

Institut national de recherche scientifique
Centre Armand Frappier Santé Biotechnologie

Rôle précoce des produits avancés de glycation et leurs précurseurs dans le développement de la maladie d'Alzheimer

Par

Mohamed Haddad

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

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Pr Stéphane Lefrançois
Institut national de recherche scientifique
Centre Armand Frappier Santé Biotechnologie

Examineur externe

Pr Francesca Cicchetti
Faculté de médecine
Université Laval

Pr Abdelouahed Khalil
Faculté de médecine et des sciences de la santé
Université de Sherbrooke

Pr Odile Sergent
Université de Rennes 1

Directeur de recherche

Pr Charles Ramassamy
Institut national de recherche scientifique
Centre Armand Frappier Santé Biotechnologie

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche le professeur Charles Ramassamy qui a contribué au succès de ce projet avec ses judicieux conseils, son partage de connaissances et son encouragement.

Je souhaite remercier le Pr Tamas Fulop et son étudiante Aurélie pour cette jolie collaboration pour le projet clinique.

Je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ma thèse. Je remercie le Pr Stéphane Lefrançois d'avoir accepté la présidence de ce jury. Je remercie également le Pr Francesca Cicchetti, le Pr Odile Sergent et le Pr Abdelouahed Khalil d'avoir accepté d'y participer en tant qu'évaluateurs externes.

Cette thèse n'aurait pas pu être réalisée sans la bourse de l'entente entre l'INRS et le Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche scientifique de Tunisie. Mes remerciements vont également aux organismes subventionnaires: La Chaire Louise et André Charron sur la maladie d'Alzheimer, la Fondation Armand-Frappier, le CRSNG et l'Institut National des Aliments Fonctionnels (INAF).

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers les amis et collègues qui m'ont apporté leur support moral et intellectuel tout au long de mon parcours (Ahmed, Slimane, Mondher, Moez, Mostapha, Mohamed Eissa, Akil, Dali, ...). Un grand merci à l'ensemble de l'équipe du laboratoire de Pr Charles Ramassamy, les anciens (Ghislain, Ahlem, les deux Morgane, Vincent et Jean Michel) et les nouveaux (Raafet, Sarra, Érmine et roumi).

Je remercie tous les membres de ma famille. Je remercie mes très chers parents, Fethi et Souad et mon cher oncle Nejib qui ont toujours été là pour moi. Je suis redevable d'une éducation dont je suis fier. Je remercie mon frère Ahmed, et mes sœurs Khouloud et Habiba pour leur encouragement. Je remercie également tonton Habib et tata Rafika, Mouna, Anouar et Karim. Je souhaite remercier du fond du cœur mon amour Amani. Durant ces cinq longues années, tu as été toute ma vie. Je n'ai pas de mots pour te remercier. Mille mercis pour ton soutien nuit et jour, ta patience et ton amour.

RÉSUMÉ

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative qui ne dispose d'aucun traitement efficace ni de diagnostic certain. Actuellement, le diagnostic probable de la MA montre plusieurs limites et reste un événement tardif durant lequel le cerveau aurait déjà subi des dommages irréversibles. Ainsi, il est important d'identifier des marqueurs permettant de diagnostiquer la maladie le plus précocement possible. Les produits avancés de glycation (AGEs) tel que la pentosidine et le carboxyméthyl lysine (CML), leurs précurseurs méthylglyoxal (MG) et glyoxal (GO) ainsi que leur enzyme de dégradation la glyoxalase 1 (GLO-1) et leur récepteur RAGE, sont connus pour être impliqués dans la MA. Cependant, leurs concentrations sériques et dans les vésicules extracellulaires (EVs), chez des patients à risque de développer la MA (MCI) et des patients à différents stades de la MA, restent inconnues. Également, on ne connaît pas l'effet des AGEs et leurs précurseurs sur les niveaux d'expression et de libération vésiculaires des marqueurs neurotrophiques, inflammatoires et neurodégénératifs impliqués dans la physiopathologie de la MA. Nos résultats suggèrent que les taux sériques de CML augmentent au début de la MA tandis que les niveaux vésiculaires de ce même AGEs diminuent au stade modéré. Cependant, les niveaux de pentosidine ne varient pas entre les groupes. Les niveaux de RAGE dans les EVs diminuent chez les patients MCI et atteints de la MA aux stades précoce et modéré par rapport aux patients de stade avancé. Les niveaux vésiculaires de GLO-1 diminuent au début de la MA par rapport aux témoins et aux patients MCI. Fait intéressant, les niveaux du CML, de RAGE et de GLO-1 corrèlent avec les scores cognitifs. Les niveaux sériques de MG et de GO sont plus élevés chez les patients MCI permettant de différencier ces derniers des personnes saines et atteintes de la MA. De plus, nous avons montré que les neurones sont capables de libérer le CML, RAGE et GLO-1 et d'autres protéines neurotrophiques et inflammatoires dans les EVs. Le MG et le GO altèrent également les taux neuronaux et vésiculaires de certains facteurs neurotrophiques et inflammatoires impliqués dans la MA. En conclusion, nos travaux démontrent la pertinence d'utiliser les taux vésiculaires et sériques des AGEs, leurs précurseurs et leur récepteur pour le diagnostic précoce et l'évaluation de la progression de la MA. Ces résultats suggèrent l'utilisation des traitements contre les AGEs et leurs précurseurs pour prévenir le développement de la MA.

Mots clés : maladie d'Alzheimer, carboxyméthyl lysine (CML), RAGE, glyoxalase 1, méthylglyoxal, glyoxal, vésicules extracellulaires.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease with no effective treatment and no definitive diagnosis. Currently, the probable diagnosis of AD shows several limitations and is only identified at a late stage once the brain has suffered irreversible damages. It is therefore important to identify early and easily accessible biomarkers. Advanced glycation products (AGEs) such as pentosidine and carboxymethyl lysine (CML), their precursors methylglyoxal (MG) and glyoxal (GO), their detoxification enzymes glyoxalase 1 (GLO-1) and their receptors RAGE are known to be involved in AD. However, their serum and extracellular vesicle (EVs) levels in patients at risk for developing AD (MCI) and patients at different stages of AD remain unknown. Moreover, the effect of AGEs and their precursors on the expression levels and release of neurotrophic, inflammatory and neurodegenerative markers involved in the pathophysiology of AD is unknown. Our results showed that serum CML levels increase at the onset of AD whereas, its vesicular levels decreased during the moderate stage. However, the levels of pentosidine do not vary between groups. RAGE levels in EVs decreased in MCI as well as mild and moderate stages of AD patients compared to patients in the severe stage. EVs GLO-1 levels decrease at the onset of AD compared to controls and MCI patients. Interestingly, the levels of CML, RAGE and GLO-1 correlated with cognitive scores. Serum MG and GO levels are higher in MCI patients and allow the differentiation of this stage from control and AD subjects. In addition, we have shown that neurons are able to release CML, RAGE and GLO-1 and other neurotrophic and inflammatory factors in EVs. Additionally, MG and GO alter neuronal and vesicular levels of some neurotrophic and inflammatory factors involved in AD. In conclusion, this work shows the relevance of using vesicular and serum levels of AGEs, their precursors and their receptors for the early diagnosis and evaluation of AD progression. These results also confirm the need to develop treatments against AGEs and their precursors to prevent the development of AD.

Keywords: Alzheimer's disease, carboxymethyl lysine, RAGE, glyoxalase 1, methylglyoxal, glyoxal, extracellular vesicles.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	VI
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES TABLEAUX.....	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XV
1 CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE	1
1.1 LA MALADIE D'ALZHEIMER	1
1.1.1 <i>Généralités</i>	1
1.1.2 <i>Physiopathologie</i>	2
1.1.2.1 Le peptide amyloïde bêta.....	2
1.1.2.2 La protéine tau.....	5
1.1.2.3 Stress oxydatif et dysfonctionnement mitochondrial	8
1.1.2.4 L'inflammation.....	10
1.1.2.5 Dysfonctionnement des systèmes de neurotransmission	13
1.1.2.6 Autres mécanismes	14
1.1.3 <i>Facteurs de risque</i>	16
1.1.3.1 Les facteurs génétiques.....	16
1.1.3.2 Les facteurs non génétiques.....	17
1.1.4 <i>Diagnostic actuel</i>	18
1.1.4.1 Tests cognitifs.....	18
1.1.4.2 L'imagerie	19
1.1.4.3 Les biomarqueurs utilisés pour le diagnostic	20
1.1.4.4 Diagnostic précoce et le stade MCI (Mild cognitive Impairment ou Déficit cognitif léger)	21
1.1.5 <i>Traitement actuel</i>	22
1.1.5.1 Les inhibiteurs d'acétylcholine estérase	22
1.1.5.2 Les antagonistes du récepteur NMDA.....	22
1.2 LES PRODUITS AVANCÉS DE GLYCATION.....	23
1.2.1 <i>Métabolisme des produits avancés de glycation</i>	23
1.2.1.1 Formation endogène.....	23
1.2.1.2 Apport exogène	24
1.2.1.3 Dégradation et élimination	25
1.2.2 <i>Caractérisation des produits avancés de glycation</i>	26
1.2.3 <i>Précurseurs des produits avancés de glycation : Méthylglyoxal et Glyoxal</i>	27
1.2.3.1 Méthylglyoxal et glyoxal dans la maladie d'Alzheimer	29

1.2.4	<i>Les récepteurs des produits avancés de glycation</i>	32
1.2.4.1	Le récepteur RAGE	32
1.2.4.2	Les rôles physiologiques de RAGE	34
1.2.4.3	Les rôles physiopathologiques de RAGE dans la maladie d'Alzheimer	36
1.2.5	<i>Les produits avancés de glycation et la maladie d'Alzheimer</i>	39
1.3	LES VÉSICULES EXTRACELLULAIRES	40
1.3.1	<i>Mécanismes de biogenèse et de libération</i>	41
1.3.2	<i>Compositions</i>	44
1.3.3	<i>Mécanismes d'interactions avec les cellules réceptrices</i>	46
1.3.4	<i>Rôle des vésicules extracellulaires dans la maladie d'Alzheimer</i>	47
2	HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE	50
3	CHAPITRE 2 : ARTICLE 1	53
3.1	RÉSUMÉ ET OBJECTIFS DE L'ARTICLE 1	53
3.2	CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANT À L'ARTICLE 1	54
3.3	ARTICLE 1	54
4	CHAPITRE 3 : ARTICLE 2	75
4.1	RÉSUMÉ ET OBJECTIFS DE L'ARTICLE 2	75
4.2	CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANT À L'ARTICLE 2	76
4.3	ARTICLE 2.....	77
5	CHAPITRE 4 : ARTICLE 3	112
5.1	RÉSUMÉ ET OBJECTIFS DE L'ARTICLE 3	112
5.2	CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANT À L'ARTICLE 3	113
5.3	ARTICLE 3.....	113
6	CHAPITRE 5 : DISCUSSION GÉNÉRALE	141
6.1	LES LIMITES DE BIOMARQUEURS CANDIDATS DE LA MA	142
6.2	LES AGES ET LEURS PRÉCURSEURS COMME MARQUEURS PRÉCOCES DE LA MA ?	144
6.3	LES EVS PÉRIPHÉRIQUES OUTIL DE DIAGNOSTIC DE LA MA.....	148
6.4	LES AGES ET LEURS PRÉCURSEURS AU CŒUR DE DÉVELOPPEMENT DE LA MA.....	151
6.5	COMBATTRE LA FORMATION DES AGES PRÉVIENT LE DÉVELOPPEMENT DE LA MA	154
7	CHAPITRE 7 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES	156
8	BIBLIOGRAPHIE	158
9	ANNEXE I : BREVET	195
10	ANNEXE II : ARTICLE EN DEUXIÈME AUTEUR	218
11	ANNEXE III : REVUES	219
12	ANNEXE IV: CHAPITRE DE LIVRE	222

13 ANNEXE V: ARTICLES EN PRÉPARATION224

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1: LES MARQUEURS HISTOPATHOLOGIQUES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER (MODIFIÉ DE (NELSON ET AL., 2012)).....	2
FIGURE 2: SCHÉMA DE DEUX VOIES DE CLIVAGES DE L'APP (MODIFIÉ DE (THINAKARAN & KOO, 2008))	3
FIGURE 3: REPRÉSENTATION GRAPHIQUE DES ISOFORMES DE LA PROTÉINE TAU (ŠIMIĆ ET AL., 2016)	5
FIGURE 4: SCHÉMA DE L'HYPERPHOSPHORYLATION DE LA PROTÉINE TAU ET LA FORMATION DES ENCHEVÊTREMENTS NEUROFIBRILLAIRE INTRACELLULAIRE (MODIFIÉ DE (BARRON ET AL., 2017))	7
FIGURE 5: LE STRESS OXYDATIF ET LE SYSTÈME ANTIOXYDANTS (MODIFIÉE DE (KUMAR ET AL., 2018)).....	9
FIGURE 6: SCHÉMA DE MÉCANISME DE L'INFLAMMATION DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER	11
FIGURE 7: SCHÉMA DES VOIES DE FORMATION DES PRODUITS AVANCÉS DE GLYCATION.....	23
FIGURE 8: REPRÉSENTATION DES STRUCTURES DE QUELQUES AGES CARACTÉRISÉS <i>IN VIVO</i> (MODIFIÉ DE (THORPE & BAYNES, 2003))	26
FIGURE 9: SCHÉMA DE L'IMPLICATION DU MÉTHYLGLYOXAL (MG) ET DU GLYOXAL (GO) DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MA	29
FIGURE 10: SCHÉMA DES DIFFÉRENTES FORMES DE RAGE (MODIFIÉ DE (KIERDORF & FRITZ, 2013))	34
FIGURE 11: IMAGERIES DES VÉSICULES EXTRACELLULAIRES PRÉSENT PAR MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION (VAN DER POL ET AL., 2012)	40
FIGURE 12: SCHÉMA DE MÉCANISME DE FORMATION DES EXOSOMES DÉPENDANT DU COMPLEXE ESCRT (MODIFIÉ DE (WOLLERT & HURLEY, 2010))	42
FIGURE 13: SCHÉMA DES MÉCANISMES DE FORMATION DES MICROVÉSICULES (MODIFIÉ DE (KALRA ET AL., 2016))	44
FIGURE 14: SCHÉMA DE LA COMPOSITION DES VÉSICULES EXTRACELLULAIRES (MODIFIÉ DE (AKUMA ET AL., 2019))	45
FIGURE 15: SCHÉMA DE DIFFÉRENTS MÉCANISMES D'INTERACTION DES VÉSICULES EXTRACELLULAIRES AVEC LES CELLULES RÉCEPTRICES (MODIFIÉ DE (MULCAHY ET AL., 2014))	46

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1: LES AUTRES RÉCEPTEURS DES AGES	37
---	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACh: Acétylcholine

AGEs: *Advanced Glycation End products* (produits avancés de glycation)

AICD: *APP Intracellular Domain* (domaine intracellulaire de l'APP)

Alix: *Alg2 Interacting Protein X*

AMPA: Acide amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique

ANGPTL4: *Angiopoïétine Like 4*

ApoE: Apolipoprotéine E

APP: *Amyloid Precursor Protein* (protéine précurseur de l'amyloïde bêta)

AVC: Accidents vasculaires cérébraux

A β : Peptide bêta amyloïde

BDNF: *Brain-Derived Neurotrophic Factor*

BHE: Barrière hémato encéphalique

cdk5: *Cyclin Dependant Kinase 5*

CHMP: *Charged-Multivesicular body Proteins*

CK1: *Casein Kinase 1*

DT2: Diabète de type 2

DYRK-1A: *Dual specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinase 1A*

eIF2 α : *Eukaryotic Initiation Factor-2 α*

ENF: Enchevêtrement neurofibrillaires

ESGRT: *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*

Fyn: *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase*

GM130: *Cis-Golgi matrix protein*

GPx: Glutathion peroxydase

GRP78/BiP: *Glucose-Regulated Protein 78*

GSK3 β : *Glycogen Synthase Kinase 3 β*

GSH: Glutathion réduit

GSSG: Glutathion oxydé

Hrs: *Hepatocyte Growth Factor-regulated Tyrosine Kinase Substrate*

ICV: Intracérébroventriculaire

IRE1 α : Inositol-Requiring Enzyme-1 α

IRM: Imagerie par résonance magnétique

IVs: *Intraluminal Vesicles* (vésicules intraluminales)

IWG: *International Working Group* (groupe international de travail sur les nouveaux critères de recherche pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer)

JAK: *Janus kinases*

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*

KA: *Kainic Acid* (acide kaïnique)

L1CAM: *L1 Cell Adhesion Molecule*

LAMP1: *Lysosome-Associated Membrane Protein 1*

LCN-2: Lipocaline-2

LCR: Liquide Céphalorachidien

LRP: *Lipoprotein Receptor-related Protein-1*

MA: Maladie d'Alzheimer

MARKs: *Microtubule Affinity-Regulating Kinases*

MCI: *Mild Cognitive Impairment*

MMP-2: Métalloprotéase Matricielle 2

MMP-9: Métalloprotéase Matricielle 9

MMSE: *Mini Mental State Examination*

MoCA: *Montreal Cognitive Assessment*

MT: Microtubules

MVB: *Multivesicular bodies* (corps multivésiculaires)

NF-L: *Neurofilament Light*

NF- κ B: *Nuclear Factor-kappa B*

NIA-AA: Le groupe de l'institut national du vieillissement et de l'Association d'Alzheimer

NMDA: N-Méthyl-D-Aspartate

NSE: *Neuron Specific Enolase* (énolase spécifique de neurone)

PDI: Protéine Disulfure Isomérase

PDPK: *Proline Directed Protein Kinase*

PERK: *Protein kinase RNA-like endoplasmic Reticulum Kinase*

PET-scans: Tomographie par émission de positrons

PI3K: *Phosphoinositide-3-kinase*

PKA: *Cyclic AMP-dependent protein Kinase A*

PRGN: Progranuline

PS: Plaques séniles

PSEN1: Préséniline-1

PSEN2: Préséniline-2

Rab: *Ras-related in Brain*

RAGE: Récepteur des produits avancés de glycation

RE: Réticulum endoplasmique

RNS: Espèce réactive d'azote

ROS: Espèce réactive d'oxygène

sAPP α : Soluble APP α

sAPP β : Soluble APP β

SNC: Système nerveux central

SOD: Superoxydes dismutases

SSAO: Semi-carbazides amine oxydase

STAM: *Signal Transducing Adapter Molecule 1*

STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription proteins*

Syk: *Spleen tyrosine Kinase*

Tau: *Tubulin associated unit*

TREM2: *Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2*

TSG101: *Tumor Susceptibility Gene 101*

UPR: *Unfolded Protein Response*

Vps: *Vacuolar protein sorting-associated protein*

1 CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 La maladie d'Alzheimer

1.1.1 Généralités

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative qui se caractérise par une perte progressive et irréversible des neurones du système nerveux central (SNC). La perte neuronale débute au niveau du cortex entorhinal et de l'hippocampe et progresse dans différentes régions corticales du cerveau. Au niveau neuropathologique, les coupes des cerveaux des personnes atteintes de la MA montrent la présence anormale de plaques séniles (PS) correspondant à l'accumulation extracellulaire du peptide bêta amyloïde (A β) et d'enchevêtrement neurofibrillaires (ENF) dû à l'hyperphosphorylation de la protéine tau (Nelson et al., 2007). La MA a été décrite pour la première fois par le docteur Aloïs Alzheimer, un médecin psychiatre allemand, lors de l'examen neurologique d'une patiente qui présentait des problèmes de mémoire, de compréhension et des déficits comportementaux. Comme décrit par le médecin allemand, la déficience de mémoire (l'incapacité à retenir des informations récentes) est considérée le symptôme principal de la MA. En plus, le sujet atteint souffre d'une détérioration du langage et une altération de la capacité à réaliser des activités. Ces signes cliniques s'aggravent à fur et à mesure que la maladie progresse pour finir par la perte d'autonomie du patient (Snowden et al., 2011).

