induced neuritic damage in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 45(1):425-437.
- Dassati S, Waldner A & Schweigreiter R (2014) Apolipoprotein D takes center stage in the stress response of the aging and degenerative brain. *Neurobiol Aging* 35(7):1632-1642.
- de Almeida SM, Shumaker SD, LeBlanc SK, Delaney P, Marquie-Beck J, Ueland S, Alexander T & Ellis RJ (2011) Incidence of post-dural puncture headache in research volunteers. *Headache* 51(10):1503-1510.
- DeMattos RB, Cirrito JR, Parsadanian M, May PC, O'Dell MA, Taylor JW, Harmony JA, Aronow BJ, Bales KR, Paul SM & Holtzman DM (2004) ApoE and clusterin cooperatively suppress Abeta levels and deposition: evidence that ApoE regulates extracellular Abeta metabolism in vivo. *Neuron* 41(2):193-202.
- Desai PP, Ikonovic MD, Abrahamson EE, Hamilton RL, Isanski BA, Hope CE, Klunk WE, DeKosky ST & Kamboh MI (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.
- Ding X, Zhang S, Jiang L, Wang L, Li T & Lei P (2021) Ultrasensitive assays for detection of plasma tau and phosphorylated tau 181 in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Transl Neurodegener* 10(1):10.
- Dinkins MB, Wang G & Bieberich E (2017) Sphingolipid-Enriched Extracellular Vesicles and Alzheimer's Disease: A Decade of Research. *J Alzheimers Dis* 60(3):757-768.
- Dong Z, Han H, Li H, Bai Y, Wang W, Tu M, Peng Y, Zhou L, He W, Wu X, Tan T, Liu M, Wu X, Zhou W, Jin W, Zhang S, Sacktor TC, Li T, Song W & Wang YT (2015) Long-term potentiation decay and memory loss are mediated by AMPAR endocytosis. *J Clin Invest* 125(1):234-247.
- Dose J, Huebbe P, Nebel A & Rimbach G (2016) APOE genotype and stress response - a mini review. *Lipids Health Dis* 15:121.
- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, Delacourte A, Galasko D, Gauthier S, Jicha G, Meguro K, O'Brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Stern Y, Visser PJ & Scheltens P (2007) Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* 6(8):734-746.
- Duong S, Patel T & Chang F (2017) Dementia: What pharmacists need to know. *Can Pharm J (Ott)* 150(2):118-129.
- Edgar JR (2016) Q&A: What are exosomes, exactly? *BMC Biol* 14:46.
- Eitan E, Hutchison ER, Marosi K, Comotto J, Mustapic M, Nigam SM, Suire C, Maharana C, Jicha GA, Liu D, Machairaki V, Witwer KW, Kapogiannis D & Mattson MP (2016) Extracellular

- Vesicle-Associated A β Mediates Trans-Neuronal Bioenergetic and Ca²⁺-Handling Deficits in Alzheimer's Disease Models. *NPJ Aging Mech Dis* 2:16019-.
- Elbaz I, Lerer-Goldshtein T, Okamoto H & Appelbaum L (2015) Reduced synaptic density and deficient locomotor response in neuronal activity-regulated pentraxin 2a mutant zebrafish. *FASEB J* 29(4):1220-1234.
- Elliott DA, Weickert CS & Garner B (2010a) Apolipoproteins in the brain: implications for neurological and psychiatric disorders. *Clin Lipidol* 51(4):555-573.
- Elliott DA, Weickert CS & Garner B (2010b) Apolipoproteins in the brain: implications for neurological and psychiatric disorders. *Clinical lipidology* 51(4):555-573.
- Ellis JR, Ellis KA, Bartholomeusz CF, Harrison BJ, Wesnes KA, Erskine FF, Vitetta L & Nathan PJ (2006) Muscarinic and nicotinic receptors synergistically modulate working memory and attention in humans. *Int J Neuropsychopharmacol* 9(2):175-189.
- Emmady PD & Tadi P (2022) Dementia. *StatPearls*, © 2022, StatPearls Publishing LLC., Treasure Island FL.
- Emmanouilidou E, Melachroinou K, Roumeliotis T, Garbis SD, Ntzouni M, Margaritis LH, Stefanis L & Vekrellis K (2010) Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J Neurosci* 30(20):6838-6851.
- Enroth S, Hallmans G, Grankvist K, Gyllensten U (2016) Effects of Long-Term Storage Time and Original Sampling Month on Biobank Plasma Protein Concentrations. *EBioMedicine* 12:309-314.
- Esparza TJ, Zhao H, Cirrito JR, Cairns NJ, Bateman RJ, Holtzman DM & Brody DL (2013) Amyloid- β oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls. *Ann Neurol* 73(1):104-119.
- Etgen T, Sander D, Bickel H & Förstl H (2011) Mild cognitive impairment and dementia: the importance of modifiable risk factors. *Deutsches Arzteblatt international* 108(44):743-750.
- Fan MM & Raymond LA (2007) N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. *Prog Neurobiol* 81(5-6):272-293.
- 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. *Alzheimers Dement* 11(6):600-607 e601.
- Fiest KM, Jetté N, Roberts JI, Maxwell CJ, Smith EE, Black SE, Blaikie L, Cohen A, Day L, Holroyd-Leduc J, Kirk A, Pearson D, Pringsheim T, Venegas-Torres A & Hogan DB (2016a) The Prevalence and Incidence of Dementia: a Systematic Review and Meta-analysis. *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques* 43(S1):S3-S50.
- Fiest KM, Roberts JI, Maxwell CJ, Hogan DB, Smith EE, Frolkis A, Cohen A, Kirk A, Pearson D, Pringsheim T, Venegas-Torres A & Jetté N (2016b) The Prevalence and Incidence of Dementia Due to Alzheimer's Disease: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Can J Neurol Sci* 43 Suppl 1:S51-82.
- Folch J, Busquets O, Ettcheto M, Sánchez-López E, Castro-Torres RD, Verdaguer E, Garcia ML, Olloquequi J, Casadesús G, Beas-Zarate C, Pelegri C, Vilaplana J, Auladell C & Camins A (2018) Memantine for the Treatment of Dementia: A Review on its Current and Future Applications. *J Alzheimers Dis* 62(3):1223-1240.

- 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(3):189-198.
- Foster EM, Dangla-Valls A, Lovestone S, Ribe EM & Buckley NJ (2019) Clusterin in Alzheimer's Disease: Mechanisms, Genetics, and Lessons From Other Pathologies. *Frontiers in neuroscience* 13:164-164.
- Fourcade O, Simon MF, Viodé C, Rugani N, Leballe F, Ragab A, Fournié B, Sarda L & Chap H (1995) Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell* 80(6):919-927.
- Franz G, Reindl M, Patel SC, Beer R, Unterrichter I, Berger T, Schmutzhard E, Poewe W & Kampfl A (1999) Increased expression of apolipoprotein D following experimental traumatic brain injury. *J Neurochem* 73(4):1615-1625.
- Gackowski D, Rozalski R, Siomek A, Dziaman T, Nicpon K, Klimarczyk M, Araszkiwicz A & Olinski R (2008) Oxidative stress and oxidative DNA damage is characteristic for mixed Alzheimer disease/vascular dementia. *J Neurol Sci* 266(1-2):57-62.
- Gale SA, Acar D & Daffner KR (2018) Dementia. *The American Journal of Medicine* 131(10):1161-1169.
- Gandhi S & Abramov AY (2012) Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012:428010-428010.
- Ganformina MD, Do Carmo S, Lora JM, Torres-Schumann S, Vogel M, Allhorn M, González C, Bastiani MJ, Rassart E & Sanchez D (2008) Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress. *Aging cell* 7(4):506-515.
- Gąsecka A, Banaszkiwicz M, Nieuwland R, van der Pol E, Hajji N, Mutwil H, Rogula S, Rutkowska W, Pluta K, Eyileten C, Postuła M, Darocha S, Huczek Z, Opolski G, Filipiak KJ, Torbicki A & Kurzyna M (2021) Prostacyclin Analogues Inhibit Platelet Reactivity, Extracellular Vesicle Release and Thrombus Formation in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension. *J Clin Med* 10(5).
- Gasecka A, Nieuwland R, Budnik M, Dignat-George F, Eyileten C, Harrison P, Lacroix R, Leroyer A, Opolski G, Pluta K, van der Pol E, Postuła M, Siljander P, Siller-Matula JM & Filipiak KJ (2020) Ticagrelor attenuates the increase of extracellular vesicle concentrations in plasma after acute myocardial infarction compared to clopidogrel. *J Thromb Haemost* 18(3):609-623.
- Georganopoulou DG, Chang L, Nam JM, Thaxton CS, Mufson EJ, Klein WL & Mirkin CA (2005) Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(7):2273-2276.
- Ghidoni R, Paterlini A & Benussi L (2013) Translational proteomics in Alzheimer's disease and related disorders. *Clin Biochem* 46(6):480-486.
- Ghiglieri V, Calabrese V & Calabresi P (2018) Alpha-Synuclein: From Early Synaptic Dysfunction to Neurodegeneration. *Front Neurol* 9:295.
- Ghosh S, Sil TB, Dolai S & Garai K (2019) High-affinity multivalent interactions between apolipoprotein E and the oligomers of amyloid- β . *FEBS J* 286(23):4737-4753.
- Glaso M, Nordbo G, Diep L & Bohmer T (2004) Reduced concentrations of several vitamins in normal weight patients with late-onset dementia of the Alzheimer type without vascular disease. *J Nutr Health Aging* 8(5):407-413.