La MA est le type de démence le plus fréquent. Elle représente environ 60 à 70 % des cas. Sa prévalence augmente avec l'âge et le nombre de personnes atteintes devrait dépasser 131 millions dans le monde d'ici 2050. La MA touche 10% des individus âgés de plus de 65 ans et environ 50% âgées de plus de 85 ans (Zvěřová, 2019).

Il existe deux formes de la MA, la forme familiale ou appelée encore la forme héréditaire et la forme sporadique. La forme familiale présente 1 à 5 % des cas. Elle se caractérise par l'apparition des symptômes cliniques à un âge inférieur à 60 ans. Elle est directement liée aux mutations des trois gènes : la protéine précurseur de l'amyloïde bêta (APP), préséniline-1 (PSEN1) et préséniline-2 (PSEN2) qui ont un impact direct sur les taux ou l'agrégation d'A β (Bertram et al., 2010). La deuxième forme est la forme sporadique qui constitue la grande majorité des cas (95 à 99 %). Celle-ci se caractérise par l'apparition tardive des signes cliniques à un âge supérieur à 60 ans. Le déclenchement de cette forme est associé à des causes complexes et inconnues, incluant de nombreux facteurs génétiques et environnementaux.

1.1.2 Physiopathologie

La présence des PS et des ENF dans les cerveaux des personnes atteintes constitue la marque distinctive de la MA (figure 1). Par contre, La physiopathologie de cette maladie n'est pas complètement connue et reste un phénomène complexe lié à de multiples facteurs.

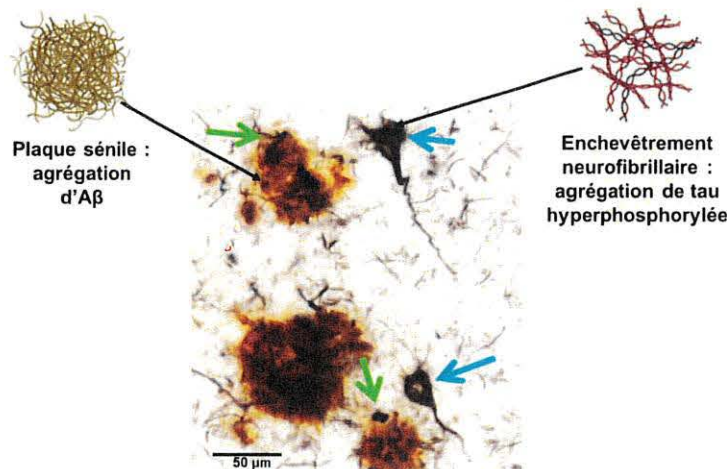


Figure 1: Les marqueurs histopathologiques de la maladie d'Alzheimer (modifié de (Nelson et al., 2012))

Les plaques amyloïdes bêta (flèches vertes) et les enchevêtrements neurofibrillaires (flèches bleu) au niveau du cortex cérébral d'un patient atteint de la MA.

1.1.2.1 Le peptide amyloïde bêta

La MA est caractérisée par une accumulation anormale du peptide Aβ dans le cerveau. Malgré son rôle clé dans la physiopathologie de la MA, le peptide Aβ généré dans le cerveau et par les tissus périphériques joue également d'autres rôles biologiques. En effet, l'Aβ fonctionne comme des peptides antimicrobiens puisqu'il inhibe la croissance et engendre la mort des agents pathogènes qui interviennent dans plusieurs modèles d'infection (Kumar et al., 2016; Soscia et al., 2010). A des concentrations physiologiques (de l'ordre de pico molaire), le peptide Aβ provoque l'amélioration de l'apprentissage et de la mémoire (Morley & Farr, 2014). En plus, il joue un rôle d'antioxydant qui empêche la mort neuronale causée par les dommages oxydatifs induits par les métaux de transition et favorise également la croissance et la survie des neurites (Koo et al., 1993; Zou et al., 2002). Ce peptide est un produit de clivage de la protéine membranaire APP. Cette dernière est exprimée dans de nombreux tissus, en particulier dans les synapses des neurones. La fonction physiologique précise de cette protéine est mal connue, mais elle joue un rôle important dans diverses activités biologiques, notamment le développement neuronal, le transport intracellulaire et d'autres aspects de l'homéostasie neuronale telles que la croissance

et la survie. L'APP est aussi impliquée dans la liaison et le transport des métaux comme le fer et la régulation de la transcription des gènes (Gralle & Ferreira, 2007; Turner et al., 2003). Chez l'humain, l'APP peut être clivée selon deux voies : la voie amyloïdogénique et la voie non amyloïdogénique (figure 2).

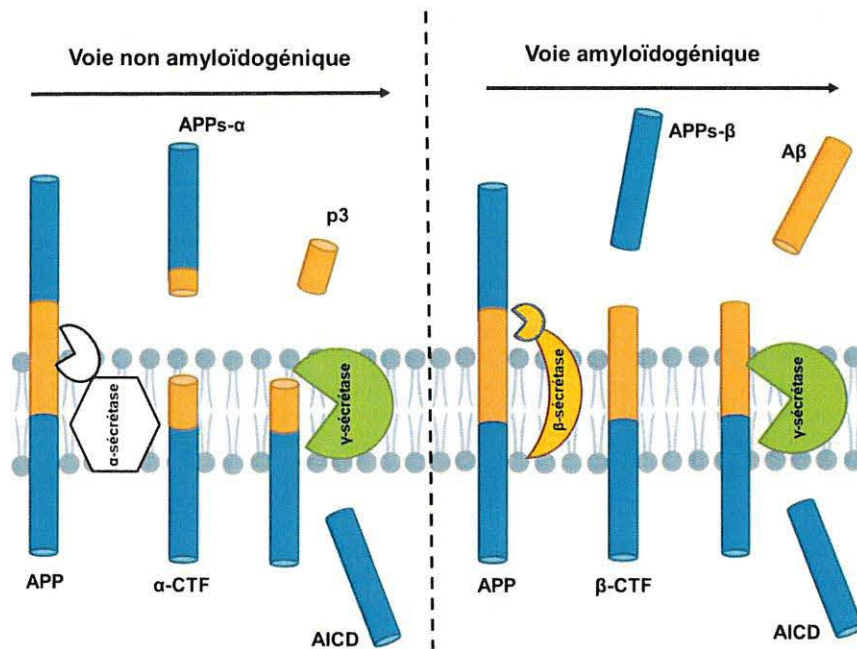


Figure 2: Schéma de deux voies de clivages de l'APP (modifié de (Thinakaran & Koo, 2008))

Dans la première voie (non amyloïdogénique), l'α sécrétase clive l'APP à la position du 83^{ème} résidu du côté C-terminal donnant naissance à une partie N-terminal APPα soluble (sAPPα) qui est sécrétée dans le milieu extracellulaire. Le fragment de 83 acides aminés (CTFα) restant est clivé par la suite par une deuxième enzyme la γ sécrétase. Cette action permet de générer le domaine intracellulaire de l'APP (AICD) et un peptide P3. La deuxième voie (amyloïdogénique) commence par le clivage de l'APP par la β sécrétase au niveau du 99^{ème} résidu du côté C-terminal. Cette action aboutit à la libération du sAPPβ dans l'espace extracellulaire et d'un fragment C99, CTFβ. Le fragment restant (C99) subit un clivage par la γ sécrétase et produit l'AICD et différentes longueurs de peptide Aβ (Macias *et al.*, 2014; Olsson *et al.*, 2014). Majoritairement, on retrouve la forme Aβ₁₋₄₂ (42 acides aminés) qui est considérée la plus dominante dans la structure des plaques séniles à cause de son aspect hydrophobe et sa tendance à l'agrégation. En plus de cette forme, on retrouve la forme Aβ₁₋₄₀ (40 acides aminés) et d'autres fragments de différentes tailles, mais en proportions moindres (Clementi *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 1996). Le peptide Aβ monomère libéré par le clivage amyloïdogénique de l'APP

s'agrège en divers types d'assemblages, notamment des oligomères, des protofibrilles et des fibrilles. Les fibrilles d'amyloïdes sont plus grosses et insolubles et peuvent encore s'assembler sous forme de PS, tandis que les formes oligomériques d'amyloïdes sont solubles et peuvent se propager dans tout le cerveau (Chen *et al.*, 2017). Les PS sont majoritairement constitués par des agrégats du peptide A β . Cependant, de nombreuses molécules ont été trouvées dans la composition de ces plaques telles que les apolipoprotéines E et J, les phospholipides, les ARN, les ions métalliques (Fe²⁺, Cu²⁺ et Zn²⁺) ainsi que les produits avancés de glycation (AGEs) (Morgan *et al.*, 2004).

L'accumulation et l'agrégation d'A β dans le cerveau dépendent de son homéostasie qui implique à la fois sa production, son transport et sa dégradation. Ce peptide est produit dans le SNC et dans les tissus périphériques. Le récepteur des produits avancés de glycation (RAGE) favorise le transport d'A β du sang au cerveau à travers la barrière hémato encéphalique (BHE). Le récepteur des lipoprotéines « Lipoprotein receptor-related protein-1 » (LRP1) est responsable du transport de ce peptide du cerveau vers le sang (Deane *et al.*, 2003; Zlokovic *et al.*, 2010). Le transport d'A β est influencé également par sa liaison aux protéines de transport tel que l'Apo lipoprotéine E et J (apoE, apoJ) et l' α 2-macroglobuline. L'A β peut être dégradé grâce à des enzymes protéolytiques tels que la néprilysine, l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE), l'enzyme de dégradation de l'insuline (IDE), la plasmine et les métalloprotéines (MMP) (Baranello *et al.*, 2015).

Les causes de développement de la MA restent inconnues. Cependant, différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer l'origine des effets observés au cours de cette maladie. L'hypothèse de la cascade amyloïde propose que l'agrégation de l'A β en plaques conduise à la neurotoxicité et à la démence par le biais d'effets cytotoxiques chevauchants contribuant à la pathogenèse de la MA (Hardy & Allsop, 1991). La formation des agrégats d'A β peut se réaliser par deux différentes réactions dont l'une est dépendante de la présence des métaux. Les agrégats d'A β non métallique forment des oligomères solubles et des fibrilles d'amyloïde, tandis que les agrégats d'A β métallique forment des agrégats et des oligomères plus réticulés par des liaisons covalentes (Atwood *et al.*, 2000). L'agrégation d'A β pourrait induire la production des radicaux libres tels que les espèces réactives d'oxygènes (ROS) qui réagissent rapidement avec les protéines ou les lipides, entraînant la formation de protéines oxydées et de lipides peroxydés. Ce phénomène d'agrégation pourrait se produire sur les membranes neuronales provoquant la peroxydation des lipides, la perturbation d'intégrité membranaire et le dysfonctionnement des transporteurs de glucose et du glutamate (Mattson, 2004). L'agrégation d'A β peut également

altérer l'équilibre d'oxydation au sein des neurones en diminuant l'expression des enzymes antioxydants et en augmentant les ROS produits. À l'inverse, les ROS peuvent provoquer la libération et l'agrégation d'A β . De plus, ce peptide perturbe l'homéostasie intracellulaire du calcium et provoque l'oxydation d'ADN, le dysfonctionnement mitochondrial et la phosphorylation de la protéine tau. Ces conséquences altèrent la capacité neuronale à mener des activités physiologiques normales et conduit à la neurodégénérescence (Selkoe & Hardy, 2016). Des taux élevés et une agrégation contenue d'A β provoquent une activation des microglies et des astrocytes qui libèrent des chimiokines et des cytokines pro-inflammatoires. En conséquence, un état de neuro inflammation s'installe et cause la perte des synapses et la mort neuronale (Heneka *et al.*, 2015).

1.1.2.2 La protéine tau

La protéine tau (tubulin associated unit) est la principale protéine associée aux microtubules (MT) des neurones. Elle joue un rôle important dans l'assemblage et la stabilisation des microtubules, ainsi que dans le transport axonal des organelles et des biomolécules (Sotiropoulos *et al.*, 2017; Weingarten *et al.*, 1975). Dans le cerveau humain, il existe six isoformes de tau qui sont codés par un seul gène situé sur le chromosome 17 et qui sont exprimés en raison de l'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10. Les exons 2 et 3 codent pour des répétitions dans la partie N-terminale de la protéine alors que l'exon 10 code pour des répétitions dans la partie de liaison au MT. Les six isoformes ont des longueurs qui varient entre 352 à 441 acides aminés. Ils peuvent contenir ou non un ou deux inserts amino-terminaux (0N, 1N ou 2N) et trois ou quatre répétitions dans le domaine de liaison aux MT (3R ou 4R) (figure 3) (Goedert *et al.*, 1989; Himmler *et al.*, 1989).

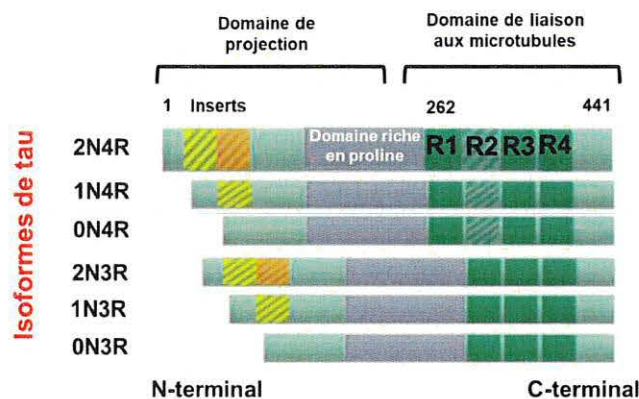


Figure 3: Représentation graphique des isoformes de la protéine tau (Šimić *et al.*, 2016)

Le fonctionnement normal de la protéine tau dépend de son degré de phosphorylation. La forme la plus longue de cette protéine contient 85 sites de phosphorylation qui touchent les acides aminés sérines (Ser), thréonines (Thr) et tyrosines (Tyr). Le degré de la phosphorylation de tau est modulé par des kinases et des phosphatases (Avila *et al.*, 2004; Lindwall & Cole, 1984). Il existe des kinases spécifiques pour la phosphorylation des sérines et thréonines suivies d'une proline (motifs Ser-Pro et Thr-Pro) nommées (PDPK) « proline directed protein kinases ». Parmi cette famille, on retrouve les deux kinases GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase) et cdk5 (Cyclin Dependant Kinase 5). Les autres kinases qui n'appartiennent pas à la famille PDPK, telles que la (CK1) « casein kinase 1 », les (MARKs) « microtubule affinity-regulating kinases » la (PKA) « cyclic AMP-dependent protein kinase A », la (DYRK-1A) « dual specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinase 1A », la (Fyn) « Proto-oncogene tyrosine-protein kinase » et la (Syk) « Spleen tyrosine kinase » phosphorylent les sites non suivis de proline (Morishima-Kawashima *et al.*, 1995; Noble *et al.*, 2013). Les principales phosphatases impliquées dans la déphosphorylation de la protéine tau sont les protéines phosphatase 1, 2A et 5 (PP1, PP2A, et PP5) (Liu *et al.*, 2005).

Dans les conditions physiologiques du cerveau humain, la présence de molécules de phosphate sur la protéine tau ne dépasse pas 3 molécules. Dans des conditions pathologiques comme le cas de la MA, l'hyperactivation des kinases et la diminution de l'activité des phosphatases provoquent une hyperphosphorylation de la protéine tau. Cette phosphorylation excessive entraîne le détachement de tau des MT, la formation des agrégats oligomériques et leur accumulation sous forme d'ENF intracellulaire, une caractéristique pathologique de la MA (Iqbal *et al.*, 2010). Cette accumulation anormale entraîne à son tour une altération de la physiologie neuronale et synaptique conduisant à la mort des neurones (figure 4) (Iqbal *et al.*, 2009; Šimić *et al.*, 2016).

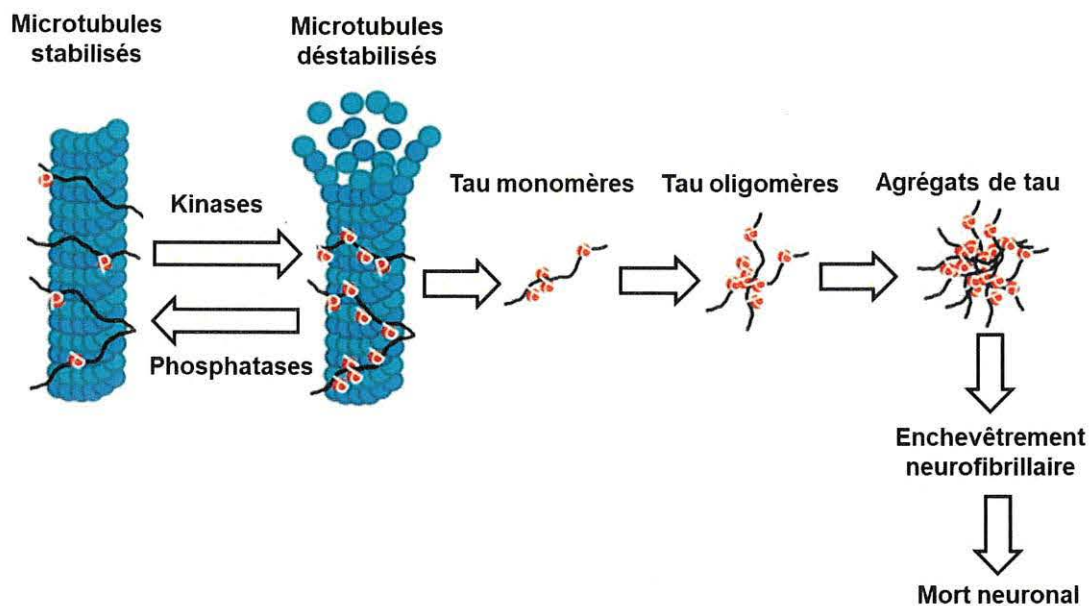


Figure 4: Schéma de l'hyperphosphorylation de la protéine tau et la formation des enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires (modifié de (Barron et al., 2017))

L'activation des kinases provoque la phosphorylation de la protéine tau et son détachement de microtubules. La formation des agrégats oligomériques et leur accumulation sous forme d'ENF intracellulaire favorisent la mort neuronale.

Selon l'échelle de Braak et Braak, les ENF apparaissent tout d'abord dans la région trans-entorhinale, puis s'étendent vers la région limbique et enfin dans les zones corticales. Cette propagation pathologique de tau corrèle avec la progression des symptômes cognitifs et cliniques de la MA (Braak & Braak, 1991). De manière générale, l'accumulation intracellulaire des agrégats de tau provoque une toxicité au sein de la cellule. En outre, les oligomères solubles peuvent facilement se propager entre les cellules et causer la phosphorylation et l'agrégation de tau menant à la mort de la cellule réceptrice (Guerrero-Muñoz *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2018b). La propagation de cette protéine dans les différentes régions du cerveau peut s'expliquer par plusieurs mécanismes. En effet, tau est libéré de la cellule lors de la sécrétion des vésicules synaptiques (Pooler *et al.*, 2013). Elle peut aussi se trouver dans le contenu des vésicules extracellulaires telles que les exosomes (Saman *et al.*, 2012). De plus, la translocation directe à travers la membrane et le transport par des nanotubes favorisent sa libération (Katsinelos *et al.*, 2018; Tardivel *et al.*, 2016). Différentes modalités permettent à cette protéine de rejoindre la cellule réceptrice. Elle peut être captée de l'espace extracellulaire par endocytose, macropinocytose et par la fusion de la membrane des vésicules extracellulaires avec la membrane de la cellule réceptrice (Wu *et al.*, 2013). De plus, il a été montré que la microglie et

les astrocytes peuvent phagocyter la protéine tau extracellulaire et favoriser sa propagation (Asai *et al.*, 2015; Martini-Stoica *et al.*, 2018).

1.1.2.3 Stress oxydatif et dysfonctionnement mitochondrial

Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre entre la production des radicaux libres et leur neutralisation par les systèmes antioxydants causant un dommage des macromolécules cellulaires (Dasuri *et al.*, 2013). Principalement, le stress oxydatif s'installe par le biais d'une augmentation des niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et/ou d'azote (RNS). Parmi les ROS, on distingue l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical d'hydroxyle ($^{\bullet}OH$). Le monoxyde d'azote (NO) et le peroxydinitrite ($ONOO^-$) sont classés dans la famille des RNS (Di Meo *et al.*, 2016). Au niveau cellulaire, les ROS sont produits à partir de différentes sources, notamment la chaîne respiratoire mitochondriale, le réticulum endoplasmique, les peroxysomes, les enzymes tels que les NADPH oxydases, les monoamines-oxydases, les xanthines oxydase et les eNOS « endothelial nitric oxide synthase » (von Bernhardt & Eugenin, 2012).

Dans des conditions physiologiques, de faibles niveaux de ROS sont produits dans les cellules. Ces niveaux jouent un rôle important dans les cascades des voies de signalisation (Ray *et al.*, 2012), tandis que dans des conditions pathologiques, des niveaux élevés des ROS favorisent l'installation d'un stress oxydatif. Ce dernier entraîne plusieurs dommages qui peuvent se traduire par diverses altérations biochimiques intracellulaires telles que l'oxydation des protéines et d'ADN et la peroxydation des lipides. Le principal marqueur biologique de l'oxydation protéique est les protéines carbonylées. Des taux élevés de ce type de modification de protéines sont observés dans les cerveaux, le liquide céphalorachidien (LCR) et le plasma des patients atteints de la MA (Aksenov *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2014; Perrotte *et al.*, 2019). La peroxydation lipidique causée par l'attaque des ROS sur les acides gras induit la génération de divers produits tels que le malondialdéhyde (MDA), le 4 hydroxynonanal (4-HNE), l'isoprostane et l'acroléine. Ces produits réactifs peuvent à leur tour attaquer des macromolécules cellulaires. Ce mécanisme perturbe l'intégrité de la membrane cellulaire et altère la perméabilité et le transport ionique (Singh *et al.*, 2010). Dans les cerveaux des patients atteints de la MA, des niveaux élevés des produits de la peroxydation lipidiques ont été observés (Bradley *et al.*, 2010; Bradley *et al.*, 2012; Ramassamy *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 2006). L'oxydation de l'ADN favorise la formation de 8-OH-2-deoxyguanosine (8-OHd6) et 8-oxo-7,8-dihydroguanosine (8-OHG). Des taux élevés de ces

produits sont observés dans les cerveaux des patients atteints de la MA (Lovell & Markesbery, 2007; Lovell et al., 2011).

Pour se défendre contre le stress oxydatif et les effets néfastes de l'augmentation cellulaire des oxydants, le corps humain est équipé d'une variété d'antioxydants qui servent à contrebalancer l'effet des ROS et des RNS. Les cellules contiennent un système de défense qui peut être divisé en deux catégories: des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (figure 5). Le système d'antioxydant enzymatique se base majoritairement sur les activités des superoxydes dismutases (SOD), les glutathion peroxydases (GPx) et la catalase. La SOD favorise la transformation spontanée d' O_2^- en H_2O_2 (Zelko et al., 2002). Ce dernier est transformé en une molécule d'eau et une molécule d'oxygène par l'action de la catalase (Scibior & Czczot, 2006). De plus, les GPx en présence du glutathion réduit (GSH) catalysent la dégradation de H_2O_2 en eau et en glutathion oxydé (GSSG) (Arthur, 2000).

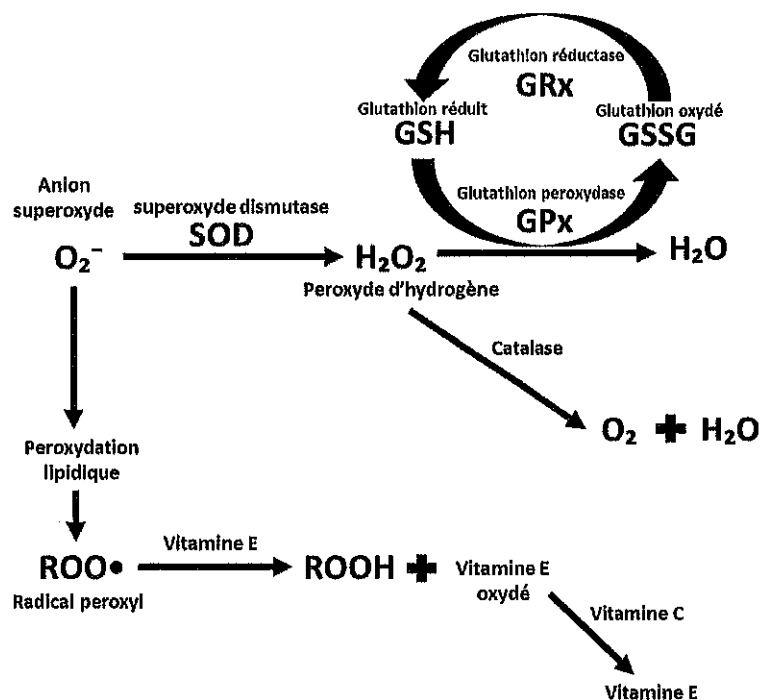


Figure 5: Le stress oxydatif et le système antioxydants (modifiée de (Kumar et al., 2018))

Parmi les molécules anti oxydantes non enzymatiques présentes dans les cellules, on retrouve entre autres, la vitamine C ou l'acide ascorbique, la vitamine E ou l' α -tocophérol et le GSH. La vitamine E neutralise les radicaux peroxydes formés lors de la peroxydation des lipides. La forme oxydée de la vitamine E issue de cette réaction est reconvertie en forme stable par la vitamine C. De plus, ce dernier est considéré comme l'un des plus puissants capteurs des ROS (Birben et

al., 2012). De son côté, le GSH est considéré comme étant la principale molécule anti oxydante puisqu'il est abondant dans tous les compartiments cellulaires. Cette molécule antioxydante donne son électron au H₂O₂ pour le réduire en H₂O sous l'action de GPx. Le GSSG formé est à nouveau réduit en GSH par la GSH réductase qui utilise le NADPH comme cofacteur (Masella et al., 2005). Une diminution des taux des molécules antioxydantes (vitamine C et E et GSH) et des activités des enzymes antioxydants (SOD, catalase et GPx) est observée dans les cerveaux des patients atteints de la MA (Wang et al., 2014).

Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'apparition du stress oxydatif dans le cerveau précède l'apparition des symptômes cliniques et la formation des PS et ENF de la MA. Cette installation précoce est liée à un dysfonctionnement mitochondrial (Belkacemi & Ramassamy, 2012; Nunomura et al., 2001). En effet, les mitochondries sont la principale source de stress oxydatif cellulaire en raison de la production constante d'anion superoxyde pendant le transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire. Malgré la présence d'un système antioxydant mitochondrial, il a été montré que dans le cadre d'un dysfonctionnement, ces organites produisent moins d'ATP et plus de ROS. Ce phénomène constitue une source majeure de déséquilibre oxydatif observé dans la MA (Castellani et al., 2002; Gibson et al., 1998). En général, la fonction normale de la mitochondrie dépend de sa structure intacte. Les neurones altérés dans les cerveaux des patients atteints de la MA présentent des mitochondries structurellement endommagées. Ces organelles, dont le nombre est diminué d'une façon significative par rapport à la normale, témoignent des fractures de crêtes et une perte partielle ou presque complète de la structure interne (Hirai et al., 2001). Cette altération structurelle est associée à une diminution d'expression et d'activité des enzymes clés de la chaîne de transport d'électrons (Chandrasekaran et al., 1994; Cottrell et al., 2002; Nagy et al., 1999). Le dysfonctionnement mitochondrial provoque une altération de l'hémostasie calcique neuronale, une augmentation de l'oxydation de l'ADN mitochondriale et l'apoptose de la cellule (McKee et al., 1990; Mecocci et al., 1994).

1.1.2.4 L'inflammation

L'inflammation est un mécanisme de défense cellulaire et moléculaire complexe qui implique plusieurs éléments en réponse à diverses stimulations, notamment le stress, les blessures et les infections. La réponse inflammatoire dans le cerveau est connue sous le nom de la neuroinflammation. Ce mécanisme se caractérise principalement par l'activation des microglies et des astrocytes et la libération de médiateurs pro-inflammatoires, des ROS et de monoxyde

d'azote (Bagyinszky et al., 2017). Les cytokines pro-inflammatoires libérées, en particulier IL-6, TNF α et IL-1 β sont les principaux effecteurs neuroinflammatoires affectant les mécanismes neurophysiologiques (Liu & Chan, 2014). Les cytokines libérées pourraient propager la zone d'inflammation par l'activation d'autres microglies et astrocytes et, par conséquent, conduire à une nouvelle génération de molécules inflammatoires. De plus, les molécules sécrétées recrutent d'autres cellules immunitaires telles que les monocytes et les lymphocytes qui traversent la BHE aggravant d'avantage la réponse inflammatoire dans le SNC (Kinney et al., 2018). Dans le cadre de la MA, la neuroinflammation favorise la libération du peptide amyloïde et la formation des PS ainsi que la phosphorylation de tau et la formation des ENF. Par conséquent, l'augmentation des PS et des ENF provoque l'activation des microglies et des astrocytes et favorise la libération des facteurs inflammatoires. Ce mécanisme progresse de façon irréversible vers la cytotoxicité cellulaire et la mort des neurones (figure 6) (Walters et al., 2016).

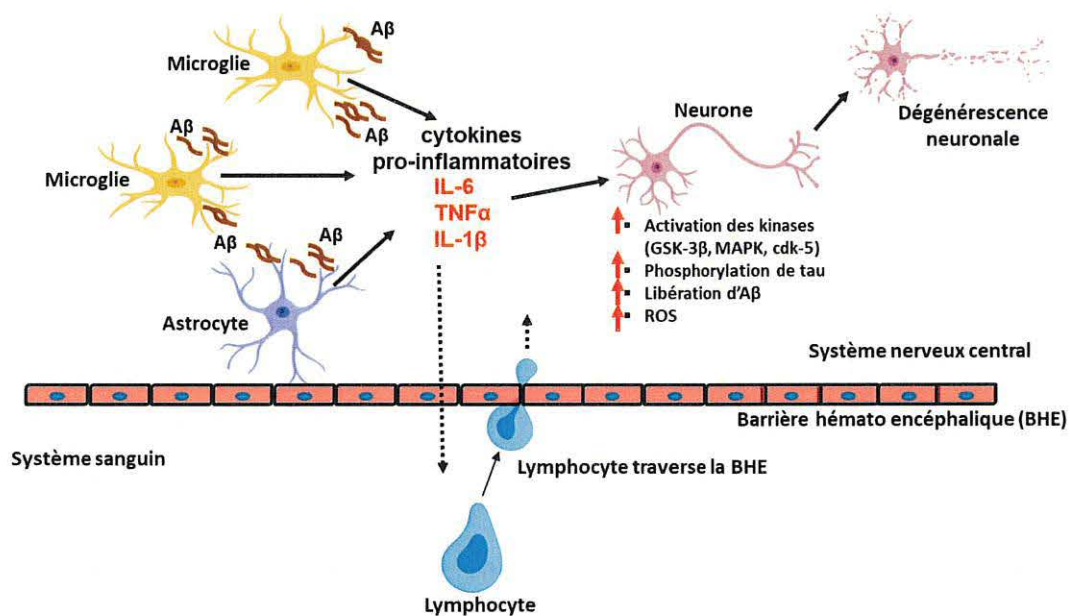


Figure 6: Schéma de mécanisme de l'inflammation dans la maladie d'Alzheimer

Des concentrations élevées d'A β activent les microglies et les astrocytes qui libèrent des cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-6, le TNF α et l'IL-1 β . Ces derniers provoquent l'activation des kinases (MAPK, GSK-3 β et cdk5), l'hyperphosphorylation de la protéine tau, la libération d'A β et la genèse des ROS dans les neurones. De plus, les cytokines pro-inflammatoires recrutent d'autres cellules immunitaires telles que les lymphocytes qui traversent la BHE aggravant d'avantage la réponse inflammatoire dans le SNC (MERAZ RIOS et al., 2013).

Les cellules gliales (microglie et astrocytes) sont considérées comme les principaux acteurs dans le mécanisme de la neuroinflammation. Les cellules microgliales présentent environ 20% du total des cellules gliales du cerveau et 10% des cellules du SNC (Rubio-Perez & Morillas-Ruiz, 2012) alors que les astrocytes constituent environ 20 à 50% du volume du cerveau humain et se

classent parmi les cellules non neuronales les plus abondants du SNC (Shimada et al., 2012). Les microglies peuvent être stimulées par de nombreux facteurs, notamment l'A β . Suite à cette activation, des modifications morphologiques affectent la microglie de sorte qu'on observe plus de ramifications, une forme amiboïde et l'apparition de divers marqueurs spécifiques sur sa surface (Town et al., 2005). Les microglies activées se caractérisent par une capacité de migrer et phagocyter les cellules endommagées ou les débris. Dans cet état, ils peuvent également libérer des molécules inflammatoires tels que les cytokines, les chimiokines et les ROS. Il a été montré que les microglies activées se localisent dans les zones qui présentent une forte concentration en A β , et surtout sa forme fibrillaire (D'Andrea et al., 2004). Les microglies se comportent différemment selon la concentration d'A β . En présence d'une faible concentration de ce peptide, les microglies l'éliminent par phagocytose. Cependant, si les microglies sont fortement activées par une concentration élevée d'A β , elles se trouvent incapables de phagocyter ces peptides et favorisent la génération de molécules pro-inflammatoires (Hickman et al., 2008; Permanne et al., 2002). La libération d'IL-1 β par les microglies à la suite de leur activation par l'A β induit une suractivation des kinases (MAPK, GSK-3 β et cdk5) et, par conséquent, l'hyperphosphorylation de la protéine tau (Li et al., 2003; Sy et al., 2011). Dans le cerveau, les astrocytes sont considérés comme les cellules de soutien des neurones. Ils sont connus pour leur implication dans la régulation de la sécrétion et du recyclage des neurotransmetteurs, le remodelage synaptique, le métabolisme énergétique et l'homéostasie ionique (Sofroniew & Vinters, 2010). L'activation des astrocytes peut être modulée par de nombreux facteurs, notamment les agents pathogènes, les lipopolysaccharides, le stress oxydatif et les acides gras saturés circulants et l'A β (Jana & Pahan, 2010; Liu et al., 2013). Les astrocytes activés peuvent produire des cytokines pro-inflammatoires, l'interféron γ et un faible taux d'A β (Blasko et al., 2000). De plus, ces molécules pro-inflammatoires sécrétées peuvent augmenter l'expression des sécrétases dans les neurones et provoquer l'augmentation de la production d'A β et ainsi favoriser l'activation des microglies qui libèrent à leur tour des cytokines pro-inflammatoires (Otth et al., 2002; Tang, 2009). En plus des astrocytes et des microglies, les neurones contribuent à la réponse inflammatoire dans le SNC en libérant des cytokines IL-1 β et IL-18 (de Rivero Vaccari et al., 2008). D'autre part, il a été montré que les neurones sont capables de sécréter diverses molécules anti-inflammatoires, telles que TREM2 « triggering receptor expressed on myeloid cells 2 », CD22, CD200 et CD59. Dans le contexte de la MA, l'expression et les niveaux de ces molécules sont déficients (Hsieh et al., 2009; Walker et al., 2009; Yang et al., 2000).

1.1.2.5 Dysfonctionnement des systèmes de neurotransmission

Les neurones assurent la transmission du potentiel d'action par le biais des synapses. Ces derniers sont composés de deux compartiments pré et post-synaptiques séparés par une fente synaptique. Pendant le processus de neurotransmission, des molécules de signalisation (des neurotransmetteurs) telles que le glutamate, l'acétylcholine, la dopamine et d'autres sont libérés par des neurones présynaptiques et se lient sur leurs récepteurs spécifiques des neurones postsynaptiques (Szule et al., 2015). Dans la MA, des altérations au niveau des niveaux et de la signalisation de divers systèmes de neurotransmission ont été observées (Mufson et al., 2008; Nava-Mesa et al., 2014). Le système cholinergique est le plus affecté et les altérations observées corrélient avec la progression de la MA. La synthèse de l'acétylcholine (ACh) dépend de l'activité enzymatique de la choline acétyltransférase. Le fonctionnement de cette enzyme nécessite la présence de la choline, l'acétyl-CoA et l'adénosine triphosphate. La dégradation de l'ACh dans les fentes synaptiques est menée par l'intermédiaire d'une enzyme nommée l'acétylcholine estérase (Dani & Bertrand, 2007). Les cerveaux des patients atteints de la MA sont caractérisés par une diminution de la concentration d'ACh au niveau des synapses et une réduction dans l'activité enzymatique de choline acétyltransférase dans l'hippocampe, l'amygdale et le cortex (Davies & Maloney, 1976).

Le glutamate est considéré comme le neurotransmetteur exciteur majeur du SNC. Il permet la transmission du signal nerveux par la liaison à ses récepteurs à savoir le récepteur de N-méthyl-D-aspartate (NMDA), le récepteur de l'acide amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique (AMPA) et le récepteur de l'acide kaïnique (KA) (Conn & Pin, 1997). Dans des conditions physiologiques, le glutamate assure des rôles clés dans la croissance et la différenciation neuronales, la transmission et la plasticité synaptique ainsi que l'apprentissage et la mémoire (Butterfield & Pocernich, 2003). Cependant, l'augmentation de la concentration du glutamate favorise une suractivation des récepteurs NMDA et par conséquent une production du peptide A β et la formation des PS. De plus, la suractivation des récepteurs NMDA provoque l'influx du calcium dans le cytoplasme qui sera accompagné par un dysfonctionnement mitochondrial et un état de stress oxydatif menant à la mort neuronale (Rudy et al., 2015).

Même si l'altération des systèmes cholinergique et glutamatergique semble essentielle à la physiopathologie de la MA, d'autres systèmes de neurotransmission comme le système dopaminergique, adrénergique, sérotoninergique et GABAergique jouent également un rôle dans les processus cognitifs et le transfert des messages nerveux sont perturbés au cours de la maladie. Des modifications de concentration de leurs neurotransmetteurs (dopamine, adrénaline,

sérotonine et l'acide gamma-aminobutyrique (GABA)) et l'expression de leurs récepteurs ont été reportées au cours de la MA (Calvo-Flores Guzman et al., 2018; Kalaria et al., 1989; Martorana & Koch, 2014; Meltzer et al., 1998).