- Glöckner F & Ohm TG (2003) Hippocampal apolipoprotein D level depends on Braak stage and APOE genotype. *Neuroscience* 122(1):103-110.
- Goedert M, Klug A & Crowther RA (2006) Tau protein, the paired helical filament and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 9(3 Suppl):195-207.
- Goetzl EJ, Abner EL, Jicha GA, Kapogiannis D & Schwartz JB (2018a) Declining levels of functionally specialized synaptic proteins in plasma neuronal exosomes with progression of Alzheimer's disease. *FASEB J* 32(2):888-893.
- Goetzl EJ, Boxer A, Schwartz JB, Abner EL, Petersen RC, Miller BL, Carlson OD, Mustapic M & Kapogiannis D (2015a) Low neural exosomal levels of cellular survival factors in Alzheimer's disease. *Annals of Clinical and Translational Neurology* 2(7):769-773.
- Goetzl EJ, Boxer A, Schwartz JB, Abner EL, Petersen RC, Miller BL & Kapogiannis D (2015b) Altered lysosomal proteins in neural-derived plasma exosomes in preclinical Alzheimer disease. *Neurology* 85(1):40.
- Goetzl EJ, Kapogiannis D, Schwartz JB, Lobach IV, Goetzl L, Abner EL, Jicha GA, Karydas AM, Boxer A & Miller BL (2016) Decreased synaptic proteins in neuronal exosomes of frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *The FASEB Journal* 30(12):4141-4148.
- Goetzl EJ, Nogueras-Ortiz C, Mustapic M, Mullins RJ, Abner EL, Schwartz JB & Kapogiannis D (2019) Deficient neurotrophic factors of CSPG4-type neural cell exosomes in Alzheimer disease. *FASEB J* 33(1):231-238.
- Goetzl EJ, Schwartz JB, Abner EL, Jicha GA & Kapogiannis D (2018b) High complement levels in astrocyte-derived exosomes of Alzheimer disease. *Annals of Neurology* 83(3):544-552.
- Graham JE, Rockwood K, Beattie BL, Eastwood R, Gauthier S, Tuokko H & McDowell I (1997) Prevalence and severity of cognitive impairment with and without dementia in an elderly population. *Lancet* 349(9068):1793-1796.
- Guix FX, Corbett GT, Cha DJ, Mustapic M, Liu W, Mengel D, Chen Z, Aikawa E, Young-Pearse T, Kapogiannis D, Selkoe DJ & Walsh DM (2018) Detection of Aggregation-Competent Tau in Neuron-Derived Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci* 19(3):663.
- Gulyaeva NV, Bobkova NV, Kolosova NG, Samokhin AN, Stepanichev MY & Stefanova NA (2017) Molecular and Cellular Mechanisms of Sporadic Alzheimer's Disease: Studies on Rodent Models in vivo. *Biochemistry (Mosc)* 82(10):1088-1102.
- Gupta Y, Lama RK, Kwon GR, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2019) Prediction and Classification of Alzheimer's Disease Based on Combined Features From Apolipoprotein-E Genotype, Cerebrospinal Fluid, MR, and FDG-PET Imaging Biomarkers. *Front Comput Neurosci* 13: 72.
- Haddad M, Perrotte M, Ben Khedher MR, Madec E, Lepage A, Fülöp T & Ramassamy C (2021) Levels of Receptor for Advanced Glycation End Products and Glyoxalase-1 in the Total Circulating Extracellular Vesicles from Mild Cognitive Impairment and Different Stages of Alzheimer's Disease Patients. *J Alzheimers Dis* 84(1):227-237.
- Haddad M, Perrotte M, Khedher MRB, Demongin C, Lepage A, Fülöp T & Ramassamy C (2019a) Methylglyoxal and Glyoxal as Potential Peripheral Markers for MCI Diagnosis and Their Effects on the Expression of Neurotrophic, Inflammatory and Neurodegenerative Factors in Neurons and in Neuronal Derived-Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci* 20(19):4906.

- Haddad M, Perrotte M, Landri S, Lepage A, Fülöp T & Ramassamy C (2019b) Circulating and Extracellular Vesicles Levels of N-(1-Carboxymethyl)-L-Lysine (CML) Differentiate Early to Moderate Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 69(3):751-762.
- Hampel H, O'Bryant SE, Molinuevo JL, Zetterberg H, Masters CL, Lista S, Kiddle SJ, Batrla R & Blennow K (2018) Blood-based biomarkers for Alzheimer disease: mapping the road to the clinic. *Nat Rev Neurol* 14(11):639-652.
- Harding C, Heuser J & Stahl P (1983) Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* 97(2):329-339.
- Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvina V, Dowzell K, Williams A, Jones N, Thomas C, Stretton A, Morgan AR, Lovestone S, Powell J, Proitsi P, Lupton MK, Brayne C, Rubinsztein DC, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Morgan K, Brown KS, Passmore PA, Craig D, McGuinness B, Todd S, Holmes C, Mann D, Smith AD, Love S, Kehoe PG, Hardy J, Mead S, Fox N, Rossor M, Collinge J, Maier W, Jessen F, Schürmann B, Heun R, van den Bussche H, Heuser I, Kornhuber J, Wiltfang J, Dichgans M, Frölich L, Hampel H, Hüll M, Rujescu D, Goate AM, Kauwe JS, Cruchaga C, Nowotny P, Morris JC, Mayo K, Sleegers K, Bettens K, Engelborghs S, De Deyn PP, Van Broeckhoven C, Livingston G, Bass NJ, Gurling H, McQuillin A, Gwilliam R, Deloukas P, Al-Chalabi A, Shaw CE, Tsolaki M, Singleton AB, Guerreiro R, Mühleisen TW, Nöthen MM, Moebus S, Jöckel KH, Klopp N, Wichmann HE, Carrasquillo MM, Pankratz VS, Younkin SG, Holmans PA, O'Donovan M, Owen MJ & Williams J (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41(10):1088-1093.
- Henriksen K, O'Bryant SE, Hampel H, Trojanowski JQ, Montine TJ, Jeromin A, Blennow K, Lonneborg A, Wyss-Coray T, Soares H, Bazenet C, Sjogren M, Hu W, Lovestone S, Karsdal MA & Weiner MW (2014) The future of blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 10(1):115-131.
- Herholz K & Ebmeier K (2011) Clinical amyloid imaging in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 10(7):667-670.
- Holmes C, Cunningham C, Zotova E, Woolford J, Dean C, Kerr S, Culliford D & Perry VH (2009) Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology* 73(10):768-774.
- Howitt J & Hill AF (2016) Exosomes in the Pathology of Neurodegenerative Diseases. *J Biol Chem* 291(52):26589-26597.
- Hsiung GY, Donald A, Grand J, Black SE, Bouchard RW, Gauthier SG, Loy-English I, Hogan DB, Kertesz A, Rockwood K & Feldman HH (2006a) Outcomes of cognitively impaired not demented at 2 years in the Canadian Cohort Study of Cognitive Impairment and Related Dementias. *Dement Geriatr Cogn Disord* 22(5-6):413-420.
- Hsiung GYR, Donald A, Grand J, Black SE, Bouchard RW, Gauthier SG, Loy-English I, Hogan DB, Kertesz A, Rockwood K & Feldman HH (2006b) Outcomes of Cognitively Impaired Not Demented at 2 Years in the Canadian Cohort Study of Cognitive Impairment and Related Dementias. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 22(5-6):413-420.
- Huang YJ, Jin MH, Pi RB, Zhang JJ, Ouyang Y, Chao XJ, Chen MH, Liu PQ, Yu JC, Ramassamy C, Dou J, Chen XH, Jiang YM & Qin J (2013) Acrolein induces Alzheimer's disease-like pathologies in vitro and in vivo. *Toxicol Lett* 217(3):184-191.
- Husain MA, Laurent B & Plourde M (2021) APOE and Alzheimer's Disease: From Lipid Transport to Physiopathology and Therapeutics. *Frontiers in neuroscience* 15:630502-630502.

- Hye A, Riddoch-Contreras J, Baird AL, Ashton NJ, Bazenet C, Leung R, Westman E, Simmons A, Dobson R, Sattlecker M, Lupton M, Lunnon K, Keohane A, Ward M, Pike I, Zucht HD, Pepin D, Zheng W, Tunnicliffe A, Richardson J, Gauthier S, Soininen H, Kloszewska I, Mecocci P, Tsolaki M, Vellas B & Lovestone S (2014) Plasma proteins predict conversion to dementia from prodromal disease. *Alzheimers Dement* 10(6):799-807 e792.
- Iba M, Guo JL, McBride JD, Zhang B, Trojanowski JQ & Lee VM (2013) Synthetic tau fibrils mediate transmission of neurofibrillary tangles in a transgenic mouse model of Alzheimer's-like tauopathy. *J Neurosci* 33(3):1024-1037.
- Ismail Z, Rajji TK & Shulman KI (2010) Brief cognitive screening instruments: an update. *Int J Geriatr Psychiatry* 25(2):111-120.
- Iulita MF, Allard S, Richter L, Munter LM, Ducatenzeiler A, Weise C, Do Carmo S, Klein WL, Multhaup G & Cuellar AC (2014) Intracellular A β pathology and early cognitive impairments in a transgenic rat overexpressing human amyloid precursor protein: a multidimensional study. *Acta Neuropathol Commun* 2:61.
- Jack CR, Jr., Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, Holtzman DM, Jagust W, Jessen F, Karlawish J, Liu E, Molinuevo JL, Montine T, Phelps C, Rankin KP, Rowe CC, Scheltens P, Siemers E, Snyder HM & Sperling R (2018) NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 14(4):535-562.
- Jakubec M, Maple-Grødem J, Akbari S, Nesse S, Halskau Ø & Mork-Jansson AE (2020) Plasma-derived exosome-like vesicles are enriched in lyso-phospholipids and pass the blood-brain barrier. *PLoS One* 15(9):e0232442.
- Janelidze S, Berron D, Smith R, Strandberg O, Proctor NK, Dage JL, Stomrud E, Palmqvist S, Mattsson-Carlgren N & Hansson O (2021) Associations of Plasma Phospho-Tau217 Levels With Tau Positron Emission Tomography in Early Alzheimer Disease. *JAMA Neurol* 78(2):149-156.
- Jansen PJ, Lutjohann D, Thelen KM, von Bergmann K, van Leuven F, Ramaekers FC & Monique M (2009) Absence of ApoE upregulates murine brain ApoD and ABCA1 levels, but does not affect brain sterol levels, while human ApoE3 and human ApoE4 upregulate brain cholesterol precursor levels. *J Alzheimers Dis* 18(2):319-329.
- Jessen F, Amariglio RE, van Boxtel M, Breteler M, Ceccaldi M, Chételat G, Dubois B, Dufouil C, Ellis KA, van der Flier WM, Glodzik L, van Harten AC, de Leon MJ, McHugh P, Mielke MM, Molinuevo JL, Mosconi L, Osorio RS, Perrotin A, Petersen RC, Rabin LA, Rami L, Reisberg B, Rentz DM, Sachdev PS, de la Sayette V, Saykin AJ, Scheltens P, Shulman MB, Slavin MJ, Sperling RA, Stewart R, Uspenskaya O, Vellas B, Visser PJ & Wagner M (2014) A conceptual framework for research on subjective cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 10(6):844-852.
- Jeter CB, Hergenroeder GW, Hylm MJ, Redell JB, Moore AN & Dash PK (2013) Biomarkers for the diagnosis and prognosis of mild traumatic brain injury/concussion. *J Neurotrauma* 30(8):657-670.
- Jia L, Qiu Q, Zhang H, Chu L, Du Y, Zhang J, Zhou C, Liang F, Shi S, Wang S, Qin W, Wang Q, Li F, Wang Q, Li Y, Shen L, Wei Y & Jia J (2019a) Concordance between the assessment of A β 42, T-tau, and P-T181-tau in peripheral blood neuronal-derived exosomes and cerebrospinal fluid. *Alzheimers Dement* 15(8):1071-1080.
- Jia L, Qiu Q, Zhang H, Chu L, Du Y, Zhang J, Zhou C, Liang F, Shi S, Wang S, Qin W, Wang Q, Li F, Wang Q, Li Y, Shen L, Wei Y & Jia J (2019b) Concordance between the assessment