1.1.2.6 Autres mécanismes

La physiopathologie de la MA est complexe et met en jeu plusieurs mécanismes cellulaires et moléculaires. En plus de l'implication d'A β , de la protéine tau, du stress oxydatif, du dysfonctionnement mitochondrial, d'inflammation et du dysfonctionnement synaptique, d'autres mécanismes semblent jouer un rôle dans cette maladie.

La résistance à l'insuline est un état physiopathologique qui caractérise les cerveaux des patients atteints de la MA (Arnold *et al.*, 2018). La résistance à l'insuline se définit comme une diminution progressive des réponses cellulaires à l'insuline malgré la présence de concentrations importantes de cette hormone dans le sang. Cet état se manifeste cliniquement suite à une altération de l'élimination du glucose qui provoque une augmentation de la période nécessaire de retour de la glycémie à des taux normaux. Les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus se résument à l'efficacité réduite des récepteurs de l'hormone et/ou l'altération des voies de signalisation (Reaven, 2003).

L'insuline sécrétée par le pancréas traverse la BHE pour rejoindre le cerveau où il joue plusieurs rôles importants (Begg, 2015). Cependant, des hypothèses mentionnent que l'insuline peut être d'origine cérébrale (Duarte *et al.*, 2012; Schechter *et al.*, 1988). Les actions de cette hormone incluant la modulation du métabolisme de glucose, l'amélioration ou la régulation de la mémoire et des fonctions cognitives (Neth & Craft, 2017). Les mécanismes d'action de l'insuline se traduisent par sa liaison à son récepteur membranaire spécifique. Cette liaison induit la dimérisation du récepteur et la phosphorylation de ses résidus tyrosine. Cette action déclenche l'activation de la phosphoinositide-3-kinase (PI3K) qui active à son tour la protéine kinase B (AKT). Cette dernière active d'autres kinases telles que la GSK3 β et la JNK (c-Jun N-terminal kinase) et améliore l'expression des transporteurs de glucose à la surface des cellules. En parallèle, d'autres voies de signalisation peuvent être activées comme la voie de la protéine MAPK et celle des protéines JAK (Janus kinases) et STAT (signal transducer and activator of transcription proteins) (Haeusler *et al.*, 2018). Dans le cerveau, la résistance à l'insuline se manifeste par une diminution d'expression du récepteur de l'insuline (IRS1), une diminution de l'activité des protéines PI3K et AKT, des transporteurs de glucose (GLUT 3-4) et une augmentation de l'activation du GSK3 β , JNK et MAPK (Steen *et al.*, 2005).

L'activation de GSK-3 β et la diminution de la PPA2 favorisent l'agrégation et l'accumulation de la protéine tau phosphorylé qui précède la formation de ENF dans le cerveau (Qu *et al.*, 2011). L'injection d'A β dans les cerveaux des souris génère une réponse inflammatoire et une résistance à l'insuline (Bomfim *et al.*, 2012). Ces observations suggèrent que la résistance à l'insuline favorise des troubles neurodégénératifs, lesquelles ont également conduisent à proposer que la MA soit le diabète de type 3 ou diabète de type cérébral (de la Monte, 2014).

Le réticulum endoplasmique (RE) est une organelle cellulaire qui contrôle et assure la synthèse et les modifications post-traductionnels des protéines, le stockage et l'homéostasie du calcium ainsi que la synthèse des lipides. Ces fonctions impliquent de nombreuses enzymes et protéines chaperons et dépendent du pH (Bravo *et al.*, 2013). Plusieurs facteurs peuvent perturber l'homéostasie du RE, notamment la diminution des taux de calcium, le stress oxydatif et l'accumulation de protéines mal repliées dans sa lumière, ce qui conduit au stress de RE. Pour rétablir son homéostasie, le RE active une chaîne de signalisation nommée la réponse aux protéines mal repliées (unfolded protein response : UPR). Ce processus complexe empêche l'agrégation et facilite le repliement des protéines endommagées. De plus, il diminue la traduction des protéines pour éviter leur accumulation dans la lumière du RE. Ensuite, il active la voie de dégradation des protéines associées aux RE afin de maintenir un état homéostatique (Hetz, 2012). Dans le cerveau des patients atteints de la MA, il a été montré que le marqueur de stress du RE (chaperone glucose-regulated protein 78 : GRP78/BiP) est positivement corrélé avec les stades de Braak et Braak (Hoozemans *et al.*, 2005). De plus, des altérations des niveaux d'expression de protéines de plusieurs marqueurs de RE stress, à savoir la GRP78/ BiP, la protéine disulfure isomérase (PDI), la protéine kinase RNA (PKR)-like ER kinase (PERK), la forme phosphorylé de la protéine eIF2 α (eukaryotic initiation factor-2alpha) et l'inositol-requiring enzyme-1alpha (IRE1 α) ont été observées (Santos & Ferreira, 2018). Des études *in vitro* montrent que la présence d'une forte concentration d'A β entraîne un stress de RE. Il a aussi été démontré que l'A β exogène induit un stress de RE dans les cultures des neurones primaires accompagné d'un dysfonctionnement mitochondrial menant à la mort des cellules (Costa *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2008).

1.1.3 Facteurs de risque

1.1.3.1 Les facteurs génétiques

Les facteurs génétiques qui peuvent engendrer la MA constituent un ensemble de mutations touchant les gènes qui codent pour des protéines clés intervenant dans la physiopathologie de la maladie. Dans la forme familiale de la MA, les mutations autosomales dominantes des gènes codant pour l'APP et la PSEN1 et 2 sont responsables du développement de la maladie (Bekris et al., 2010).

Dans la forme sporadique de la maladie, le grand facteur de risque génétique existant est la variation du gène de l'ApoE (apolipoprotéine E). L'ApoE est une protéine impliquée dans le métabolisme lipidique codée par le gène d'ApoE, située sur le chromosome 19. Trois allèles de cette protéine donnent naissance aux isoformes apoE2, apoE3 et apoE4. Ces isoformes sont présentes à différentes fréquences comme le suivant : (apoE2: 5–10%, apoE3: 65–70% et apoE4: 15–20%) (Corbo & Scacchi, 1999). L'allèle apoE4 est le principal facteur de risque de la MA sporadique. La présence d'une seule copie de cet allèle augmente de 3 fois le risque de développer la MA. Cependant, la présence de deux copies d'allèle apoE4 multiplie le risque de 12 fois. Inversement, la présence de l'allèle ApoE2 réduit le risque de développer la MA (Karch & Goate, 2015). Le mécanisme derrière le grand facteur de risque de la présence de l'allèle ApoE 4 peut être expliqué par la relation qui existe entre cette protéine et l'A β . En effet, l'isoforme ApoE4 possède une faible capacité de liaison à l'A β , tandis que les autres isoformes ont une capacité supérieure de lier et d'éliminer l'A β (Kim et al., 2009).

Des mutations qui touchent le gène du récepteur exprimé dans des cellules myéloïdes 2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2: TREM2) qui est localisé sur le chromosome 6 augmentent le risque de 2,9% de développer la MA (Jonsson et al., 2013). Le récepteur TREM2 est fortement exprimé à la surface des microglies. Il joue un rôle important dans la modulation des réponses phagocytaires et inflammatoires dans le SNC. L'activation de ce récepteur stimule la production des chimiokines CCL19 and CCL21 et induit le phénomène de phagocytose (Mecca et al., 2018). Chez des souris qui ne présentent pas ce récepteur, il a été observé que la capacité phagocytaire des microglies pour des corps neuronaux apoptotiques et d'A β était déficiente. Ceci favorise l'accumulation des débris neuronaux, l'accumulation des PS et le déclenchement d'un environnement inflammatoire (Xiang et al., 2016).

En plus des gènes décrits ci-dessus, d'autres mutations touchent les gènes codants pour le récepteur de complément de type 1 (CR1), la protéine 1 d'interaction dépendante de la boîte myc

(BIN1), la clusterine (CLU), la protéine d'assemblage de la clathrine liant le phosphatidylinositol (PICALM), CD33, le récepteur de l'éphrine (EPHA1) et les transporteurs ABC (ABCA7) sont considérés comme des facteurs de risques de la MA (Karch & Goate, 2015).

1.1.3.2 Les facteurs non génétiques

Plusieurs facteurs non génétiques sont associés au développement de la MA. L'âge est considéré le plus grand facteur de risque lié au développement de la forme sporadique de la MA. En effet, il a été estimé que la prévalence du développement de la maladie est de 1% à l'âge de 60 ans. Après cet âge, la prévalence double tous les 5 ans pour atteindre 30 % à 85 ans (Evans, 1996).

Les maladies vasculaires, surtout celles qui touchent la vascularisation du cerveau, les accidents vasculaires cérébraux (AVC) ischémique ou hémorragique sont considérés comme un sérieux facteur de risque de développement de la MA. Il est estimé que 7,4 % des patients qui ont eu un AVC ont développé la MA (Pendlebury & Rothwell, 2009). Les mécanismes à travers lesquels l'AVC peut causer la MA sont chevauchants. En effet, l'AVC induit un dysfonctionnement de la BHE, une réduction du débit sanguin et une diminution de l'apport sanguin dans la région touchée. Ces événements entraînent un état d'hypoxie et d'accumulation des substances neurotoxiques. De plus, les lésions vasculaires induit la surexpression d'APP et la production massive d'A β . Les dommages de la BHE entraînent également une diminution de la clairance de ce peptide et favorise son accumulation dans le cerveau menant à un état inflammatoire et à la phosphorylation de la protéine tau. Ces mécanismes altèrent les fonctions neuronales et cognitives et permettent le développement de la MA (Zlokovic, 2011).

Des études épidémiologiques ont classé le diabète de type 2 (DT2) dans la catégorie des risques accrus de développer la MA. Il est estimé que la prévalence du développement de la MA chez des personnes présentant le DT2 est de 50 à 100 % (Biessels et al., 2006; Cheng et al., 2012; Li et al., 2015). Plusieurs mécanismes pathophysiologiques font du DT2 un facteur de risque important, notamment la résistance à l'insuline, le stress oxydatif, l'inflammation, le dysfonctionnement vasculaire et l'hyperglycémie qui permettent la formation des produits avancés de glycation (Kimura, 2016).

Le syndrome métabolique désigne la présence de plusieurs anomalies métaboliques chez le même individu à savoir la résistance à l'insuline, l'obésité abdominale, l'intolérance au glucose (ou l'hyperglycémie), l'hypertension et la dyslipidémie. Ce problème de santé présente un facteur de risque de la MA (Vanhanen et al., 2006). L'hypertension est une maladie qui induit un

dysfonctionnement au niveau des parois vasculaires. Cet état entraîne une hypoperfusion, une ischémie et une hypoxie cérébrale qui favorisent le développement de la MA (Skoog & Gustafson, 2006). La dyslipidémie avec une augmentation des taux de cholestérol constitue un facteur de risque de la MA.

Des taux élevés de cholestérol perturbent l'intégrité de la BHE (Xue-Shan et al., 2016). De plus, des études *in vivo* ont rapporté que l'hypercholestérolémie est associée à une augmentation des dépôts d'A β , d'hyperphosphorylation de tau et de formation de ENF, d'un état de neuro-inflammation, d'un dysfonctionnement synaptique et d'un déclin cognitif (Ricciarelli et al., 2012; Ullrich et al., 2010). En plus des maladies vasculaires, le DT2 et le syndrome métabolique, d'autres facteurs notamment, le stress, la dépression, la perturbation du sommeil et le tabac sont considérés comme des facteurs de risque de la MA (Durazzo et al., 2014; Proserpio et al., 2018; Ray et al., 2011; Schrijvers et al., 2011; Vilalta-Franch et al., 2013).

1.1.4 Diagnostic actuel

Actuellement, le diagnostic de la MA est seulement probable et le diagnostic définitif s'effectue après la mort du patient par la visualisation des lésions cérébrales (PS dues à l'accumulation d'A β et ENF dues à l'hyperphosphorylation de tau) lors de l'autopsie du cerveau. Cependant, il existe un diagnostic dit probable lequel est établi par un entretien médical entre le médecin spécialiste et le malade accompagné d'un membre de sa famille. Au cours de cette rencontre, le médecin prend en considération l'histoire psychiatrique, la chronologie du déclin cognitif et comportemental et les différentes maladies dont le patient souffre. De plus, il procède à des examens cliniques, des tests cognitifs, d'imagerie cérébrale et des analyses biologiques du LCR (Molin & Rockwood, 2016).

1.1.4.1 Tests cognitifs

En pratique clinique, la perte de mémoire et le déficit cognitif sont considérés comme les changements clés observés chez les personnes atteintes de la MA. Les critères de diagnostic de cette maladie dépendent de l'identification de ces troubles. Les tests cognitifs sont des outils standardisés qui font appel à des épreuves permettant d'évaluer, sur une courte durée, différentes fonctions cognitives (Sheehan, 2012). Plusieurs tests sont mis au point pour la détection des altérations cognitives, mais les plus utilisés dans le cadre de la MA sont le test MMSE (Mini Mental State Examination) et le test MoCA (Montreal Cognitive Assessment test).

Le MMSE est le test le plus connu et le plus utilisé dans la pratique clinique. Il est basé sur un ensemble de 30 questions qui évaluent différents domaines cognitifs dans les domaines de l'orientation, de la mémoire, de l'attention, du calcul, du langage et de la construction visuelle. Un point est accordé pour chaque bonne réponse.

Les patients obtiennent entre 0 et 30 points et un score inférieur à 26 reflète une déficience significative des fonctions cognitives. Le score entre 26 et 30 points indique que la personne est sans troubles cognitifs apparents. Selon le score obtenu, les patients atteints de la MA peuvent être classés en différents stades, des patients au stade léger (score entre 25 et 22 points), au stade modéré (score entre 21 et 14 points) ou au stade sévère (score inférieur à 14 points) (Folstein et al., 1975; Vertesi et al., 2001). Malgré les performances de ce test dans le dépistage des altérations cognitives, il est considéré peu sensible dans la détection des personnes présentant des déficits cognitifs légers (Spencer et al., 2013). Le test MoCA montre une sensibilité supérieure de MMSE pour la détection des déficits légers. Bien qu'il offre l'évaluation des mêmes domaines cognitifs de MMSE, l'ensemble des questions du test MoCA (sur 30 points) a été développé d'une manière plus difficile. Ce test inclut l'évaluation de la fonction exécutive, le langage et la mémoire de plus haut niveau (retenir 5 mots au lieu de 3 dans le test MMSE) et un traitement visuospatial complexe (test de l'horloge). Le score supérieur à 26 points indique que le patient est normal. Les personnes dont leurs scores varient entre 26 et 18 points sont classées dans le stade MCI (Mild cognitive Impairment ou Déficit cognitif léger). Le score inférieur à 18 points indique des atteintes cognitives modérées à sévères caractéristiques de stade de la MA (Nasreddine et al., 2005; Trzepacz et al., 2015).

1.1.4.2 L'imagerie

L'imagerie cérébrale a été mise au point afin d'améliorer le diagnostic clinique de la MA. Il existe différentes techniques d'imagerie qui permettent de détecter l'atrophie cérébrale, la réduction au niveau du métabolisme du glucose et l'accumulation des peptides A β .

L'atrophie cérébrale est l'une des conséquences de la MA. Il a été reporté que les cerveaux des patients atteints de la maladie se caractérisent par l'atrophie d'hippocampe, du cortex et l'élargissement des ventricules. Ces atteintes structurales peuvent être visualisées et identifiées par la technique d'imagerie par résonance magnétique nucléaire cérébrale (IRM) (Teipel et al., 2005).

L'imagerie cérébrale fonctionnelle est un autre type d'imagerie qui permet d'évaluer le métabolisme du glucose. La technique utilisée est la tomographie par émission de positrons (PET-scans) qui permet d'observer la consommation cérébrale du glucose grâce à un traceur analogue à ce sucre, le fluorodésoxyglucose (^{18}F -FDG) (Ortner et al., 2019).

L'accumulation d'A β sous forme des PS est une caractéristique histopathologique qui caractérise les cerveaux des patients atteints de la MA. L'accumulation de ce peptide dans le cerveau pourrait être détectée *in vivo*, par la technique d'imagerie fonctionnelle (PET-scans) en utilisant des traceurs. Le premier traceur utilisé est le ^{11}C -labelled Pittsburgh compound B (^{11}C -PIB). D'autres traceurs marqués au ^{18}F et avec une demi-vie plus longue ont été utilisés comme le flutémétamol (^{18}F -PIB), le florbétapir (AV-45), le florbétabène (AV-1) (Richards & Sabbagh, 2014). En plus de la détection des PS, différents traceurs ont été utilisés pour la visualisation des ENF causé par l'accumulation et l'agrégation des protéines tau hyperphosphorylés. Parmi ces traceurs on site, C- 11 PBB3, F- 18 THK-523, F- 18 THK-5105, F- 18 THK-5117, F- 18 T808, F- 18 FDDNP, F- 18 T807 et le ^{18}F -AV1451. Cependant, la spécificité de ces traceurs est plutôt faible (James et al., 2015; Koychev et al., 2017).

1.1.4.3 Les biomarqueurs utilisés pour le diagnostic

Le groupe international de travail sur les nouveaux critères de recherche pour le diagnostic de la MA (IWG) et le groupe de l'institut national du vieillissement et de l'Association d'Alzheimer (NIA-AA) ont développé des nouveaux critères pour le diagnostic probable de la MA incluant l'utilisation des techniques d'imageries (PET-scans) et d'IRM et le dosage des taux d'A β 1-42, tau total et tau phosphorylée à la thréonine 181 (T181) dans le LCR (Molin & Rockwood, 2016; Weiner et al., 2015). La comparaison des taux de ces biomarqueurs dans le LCR des patients atteints de la MA et des sujets sains a montré une diminution des taux d'A β 1-42 et une augmentation des taux de tau total et tau phosphorylé T181 chez les patients atteints de la MA (Counts et al., 2017). Les taux d'A β 1-42 dans LCR ont démontré une sensibilité de 86% et une spécificité de 89%. Les taux de tau total ont dévoilé une sensibilité de 81% et une spécificité de 91% et les taux de la forme phosphorylée de tau T181 ont montré une sensibilité de 81% et une spécificité moyenne de 91% (Blennow, 2004). Cependant, le rapport de taux de tau T181 sur l'A β 1-42 a révélé une meilleure identification des patients atteints de la MA des sujets sains avec une sensibilité de 86% et une spécificité de 97% (Maddalena et al., 2003).

1.1.4.4 Diagnostic précoce et le stade MCI (Mild cognitive Impairment ou Déficit cognitif léger)

Les nouveaux critères de diagnostic élaborés par l'IWG-2 et NIA-AA ont permis de définir un stade préclinique, un stade MCI dont les déficits cognitifs sont légers et trois stades de la MA (Budson & Solomon, 2012; Molin & Rockwood, 2016). Le stade préclinique est défini comme un état asymptomatique où les personnes touchées ne présentent pas des signes cliniques, mais elles montrent la présence des biomarqueurs de la pathologie de la MA (Sperling et al., 2011; Sperling et al., 2013). Généralement, selon les degrés de déficits cognitifs et de mémoire déterminés chez les patients à l'aide des scores des tests cognitifs (MMSE, MoCA), on distingue trois stades de la MA : léger, modéré et sévère (Budson & Solomon, 2012).

Le stade MCI est considéré comme un état de transition intermédiaire entre le vieillissement normal et la démence. Ce stade se caractérise par l'apparition de signes cliniques qui se manifeste par une perte de mémoire et un déficit cognitif léger. Ces perturbations cognitives sont considérées supérieures à celles observées chez les personnes âgées, mais elles n'interfèrent pas avec les activités de la vie quotidienne du patient (Sanford, 2017). Après l'âge de 60 ans, on estime que la prévalence du MCI varie entre 15% à 20% (Ganguli et al., 2010; Manly et al., 2008). Des études ont montré que le groupe MCI était associé à un risque accru de progression vers la démence et en particulier la MA. Les patients atteints de MCI progressent vers la MA à un taux de 10% à 15% par an, et 80% de ces patients ont évolué vers la MA après environ 6 ans de suivi (Albert et al., 2011; Bachurin et al., 2018; Petersen et al., 1999). Comme celle de la MA, la physiopathologie du MCI reste mal connue, mais il a été montré que les troubles métaboliques, neurologiques et psychiatriques contribuent largement à ce stade de déficience cognitive léger (Roberts & Knopman, 2013). Actuellement, le diagnostic des patients atteints de MCI est basé sur les tests cognitifs, le dosage des taux de tau phosphorylée et d'A β 1-42 dans le LCR, la détermination de leur rapport et la visualisation de l'atrophie cérébrale, le dysfonctionnement du métabolisme du glucose et l'accumulation du peptide A β par des techniques d'imagerie (Petersen, 2016). Cependant, le diagnostic actuel est peu sensible et spécifique de ce stade. De plus, l'application systématique de ces critères est relativement limitée et difficile en raison des coûts élevés d'imagerie, de la nature invasive du prélèvement du LCR et de l'hétérogénéité clinique des patients MCI. Par conséquent, il est nécessaire d'identifier de nouveaux biomarqueurs sanguins liés au processus neurodégénératif et associé au stade MCI qui permettent un diagnostic précoce de la maladie avec des coûts réduits.

1.1.5 Traitement actuel

L'origine inconnue et la complexité de la physiopathologie de la MA rendent son traitement difficile. Il n'existe actuellement aucun traitement efficace de la MA. Les médicaments approuvés par l'administration américaine des aliments et des médicaments se classent en deux catégories: la première regroupe les inhibiteurs d'acétylcholine estérase et la deuxième inclut les antagonistes des récepteurs NMDA.

1.1.5.1 Les inhibiteurs d'acétylcholine estérase

La stratégie de cette catégorie est fondée sur la diminution du neurotransmetteur l'ACh chez les patients atteints de la MA. Cette diminution est due à une baisse d'expression de l'acétylcholine transférase, une enzyme clé dans la synthèse du ACh. Ces médicaments diminuent l'activité de l'acétylcholine estérase (enzyme de dégradation de l'ACh), induisant l'augmentation des taux d'ACh dans les fentes synaptiques.

En 1994, la tacrine fut le premier médicament approuvé dans cette catégorie. Mais à cause de ses effets secondaires indésirables tels que l'hépatotoxicité, la tachycardie et des problèmes gastriques, ce médicament fut retiré du marché (Crismon, 1994). D'autres médicaments sont apparus entre 1997 et 2001. Le donépézil est utilisé pour le traitement de tous les stades de la maladie (Black et al., 2007). Alors que la rivastigmine et la galantamine sont utilisées pour le traitement des patients atteints de la MA à des stades précoces à modérés (Kobayashi et al., 2016). Cette stratégie de traitement est peu efficace puisque les neurones des personnes souffrant de la MA produisent de moins en moins d'ACh avec le temps. De plus, il y a d'autres mécanismes altérés dans cette maladie.

1.1.5.2 Les antagonistes du récepteur NMDA

La stratégie de cette catégorie se base sur la présence d'une forte concentration de glutamate qui induit une neurotoxicité par la liaison à son récepteur NMDA. Les antagonistes de ce récepteur prennent la place du glutamate permettant d'empêcher ses effets néfastes. La Memantine est le seul médicament de cette catégorie qui existe sur le marché. Il a été approuvé en 2003 pour le traitement des personnes atteintes de la MA à des stades modérés et sévères (Wang et al., 2015).

1.2 Les produits avancés de glycation

Les produits avancés de glycation (AGEs) forment un groupe structuralement hétérogène de composés. Ces derniers sont observés et décrits pour la première fois par Louise Camille Maillard en 1912 lors du processus de brunissement qui se produit pendant la cuisson des aliments (John & Lamb, 1993). La réaction de Maillard est un processus non enzymatique qui favorise la formation des produits de coloration brun jaunâtre. Ce processus implique un ensemble des réactions chimiques qui se déroule à la suite d'interaction entre les sucres et les protéines. Quarante ans plus tard, les mécanismes chimiques impliqués dans la réaction de Maillard sont décrits par Hodge (Hodge, 1953). En 1955, Kunkel et Wallenius ont découvert la première protéine glyquée (l'hémoglobine glyquée ou appelée HbA1C) dans le corps humain (Kunkel & Wallenius, 1955). Cette découverte est aussi importante que l'étude de Monnier et Cerami qui montre l'association des protéines glyquées et les pathologies liées au vieillissement (Monnier & Cerami, 1981). Ces études et d'autres ainsi que la présence des AGEs dans divers tissus et fluides biologiques ont donné plus d'intérêt à étudier leurs implications dans différentes pathologies. La formation des AGEs sur les protéines entraîne une altération à leurs structures et leur confèrent une résistance au processus de dégradation (Kasper & Funk, 2001).

1.2.1 Métabolisme des produits avancés de glycation

1.2.1.1 Formation endogène

Il existe trois voies de formation endogène des AGEs : la glycation non enzymatique ou la réaction de Maillard, la glycoxydation résultant de l'auto-oxydation du glucose et la voie des polyols (figure 7).

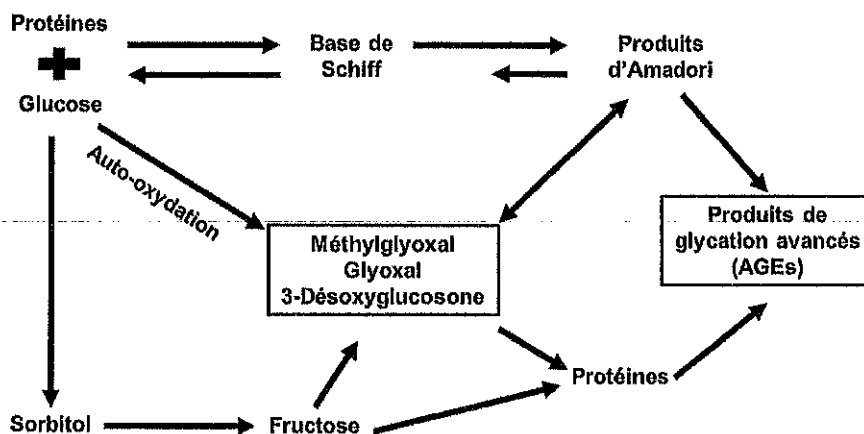


Figure 7: Schéma des voies de formation des produits avancés de glycation

La glycation est une interaction non enzymatique entre le groupement carbonyle des sucres réducteurs comme le glucose, galactose ou le ribose... et la fonction amine libre généralement de la lysine ou de l'arginine ou du côté N-terminal d'une protéine. En premier lieu, cette interaction favorise la formation d'un intermédiaire imine, également désignée sous le terme de base de Schiff. Ce dernier subit des réactions d'arrangement moléculaire dites réarrangement d'Amadori aboutissant à la formation de produit d'Amadori (Amadori, 1929). Au cours d'une phase plus tardive et irréversible, le produit d'Amadori subit des réactions de réarrangement et d'oxydation (clivage, interaction avec d'autres protéines, cyclisation...) permettant la formation des AGEs (Zhang *et al.*, 2009). En suivant différentes voies (fragmentation, fission oxydative...), le produit d'Amadori peut former des α -dicarbonyles tels que le méthylglyoxal (MG), glyoxal (GO) et le 3-désoxyglucosone (3-DG). Ces derniers sont des intermédiaires très réactifs, interagissent avec les groupements amines des protéines et favorisent la formation des AGEs (Davidek *et al.*, 2006). De plus, l'auto-oxydation du glucose contribue à la formation de ces intermédiaires réactifs et par conséquent à la formation des AGEs (Thornalley *et al.*, 1999). Des taux élevés du glucose intracellulaire activent la voie des polyols qui favorise la transformation du glucose en fructose. L'aldose réductase, la première enzyme de cette réaction, réduit le glucose en sorbitol en utilisant le NADPH comme cofacteur. Le sorbitol est ensuite métabolisé en fructose par le sorbitol déshydrogénase qui utilise le NAD^+ comme cofacteur et en libérant du NADH (Lorenzi, 2007). L'augmentation de la production du fructose peut augmenter la glycation des protéines intracellulaires puisque le fructose se caractérise par un pouvoir glyquant supérieur au glucose (Schalkwijk *et al.*, 2004). De plus, le fructose peut subir une phosphorylation et se transforme en fructose-3-phosphate. Ce dernier peut se décomposer en intermédiaires réactifs comme le 3-DG qui favorise la formation des AGEs (Szwergold *et al.*, 1990). D'autre part l'utilisation massive du NADPH peut réduire sa disponibilité intracellulaire comme cofacteur pour le glutathion réductase, essentielle au maintien des taux cellulaires de glutathion réduit (GSH). Cela diminue la capacité des cellules à réagir au stress oxydatif (Barnett *et al.*, 1986). Par contre, l'excès de NADH devient un substrat pour la NADH oxydase qui favorise la libération des ROS (Lassegue & Clempus, 2003).

1.2.1.2 Apport exogène

Les AGEs sont formés majoritairement par les voies de formation endogènes, toutefois il faut noter qu'une partie de ces produits peut être d'origine exogène. D'après la découverte de Maillard, les AGEs se forment dans les aliments lors de la cuisson à haute température dont la

couleur brune est la caractéristique de leur présence. Cette découverte a été confirmée par plusieurs études et des bases de données sont disponibles et décrivent les taux des AGEs dans les aliments, les conditions de cuisson et les transformations qui favorisent leur formation. Des études ont montré la présence de N-carboxyméthyl-lysine (CML) dans la plupart des aliments (Ahmed *et al.*, 2005b; Goldberg *et al.*, 2004). En plus, il a été montré que les AGEs sont présents dans plus de 200 aliments différents (Poulsen *et al.*, 2013). La concentration des AGEs dans les aliments peut être augmentée par différents facteurs tels que la richesse en graisse et en protéine, la température, le temps de cuisson, l'humidité et la présence des métaux. En effet, une température élevée et une durée assez longue de cuisson, ainsi que l'absence d'humidité et la présence des métaux, surtout dans les aliments riches en graisses et en protéines augmentent la formation des AGEs (Uribarri *et al.*, 2010). Ces produits peuvent aussi provenir du tabac (Nicholl & Bucala, 1998). Il a été montré que les mêmes AGEs présents dans les cigarettes sont retrouvés dans les vaisseaux sanguins des consommateurs (Nicholl *et al.*, 1998). Seulement 10 % des AGEs exogènes sont absorbés et le reste est secrété par les reins dans les urines (He *et al.*, 1999; Koschinsky *et al.*, 1997).

1.2.1.3 Dégradation et élimination

Les AGEs d'origine endogène ou exogène doivent être éliminés pour empêcher leurs effets toxiques. Dans le corps humain, l'élimination des AGEs liés à des protéines passe par leur dégradation intracellulaire puis leur élimination par le système rénal. Les macrophages, les cellules du foie et les cellules endothéliales sont capables de capter les AGEs circulants. Les récepteurs qui sont impliqués dans la capture et l'internalisation des AGEs sont AGE-R1/OST-48, AGE-R3/galectin-3 et les récepteurs « scavenger » (MSR-AII, MSR-BI, CD36 et FEEL-1/FEEL-2) (Araki *et al.*, 1995; Miyazaki *et al.*, 2002; Ohgami *et al.*, 2002). La liaison des AGEs avec ces récepteurs provoque l'endocytose de ces derniers. L'internalisation du complexe AGEs-récepteur engendre la formation d'endosome précoce. Ce dernier suit des modifications amenant à la formation d'endosome tardif. Une diminution du pH permet la dissociation du récepteur de son ligand. Après la séparation, le récepteur peut être recyclé et transféré à la surface de la cellule (von Zastrow & Sorkin, 2007). Ensuite, la fusion d'endosome avec le lysosome permet la protéolyse des protéines-AGEs par des protéases lysosomales telles que les cathepsines D, L et B (Grimm *et al.*, 2010; Grimm *et al.*, 2012). Les peptides solubles modifiés par les AGEs sont ensuite libérés à partir des cellules et transportés vers le système rénal via le système sanguin.

L'insuline peut également conduire à l'élimination des AGEs par l'augmentation de leur internalisation par les récepteurs « scavenger » en activant la voie PI3K (Sano et al., 1998).

1.2.2 Caractérisation des produits avancés de glycation

Les AGEs présentent un groupe structuralement hétérogène des produits partageant certaines caractéristiques spécifiques. Ces produits se caractérisent par la formation de liaisons croisées covalentes entre les protéines, l'habilité de transformer certains aliments en une couleur jaune-brun (effet de brunissement) et la capacité de générer une fluorescence. Sur la base de leurs propriétés, les AGEs peuvent être classés dans les catégories suivantes: les AGEs réticulant et fluorescent comme la pentosidine, la « crossline », le glyoxal lysine dimère (GOLD) et le méthylglyoxal lysine dimère (MOLD), les AGEs non réticulent comme le Nε-(carboxyméthyl)-lysine (CML), le Nε-(carboxyéthyl)-lysine (CEL) et le pyrraline (Thorpe & Baynes, 2003). De plus des groupements amine libre de l'arginine et de la lysine, les AGEs se forment à partir du groupement thiol de la cystéine qui peut réagir rapidement avec des composés dicarboxylés. Les résultats de ces interactions sont la formation du carboxyméthyl-cystéine (CMC) et du carboxyéthyl-cystéine (CEC) (Zeng & Davies, 2005) (figure 8).

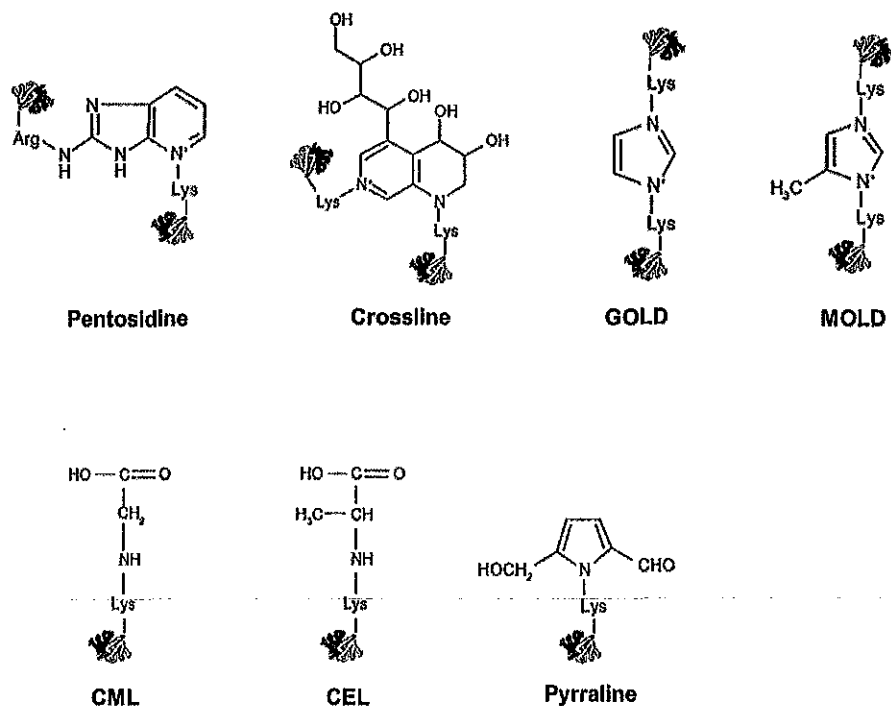


Figure 8: Représentation des structures de quelques AGEs caractérisés *in vivo* (modifié de (Thorpe & Baynes, 2003))

Devant la diversité et la complexité structurale des AGEs, la détection et le dosage de ces produits *in vivo* reste une tâche délicate. Les approches utilisées se résument à l'évaluation de la fluorescence des AGEs à des longueurs d'onde caractéristiques, la détection par des méthodes immunologiques et la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) (Jaisson & Gillery, 2018). Cependant, la pentosidine et le CML sont les AGEs les plus caractérisés. Ils sont facilement détectables et actuellement considérés comme des biomarqueurs cliniques de la formation et l'accumulation de ce groupe hétérogène de produits (Ghanem *et al.*, 2011).

La Pentosidine se classe dans la catégorie des AGEs réticulant et fluorescent. Cette molécule a été découverte et décrite pour la première fois en 1989 par Sell et Monier dans les structures du collagène (Sell & Monnier, 1989). C'est un composé de formule moléculaire générale $C_{17}H_{27}N_6O_4$, constitué par un imidazole et un anneau de pyridine ainsi que des chaînes latérales de lysine et d'arginine. Le composé est aussi fluorescent à une longueur d'onde d'excitation ($\lambda_{ex} = 335$ nm) et d'émission ($\lambda_{em} = 385$ nm). La formation de la pentosidine nécessite à la fois des réactions de glycation et d'oxydation qui se produisent entre une arginine et une lysine de différentes protéines. Le ribose est le sucre qui favorise la formation de la pentosidine, mais d'autres sucres interviennent comme le glucose et le fructose (Dyer *et al.*, 1991).

Le CML est désigné comme le produit de glycation le plus abondant dans les aliments ou dans les échantillons biologiques. Ce produit se classe dans la catégorie des AGEs non réticulant et non fluorescent. Il a été décrit en 1986 lors des expériences portant sur l'identification des produits formés par l'interaction entre le glucose et la lysine des protéines dans des conditions physiologiques (Ahmed *et al.*, 1986). Le CML est de formule brute $C_8H_{16}N_2O_4$. Il peut être formé par la réaction entre le glucose, le glyoxal et les résidus lysines, la peroxydation lipidique et l'oxydation de l'ascorbate (Delgado-Andrade, 2016).

1.2.3 Précurseurs des produits avancés de glycation : Méthylglyoxal et Glyoxal

Le méthylglyoxal (MG) et le glyoxal (GO) sont considérés comme les précurseurs majeurs de formation des AGEs grâce à leur hyperréactivité qui est estimée de l'ordre de 20.000 fois plus que le glucose (Thornalley, 2008). Ces deux composés dicarbonylés sont présents dans toutes les cellules et dans des conditions physiologiques ou physiopathologiques. Ils sont formés par des voies enzymatiques et non enzymatiques. Leur concentration dépend généralement des taux du glucose et des enzymes intervenant dans leur dégradation (Thornalley *et al.*, 1999).

Le GO est principalement généré via la voie de dégradation des sucres. En premier lieu, l'auto-oxydation de glucose favorise la formation du GO en présence des ions métalliques (Fe^{2+}). Ensuite, les produits d'Amadori formés par la réaction de Maillard peuvent se transformer en GO (Manini et al., 2006). Autrement, le GO peut également provenir de la peroxydation lipidique. En effet, la peroxydation d'acides gras polyinsaturés génère des intermédiaires peroxydes. Ces derniers se dégradent pour former une variété de produits oxydants, dont le GO (Yin & Porter, 2005). De plus, l'ascorbate peut se transformer spontanément en GO (Shangari & O'Brien, 2004).