- of A β 42, T-tau, and P-T181-tau in peripheral blood neuronal-derived exosomes and cerebrospinal fluid. *Alzheimer's & Dementia* 15(8):1071-1080.
- Jia L, Zhu M, Kong C, Pang Y, Zhang H, Qiu Q, Wei C, Tang Y, Wang Q, Li Y, Li T, Li F, Wang Q, Li Y, Wei Y & Jia J (2021) Blood neuro-exosomal synaptic proteins predict Alzheimer's disease at the asymptomatic stage. *Alzheimers Dement* 17(1):49-60.
- Jiang Q, Lee CYD, Mandrekar S, Wilkinson B, Cramer P, Zelcer N, Mann K, Lamb B, Willson TM, Collins JL, Richardson JC, Smith JD, Comery TA, Riddell D, Holtzman DM, Tontonoz P & Landreth GE (2008) ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta. *Neuron* 58(5):681-693.
- Jiao B, Liu H, Guo L, Xiao X, Liao X, Zhou Y, Weng L, Zhou L, Wang X, Jiang Y, Yang Q, Zhu Y, Zhou L, Zhang W, Wang J, Yan X, Li J, Tang B & Shen L (2021) The role of genetics in neurodegenerative dementia: a large cohort study in South China. *npj Genomic Medicine* 6(1):69.
- Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L & Turbide C (1987) Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* 262(19):9412-9420.
- Johnstone RM, Bianchini A & Teng K (1989) Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions. *Blood* 74(5):1844-1851.
- Jucker M & Walker LC (2015) Amyloid- β pathology induced in humans. *Nature* 525:193.
- Jürgensen S & Ferreira ST (2010) Nicotinic receptors, amyloid-beta, and synaptic failure in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 40(1-2):221-229.
- Kalaria RN, Kenny RA, Ballard CG, Perry R, Ince P & Polvikoski T (2004) Towards defining the neuropathological substrates of vascular dementia. *J Neurol Sci* 226(1-2):75-80.
- Kalman J, McConathy W, Araoz C, Kasa P & Lacko AG (2000) Apolipoprotein D in the aging brain and in Alzheimer's dementia. *Neurol Res* 22(4):330-336.
- Kang SW, Kim SJ & Kim MS (2017) Oxidative stress with tau hyperphosphorylation in memory impaired 1,2-diacetylbenzene-treated mice. *Toxicol Lett* 279:53-59.
- Kapogiannis D, Mustapic M, Shardell MD, Berkowitz ST, Diehl TC, Spangler RD, Tran J, Lazaropoulos MP, Chawla S, Gulyani S, Eitan E, An Y, Huang CW, Oh ES, Lyketsos CG, Resnick SM, Goetzl EJ & Ferrucci L (2019) Association of Extracellular Vesicle Biomarkers With Alzheimer Disease in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *JAMA Neurol* 76(11):1340-1351.
- Khan A, Kalaria RN, Corbett A & Ballard C (2016) Update on Vascular Dementia. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology* 29(5):281-301.
- Khan TK & Alkon DL (2015) Peripheral biomarkers of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 44(3):729-744.
- Kharrazi H, Vaisi-Raygani A, Rahimi Z, Tavilani H, Aminian M & Pourmotabbed T (2008) Association between enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense mechanism with apolipoprotein E genotypes in Alzheimer disease. *Clin Biochem* 41(12):932-936.
- Kim WS, Rahmanto AS, Kamili A, Rye KA, Guillemin GJ, Gelissen IC, Jessup W, Hill AF & Garner B (2007) Role of ABCG1 and ABCA1 in regulation of neuronal cholesterol efflux to apolipoprotein E discs and suppression of amyloid-beta peptide generation. *J Biol Chem* 282(5):2851-2861.

- Kim Y-S, Ahn J-S, Kim S, Kim H-J, Kim S-H & Kang J-S (2018) The potential theragnostic (diagnostic+therapeutic) application of exosomes in diverse biomedical fields. *Korean J Physiol Pharmacol* 22(2):113-125.
- Kinney JW, Bemiller SM, Murtishaw AS, Leisgang AM, Salazar AM & Lamb BT (2018) Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y)* 4:575-590.
- Knobloch M, Konietzko U, Krebs DC & Nitsch RM (2007) Intracellular Abeta and cognitive deficits precede beta-amyloid deposition in transgenic arcAbeta mice. *Neurobiol Aging* 28(9):1297-1306.
- Kobro-Flatmoen A, Nagelhus A & Witter MP (2016) Reelin-immunoreactive neurons in entorhinal cortex layer II selectively express intracellular amyloid in early Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 93:172-183.
- Koch M, DeKosky ST, Fitzpatrick AL, Furtado JD, Lopez OL, Kuller LH, Mackey RH, Hughes TM, Mukamal KJ & Jensen MK (2018) Apolipoproteins and Alzheimer's pathophysiology. *Alzheimers Dement (Amst)* 10:545-553.
- Kojima R, Bojar D, Rizzi G, Hamri GC-E, El-Baba MD, Saxena P, Ausländer S, Tan KR & Fussenegger M (2018) Designer exosomes produced by implanted cells intracerebrally deliver therapeutic cargo for Parkinson's disease treatment. *Nature Communications* 9(1):1305.
- Koldamova RP, Lefterov IM, Lefterova MI & Lazo JS (2001) Apolipoprotein A-I directly interacts with amyloid precursor protein and inhibits A beta aggregation and toxicity. *Biochemistry* 40(12):3553-3560.
- Kook SY, Hong HS, Moon M, Ha CM, Chang S & Mook-Jung I (2012) A β_{1-42} -RAGE interaction disrupts tight junctions of the blood-brain barrier via Ca²⁺-calcineurin signaling. *J Neurosci* 32(26):8845-8854.
- Kouvari M, D'Cunha NM, Travica N, Sergi D, Zec M, Marx W & Naumovski N (2022) Metabolic Syndrome, Cognitive Impairment and the Role of Diet: A Narrative Review. *Nutrients* 14(2).
- Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, Dingli F, Loew D, Tkach M & Théry C (2016) Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(8):E968-977.
- Kur I-M, Prouvot P-H, Fu T, Fan W, Müller-Braun F, Das A, Das S, Deller T, Roeper J, Stroh A & Momma S (2020) Neuronal activity triggers uptake of hematopoietic extracellular vesicles in vivo. *PLOS Biology* 18(3):e3000643.
- Kusuma GD, Barabadi M, Tan JL, et al. (2018) To protect and to preserve: novel preservation strategies for extracellular vesicles. *Front Pharmacol* 9:1199.
- Lama RK, Gwak J, Park JS & Lee SW (2017) Diagnosis of Alzheimer's Disease Based on Structural MRI Images Using a Regularized Extreme Learning Machine and PCA Features. *J Healthc Eng* 2017:5485080.
- Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, Zelenika D, Bullido MJ, Tavernier B, Letenneur L, Bettens K, Berr C, Pasquier F, Fiévet N, Barberger-Gateau P, Engelborghs S, De Deyn P, Mateo I, Franck A, Helisalmi S, Porcellini E, Hanon O, de Pancorbo MM, Lendon C, Dufouil C, Jaillard C, Leveillard T, Alvarez V, Bosco P, Mancuso M, Panza F, Nacmias B, Bossù P, Piccardi P, Annoni G, Seripa D, Galimberti

- D, Hannequin D, Licastro F, Soininen H, Ritchie K, Blanché H, Dartigues JF, Tzourio C, Gut I, Van Broeckhoven C, Alperovitch A, Lathrop M & Amouyel P (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41(10):1094-1099.
- Lawton DM, Furness DN, Lindemann B & Hackney CM (2000) Localization of the glutamate-aspartate transporter, GLAST, in rat taste buds. *Eur J Neurosci* 12(9):3163-3171.
- Lee S, Mankhong S & Kang JH (2019) Extracellular Vesicle as a Source of Alzheimer's Biomarkers: Opportunities and Challenges. *Int J Mol Sci* 20(7).
- Lee YJ, Jy W, Horstman LL, Janania J, Reyes Y, Kelley RE & Ahn YS (1993) Elevated platelet microparticles in transient ischemic attacks, lacunar infarcts, and multiinfarct dementias. *Thromb Res* 72(4):295-304.
- Leon WC, Canneva F, Partridge V, Allard S, Ferretti MT, DeWilde A, Vercauteren F, Atifeh R, Ducatenzeiler A, Klein W, Szyf M, Alhonen L & Cuellio AC (2010) A novel transgenic rat model with a full Alzheimer's-like amyloid pathology displays pre-plaque intracellular amyloid-beta-associated cognitive impairment. *J Alzheimers Dis* 20(1):113-126.
- Lesné SE, Sherman MA, Grant M, Kuskowski M, Schneider JA, Bennett DA & Ashe KH (2013) Brain amyloid- β oligomers in ageing and Alzheimer's disease. *Brain* 136(Pt 5):1383-1398.
- Levros LC, Jr., Labrie M, Charfi C & Rassart E (2013) Binding and repressive activities of apolipoprotein E3 and E4 isoforms on the human ApoD promoter. *Mol Neurobiol* 48(3):669-680.
- Li F, Xie X-Y, Sui X-F, Wang P, Chen Z & Zhang J-B (2020) Profile of Pathogenic Proteins and MicroRNAs in Plasma-derived Extracellular Vesicles in Alzheimer's Disease: A Pilot Study. *Neuroscience* 432:240-246.
- Li JJ, Wang B, Kodali MC, Chen C, Kim E, Patters BJ, Lan L, Kumar S, Wang X, Yue J & Liao FF (2018) In vivo evidence for the contribution of peripheral circulating inflammatory exosomes to neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 15(1):8.
- Li R, Yang L, Lindholm K, Konishi Y, Yue X, Hampel H, Zhang D & Shen Y (2004) Tumor necrosis factor death receptor signaling cascade is required for amyloid-beta protein-induced neuron death. *J Neurosci* 24(7):1760-1771.
- Li Y, Tian X, Xiong Z-Y, Liao J-L, Hao L, Liu G-L, Ren Y-P, Wang Q, Duan L-P, Zheng Z-X, Quan W-X & Dong J (2016) Performance of the Modified Mini-Mental State Examination (3MS) in Assessing Specific Cognitive Function in Patients Undergoing Peritoneal Dialysis. *PLoS one* 11(12):e0166470-e0166470.
- Liao YF, Wang BJ, Cheng HT, Kuo LH & Wolfe MS (2004) Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interferon-gamma stimulate gamma-secretase-mediated cleavage of amyloid precursor protein through a JNK-dependent MAPK pathway. *J Biol Chem* 279(47):49523-49532.
- Lim HJ, Yoon H, Kim H, Kang Y-W, Kim J-E, Kim OY, Lee E-Y, Twizere J-C, Rak J & Kim D-K (2021) Extracellular Vesicle Proteomes Shed Light on the Evolutionary, Interactive, and Functional Divergence of Their Biogenesis Mechanisms. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9.
- Lischinig A, Bergqvist M, Ochiya T & Lässer C (2022) Quantitative Proteomics Identifies Proteins Enriched in Large and Small Extracellular Vesicles. *Molecular & Cellular Proteomics* 21(9).