Le MG est principalement formé par la fragmentation des intermédiaires glycolytiques glyceraldéhyde-3-phosphate et dihydroxyacétone phosphate (DHAP). Ce dernier peut produire du MG à la fois par élimination spontanée non enzymatique du groupement phosphate et par l'action du méthylglyoxal synthase (Kalapos, 1999). Le métabolisme des lipides participe à la formation du MG. En effet, l'acétone qui dérive de l'acétoacétate par l'activité de la myéloperoxydase est convertie en MG par l'action du cytochrome P450 2E1. De plus, l'hydrolyse de triacylglycérol permet de produire du glycérol phosphate qui peut être transformé en MG (Bondoc et al., 1999; Turk et al., 2006). La dégradation de la thréonine et de la glycine engendre la formation d'aminocétone. Sous l'action de semicarbazide sensitive amine oxydase (SSAO), ce dernier est transformé en MG (Lyles, 1996). Comme le GO, le MG peut être formé au cours de la réaction de Maillard par la transformation des bases de schiffs et des produits d'Amadori. En plus de la formation endogène du MG et GO, ces deux dicarboxyles peuvent être apportés par les aliments qui contiennent des fortes teneurs en sucres et en lipides ainsi que les cigarettes (Fujioka & Shibamoto, 2006; Kuntz et al., 2009). La forte température de cuisson et la longue durée de stockage peuvent favoriser la génération de ces dicarboxyles (Homoki-Farkas et al., 1997). En outre, de nombreux microorganismes qui sont impliqués dans le processus de fermentation produisent et libèrent du MG. Il a été montré que la fermentation peut entraîner une augmentation de ce produit dans les boissons alcoolisées et les aliments fermentés (Cooper, 1984).

1.2.3.1 Méthylglyoxal et glyoxal dans la maladie d'Alzheimer

En plus de son rôle majeur dans la formation des AGEs, ces deux précurseurs (MG et GO) peuvent être impliqués dans la physiopathologie de la MA (figure 9).

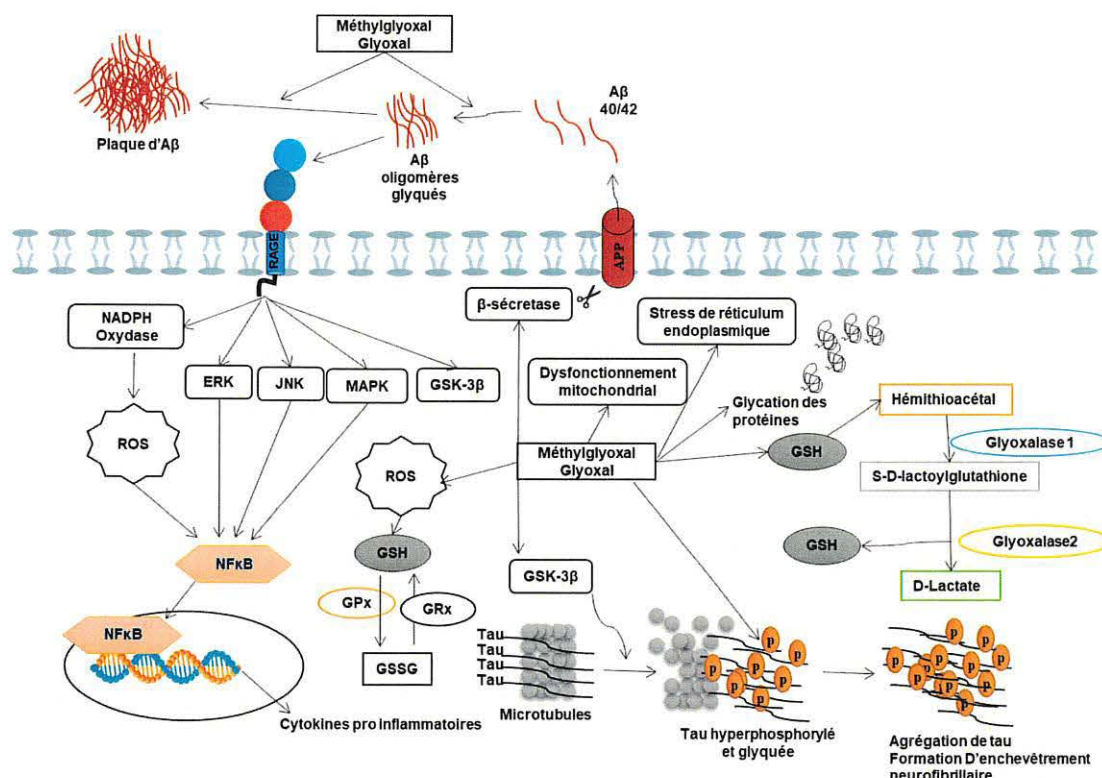


Figure 9: Schéma de l'implication du méthylglyoxal (MG) et du glyoxal (GO) dans la physiopathologie de la MA

Le MG et le GO favorisent l'agrégation d'Aβ et accélèrent la formation des plaques. Ce peptide peut se lier au récepteur RAGE et induire différentes voies de signalisations intracellulaires. L'activation du RAGE induit l'augmentation du stress oxydatif cellulaire, la libération des cytokines pro-inflammatoires et la phosphorylation de tau. Dans la cellule, le MG et le GO provoquent l'augmentation de stress oxydatif, le dysfonctionnement mitochondrial, le stress de réticulum endoplasmique, la glycation des protéines cytosoliques et la phosphorylation et l'agrégation de tau. Les deux enzymes glyoxalase 1 et 2 sont responsables de la dégradation du MG et du GO. L'interaction du GSH avec le MG ou le GO favorise la formation d'hémithioacétal qui sera métabolisé en S-D-lactoylglutathion par le GLO-1. Le GLO-2 favorise la production du D-lactate à partir du S-D-lactoylglutathion en libérant du glutathion (Angeloni *et al.*, 2014; Cai *et al.*, 2016).

La présence et l'abondance du MG et du GO sont corrélées à une augmentation de l'un des mécanismes physiopathologiques de la MA (le stress oxydatif). Il a été montré que le traitement des cellules neuronales en culture par ces dicarbonyles diminue fortement les taux intracellulaires de GSH et perturbe les processus antioxydants. Ces effets entraînent une production des ROS et, par conséquent, un état de stress oxydatif cellulaire (Dafre *et al.*, 2015; de Arriba *et al.*, 2007b; Di Loreto *et al.*, 2008).

En outre, les ROS peuvent être générés au cours de la formation et la dégradation du MG et GO. La formation du MG à partir d'aminocétone ou acétol permet la libération du peroxyde d'hydrogène (Yu *et al.*, 2003). La conversion du MG en pyruvate par l'action du glyoxal oxydase produit également le peroxyde d'hydrogène (Kersten & Kirk, 1987). De plus, le GO peut former du glycolate qui s'oxyde en glyoxylate avec la libération de H₂O₂ (Yang *et al.*, 2011). Le GO peut également réagir avec un radical hydroxyle pour former un radical GO. Cette réaction est trois fois plus rapide que la réaction entre MG et les radicaux hydroxyles (Galano *et al.*, 2004). Le dysfonctionnement mitochondrial est la principale source de génération de ROS qui est impliqué dans la MA. Le traitement des cellules neuronales par le MG provoque une altération de la respiration mitochondriale et du statut énergétique des cellules. De plus, ce dicarbone favorise l'augmentation de la production de ROS et de lactate et diminue le potentiel des membranes mitochondriales et des taux d'ATP intracellulaire (de Arriba *et al.*, 2007a). Il a été montré que le traitement des cultures primaires de neurones d'hippocampe de rat par le MG augmente le niveau d'expression de caspase-3 clivée et diminue le rapport Bcl-2/Bax (Chen *et al.*, 2010). Le MG joue un double rôle dans l'induction de l'hyperphosphorylation de la protéine tau de telle sorte qu'il augmente les activités des kinases et réduit les niveaux de phosphatases. Le traitement des cellules N2a de souris avec du MG a montré l'activation des kinases GSK-3 β et p38 ainsi que l'hyperphosphorylation de tau. L'inhibition de ces deux kinases diminue les taux de tau hyperphosphorylée induites par le MG. D'autre part, le MG provoque une diminution des taux de PP2. (Li *et al.*, 2012b). *In vitro*, l'incubation de protéines tau phosphorylées en présence du MG favorise la formation des agrégats et de structures fibrillaires (Kuhla *et al.*, 2007b). Le MG est également capable d'augmenter le taux de production d'A β et la formation d'oligomères et de fibrilles ainsi d'accroître la taille des agrégats (Chen *et al.*, 2006). Chez des souris, l'administration intracérébroventriculaire (ICV) du MG induit une hyperphosphorylation de tau et provoque des lésions de l'hippocampe et des troubles de mémoire (Qi *et al.*, 2017). Des taux élevés du MG chez des rats diabétiques a été associée à des troubles cognitifs, de mémoire et d'apprentissage (Huang *et al.*, 2012). L'administration du MG par ICV induit un déficit cognitif et des altérations neurochimiques dans l'hippocampe de rat (Hansen *et al.*, 2016).

Malgré tous les effets neurotoxiques du MG, leurs niveaux dans les liquides biologiques ont été peu étudiés. Dans le LCR, les taux du MG sont plus élevés chez les patients atteints de la MA par rapport au témoin. Ces niveaux sont inversement associés aux scores cognitifs du test MMSE (Ahmed *et al.*, 2005a). De plus, chez des personnes âgées, des taux sériques élevés de MG sont associés à un déficit de mémoire, à un volume de matière grise plus faible (Srikanth *et al.*, 2013)

et un plus grand déclin cognitif significatif par rapport à ceux qui ont des taux faibles de ce dicarbonyl (Beeri *et al.*, 2011).

Différentes enzymes contribuent à la détoxification du MG et du GO, parmi lesquelles le système glyoxalase est décrit comme le plus spécifique (Vander Jagt & Hunsaker, 2003). Ce système est composé par deux enzymes, glyoxalase 1 et 2 (GLO-1 et 2). L'interaction de GSH avec le MG favorise la formation d'hémithioacétal qui est métabolisée en S-D-lactoylglutathion par le GLO-1. Le GLO-2 favorise la production du D-lactate à partir du S-D-lactoylglutathion en libérant du glutathion.

L'accumulation de MG et du GO est étroitement liée au stress oxydatif et à la formation d'AGEs, qui sont des facteurs majeurs impliqués dans plusieurs pathologies liées à l'âge. Des observations des coupes du cerveau humain ont montré que l'expression de GLO-1 dans les astrocytes et les neurones augmente avant 55 ans et diminue progressivement en fonction de l'âge. Ces résultats ont été confirmés par les niveaux d'ARNm et d'activité enzymatique. Les auteurs du travail ont expliqué que l'augmentation d'expression du GLO-1 jusqu'à l'âge de 55 ans pourrait être due à un mécanisme compensatoire contre les taux élevés des dicarbonyls (Kuhla *et al.*, 2006). Kuhla *et al.* ont comparé les niveaux d'ARNm et l'activité enzymatique du GLO-1 chez des patients atteints de la MA à différents stades et des personnes saines. Leurs résultats ont montré que les niveaux d'ARNm ou l'activité enzymatique du GLO1 augmentent aux stades précoces de la maladie et diminuent progressivement aux stades modérés et sévères par rapport aux personnes saines (Kuhla *et al.*, 2007a). En plus du système glyoxalase, il existe également d'autres enzymes qui participent à la détoxification du MG et du GO, telles que l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH), l'aldose réductase NADPH-dépendante, la 2-oxoaldéhyde déshydrogénase et le carbonyle réductase. Il a été montré que l'activité enzymatique d'ALDH est augmentée dans le cortex temporal des patients atteints de MA par rapport aux sujets sains. Cette augmentation est expliquée par un effet compensatoire contre les taux élevés des dicarbonyls et du stress oxydatif (Picklo *et al.*, 2001). Le GSH possède une importante capacité antioxydante qui permet de neutraliser les radicaux libres, le MG et le GO. Des études *in vitro* et *in vivo* et des coupes de cerveaux des patients atteints de la MA montrent une association entre la réduction des taux du GSH, l'altération des fonctions cognitives et la pathogenèse de la MA (Mandal *et al.*, 2015; Resende *et al.*, 2008; Venkateshappa *et al.*, 2012). Il est intéressant de noter que des récents travaux ont rapporté une autre protéine qui favorise la détoxification du MG et du GO nommé DJ-1. Cette protéine est décrite en tant qu'homologue humain d'un nouveau

type de glyoxalase (GLO-3) qui convertit le MG en acide lactique en absence de glutathion (De Lazzari & Bisaglia, 2017; Lee *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2019a).

1.2.4 Les récepteurs des produits avancés de glycation

Différents types de récepteurs sont capables de lier les AGEs. Selon leurs actions vis-à-vis la fixation des AGEs, ces récepteurs forment deux catégories: les récepteurs qui interviennent dans l'endocytose et la dégradation des AGEs incluant AGE-R1/OST-48, AGE-R3/galectin-3 et les récepteurs « scavenger » (MSR-AII, MSR-BI, CD36 et FEEL-1/FEEL-2) et les récepteurs qui activent les réponses cellulaires comme AGE-R2/80K-H et le récepteur le plus étudié RAGE (tableau 1).

1.2.4.1 Le récepteur RAGE

Le récepteur des produits avancés de glycation (RAGE) est un récepteur membranaire de 404 acides aminés qui appartient à la superfamille des immunoglobulines. Il est exprimé dans de nombreux types cellulaires dont les monocytes, les macrophages, les lymphocytes T, les neurones, les cellules gliales, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes (Kierdorf & Fritz, 2013). Structuralement, RAGE est constituée de 3 domaines: un domaine extracellulaire nécessaire à la reconnaissance et à la liaison des ligands, une seule hélice transmembranaire responsable de l'ancrage de la protéine à la membrane et un domaine cytoplasmique qui favorise l'activation de différentes voies de signalisation. Le domaine extracellulaire est formé de trois sous domaines V, C1 et C2 dont les deux sous domaines V et C1 forment une seule entité qui est attaché au sous-domaine C2 par quelques acides aminés. Ce récepteur possède la capacité de lier une grande variété de ligands telle que les AGEs (comme le CML), les peptides A β sous différentes formes (monomères, d'oligomères et fibrilles), la famille des protéines S100 / calgranuline, la protéine HMGB1 (High mobility group box 1), les lipopolysaccharides (LPS) et l'acide lysophosphatidique. Cette capacité est due à la distribution des acides aminés dans les différents sous domaines du récepteur.

En effet, le bloc VC1 contient 95% de résidus d'arginines et de lysines qui associent une charge positive à la surface du domaine. Ceci donne à ce dernier une affinité pour une variété de composés polyanioniques, telles que les protéines modifiées par les AGEs exprimant une charge négative. La présence majeure des acides aminés acides (Aspartate et Glutamate) sur le sous-domaine C2 lui confère une charge négative ayant une affinité pour des molécules positivement chargées (Fritz, 2011).

En plus de la forme membranaire pleine longueur, plusieurs isoformes de RAGE ont été décrites, principalement sa forme soluble (figure 10). Deux différents types de RAGE soluble ont été identifiés: cRAGE est le résultat d'un clivage du récepteur membranaire et esRAGE (endosomal soluble RAGE) est le résultat d'un épissage alternatif d'ARNm du RAGE. cRAGE est obtenue par le clivage protéolytique de la forme complète du récepteur à la membrane par l' α sécrétase (ADAM-10) et la métalloprotéase matricielle 9 (MMP9), ce qui permettra à la partie extracellulaire de se libérer du récepteur (Raucci et al., 2008; Zhang et al., 2008). L'épissage alternatif de l'intron 9 et l'excision de l'exon 10 d'ARNm de RAGE sont à l'origine de la production de l'autre forme soluble (esRAGE). En effet, ce processus entraîne la modification du cadre de lecture via la génération d'un codon-stop de façon prématurée au sein de l'intron 9. Par conséquent, on obtient un récepteur tronqué qui ne contient pas l'hélice transmembranaire ni la queue intracellulaire avec l'ajout de 16 nouveaux acides aminés dans la région C-terminale. Cette séquence d'acides aminés différencie le RAGE membranaire du clivé et de l'esRAGE (Schlueter et al., 2003; Yonekura et al., 2003). En plus des isoformes solubles, d'autres isoformes membranaires de RAGE ont été identifiés. La dominante négative de RAGE (DN-RAGE) est le résultat d'un épissage alternatif qui donne naissance à un récepteur membranaire identique à RAGE pleine longueur, dont il ne manque que le domaine intracellulaire. Par conséquent, cette forme est incapable d'induire une réponse cellulaire à la suite de la liaison des ligands. En plus, elle entre en compétition pour la liaison des ligands de RAGE pleine longueur et réduit son activation (Ding & Keller, 2005a). En outre, un autre isoforme de RAGE est retrouvé de façon moins abondante que RAGE pleine longueur, il s'agit de Δ N-RAGE. Ce dernier ne possède pas le sous-domaine V et ne peut pas lier la plupart des ligands du récepteur (Yonekura et al., 2003). D'autres isoformes de RAGE sont retrouvés spécifiquement dans le cerveau humain. Les astrocytes et les neurones expriment les isoformes décrits précédemment avec des légères modifications structurales. On trouve la forme RAGE_B qui présente le récepteur pleine longueur manquant une séquence de 16 acides aminés sur sa partie intracellulaire. La structure de la forme soluble de RAGE et le dominant négatif ont été également observés avec un sous domaine C1 tronqué (Ding & Keller, 2005c).

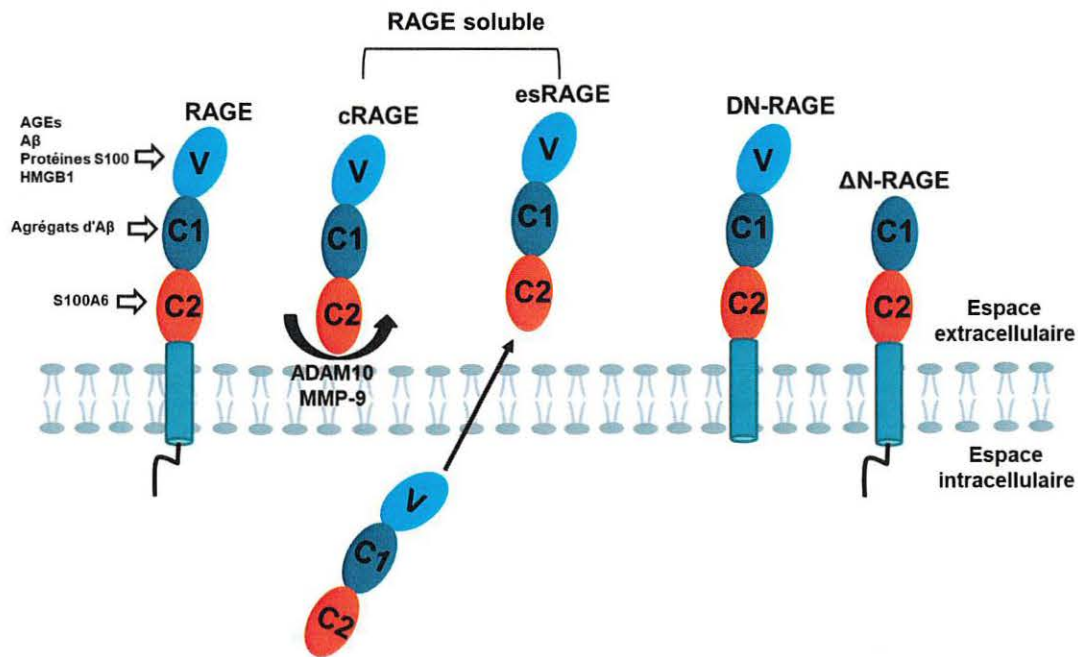


Figure 10: Schéma des différentes formes de RAGE (modifié de (Kierdorf & Fritz, 2013))

La liaison d'un ligand à un récepteur représente l'étape la plus importante pour son activation. L'analyse biochimique de RAGE membranaire indique que ce dernier n'agit pas comme un récepteur monomérique. Généralement, il forme des multimères comprenant au moins quatre récepteurs dans la membrane plasmique. Le sous-domaine C1 est le responsable de l'assemblage des RAGE. La formation des oligomères de RAGE à la membrane semble être un mécanisme important pour la liaison et l'affinité des ligands. Des études ont montré que l'affinité des monomères de RAGE pour ces ligands est généralement plus faible que celle des oligomères. Cette différence est expliquée par la proximité des sous-domaines V engendrée par l'assemblage des récepteurs, ce qui augmente le nombre de sites de liaison disponibles pour le ligand (Kislinger *et al.*, 1999; Xie *et al.*, 2008; Yatime & Andersen, 2013).

1.2.4.2 Les rôles physiologiques de RAGE

RAGE est exprimé dans plusieurs types cellulaires mais son rôle physiologique reste encore relativement mal compris. Les poumons sont les tissus qui présentent une forte expression de ce récepteur (Brett *et al.*, 1993), suggérant un rôle spécifique de ce récepteur dans le maintien de l'homéostasie de cet organe. Il a été montré que les souris qui n'expriment pas le récepteur (RAGE - / -) présentent une altération au niveau des capacités respiratoires. Chez ces animaux, une augmentation de la compliance pulmonaire et une diminution de la capacité expiratoire

maximale sont observées par rapport à des souris qui expriment le récepteur (Al-Robaiy et al., 2013). Sur la base des travaux de Bartling et al qui montrent l'implication de RAGE dans l'adhésion cellulaire (Bartling et al., 2005), il a été montré que RAGE est impliqué dans l'adhésion entre les cellules et leur matrice et permettait ainsi un meilleur étalement cellulaire sur la surface de la membrane basolatérale des poumons (Demling et al., 2006).

RAGE est exprimé dans les cellules osseuses (ostéoclastes et ostéoblastes). Il est impliqué dans la différenciation des ostéoclastes. Il a été montré que les macrophages issus des cultures de moelle osseuse qui n'expriment pas le récepteur (RAGE - / -) semblent plus petites que celles de cultures des cellules normales (Zhou et al., 2006). En plus de son rôle dans la biogenèse des cellules immunitaires par la différenciation des cellules de la moelle osseuse, ce récepteur est présent à la surface de plusieurs cellules immunitaires, dont les macrophages, les monocytes, les neutrophiles, les lymphocytes et les cellules dendritiques. Il est impliqué dans l'immunité innée par la libération des divers facteurs pro-inflammatoire à la suite de l'activation du facteur NF- κ B. Il participe également au recrutement des leucocytes en liant leur intégrine Mac-1. De plus, il forme un complexe avec le récepteur de type Toll-9 qui a la capacité de reconnaître et lier l'ADN provenant de pathogènes (Chavakis et al., 2003; Tian et al., 2007). Il a été montré que des souris qui n'expriment pas le récepteur (RAGE - / -) présentent une inflammation locale faible, une activation moindre de NF- κ B et une réduction de la réponse aux pathogènes (Liliensiek et al., 2004). Dans le cadre d'immunité adaptative, l'administration de sRAGE à des souris naïves provoque l'activation et la maturation des cellules B, ce qui entraîne une sécrétion plus élevée d'IgM et d'IgG et conduit à l'activation des cellules T (Brisslert et al., 2013).

Dans le SNC, RAGE est impliqué dans des conditions physiologiques et pathologiques. L'interaction des RAGE avec les AGEs ou l'A β provoque l'inflammation et l'augmentation du stress oxydatif favorisant la pathogenèse de certains troubles neurologiques comme la MA (Chen et al., 2014a). La liaison de HMGB1 et S100B sur RAGE à de faibles concentrations est impliquée dans de nombreuses fonctions neuronales, notamment la croissance, la migration, la différenciation et la survie des neurites. Cependant, des concentrations élevées induisent la libération des facteurs pro-inflammatoires permettant l'installation d'un état d'inflammation (Huttunen et al., 2000). En plus de l'influence de la concentration, le type de cellule semble également être important dans l'effet des ligands du RAGE. Dans les neurones, la liaison de HMGB1 entraîne la croissance des neurites alors que l'interaction de cette molécule sur RAGE des microglies provoque une réponse inflammatoire (Ding & Keller, 2005b).

1.2.4.3 Les rôles physiopathologiques de RAGE dans la maladie d'Alzheimer

Le récepteur RAGE joue un rôle important dans la MA. Il intervient dans plusieurs mécanismes physiopathologiques impliqués dans cette maladie. Ce récepteur est impliqué dans la formation des plaques séniles dans les cerveaux des patients atteints de la MA puisqu'il assure le transport de ce peptide. Des études ont montré que RAGE agit comme un transporteur important en régulant l'influx d'A β circulant dans le cerveau, alors que l'efflux d'A β dérivé du cerveau dans la circulation via la BHE est mis en œuvre par le récepteur LRP1 et la glycoprotéine P (Deane et al., 2009; Deane et al., 2003). *In vitro*, le peptide A β altère l'intégrité des cellules endothéliales via son interaction avec le récepteur RAGE. En effet, cette interaction perturbe les protéines de jonction serrées et induit la rupture de l'intégrité de la BHE (Chen et al., 2018b; Kook et al., 2012; Wan et al., 2015).

Dans les cerveaux de patients atteints de la MA, RAGE présente une expression plus élevée dans les cellules neuronales et gliales de l'hippocampe et du cortex par rapport au cerveau des sujets contrôlés (Sasaki et al., 2001). La liaison des AGEs et d'A β à la surface du RAGE déclenche des réponses cellulaires impliquées dans le développement et la progression de la MA. Les cascades de signalisation induites sont dépendantes de la nature et de la concentration de ligands et du type cellulaire. Parmi les voies activées par ce récepteur, la voie de NADPH oxydase favorise la formation des ROS et, par conséquent, l'activation du facteur de transcription NF- κ B. De plus, RAGE est impliqué dans l'activation d'autres voies de signalisation telles que les voies des protéines kinase ERK, JNK, MAPK et GSK-3 β qui sont impliquées dans la MA. L'activation de ces voies favorise un état de stress oxydatif, la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α et IL-6 via l'activation de NF- κ B, la formation de PS par la genèse d'A β et la surexpression de BACE1, l'hyperphosphorylation de tau et l'activation des cellules gliales (figure 7) (Arancio et al., 2004; Bourne et al., 2007; Chen et al., 2014b; Li et al., 2013b; Yan et al., 1996).

Contrairement au RAGE, les deux isoformes de sécrétion (le variant d'épissage alternatif (esRAGE) et le variant clivé de RAGE pleine longueur (cRAGE)) circulent librement dans les fluides biologiques. Ces deux isoformes peuvent contribuer à l'élimination ou à la neutralisation des ligands en circulation, permettant ainsi la protection contre les effets néfastes d'activation du RAGE. Certaines études ont démontré la relation entre les taux circulaires du RAGE et la démence. Dans une étude clinique qui portait sur 152 patients atteints de MA, 91 atteints de démence vasculaire et 161 sujets témoins, l'équipe de Emanuele et al. a montré que les taux du

cRAGE plasmatiques étaient significativement réduits chez des patients atteints de la MA par rapport aux patients atteints de démence vasculaire ou des sujets témoins (Emanuele et al., 2005). De plus, un niveau réduit de cette forme circulante a été observé chez des patients présentant une déficience cognitive (MCI) (Ghidoni et al., 2008). La réduction de taux circulaire de RAGE chez les patients MCI et atteints de la MA suggèrent un rôle de RAGE et ces ligands dans la pathogenèse de la maladie.

Tableau 1: Les autres récepteurs des AGEs

Récepteur	Expression cellulaires	Ligands	Rôle
AGE-R1/OST-48 (Li <i>et al.</i> , 1996; Yang <i>et al.</i> , 1991) (Cai <i>et al.</i> , 2006; Vlassara <i>et al.</i> , 2009)	Monocytes Macrophages Lymphocytes T Cellules endothéliales, Fibroblastes Cellules musculaires lisses Cellules neuronales	AGEs	Ce récepteur joue un rôle important dans l'endocytose et la dégradation des AGEs et la protection contre la production des ROS et du stress oxydatif.
AGE-R2/80K-H (Ott <i>et al.</i> , 2014) (Hodgkinson <i>et al.</i> , 2005; Kanai <i>et al.</i> , 1997)	Monocytes Macrophages Lymphocytes T Cellules endothéliales Fibroblastes Cellules musculaires lisses Cellules neuronales	AGEs	La fonction biologique de ce récepteur est peu connue. Mais, il est impliqué dans la signalisation intracellulaire et le trafic vésiculaire.
AGE-R3/galectin-3 (Barondes <i>et al.</i> , 1994; Ott <i>et al.</i> ,	Monocytes	AGEs Fibronectine	Ce récepteur est impliqué dans les processus de migration et d'adhésion, de croissance et de

2014; Pricci <i>et al.</i> , 2000; Yoshii <i>et al.</i> , 2002)	Macrophages, Lymphocytes T Cellules endothéliales Fibroblastes Cellules musculaires lisses Cellules neuronales	Collagène	différenciation cellulaire, ainsi que dans la modulation de la réponse immunitaire.
MSR-AII (Emi <i>et al.</i> , 1993; Kodama <i>et al.</i> , 1990; Ott <i>et al.</i> , 2014) (Araki <i>et al.</i> , 1995)	Monocytes Macrophages Cellules dendritiques Cellules endothéliales	AGEs LDL oxydés Amyloïde bêta	Ce récepteur joue un rôle dans l'endocytose et la dégradation des LDL oxydés et des AGEs.
MSR-BI et CD36 (Gu <i>et al.</i> , 1998; Kuniyasu <i>et al.</i> , 2003; Nakata <i>et al.</i> , 1999; Ohgami <i>et al.</i> , 2001).	Lymphocytes B Cellules endothéliales Cellules épithéliales Adipocytes Plaquettes	AGEs LDL oxydés HDL LDL VLDL Collagène Acide gras à longues chaines	Ce récepteur joue un rôle dans l'endocytose et la dégradation des LDL oxydés et des AGEs, l'adhésion cellulaire et la régulation de transport des acides gras
FEEL-1/FEEL-2 (Ott <i>et al.</i> , 2014; Tamura <i>et al.</i> , 2003)	Macrophage Monocyte Cellules endothéliales	AGEs LDL oxydés et acétylé	Ce récepteur joue un rôle dans l'endocytose et la dégradation des LDL oxydés/acétylés et des AGES.

1.2.5 Les produits avancés de glycation et la maladie d'Alzheimer

Plusieurs études ont montré l'implication des AGEs dans la physiopathologie de la MA. D'une manière indirecte, ces produits sont impliqués dans des processus et mécanismes physiopathologiques du diabète, du syndrome métabolique, du vieillissement et des complications cardiovasculaires, qui sont des facteurs de risque bien connus de la MA (Haddad et al., 2016; Simm, 2013). Des études d'immunohistochimie ont montré que les AGEs s'accumulent dans les plaques séniles et les ENF des cerveaux des patients atteints de la MA (Girones et al., 2004). Cette accumulation augmente dans la région d'hippocampe par rapport au cortex frontal et temporal. Les deux majeurs AGEs trouvés dans les cerveaux des patients atteints de la MA sont le CML et la pentosidine (Horie et al., 1997). Des concentrations élevées de ces deux produits sont identifiées dans les astrocytes et les microglies activées (Takeda et al., 1998). Dans les neurones, les AGEs s'accumulent dans les endosomes et les lysosomes et favorisent la formation des pigments de lipofuscine (Li et al., 1995; Takeda et al., 1996). Une étude qui a été réalisée sur des cerveaux issus des personnes âgées et des personnes atteintes de la MA a montré que le nombre des neurones qui contiennent des AGEs augmentent et corrélient avec l'âge et avec la progression de la maladie. Dans cette étude, les neurones qui montrent des taux élevés des AGEs présentent une augmentation des taux de la protéine tau hyperphosphorylée (Lüth et al., 2005). Ces observations suggèrent un lien entre l'accumulation des AGEs et la formation des ENF. *In vitro*, la formation des AGEs sur le peptide A β favorise son agrégation en présence d'ions de cuivre et de fer. Ceci suggère que les AGEs pourraient accélérer le dépôt et l'agrégation d'A β ainsi que la formation de plaques (Fica-Contreras et al., 2017; Loske et al., 2000). L'interaction entre les AGEs et RAGE induit la génération de stress oxydatif intracellulaire, la libération de cytokines pro-inflammatoires sous forme d'IL6 et de TNF- α , l'augmentation de la libération d'A β et l'hyperphosphorylation de tau (Cai et al., 2016). Dans un modèle animal, une injection en ICV d'A β glyquée provoque un déficit de mémoire chez le rat (Chen et al., 2014a). L'injection intra hippocampique d'AGEs, obtenue à partir de l'incubation du BSA et du glucose, provoque une hyperphosphorylation de tau, une détérioration de la mémoire, une diminution des niveaux de protéines synaptiques et une altération de la potentialisation à long terme (LTP) (Li et al., 2012a).

Il existe peu d'études qui décrivent le profil plasmatique ou sérique de la pentosidine et du CML dans le cadre de la MA. En effet, une augmentation de la concentration de la pentosidine dans le LCR et le sérum chez les patients atteints de la MA par rapport aux témoins a été observée dans différentes études (Meli et al., 2002; Monacelli et al., 2015; Monacelli et al., 2014).

Une autre étude a montré que les taux de CML et du pentosidine sont significativement élevés dans le LCR des patients atteints de la MA et de démence vasculaire par rapport aux témoins (Bar et al., 2003).

1.3 Les vésicules extracellulaires

Les vésicules extracellulaires (EVs) sont des particules de taille nanométriques (qui varient de 30 nm à quelques μm) libérées par la plupart des cellules eucaryotes. Chez l'homme, les EVs se trouvent dans de nombreux fluides biologiques, y compris le sang, l'urine, les larmes et la salive. Ils sont impliqués dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques (Abels & Breakefield, 2016; Raposo & Stoorvogel, 2013). Des images prises par microscopie électronique à transmission révèlent que ces vésicules se caractérisent par une structure sphérique qui est constituée d'une bicouche lipidique (figure 11).

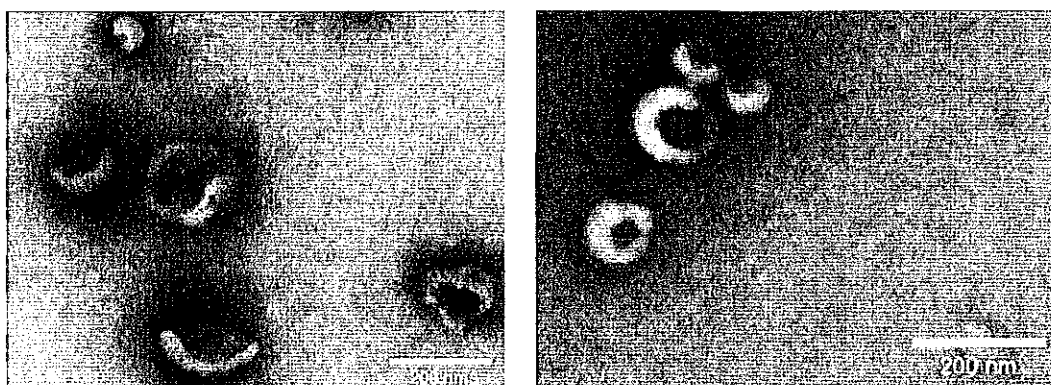


Figure 11: Imageries des vésicules extracellulaires prises par microscopie électronique à transmission (van der Pol et al., 2012)

Les EVs se divisent en trois sous-types qui se distinguent par leur taille et leur voie de biogenèse. Deux d'entre eux sont libérés par les cellules vivantes, il s'agit des exosomes (de diamètre qui varie de 30 à 150 nm) et des microvésicules (diamètre qui varie de 50 à 1000 nm). Le troisième sous type regroupe les corps apoptotiques. Ce sont des vésicules hétérogènes dont le diamètre est compris entre 500 et 5 000 nm. Ils sont libérés des cellules au cours de l'apoptose (Kalra et al., 2016; van der Pol et al., 2016). Les exosomes sont des EVs dont la densité se situe entre 1,13 et 1,19 g/ml dans un gradient de sucrose. Ces petites vésicules sont formées à la suite du phénomène de l'endocytose qui permet la formation d'endosome précoce. Ce dernier se transforme en corps multivésiculaires (MVB) qui contient des vésicules intraluminales (IVs). Le MVB se fusionne avec la membrane plasmique et libère les IVs à l'extérieur de la cellule. Les IVs libérés ont pris la nomination des exosomes (Mathivanan et al., 2010; Thery et al., 2002).

Contrairement aux exosomes, les microvésicules sont libérées par le bourgeonnement de la membrane plasmique suite à un mécanisme soutenu par le remodelage du cytosquelette (Lasser *et al.*, 2018). En fonction de leur type, les EVs renferment plusieurs molécules y compris des protéines, des lipides, des enzymes, du cholestérol, de l'ARN et de l'ADN. Ils jouent un rôle important dans la communication cellulaire. Au cours des dernières années, les intérêts scientifiques se sont dirigés vers les études des EVs en raison de leurs importances en tant qu'outil potentiel de diagnostic ou comme véhicule thérapeutique (Melling *et al.*, 2019; Momen-Heravi *et al.*, 2018).

1.3.1 Mécanismes de biogenèse et de libération

Les EVs issues des cellules vivantes (exosomes et microvésicules) suivent deux différentes routes de biogenèse. La formation des exosomes est dépendant de la voie d'endocytose et la formation des endosomes. L'induction d'endocytose (exemple : interaction ligand-récepteur) permet la déformation de la membrane plasmique vers l'intérieur et la formation d'endosome précoce enfermant une portion de cytosol (Grant & Donaldson, 2009). Ensuite, l'endosome précoce se transforme en endosomes tardifs par l'action des différents complexes protéiques qui assurent la formation des IVs à partir de la membrane endosomale (Stoorvogel *et al.*, 1991). Selon son contenu, l'endosome tardif ou le MVB (corps multivésiculaires) prendra deux différentes directions. Dans le cas où son contenu est destiné à la dégradation, le MVB fusionne avec le lysosome. Dans le second cas, il fusionne avec la membrane cellulaire libérant les IVs dans l'espace extracellulaire (Simons & Raposo, 2009). La formation des IVs est un mécanisme clé dans la biogenèse des exosomes. Ce mécanisme met en jeu différents acteurs qui se distinguent sur deux voies différentes dépendantes et indépendantes d'un complexe protéique appelé ESCRT (endosomal sorting complexe required for transport). Le processus de formation d'IVs dépendant du complexe ESCRT commence lorsque la membrane endosomale est réorganisée en microdomaines spécialisés enrichis en tétraspanines tels que le CD9 et le CD63 (Pols & Klumperman, 2009). Le complexe ESCRT est composé de quatre complexes protéiques (ESCRT-0, I, II et III) dont chacun joue un rôle bien déterminé (figure 12) (Colombo *et al.*, 2013).