- Liskowsky W & Schliebs R (2006) Muscarinic acetylcholine receptor inhibition in transgenic Alzheimer-like Tg2576 mice by scopolamine favours the amyloidogenic route of processing of amyloid precursor protein. *Int J Dev Neurosci* 24(2-3):149-156.
- Liu C-G, Song J, Zhang Y-Q & Wang P-C (2014) MicroRNA-193b is a regulator of amyloid precursor protein in the blood and cerebrospinal fluid derived exosomal microRNA-193b is a biomarker of Alzheimer's disease. *Mol Med Rep* 10(5):2395-2400.
- Liu CC, Liu CC, Kanekiyo T, Xu H & Bu G (2013) Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol* 9(2):106-118.
- Llorente A, Skotland T, Sylväne T, Kauhanen D, Róg T, Orłowski A, Vattulainen I, Ekroos K & Sandvig K (2013) Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1831(7):1302-1309.
- Lőrincz ÁM, Timár CI, Marosvári KA, et al (2014) Effect of storage on physical and functional properties of extracellular vesicles derived from neutrophilic granulocytes. *J Extracell Vesicles* 3:25465.
- Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE & Rogers J (1999) Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 155(3):853-862.
- Lyketsos CG, Toone L, Tschanz J, Rabins PV, Steinberg M, Onyike CU, Corcoran C, Norton M, Zandi P, Breitner JC, Welsh-Bohmer K, Anthony J, Østbye T, Bigler E, Pieper C, Burke J, Plassman B, Green RC, Steffens DC, Klein L, Leslie C, Townsend JJ, Wyse BW, Munger R & Williams M (2005) Population-based study of medical comorbidity in early dementia and "cognitive impairment, no dementia (CIND)": association with functional and cognitive impairment: The Cache County Study. *Am J Geriatr Psychiatry* 13(8):656-664.
- Lynch MA (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84(1):87-136.
- Madrid L, Moreno-Grau S, Ahmad S, González-Pérez A, de Rojas I, Xia R, Martino Adami PV, García-González P, Kleineidam L, Yang Q, Damotte V, Bis JC, Noguera-Perea F, Bellenguez C, Jian X, Marín-Muñoz J, Grenier-Boley B, Orellana A, Ikram MA, Amouyel P, Satizabal CL, Real LM, Antúnez-Almagro C, DeStefano A, Cabrera-Socorro A, Sims R, Van Duijn CM, Boerwinkle E, Ramírez A, Fornage M, Lambert JC, Williams J, Seshadri S, Ried JS, Ruiz A & Saez ME (2021) Multiomics integrative analysis identifies APOE allele-specific blood biomarkers associated to Alzheimer's disease etiopathogenesis. *Ageing (Albany NY)* 13(7):9277-9329.
- Mandal PK, Saharan S, Tripathi M & Murari G (2015) Brain glutathione levels--a novel biomarker for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 78(10):702-710.
- Marksbery WR, Kryscio RJ, Lovell MA & Morrow JD (2005) Lipid peroxidation is an early event in the brain in amnesic mild cognitive impairment. *Ann Neurol* 58(5):730-735.
- Marksbery WR & Lovell MA (2007) Damage to lipids, proteins, DNA, and RNA in mild cognitive impairment. *Arch Neurol* 64(7):954-956.
- Maroto R, Zhao Y, Jamaluddin M, et al. (2017) Effects of storage temperature on airway exosome integrity for diagnostic and functional analyses. *J Extracell Vesicles* 6:1359478.
- Martin L, Latypova X, Wilson CM, Magnaudeix A, Perrin ML & Terro F (2013) Tau protein phosphatases in Alzheimer's disease: the leading role of PP2A. *Ageing Res Rev* 12(1):39-49.

- Mattsson N, Andreasson U, Persson S, Carrillo MC, Collins S, Chalbot S, Cutler N, Dufour-Rainfray D, Fagan AM, Heegaard NH, Robin Hsiung GY, Hyman B, Iqbal K, Kaeser SA, Lachno DR, Lleo A, Lewczuk P, Molinuevo JL, Parchi P, Regeniter A, Rissman RA, Rosenmann H, Sancesario G, Schroder J, Shaw LM, Teunissen CE, Trojanowski JQ, Vanderstichele H, Vandijck M, Verbeek MM, Zetterberg H & Blennow K (2013) CSF biomarker variability in the Alzheimer's Association quality control program. *Alzheimers Dement* 9(3):251-261.
- Mattsson N, Andreasson U, Zetterberg H & Blennow K (2017) Association of Plasma Neurofilament Light With Neurodegeneration in Patients With Alzheimer Disease. *JAMA Neurol* 74(5):557-566.
- Mattsson N, Insel PS, Landau S, Jagust W, Donohue M, Shaw LM, Trojanowski JQ, Zetterberg H, Blennow K & Weiner M (2014) Diagnostic accuracy of CSF Ab42 and florbetapir PET for Alzheimer's disease. *Ann Clin Transl Neurol* 1(8):534-543.
- Mattsson N, Zetterberg H, Janelidze S, Insel PS, Andreasson U, Stomrud E, Palmqvist S, Baker D, Tan Hehir CA, Jeromin A, Hanlon D, Song L, Shaw LM, Trojanowski JQ, Weiner MW, Hansson O, Blennow K & Investigators A (2016) Plasma tau in Alzheimer disease. *Neurology* 87(17):1827-1835.
- May PC, Lampert-Etchells M, Johnson SA, Poirier J, Masters JN, Finch CE (1990) Dynamics of gene expression for a hippocampal glycoprotein elevated in Alzheimer's disease and in response to experimental lesions in rat. *Neuron* 5(6):831-839.
- Mayo JN & Bearden SE (2015) Driving the Hypoxia-Inducible Pathway in Human Pericytes Promotes Vascular Density in an Exosome-Dependent Manner. *Microcirculation* 22(8):711-723.
- McGrath LT, McGleenon BM, Brennan S, McColl D, Mc IS & Passmore AP (2001) Increased oxidative stress in Alzheimer's disease as assessed with 4-hydroxynonenal but not malondialdehyde. *QJM* 94(9):485-490.
- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Jr., Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carrillo MC, Thies B, Weintraub S & Phelps CH (2011) The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 7(3):263-269.
- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI & Masters CL (1999) Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 46(6):860-866.
- Misrani A, Tabassum S & Yang L (2021) Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 13:617588.
- Mohandas E, Rajmohan V & Raghunath B (2009) Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian J Psychiatry* 51(1):55-61.
- 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 Neuropathol* 136(6):821-853.

- Monllor P, Giraldo E, Badia MC, de la Asuncion JG, Alonso MD, Lloret A & Vina J (2021) Serum Levels of Clusterin, PKR, and RAGE Correlate with Amyloid Burden in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 80(3):1067-1077.
- Morales-Prieto DM, Murrieta-Coxca JM, Stojiljkovic M, Diezel C, Streicher PE, Henao-Restrepo JA, Röstel F, Lindner J, Witte OW, Weis S, Schmeer C & Marz M (2022) Small Extracellular Vesicles from Peripheral Blood of Aged Mice Pass the Blood-Brain Barrier and Induce Glial Cell Activation. *Cells* 11(4).
- Morley JE & Farr SA (2014) The role of amyloid-beta in the regulation of memory. *Biochem Pharmacol* 88(4):479-485.
- Moscoso A, Grothe MJ, Ashton NJ, Karikari TK, Lantero Rodríguez J, Snellman A, Suárez-Calvet M, Blennow K, Zetterberg H, Schöll M & Initiative AsDN (2021) Longitudinal Associations of Blood Phosphorylated Tau181 and Neurofilament Light Chain With Neurodegeneration in Alzheimer Disease. *JAMA Neurology* 78(4):396-406.
- Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K & McConlogue L (2000) High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 20(11):4050-4058.
- Mulder C, Scheltens P, Barkhof F, Gundy C, Verstraeten RA & de Leeuw FE (2005) Low vitamin B6 levels are associated with white matter lesions in Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc* 53(6):1073-1074.
- Muraoka S, Hirano M, Isoyama J, Nagayama S, Tomonaga T & Adachi J (2022) Comprehensive proteomic profiling of plasma and serum phosphatidylserine-positive extracellular vesicles reveals tissue-specific proteins. *iScience* 25(4):104012.
- Murr J, Carmichael PH, Julien P & Laurin D (2014) Plasma oxidized low-density lipoprotein levels and risk of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 35(8):1833-1838.
- Mustapic M, Eitan E, Werner JK, Jr., Berkowitz ST, Lazaropoulos MP, Tran J, Goetzl EJ & Kapogiannis D (2017) Plasma Extracellular Vesicles Enriched for Neuronal Origin: A Potential Window into Brain Pathologic Processes. *Front Neurosci* 11:278.
- Nakamura A, Kaneko N, Villemagne VL, Kato T, Doecke J, Dore V, Fowler C, Li QX, Martins R, Rowe C, Tomita T, Matsuzaki K, Ishii K, Ishii K, Arahata Y, Iwamoto S, Ito K, Tanaka K, Masters CL & Yanagisawa K (2018a) High performance plasma amyloid-beta biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature* 554(7691):249-254.
- Nakamura A, Kaneko N, Villemagne VL, Kato T, Doecke J, Doré V, Fowler C, Li QX, Martins R, Rowe C, Tomita T, Matsuzaki K, Ishii K, Ishii K, Arahata Y, Iwamoto S, Ito K, Tanaka K, Masters CL & Yanagisawa K (2018b) High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature* 554(7691):249-254.
- Näslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P & Buxbaum JD (2000) Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA* 283(12):1571-1577.
- 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(4):695-699.
- Navarro A, Méndez E, Diaz C, del Valle E, Martínez-Pinilla E, Ordóñez C & Tolivia J (2013) Lifelong Expression of Apolipoprotein D in the Human Brainstem: Correlation with Reduced Age-Related Neurodegeneration. *PLOS ONE* 8(10):e77852.

- Ndountse LT & Chan HM (2009) Role of N-methyl-D-aspartate receptors in polychlorinated biphenyl mediated neurotoxicity. *Toxicol Lett* 184(1):50-55.
- Ni R, Marutle A & Nordberg A (2013) Modulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor and fibrillar amyloid-beta interactions in Alzheimer's disease brain. *J Alzheimers Dis* 33(3):841-851.
- Nikitidou E, Khoonsari PE, Shevchenko G, Ingelsson M, Kultima K & Erlandsson A (2017) Increased Release of Apolipoprotein E in Extracellular Vesicles Following Amyloid- β Protofibril Exposure of Neuroglial Co-Cultures. *J Alzheimers Dis* 60(1):305-321.
- Nogueras-Ortiz CJ, Mahairaki V, Delgado-Peraza F, Das D, Avgerinos K, Eren E, Hentschel M, Goetzl EJ, Mattson MP & Kapogiannis D (2020) Astrocyte- and Neuron-Derived Extracellular Vesicles from Alzheimer's Disease Patients Effect Complement-Mediated Neurotoxicity. *Cells* 9(7):1618.
- Nunez EA, Wallis J & Gershon MD (1974) Secretory processes in follicular cells of the bat thyroid. 3. The occurrence of extracellular vesicles and colloid droplets during arousal from hibernation. *Am J Anat* 141(2):179-201.
- Nunomura A, Perry G, Pappolla MA, Wade R, Hirai K, Chiba S & Smith MA (1999) RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 19(6):1959-1964.
- Ogaki K, Martens YA, Heckman MG, Koga S, Labbé C, Lorenzo-Betancor O, Wernick AI, Walton RL, Soto AI, Vargas ER, Nielsen HM, Fujioka S, Kanekiyo T, Uitti RJ, van Gerpen JA, Cheshire WP, Wszolek ZK, Low PA, Singer W, Dickson DW, Bu G & Ross OA (2018) Multiple system atrophy and apolipoprotein E. *Mov Disord* 33(4):647-650.
- Padurariu M, Ciobica A, Hritcu L, Stoica B, Bild W & Stefanescu C (2010) Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 469(1):6-10.
- Palmqvist S, Zetterberg H, Blennow K, Vestberg S, Andreasson U, Brooks DJ, Owenius R, Hagerstrom D, Wollmer P, Minthon L & Hansson O (2014) Accuracy of brain amyloid detection in clinical practice using cerebrospinal fluid beta-amyloid 42: a cross-validation study against amyloid positron emission tomography. *JAMA Neurol* 71(10):1282-1289.
- Paolicelli RC, Bisht K & Tremblay M (2014) Fractalkine regulation of microglial physiology and consequences on the brain and behavior. *Front Cell Neurosci* 8:129.
- Paolicelli RC & Ferretti MT (2017) Function and Dysfunction of Microglia during Brain Development: Consequences for Synapses and Neural Circuits. *Front Synaptic Neurosci* 9:9.
- Parameshwaran K, Dhanasekaran M & Suppiramaniam V (2008) Amyloid beta peptides and glutamatergic synaptic dysregulation. *Exp Neurol* 210(1):7-13.
- Pascua-Maestro R, González E, Lillo C, Ganfornina MD, Falcón-Pérez JM & Sanchez D (2018) Extracellular Vesicles Secreted by Astroglial Cells Transport Apolipoprotein D to Neurons and Mediate Neuronal Survival Upon Oxidative Stress. *Front Cell Neurosci* 12:526.
- Peña-Bautista C, Álvarez-Sánchez L, Ferrer I, López-Nogueroles M, Cañada-Martínez AJ, Oger C, Galano J-M, Durand T, Baquero M & Cháfer-Pericás C (2021) Lipid Peroxidation Assessment in Preclinical Alzheimer Disease Diagnosis. *Antioxidants* 10(7).

- Peng KY, Pérez-González R, Alldred MJ, Goulbourne CN, Morales-Corraliza J, Saito M, Saito M, Ginsberg SD, Mathews PM & Levy E (2019) Apolipoprotein E4 genotype compromises brain exosome production. *Brain* 142(1):163-175.
- Perani D, Della Rosa PA, Cerami C, Gallivanone F, Fallanca F, Vanoli EG, Panzacchi A, Nobili F, Pappata S, Marcone A, Garibotto V, Castiglioni I, Magnani G, Cappa SF & Gianolli L (2014) Validation of an optimized SPM procedure for FDG-PET in dementia diagnosis in a clinical setting. *Neuroimage Clin* 6:445-454.
- Pericak-Vance M, Rajabli F, Feliciano-Astacio B, et al. (2017) African haplotypic background mitigates the effect of apoe ϵ 4 risk allele in Alzheimer disease. *J Neurol Sci* 381:1137.
- Perrotte M, Haddad M, Le Page A, Frost EH, Fulöp T & Ramassamy C (2020) Profile of pathogenic proteins in total circulating extracellular vesicles in mild cognitive impairment and during the progression of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 86:102-111.
- Perrotte M, Le Page A, Fournet M, Le Sayec M, Rassart É, Fulop T & Ramassamy C (2019) 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.
- Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE (1977) A cholinergic connection between normal aging and senile dementia in the human hippocampus. *Neurosci Lett* 6:85-89.
- Petersen RC (2000) Aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *Neurol Clin* 18(4):789-806.
- Petersen RC (2004) Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J Intern Med* 256(3):183-194.
- Pham E, Crews L, Ubhi K, Hansen L, Adame A, Cartier A, Salmon D, Galasko D, Michael S, Savas JN, Yates JR, Glabe C & Masliah E (2010) Progressive accumulation of amyloid-beta oligomers in Alzheimer's disease and in amyloid precursor protein transgenic mice is accompanied by selective alterations in synaptic scaffold proteins. *FEBS J* 277(14):3051-3067.
- Picard C, Nilsson N, Labonté A, Auld D, Rosa-Neto P, Ashton NJ, Zetterberg H, Blennow K, Breitner JCB, Villeneuve S & Poirier J (2022) Apolipoprotein B is a novel marker for early tau pathology in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 18(5):875-887.
- Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P & Gauthier S (1993) Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 342(8873):697-699.
- Polidori MC, Mattioli P, Aldred S, Cecchetti R, Stahl W, Griffiths H, Senin U, Sies H & Mecocci P (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.
- Powell JJ, Harvey RS & Thompson RP (1996) Microparticles in Crohn's disease--has the dust settled? *Gut* 39(2):340-341.
- Pu Z, Xu W, Lin Y, He J & Huang M (2017) Oxidative Stress Markers and Metal Ions are Correlated With Cognitive Function in Alzheimer's Disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 32(6):353-359.
- Pulido R, Jiménez-Escrig A, Orensanz L, Saura-Calixto F & Jiménez-Escrig A (2005) Study of plasma antioxidant status in Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 12(7):531-535.

- Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fa M, Staniszewski A, Palmeri A & Arancio O (2008) Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci* 28(53):14537-14545.
- Querfurth HW & LaFerla FM (2010) Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 362(4):329-344.
- Quintanilla RA, Orellana DI, González-Billault C & Maccioni RB (2004) Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Exp Cell Res* 295(1):245-257.
- Rafii MS & Aisen PS (2009) Recent developments in Alzheimer's disease therapeutics. *BMC Med* 7:7.
- Rajendran L, Hoshino M, Zahn TR, Keller P, Geiger KD, Verkade P & Simons K (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, 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(5-6):544-553.
- Ramassamy C, Averill D, Beffert U, Theroux L, Lussier-Cacan S, Cohn JS, Christen Y, Schoofs A, Davignon J & Poirier J (2000) Oxidative insults are associated with apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Dis* 7(1):23-37.
- Ramassamy C, Krzywkowski P, Averill D, Lussier-Cacan S, Theroux L, Christen Y, Davignon J & Poirier J (2001) Impact of apoE deficiency on oxidative insults and antioxidant levels in the brain. *Brain Res Mol Brain Res* 86(1-2):76-83.
- Rasmussen KL, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG & Frikke-Schmidt R (2015) Plasma levels of apolipoprotein E and risk of dementia in the general population. *Ann Neurol* 77(2):301-311.
- Rassart E, Desmarais F, Najyb O, Bergeron KF & Mounier C (2020) Apolipoprotein D. *Gene* 756:144874.
- Reiman EM, Arboleda-Velasquez JF, Quiroz YT, Huentelman MJ, Beach TG, Caselli RJ, Chen Y, Su Y, Myers AJ, Hardy J, Paul Vonsattel J, Younkin SG, Bennett DA, De Jager PL, Larson EB, Crane PK, Keene CD, Kamboh MI, Kofler JK, Duque L, Gilbert JR, Gwirtsman HE, Buxbaum JD, Dickson DW, Frosch MP, Ghetti BF, Lunetta KL, Wang L-S, Hyman BT, Kukull WA, Foroud T, Haines JL, Mayeux RP, Pericak-Vance MA, Schneider JA, Trojanowski JQ, Farrer LA, Schellenberg GD, Beecham GW, Montine TJ, Jun GR, Abner E, Adams PM, Albert MS, Albin RL, Apostolova LG, Arnold SE, Asthana S, Atwood CS, Baldwin CT, Barber RC, Barnes LL, Barral S, Becker JT, Beekly D, Bigio EH, Bird TD, Blacker D, Boeve BF, Bowen JD, Boxer A, Burke JR, Burns JM, Cairns NJ, Cantwell LB, Cao C, Carlson CS, Carlsson CM, Carney RM, Carrasquillo MM, Chui HC, Cribbs DH, Crocco EA, Cruchaga C, DeCarli C, Dick M, Doody RS, Duara R, Ertekin-Taner N, Evans DA, Faber KM, Fairchild TJ, Fallon KB, Fardo DW, Farlow MR, Ferris S, Galasko DR, Gearing M, Geschwind DH, Ghisays V, Goate AM, Graff-Radford NR, Green RC, Growdon JH, Hakonarson H, Hamilton RL, Hamilton-Nelson KL, Harrell LE, Honig LS, Huebinger RM, Hulette CM, Jarvik GP, Jin L-W, Karydas A, Katz MJ, Kauwe JSK, Kaye JA, Kim R, Kowall NW, Kramer JH, Kunkle BW, Kuzma AP, LaFerla FM, Lah JJ, Leung YY, Leverenz JB, Levey AI, Li G, Lieberman AP, Lipton RB, Lopez OL, Lyketsos CG, Malamon J, Marson DC, Martin ER, Martiniuk F, Mash DC, Masliah E, McCormick WC, McCurry SM, McDavid AN, McDonough S, McKee AC, Mesulam M, Miller BL, Miller CA,

- Miller JW, Morris JC, Mukherjee S, Naj AC, O'Bryant S, Olichney JM, Parisi JE, Paulson HL, Peskind E, Petersen RC, Pierce A, Poon WW, Potter H, Qu L, Quinn JF, Raj A, Raskind M, Reisberg B, Reisch JS, Reitz C, Ringman JM, Roberson ED, Rogaeve E, Rosen HJ, Rosenberg RN, Royall DR, Sager MA, Sano M, Saykin AJ, Schneider LS, Seeley WW, Smith AG, Sonnen JA, Spina S, George-Hyslop PS, Stern RA, Swerdlow RH, Tanzi RE, Troncoso JC, Tsuang DW, Valladares O, Van Deerlin VM, Van Eldik LJ, Vardarajan BN, Vinters HV, Weintraub S, Welsh-Bohmer KA, Wilhelmsen KC, Williamson J, Wingo TS, Woltjer RL, Wright CB, Wu C-K, Yu C-E, Yu L, Zhao Y & The Alzheimer's Disease Genetics C (2020) Exceptionally low likelihood of Alzheimer's dementia in APOE2 homozygotes from a 5,000-person neuropathological study. *Nature Communications* 11(1):667.
- Royo F, Théry C, Falcón-Pérez JM, Nieuwland R & Witwer KW (2020) Methods for Separation and Characterization of Extracellular Vesicles: Results of a Worldwide Survey Performed by the ISEV Rigor and Standardization Subcommittee. *Cells* 9(9):1955.
- Ruan Z, Pathak D, Venkatesan Kalavai S, Yoshii-Kitahara A, Muraoka S, Bhatt N, Takamatsu-Yukawa K, Hu J, Wang Y, Hersh S, Ericsson M, Gorantla S, Gendelman HE, Kaye D, Ikezu S, Luebke JI & Ikezu T (2021) Alzheimer's disease brain-derived extracellular vesicles spread tau pathology in interneurons. *Brain* 144(1):288-309.
- Sachdev PS, Mohan A, Taylor L & Jeste DV (2015) DSM-5 and Mental Disorders in Older Individuals: An Overview. *Harvard review of psychiatry* 23(5):320-328.
- Safieh M, Korczyn AD & Michaelson DM (2019) ApoE4: an emerging therapeutic target for Alzheimer's disease. *BMC Medicine* 17(1):64.
- Saint-Aubert L, Lemoine L, Chiotis K, Leuzy A, Rodriguez-Vieitez E & Nordberg A (2017) Tau PET imaging: present and future directions. *Molecular Neurodegeneration* 12(1):19.
- 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(6):3842-3849.
- Sanabria-Castro A, Alvarado-Echeverría I & Monge-Bonilla C (2017) Molecular Pathogenesis of Alzheimer's Disease: An Update. *Annals of neurosciences* 24(1):46-54.
- Sardar Sinha M, Ansell-Schultz A, Civitelli L, Hildesjö C, Larsson M, Lannfelt L, Ingelsson M & Hallbeck M (2018) Alzheimer's disease pathology propagation by exosomes containing toxic amyloid-beta oligomers. *Acta Neuropathol* 136(1):41-56.
- Schaeffer EL & Gattaz WF (2008) Cholinergic and glutamatergic alterations beginning at the early stages of Alzheimer disease: participation of the phospholipase A2 enzyme. *Psychopharmacology (Berl)* 198(1):1-27.
- Scheltens P, Blennow K, Breteler MM, de Strooper B, Frisoni GB, Salloway S & Van der Flier WM (2016) Alzheimer's disease. *Lancet* 388(10043):505-517.
- Scholl M, Lockhart SN, Schonhaut DR, O'Neil JP, Janabi M, Ossenkoppele R, Baker SL, Vogel JW, Faria J, Schwimmer HD, Rabinovici GD & Jagust WJ (2016) PET Imaging of Tau Deposition in the Aging Human Brain. *Neuron* 89(5):971-982.
- Schorey JS, Cheng Y, Singh PP & Smith VL (2015) Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO reports* 16(1):24-43.

- Schrag M, Mueller C, Zabel M, Crofton A, Kirsch WM, Ghribi O, Squitti R & Perry G (2013) Oxidative stress in blood in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a meta-analysis. *Neurobiol Dis* 59:100-110.
- Selkoe DJ (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298(5594):789-791.
- Selkoe DJ & Hardy J (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 8(6):595-608.
- Serpente M, Fenoglio C, D'Anca M, Arcaro M, Sorrentino F, Visconte C, Arighi A, Fumagalli GG, Porretti L, Cattaneo A, Ciani M, Zanardini R, Benussi L, Ghidoni R, Scarpini E & Galimberti D (2020) MiRNA Profiling in Plasma Neural-Derived Small Extracellular Vesicles from Patients with Alzheimer's Disease. *Cells* 9(6).
- Sharma A, Weber D, Raupbach J, Dakal TC, Fließbach K, Ramirez A, Grune T & Wüllner U (2020) Advanced glycation end products and protein carbonyl levels in plasma reveal sex-specific differences in Parkinson's and Alzheimer's disease. *Redox Biol* 34:101546.
- Shen J & Wu J (2015) Nicotinic Cholinergic Mechanisms in Alzheimer's Disease. *Int Rev Neurobiol* 124:275-292.
- Shen X-N, Huang Y-Y, Chen S-D, Guo Y, Tan L, Dong Q, Yu J-T & Alzheimer's Disease Neuroimaging I (2021) Plasma phosphorylated-tau181 as a predictive biomarker for Alzheimer's amyloid, tau and FDG PET status. *Transl Psychiatry* 11(1):585-585.
- Sheppard O & Coleman M (2020) Alzheimer's Disease: Etiology, Neuropathology and Pathogenesis. *Alzheimer's Disease: Drug Discovery*, Huang X (Édit.) : The Authors., Brisbane AU10.36255/exonpublications.alzheimersdisease.2020.ch1.
- Shi M, Kovac A, Korff A, Cook TJ, Ghingina C, Bullock KM, Yang L, Stewart T, Zheng D, Aro P, Atik A, Kerr KF, Zabetian CP, Peskind ER, Hu SC, Quinn JF, Galasko DR, Montine TJ, Banks WA & Zhang J (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, Liu C, Cook TJ, Bullock KM, Zhao Y, Ghingina C, Li Y, Aro P, Dator R, He C, Hipp MJ, Zabetian CP, Peskind ER, Hu SC, Quinn JF, Galasko DR, Banks WA & Zhang J (2014) Plasma exosomal α -synuclein is likely CNS-derived and increased in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 128(5):639-650.
- Sinem F, Dildar K, Gokhan E, Melda B, Orhan Y & Filiz M (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 N, Gemmell CH, Daly PA & Yeo EL (1995) Elevated platelet-derived microparticle levels during unstable angina. *Can J Cardiol* 11(11):1015-1021.
- Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT, Jr., Carter BS, Krichevsky AM & Breakefield XO (2008) Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 10(12):1470-1476.
- Skoumalova A & Hort J (2012) Blood markers of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 16(10):2291-2300.
- Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK & Greengard P (2005) Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* 8(8):1051-1058.

- Sokolova V, Ludwig AK, Hornung S (2011) Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces* 87:146–150.
- Spangenberg EE & Green KN (2017) Inflammation in Alzheimer's disease: Lessons learned from microglia-depletion models. *Brain Behav Immun* 61:1-11.
- Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, Iwatsubo T, Jack CR, Jr., Kaye J, Montine TJ, Park DC, Reiman EM, Rowe CC, Siemers E, Stern Y, Yaffe K, Carrillo MC, Thies B, Morrison-Bogorad M, Wagster MV & Phelps CH (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.
- Sproviero D, Gagliardi S, Zucca S, Arigoni M, Giannini M, Garofalo M, Olivero M, Dell'Orco M, Pansarasa O, Bernuzzi S, Avenali M, Cotta Ramusino M, Diamanti L, Minafra B, Perini G, Zangaglia R, Costa A, Ceroni M, Perrone-Bizzozero NI, Calogero RA & Cereda C (2021) Different miRNA Profiles in Plasma Derived Small and Large Extracellular Vesicles from Patients with Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci* 22(5).
- Srivastava A, Amreddy N, Pareek V, Chinnappan M, Ahmed R, Mehta M, Razaq M, Munshi A & Ramesh R (2020) Progress in extracellular vesicle biology and their application in cancer medicine. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 12(4):e1621.
- Steinerman JR, Irizarry M, Scarneas N, Raju S, Brandt J, Albert M, Blacker D, Hyman B & Stern Y (2008) Distinct pools of beta-amyloid in Alzheimer disease-affected brain: a clinicopathologic study. *Arch Neurol* 65(7):906-912.
- Stichel CC & Luebbert H (2007) Inflammatory processes in the aging mouse brain: participation of dendritic cells and T-cells. *Neurobiol Aging* 28(10):1507-1521.
- Strimbu K & Tavel JA (2010) What are biomarkers? *Current opinion in HIV and AIDS* 5(6):463-466.
- Sultana R, Perluigi M, Newman SF, Pierce WM, Cini C, Coccia R & Butterfield DA (2010) Redox proteomic analysis of carbonylated brain proteins in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Antioxid Redox Signal* 12(3):327-336.
- Sultana R, Piroddi M, Galli F & Butterfield DA (2008) Protein levels and activity of some antioxidant enzymes in hippocampus of subjects with amnesic mild cognitive impairment. *Neurochem Res* 33(12):2540-2546.
- Szado T, Vanderheyden V, Parys JB, De Smedt H, Rietdorf K, Kotelevets L, Chastre E, Khan F, Landegren U, Soderberg O, Bootman MD & Roderick HL (2008) Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by protein kinase B/Akt inhibits Ca²⁺ release and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(7):2427-2432.
- Tamboli IY, Barth E, Christian L, Siepmann M, Kumar S, Singh S, Tolksdorf K, Heneka MT, Lütjohann D, Wunderlich P & Walter J (2010) Statins Promote the Degradation of Extracellular Amyloid β -Peptide by Microglia via Stimulation of Exosome-associated Insulin-degrading Enzyme (IDE) Secretion*. *Journal of Biological Chemistry* 285(48):37405-37414.
- Tanaka Y, Okada Y & Hirokawa N (2005) FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination. *Nature* 435(7039):172-177.

- Tang MX, Maestre G, Tsai WY, et al. (1996) Relative risk of Alzheimer disease and age-at-onset distributions, based on APOE genotypes among elderly African Americans, Caucasians, and Hispanics in New York City. *Am J Hum Genet* 58(3):574-584.
- Teng EL & Chui HC (1987) The Modified Mini-Mental State (3MS) examination. *J Clin Psychiatry* 48(8):314-318.
- Terrisse L, Poirier J, Bertrand P, Merched A, Visvikis S, Siest G, Milne R & Rassart E (1998) Increased levels of apolipoprotein D in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer's patients. *J Neurochem* 71(4):1643-1650.
- Terry AV, Jr. & Buccafusco JJ (2003) The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J Pharmacol Exp Ther* 306(3):821-827.
- Thijssen EH, Verberk IMW, Vanbrabant J, Koelewijn A, Heijst H, Scheltens P, van der Flier W, Vanderstichele H, Stoops E & Teunissen CE (2021) Highly specific and ultrasensitive plasma test detects Aβ(1–42) and Aβ(1–40) in Alzheimer's disease. *Scientific Reports* 11(1):9736.
- Thomas EA, Laws SM, Sutcliffe JG, Harper C, Dean B, McClean C, Masters C, Lautenschlager N, Gandy SE & Martins RN (2003) Apolipoprotein D levels are elevated in prefrontal cortex of subjects with Alzheimer's disease: no relation to apolipoprotein E expression or genotype. *Biol Psychiatry* 54(2):136-141.
- Thomas EA, Sautkulis LN, Criado JR, Games D & Sutcliffe JG (2001) Apolipoprotein D mRNA expression is elevated in PDAPP transgenic mice. *J Neurochem* 79(5):1059-1064.
- Tierney MC, Szalai JP, Snow WG, Fisher RH, Nores A, Nadon G, Dunn E & St George-Hyslop PH (1996) Prediction of probable Alzheimer's disease in memory-impaired patients: A prospective longitudinal study. *Neurology* 46(3):661-665.
- Tonnies E & Trushina E (2017) Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 57(4):1105-1121.
- Tönnes E & Trushina E (2017) Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 57(4):1105-1121.
- Trams EG, Lauter CJ, Salem N, Jr. & Heine U (1981) Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta* 645(1):63-70.
- Turner NP, Abeysinghe P, Kwan Cheung KA, Vaswani K, Logan J, Sadowski P & Mitchell MD (2022) A Comparison of Blood Plasma Small Extracellular Vesicle Enrichment Strategies for Proteomic Analysis. *Proteomes* 10(2).
- Turney IC, Chesebro AG, Rentería MA, Lao PJ, Beato JM, Schupf N, Mayeux R, Manly JJ & Brickman AM (2020) APOE ε4 and resting-state functional connectivity in racially/ethnically diverse older adults. *Alzheimers Dement (Amst)* 12(1):e12094.
- Twohig D, Rodriguez-Vieitez E, Sando SB, Berge G, Lauridsen C, Møller I, Grøntvedt GR, Bråthen G, Patra K, Bu G, Benzinger TLS, Karch CM, Fagan A, Morris JC, Bateman RJ, Nordberg A, White LR & Nielsen HM (2018) The relevance of cerebrospinal fluid α-synuclein levels to sporadic and familial Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* 6(1):130.
- Vagner T, Chin A, Mariscal J, Bannykh S, Engman DM & Di Vizio D (2019) Protein Composition Reflects Extracellular Vesicle Heterogeneity. *Proteomics* 19(8):e1800167.

- van Niel G, D'Angelo G & Raposo G (2018) Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19(4):213-228.
- Vandendriessche C, Balusu S, Van Cauwenberghe C, Brkic M, Pauwels M, Plehiers N, Bruggeman A, Dujardin P, Van Imschoot G, Van Wonterghem E, Hendrix A, Baeke F, De Rycke R, Gevaert K & Vandenbroucke RE (2021) Importance of extracellular vesicle secretion at the blood–cerebrospinal fluid interface in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications* 9(1):143.
- Vandendriessche C, Bruggeman A, Van Cauwenberghe C & Vandenbroucke RE (2020) Extracellular Vesicles in Alzheimer's and Parkinson's Disease: Small Entities with Large Consequences. *Cells* 9(11).
- Vergallo A, Bun RS, Toschi N, Baldacci F, Zetterberg H, Blennow K, Cavedo E, Lamari F, Habert MO, Dubois B, Floris R, Garaci F, Lista S & Hampel H (2018) Association of cerebrospinal fluid α -synuclein with total and phospho-tau(181) protein concentrations and brain amyloid load in cognitively normal subjective memory complainers stratified by Alzheimer's disease biomarkers. *Alzheimers Dement* 14(12):1623-1631.
- Vermunt L, Sikkes SAM, van den Hout A, Handels R, Bos I, van der Flier WM, Kern S, Ousset P-J, Maruff P, Skoog I, Verhey FRJ, Freund-Levi Y, Tsolaki M, Wallin ÅK, Olde Rikkert M, Soinen H, Spuru L, Zetterberg H, Blennow K, Scheltens P, Muniz-Terrera G, Visser PJ, Alzheimer Disease Neuroimaging I, Group AR & groups IDs (2019) Duration of preclinical, prodromal, and dementia stages of Alzheimer's disease in relation to age, sex, and APOE genotype. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 15(7):888-898.
- Vogelsberg-Ragaglia V, Schuck T, Trojanowski JQ & Lee VM (2001) PP2A mRNA expression is quantitatively decreased in Alzheimer's disease hippocampus. *Exp Neurol* 168(2):402-412.
- Vollbach H, Heun R, Morris CM, Edwardson JA, McKeith IG, Jessen F, Schulz A, Maier W & Kölsch H (2005) APOA1 polymorphism influences risk for early-onset nonfamilial AD. *Ann Neurol* 58(3):436-441.
- Vyas N, Walvekar A, Tate D, Lakshmanan V, Bansal D, Lo Cicero A, Raposo G, Palakodeti D & Dhawan J (2014) Vertebrate Hedgehog is secreted on two types of extracellular vesicles with different signaling properties. *Sci Rep* 4:7357.
- Wang DS, Dickson DW & Malter JS (2006) beta-Amyloid degradation and Alzheimer's disease. *J Biomed Biotechnol* 2006(3):58406.
- Wang X, Zhou X, Li G, Zhang Y, Wu Y & Song W (2017a) Modifications and Trafficking of APP in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Front Mol Neurosci* 10:294.
- Wang Y, Balaji V, Kaniyappan S, Krüger L, Irsen S, Tepper K, Chandupatla R, Maetzler W, Schneider A, Mandelkow E & Mandelkow E-M (2017b) The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes. *Molecular Neurodegeneration* 12(1):5.
- Watanabe S, Kato I & Koizuka I (2003) Retrograde-labeling of pretecto-vestibular pathways in cats. *Auris Nasus Larynx* 30 Suppl:S35-40.
- Waxman EA & Giasson BI (2011) Induction of intracellular tau aggregation is promoted by α -synuclein seeds and provides novel insights into the hyperphosphorylation of tau. *J Neurosci* 31(21):7604-7618.
- Wenk GL (2006) Neuropathologic changes in Alzheimer's disease: potential targets for treatment. *J Clin Psychiatry* 67 Suppl 3:3-7; quiz 23.

- Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle J (1981) Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 215:1237-1239.
- Wiklander OP, Nordin JZ, O'Loughlin A, Gustafsson Y, Corso G, Mäger I, Vader P, Lee Y, Sork H, Seow Y, Heldring N, Alvarez-Erviti L, Smith CI, Le Blanc K, Macchiarini P, Jungebluth P, Wood MJ & Andaloussi SE (2015) Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *J Extracell Vesicles* 4:26316.
- Winslow AR, Moussaud S, Zhu L, Post KL, Dickson DW, Berezovska O & McLean PJ (2014) Convergence of pathology in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease: a role for the novel interaction of alpha-synuclein and presenilin 1 in disease. *Brain* 137(7):1958-1970.
- Winston CN, Goetzl EJ, Akers JC, Carter BS, Rockenstein EM, Galasko D, Masliah E & Rissman RA (2016a) Prediction of conversion from mild cognitive impairment to dementia with neuronally derived blood exosome protein profile. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring* 3(1):63-72.
- Winston CN, Goetzl EJ, Akers JC, Carter BS, Rockenstein EM, Galasko D, Masliah E & Rissman RA (2016b) Prediction of conversion from mild cognitive impairment to dementia with neuronally derived blood exosome protein profile. *Alzheimers Dement (Amst)* 3:63-72.
- Witwer KW, Buzas EI, Bemis LT, et al. (2013) Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles* 27:2.
- Wolf P (1967) The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 13(3):269-288.
- Woody SK & Zhao L (2016) Clusterin (APOJ) in Alzheimer's Disease: An Old Molecule with a New Role.
- Wortmann M (2012) Dementia: a global health priority - highlights from an ADI and World Health Organization report. *Alzheimers Res Ther* 4(5):40.
- Wu J, Ishikawa M, Zhang J & Hashimoto K (2010) Brain Imaging of Nicotinic Receptors in Alzheimer's Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease* 2010:11.
- Xiao C, Davis FJ, Chauhan BC, Viola KL, Lacor PN, Velasco PT, Klein WL & Chauhan NB (2013) Brain transit and ameliorative effects of intranasally delivered anti-amyloid- β oligomer antibody in 5XFAD mice. *J Alzheimers Dis* 35(4):777-788.
- Xiao MF, Xu D, Craig MT, Pelkey KA, Chien CC, Shi Y, Zhang J, Resnick S, Pletnikova O, Salmon D, Brewer J, Edland S, Wegiel J, Tycko B, Savonenko A, Reeves RH, Troncoso JC, McBain CJ, Galasko D & Worley PF (2017) NPTX2 and cognitive dysfunction in Alzheimer's Disease. *Elife* 6.
- Xu Q, Bernardo A, Walker D, Kanegawa T, Mahley RW & Huang Y (2006) Profile and regulation of apolipoprotein E (ApoE) expression in the CNS in mice with targeting of green fluorescent protein gene to the ApoE locus. *J Neurosci* 26(19):4985-4994.
- Yamamoto M, Kiyota T, Horiba M, Buescher JL, Walsh SM, Gendelman HE & Ikezu T (2007) Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha regulate amyloid-beta plaque deposition and beta-secretase expression in Swedish mutant APP transgenic mice. *Am J Pathol* 170(2):680-692.

- Yang TT, Liu CG, Gao SC, Zhang Y & Wang PC (2018) The Serum Exosome Derived MicroRNA-135a, -193b, and -384 Were Potential Alzheimer's Disease Biomarkers. *Biomed Environ Sci* 31(2):87-96.
- Yates AG, Pink RC, Erdbrügger U, Siljander PR-M, Dellar ER, Pantazi P, Akbar N, Cooke WR, Vatish M, Dias-Neto E, Anthony DC & Couch Y (2022a) In sickness and in health: The functional role of extracellular vesicles in physiology and pathology in vivo. *Journal of Extracellular Vesicles* 11(1):e12190.
- Yates AG, Pink RC, Erdbrügger U, Siljander PR, Dellar ER, Pantazi P, Akbar N, Cooke WR, Vatish M, Dias-Neto E, Anthony DC & Couch Y (2022b) In sickness and in health: The functional role of extracellular vesicles in physiology and pathology in vivo: Part I: Health and Normal Physiology: Part I: Health *J Extracell Vesicles* 11(1):e12151.
- Yeh FL, Wang Y, Tom I, Gonzalez LC & Sheng M (2016) TREM2 Binds to Apolipoproteins, Including APOE and CLU/APOJ, and Thereby Facilitates Uptake of Amyloid-Beta by Microglia. *Neuron* 91(2):328-340.
- Yerbury JJ, Poon S, Meehan S, Thompson B, Kumita JR, Dobson CM & Wilson MR (2007) The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures. *FASEB J* 21(10):2312-2322.
- Yu S, Liu YP, Liu HL, Li J, Xiang Y, Liu YH, Jiao SS, Liu L, Wang Y & Fu W (2018) Serum Protein-Based Profiles as Novel Biomarkers for the Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* 55(5):3999-4008.
- Yuan F, Li YM, Wang Z (2021) Preserving extracellular vesicles for biomedical applications: consideration of storage stability before and after isolation. *Drug Deliv* 28(1): 1501–1509.
- Yuyama K & Igarashi Y (2017) Exosomes as Carriers of Amyloid- β . *Front Neurosci* 11:229.
- Yuyama K, Sun H, Mitsutake S & Igarashi Y (2012) Sphingolipid-modulated exosome secretion promotes clearance of amyloid- β by microglia. *J Biol Chem* 287(14):10977-10989.
- Yuyama K, Sun H, Sakai S, Mitsutake S, Okada M, Tahara H, Furukawa J-i, Fujitani N, Shinohara Y & Igarashi Y (2014) Decreased Amyloid- β ; Pathologies by Intracerebral Loading of Glycosphingolipid-enriched Exosomes in Alzheimer Model Mice *. *Journal of Biological Chemistry* 289(35):24488-24498.
- Yuyama K, Sun H, Usuki S, Sakai S, Hanamatsu H, Mioka T, Kimura N, Okada M, Tahara H, Furukawa J-i, Fujitani N, Shinohara Y & Igarashi Y (2015) A potential function for neuronal exosomes: Sequestering intracerebral amyloid- β peptide. *FEBS Letters* 589(1):84-88.
- Zandl-Lang M, Fanaee-Danesh E, Sun Y, Albrecher NM, Gali CC, Čančar I, Kober A, Tam-Amersdorfer C, Stracke A, Storck SM, Saeed A, Stefulj J, Pietrzik CU, Wilson MR, Björkhem I & Panzenboeck U (2018) Regulatory effects of simvastatin and apoJ on APP processing and amyloid- β clearance in blood-brain barrier endothelial cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1863(1):40-60.
- Zhao B, Chen Q, Zhao L, Mao J, Huang W, Han X & Liu Y (2022) Periodontal Ligament Stem Cell-Derived Small Extracellular Vesicles Embedded in Matrigel Enhance Bone Repair Through the Adenosine Receptor Signaling Pathway. *Int J Nanomedicine* 17:519-536.
- Zheng T, Pu J, Chen Y, Mao Y, Guo Z, Pan H, Zhang L, Zhang H, Sun B & Zhang B (2017) Plasma Exosomes Spread and Cluster Around β -Amyloid Plaques in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 9:12.

11 ANNEXE I

Critères diagnostiques NINCDS-ADRDA de la MA (Dubois *et al.*, 2007)

- syndrome démentiel établi sur des bases cliniques et documenté par le *Mini-Mental State Examination* (MMSE), le *Blessed Dementia Scale* ou tout autre test équivalent et confirmé par des preuves neuropsychologiques
- déficit 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 habilités motrices (apraxie) et perceptives (agnosie)
- la perturbation des activités de la 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 (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 :

- période de plateaux au cours de l'évolution
- présence de symptômes tels que dépression, insomnie, incontinence, idées délirantes, illusions, hallucinations, réactions de catastrophe, 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 déficit du champ visuel, incoordination motrice
- crises convulsives ou troubles de la marche en tout début de maladie

5. Le diagnostic clinique de la 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, 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 considérée 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 la maladie d'Alzheimer probable ;
- et la preuve histologique apportée par la biopsie ou l'autopsie.

Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, Delacourte A, Galasko D, Gauthier S, Jicha G, Meguro K, O'Brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Stern Y, Visser PJ & Scheltens P (2007) Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. Lancet Neurol 6(8):734-746.

12 ANNEXE II

Mini Mental State Examination (MMSE) (Version consensuelle du Groupe de Recherche et d'Évaluation des outils Cognitifs GRECO)

Orientation

/ 10

Je vais vous poser quelques questions pour apprécier comment fonctionne votre mémoire.
Les unes sont très simples, les autres un peu moins. Vous devez répondre du mieux que vous pouvez.
Quelle est la date complète d'aujourd'hui ?

Si la réponse est incorrecte ou incomplète, posez les questions restées sans réponse, dans l'ordre suivant :

1. En quelle année sommes-nous ?
2. En quelle saison ?
3. En quel mois ?
4. Quel jour du mois ?
5. Quel jour de la semaine ?

Je vais vous poser maintenant quelques questions sur l'endroit où nous trouvons.

6. Quel est le nom de l'hôpital où nous sommes ?*
7. Dans quelle ville se trouve-t-il ?
8. Quel est le nom du département dans lequel est située cette ville ?**
9. Dans quelle province ou région est située ce département ?
10. A quel étage sommes-nous ?

Apprentissage

/ 3

Je vais vous dire trois mots ; je vous voudrais que vous me les répétiez et que vous essayiez de les retenir car je vous les redemanderai tout à l'heure.

- | | | | |
|------------|---------------|-----------------|--------------------------|
| 11. Cigare | <i>Citron</i> | <i>Fauteuil</i> | <input type="checkbox"/> |
| 12. Fleur | <i>Clé</i> | <i>Tulipe</i> | <input type="checkbox"/> |
| 13. Porte | <i>Ballon</i> | <i>Canard</i> | <input type="checkbox"/> |

Répéter les 3 mots.

Attention et calcul

/ 5

Voulez-vous compter à partir de 100 en retirant 7 à chaque fois ?*

14. 93
15. 86
16. 79
17. 72
18. 65

Pour tous les sujets, même pour ceux qui ont obtenu le maximum de points, demander :
Voulez-vous épeler le mot MONDE à l'envers ?**

Rappel

/ 3

Pouvez-vous me dire quels étaient les 3 mots que je vous ai demandés de répéter et de retenir tout à l'heure ?

- | | | | |
|------------|---------------|-----------------|--------------------------|
| 11. Cigare | <i>Citron</i> | <i>Fauteuil</i> | <input type="checkbox"/> |
| 12. Fleur | <i>Clé</i> | <i>Tulipe</i> | <input type="checkbox"/> |
| 13. Porte | <i>Ballon</i> | <i>Canard</i> | <input type="checkbox"/> |

Langage

/ 8

Montrer un crayon. 22. Quel est le nom de cet objet ?*
Montrer votre montre. 23. Quel est le nom de cet objet ?**
24. Ecoutez bien et répétez après moi : « PAS DE MAIS, DE SI, NI DE ET »***

Poser une feuille de papier sur le bureau, la montrer au sujet en lui disant : « Ecoutez bien et faites ce que je vais vous dire :
25. Prenez cette feuille de papier avec votre main droite,
26. Pliez-la en deux,
27. Et jetez-la par terre. »****

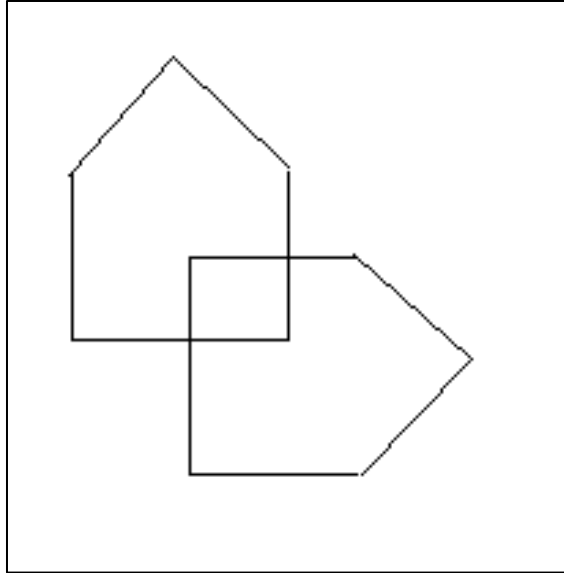
Tendre au sujet une feuille de papier sur laquelle est écrit en gros caractère : « FERMEZ LES YEUX » et dire au sujet :
28. « Faites ce qui est écrit ».

Tendre au sujet une feuille de papier et un stylo, en disant :
29. « Voulez-vous m'écrire une phrase, ce que vous voulez, mais une phrase entière. »

Praxies constructives

/ 1

Tendre au sujet une feuille de papier et lui demander :
30. « Voulez-vous recopier ce dessin ? »



Score total = 30 (1 point pour chaque réponse correcte).

- Stade MA légère : $25 > \text{score} > 19$,
- Stade de MA modérée ($19 > \text{score} > 10$)
- Stade de MA sévère ($\text{score} < 10$)

Remarque :

Cette version n'est pas celle qui a été utilisée dans notre cohorte CSHA puisque l'on se servait du 3MS.

Kalafat M, Hugonot-Diener L, Poitrenaud J. Standardisation et étalonnage français du 'Mini Mental State' (MMS) version GRECO. Revue de Neuropsychologie, 2003 ; 13 : 209–236.

13 ANNEXE III

Exemple de lettre de consentement de la CSHA-1 (a)

CANADIAN STUDY OF HEALTH AND AGING

I agree to provide a blood sample and I understand that part of the blood sample that I provide will be frozen and stored in Ottawa for future analysis.

No results will be released in a way that could identify me personally.

NAME _____

SIGNATURE _____

DATE _____

* * * * *

I understand that _____ has agreed to the storage of blood for future analysis. I agree to his/her participation.

NAME AND RELATIONSHIP TO PARTICIPANT: _____
(please print)

SIGNATURE _____

DATE _____

* * * * *

INTERVIEWER _____
or _____
RESEARCH NURSE _____
(Witness) _____

Name Number

ID# _____

Exemple de lettre de consentement de la CSHA-2 (b)

CANADIAN STUDY OF HEALTH AND AGING-2

I understand that _____ is a participant of the Canadian Study of Health and Aging-2 and that she/he has been asked for a sample of 20cc or approximately 4 teaspoons of blood.

I consent to this blood being used for running a single type of genetic test
yes no called apolipoprotein E.

I consent to this blood being stored for testing of genetic markers that may
yes no be discovered in the future.

The purpose of these tests is to learn about the relationship between genetic and other constituents of people's blood and their health.

I understand that this is for research purposes only. No results will be released in any way that could identify him/her personally. The people undertaking the analysis will not know his/her identity.

I agree to _____'s participation and fully understand that participation in this study is voluntary.

NAME of PROXY: _____
(please print)

RELATIONSHIP TO SUBJECT _____

SIGNATURE: _____

DATE: _____

Interviewer or
Research Nurse
(Witness) _____
(name) (number)

Subject ID#: _____

14 ANNEXE IV

Tableau 14.1 Limite de détection par la technique Luminex des protéines étudiées

Numéro	Protéines	Concentration (pg/ml)
1	DJ-1	49.1
2	PrGN	195
3	α -Syn	5.16
4	APP	349
5	NSE	140
6	BDNF	0.32
7	MMP-9	13.6
8	LCN-2	29.2
9	S100B	4.34
10	NPTX-2	1.66
11	ANGPTL-4	86
12	A β ₁₋₄₀	6.2
13	A β ₁₋₄₂	1.3
14	t-Tau	8.9
15	p-Tau ₁₈₁	0.7

15 ANNEXE V

Liste des communications (orales et par affiche)

1. Mohamed Raâfet Ben Khedher, Mohamed Haddad, Danielle Laurin, Charles Ramassamy. Effect of *APOE* ϵ 4 allele on levels of apolipoproteins E, J, and D, and redox signature in circulating extracellular vesicles from cognitively impaired with no dementia participants converted to Alzheimer's disease. 12^{ème} édition du Congrès Armand-Frappier (**CAF 2021**). Laval 8-12 Novembre 2021, Canada

2. Mohamed Raâfet Ben Khedher, Mohamed Haddad, Danielle Laurin, Charles Ramassamy. Circulating extracellular vesicles as tools to predict Alzheimer's disease and different forms of dementia. 14th Canadian Association for Neuroscience (**CAN 2021**). Vancouver 22- 25 Août 2021, Canada

3. Mohamed Raâfet Ben Khedher, Mohamed Haddad, Danielle Laurin, Charles Ramassamy. Effect of *APOE* ϵ 4 allele on levels of apolipoproteins E, J, and D, and redox signature in circulating extracellular vesicles from cognitively impaired with no dementia participants converted to Alzheimer's disease. Society for Redox Biology and Medicine's 28th Annual Conference (**SfRBM 2021**). Savannah 15-18 July 2021 USA.

4. Mohamed Raâfet Ben Khedher, Mohamed Haddad, Danielle Laurin, Charles Ramassamy. Apolipoprotein E4-driven effects on inflammatory and neurotrophic factors in peripheral extracellular vesicles from cognitively impaired not demented participants converted to Alzheimer's disease. Alzheimer's Association International Conference (**AAIC 2021**). Denver 26-30 July 2021, USA

5. Mohamed Raâfet Ben Khedher, Mohamed Haddad, Danielle Laurin, Charles Ramassamy. Levels of neuronal factors in circulating extracellular vesicles predict the progression of preclinical subjects to Alzheimer's disease in *APOE* ϵ 4 carriers. 10th International Society of Extracellular Vesicles (**ISEV 2021**). Lyon 19-23 May 2021, France

6. Mohamed Raâfet Ben Khedher, Mohamed Haddad, Danielle Laurin, Charles Ramassamy. Recherche des biomarqueurs périphériques précoces de la démence chez des sujets à risque ayant un déficit cognitif mais non déments. 11^{ème} Édition du Congrès Armand-Frappier (**CAF 2019**). Saint-Sauveur, Quebec 28-31 October 2019, Canada

7. Morgane Perrotte Mohamed Raâfet Ben Khedher, Mohamed Haddad, Tamas Fülöp, Charles Ramassamy. Patterns of apolipoproteins J, D and oxidative markers in circulating extracellular vesicles from MCI and Alzheimer's patients. International Society of Extracellular Vesicles (**ISEV 2020**). Philadelphia 20-24 May 2020, USA

16 ANNEXE VI

Liste des bourses, prix d'excellence et distinctions

1. Prix Relève étoile Jacques-Genest pour la meilleure publication scientifique dans le domaine de la santé. Décerné par Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS) en **Avril 2022**.
2. Prix de Congrès scientifique. Décerné par Fédération Européenne des Sociétés de Neurosciences-IBRO/PERC en **Avril 2022**.
3. Bourse de voyage. Décernée par TD Assurance en **Avril 2022**.
4. Bourse de voyage. Décernée par Institut Vieillissement et la participation sociale des aînés (IVPSA) en **Novembre 2021**.
5. Prix d'excellence pour la meilleure publication scientifique 2021. Décerné par Réseau Québécois de Recherche sur le Vieillissement (RQRV) en **Juillet 2021**.
6. Bourse d'excellence pour les études doctorales. Décernée par Fondation Armand-Frappier pour l'**année universitaire 2021-2022**.
7. Bourse d'excellence pour les études doctorales. Décernée par Fondation Armand-Frappier pour l'**année universitaire 2020-2021**.
8. Bourse d'excellence pour financer la mobilité scientifique. Décernée par Mitacs Globalink Research Award en **Mars 2020**.