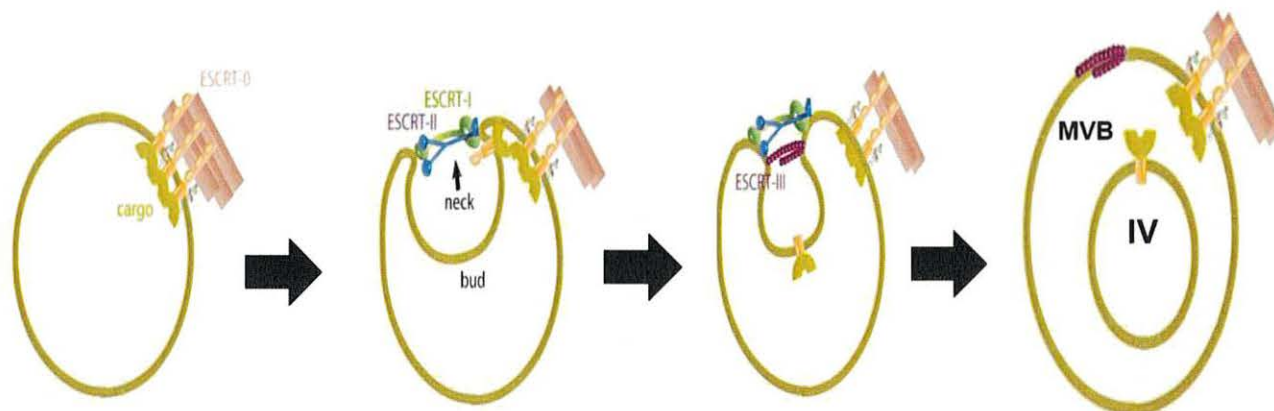


Figure 12: Schéma de mécanisme de formation des exosomes dépendant du complexe ESCRT (modifié de (Wollert & Hurley, 2010))

ESCRT-0 est formé par les deux sous unités Hrs et STAM. Il est recruté à la membrane d'endosome précoce et se lie avec le phospholipide PI (3) P et les protéines ubiquitylées grâce à la protéine Hrs. Ensuite, le complexe ESCRT-0 permet le recrutement du complexe ESCRT-I (qui est formé de deux sous unités TSG101 (tumor susceptibility gene 101) et Vps28)) à la membrane endosomale et forme un complexe ESCRT-0 / ESCRT-I. Ce complexe nouvellement formé recrute le complexe ESCRT-II qui permet la déformation et le bourgeonnement de la membrane endosomale vers l'intérieur. Ce mouvement assure la séquestration des cargos dans la vésicule formée. Le recrutement du complexe ESCRT-III (qui comporte quatre sous unités CHMP 2, 3, 4 et 6 (charged-multivesicular body proteins) et son association avec le complexe ESCRT-I par l'intermédiaire de la protéine Alix (Alg2 Interacting Protein X) favorise la scission de la membrane et aboutit à la formation des IVs (Chiaruttini *et al.*, 2015; Hurley, 2010; Raiborg & Stenmark, 2009). Les exosomes peuvent également être formés d'une manière indépendante du complexe ESCRT. En effet, il a été démontré qu'en absence du complexe ESCRT, les cellules forment et libèrent les exosomes (Stuffers *et al.*, 2009). En plus, la déplétion de la protéine TSG101 par des siRNA diminue de 40% la formation des IVs (Falguieres *et al.*, 2008). Les mécanismes de formation des IVs indépendamment du complexe ESCRT sont mal connus. Cependant, il a été démontré que la biogenèse des IVs nécessite la génération de céramide à partir de sphingomyéline. La céramide formée permet la génération de sous-domaines membranaires favorisant la naissance d'une courbure spontanée au niveau de la membrane endosomale (Trajkovic *et al.*, 2008). De plus, il a été observé que la protéine Alix participe à la biogenèse des exosomes à travers le complexe syndecane-syntenine-Alix (Baietti *et al.*, 2012). Les tetraspanines, tels que les CD 9, 63 et 81, sont impliqués dans la formation des IVs. Ces protéines se regroupent sur la membrane d'endosome et forment des interactions dynamiques

avec différentes protéines transmembranaires et intraendosomale favorisant le bourgeonnement vers l'intérieur (Zimmerman *et al.*, 2016). Une fois formé, le MVB est amené vers la membrane plasmique et la fusion permet de libérer les exosomes. Cette étape met en jeu plusieurs éléments. Le déplacement de MVB vers la membrane est assuré par une famille des petites protéines GTPases nommée Rab (Ras-related in brain). Il a été démontré que les protéines Rab 11, 35, 27A et B interviennent dans ce mécanisme (Hsu *et al.*, 2010; Ostrowski *et al.*, 2010). En plus des protéines Rab, les protéines SNARE (SNAP (Soluble NSF attachment Protein) Receptors) sont impliquées dans la fusion des bicouches lipidiques de la membrane plasmique et du MVB. Ces protéines possèdent une structure en forme d'hélice qui favorise la formation d'un complexe de quatre protéines. Ce complexe assure l'attachement et la fusion entre la membrane plasmique et celle du MVB favorisant la libération des vésicules (Cai *et al.*, 2007; Fader *et al.*, 2009).

Les microvésicules se forment par le bourgeonnement extérieur et la fission de la membrane plasmique des cellules vivantes. Une combinaison d'actions tels que la redistribution des phospholipides membranaire, le repositionnement de la phosphatidylsérine et le mouvement d'actine et myosine entraînent la formation des microvésicules (figure 13). Le bourgeonnement vers l'extérieur commence par l'action des translocases spécifiques comme la floppase ou la scramblase sur la phosphatidylsérine. Le mécanisme moléculaire est ensuite initié par le facteur de ribosylation ADP 6 qui active la phospholipase D. Cette action permet le recrutement de la kinase extracellulaire à régulation de signal (ERK) au niveau de la membrane plasmique. Cette kinase assure la phosphorylation et l'activation d'une deuxième kinase nommée la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK). Une fois activée, cette dernière induit la phosphorylation et l'activation de la myosine et favorise la libération des microvésicules (Akers *et al.*, 2013; Muralidharan-Chari *et al.*, 2009). De plus, il a été montré qu'un autre mécanisme impliquant la protéine TSG101, le complexe ESCRT-III et la protéine Vps ATPase permet la formation et la libération des microvésicules (Nabhan *et al.*, 2012).

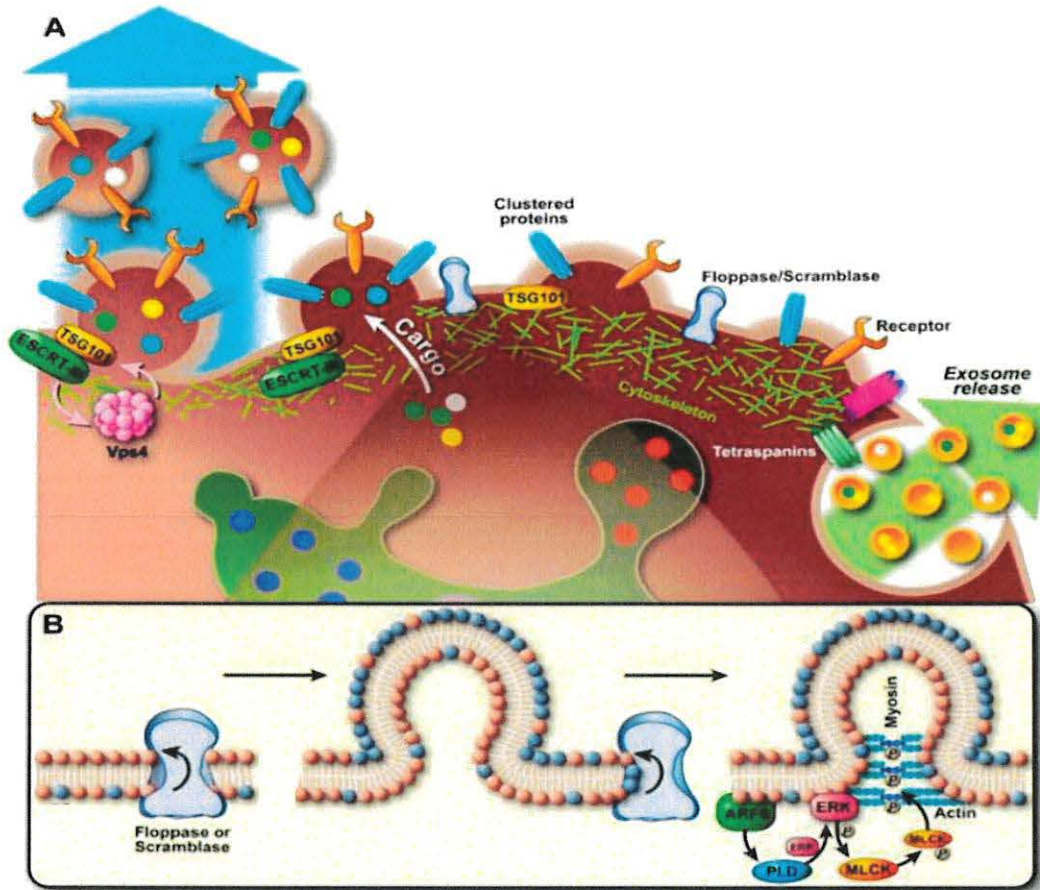


Figure 13: Schéma des mécanismes de formation des microvésicules (modifié de (Kalra et al., 2016))

A: Mécanisme dépendant de ESCRT-III, de TSG101 et de Vps4. B: Mécanisme implique les protéines floppase ou la scramblase, le facteur de ribosylation ADP 6 (ARF6), la phospholipase D (PLD), la kinase extracellulaire à régulation de signal (ERK) et la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK)

1.3.2 Compositions

Différents facteurs peuvent influencer le contenu des EVs, y compris leur nature et leur mode de biogenèse ainsi que le type et les conditions physiologiques des cellules d'origines. Généralement, les EVs peuvent contenir diverses protéines, lipides et acides nucléiques. Il existe différentes bases de données (Exocarta, Vesiclepedia et EVpedia) qui décrivent les contenus des EVs issus de nombreuses études (Keerthikumar et al., 2016; Kim et al., 2013; Pathan et al., 2019). En général, le contenu protéique des EVs inclut des protéines membranaires et cytosoliques et celles qui interviennent dans le mécanisme de biogenèse et de libération. On note la présence des protéines du complexe ESCRT telles que les deux protéines TSG101 et Alix ainsi que les tetraspanines tels que CD63, CD81 et CD9 qui sont actuellement considérés comme des

marqueurs des EVs. De plus, d'autres protéines sont identifiées comme celle du cytosquelette (actine et tubuline), des protéines de présentation d'antigène (CMH I et II) et des enzymes du métabolisme cellulaire comme la GAPDH et GTPase (Kowal et al., 2016). Généralement, les protéines associées au réticulum endoplasmique (comme la calnexine) et à l'appareil de Golgi (cis-Golgi matrix protein, GM130) ne se trouvent pas dans les EVs. Ces protéines sont utilisées comme des marqueurs négatifs afin de déterminer la pureté d'isolation des EVs (Thery et al., 2001). Dans des conditions pathologiques ou physiologiques, les EVs isolés du LCR ou du plasma contiennent des protéines dérivées du cerveau, tels que les marqueurs de la microglie (CD11b et CD45), les marqueurs neuronaux impliqués dans des maladies neurodégénératives comme des prions, des peptides A β , de la protéine tau phosphorylée, le superoxyde dismutase1 (SOD1) et l'alpha-synucléine (Arellano-Anaya et al., 2015; Chiasserini et al., 2014; Xiao et al., 2017). En plus des protéines, les EVs contiennent des lipides. Parmi les lipides identifiés, on retrouve les phospholipides, le cholestérol, des diglycérides et le céramide (Llorente et al., 2013; Skotland et al., 2019; Van Blitterswijk et al., 1982). Les acides nucléiques ont aussi été identifiés au sein des EVs. Des molécules d'ADN génomique et mitochondrial ont été trouvées avec une faible abondance dans les EVs (Guescini et al., 2010; Waldenström et al., 2012). Des séquences d'ARN sont identifiées dans le contenu des vésicules. Différents types d'ARN se présentent comme les ARNm (ARN messager), les miARN (micro ARN) et les ARNr (ribosomique ARN), l'ARNt (ARN de transfert) et les ARN non codantes (Crescitelli et al., 2013; Huang et al., 2013; Xiao et al., 2012) (figure 14).

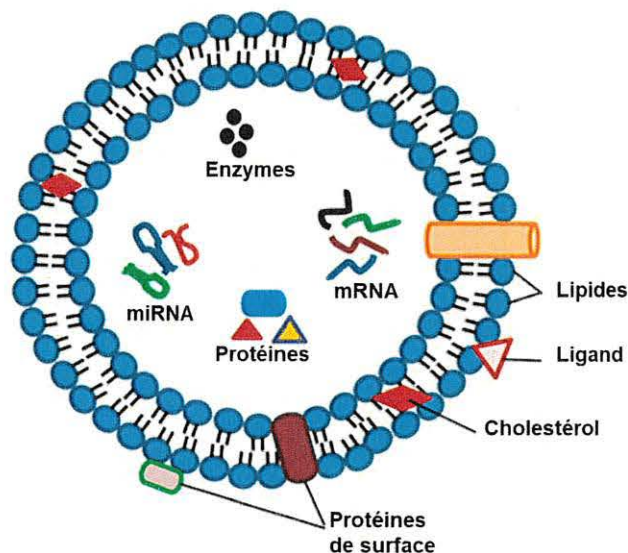


Figure 14: Schéma de la composition des vésicules extracellulaires (modifié de (Akuma et al., 2019))

1.3.3 Mécanismes d'interactions avec les cellules réceptrices

Pour délivrer leur contenu en protéines, lipides et acides nucléiques, les EVs libérés interagissent avec les cellules réceptrices par le biais des différents mécanismes. La capture des EVs dépend du type de la cellule réceptrice et de son état physiologique ainsi que la présence des récepteurs de surface capables de reconnaître des ligands vésiculaires. Généralement, la capture des EVs se fait par fusion avec la membrane plasmique ou par endocytose (figure 15) (Mulcahy et al., 2014).

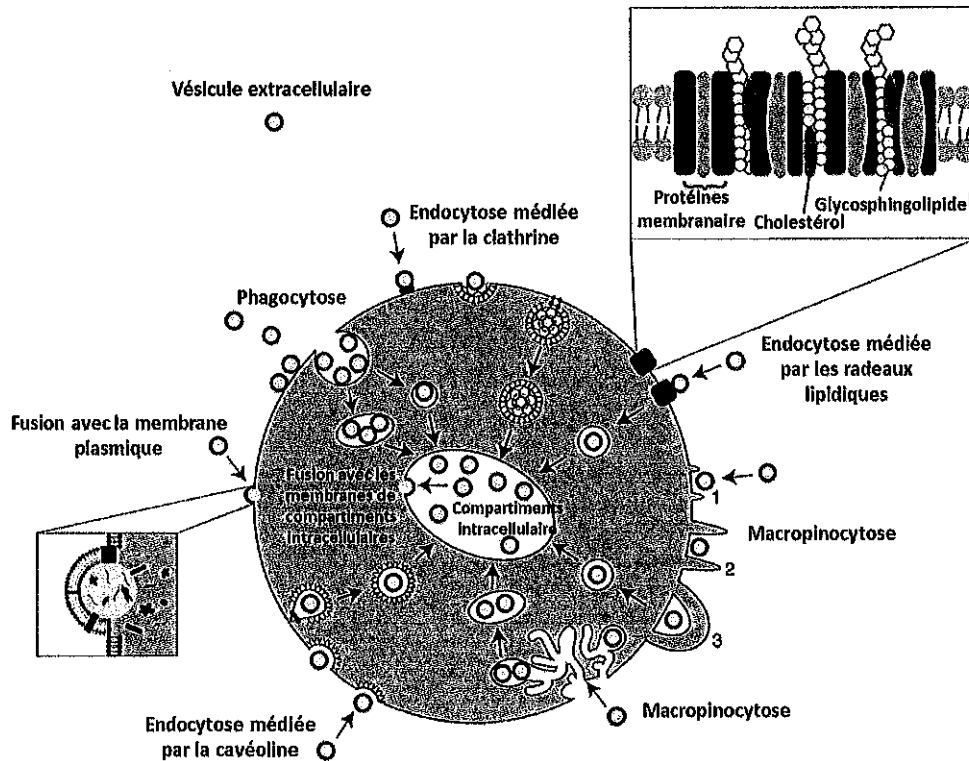


Figure 15: Schéma de différents mécanismes d'interaction des vésicules extracellulaires avec les cellules réceptrices (modifié de (Mulcahy et al., 2014))

Dans le mécanisme de la fusion des membranes, les bicouches lipidiques se rapprochent et les feuillettes externes de la cellule réceptrice et de la vésicule entrent en contact direct. Cette action conduit à la formation d'une tige d'hémifusion avec des feuillettes externes fusionnés. Par la suite, un corps de fusion se forme et les deux membranes génèrent une structure cohérente. Cette action permet la libération de contenus vésiculaires dans le cytoplasme de la cellule réceptrice (Chernomordik & Kozlov, 2008; Jahn et al., 2003). Il existe différentes classes d'endocytose qui permettent l'entrée des vésicules dans les cellules réceptrices y compris l'endocytose médiée par la clathrine, l'endocytose médiée par la cavéoline, l'endocytose médiée par les radeaux lipidiques, la macropinocytose et la phagocytose. Les EVs qui rejoignent la cellule réceptrice par endocytose

peuvent être dirigés vers la voie de dégradation par le lysosome ou ils seront resécrétés de la cellule par la fusion avec un MVB nouvellement formé (Fitzner et al., 2011; Tian et al., 2013). Les interactions entre les récepteurs de la surface cellulaire et les ligands des vésicules jouent un rôle dans l'internalisation des EVs. Il a été montré que l'élimination des protéines de surface des EVs par un traitement avec la protéinase K réduit leur internalisation dans les cellules réceptrices (Escrevente et al., 2011). En effet, il a été montré que les tétraspanines, les intégrines et les protéoglycanes sont des molécules qui favorisent les interactions entre les cellules et les vésicules. Les tétraspanines peuvent interagir avec d'autres tétraspanines ou avec les intégrines. Le blocage des intégrines ou des tétraspanines des EVs par des anticorps spécifiques provoque une réduction de la capture des vésicules par les cellules (Morelli et al., 2004). De plus, le blocage des protéoglycanes de la membrane plasmique de la cellule réceptrice réduit aussi l'internalisation des EVs (Atai et al., 2013). En outre, l'interaction des ligands vésiculaires avec les récepteurs cellulaires peut engendrer le déclenchement d'une voie de signalisation intracellulaire (Cossetti et al., 2014; Patel et al., 2016).

1.3.4 Rôle des vésicules extracellulaires dans la maladie d'Alzheimer

Les fonctions et les rôles des EVs sont actuellement mal connus mais il est clair que ces vésicules assurent la communication entre les cellules. Les cellules résidentes du cerveau comme les neurones, les astrocytes, les microglies et les oligodendrocytes ont la capacité de libérer et de capter les EVs (Fruhbeis et al., 2012; Lachenal et al., 2011). Dans un état physiologique, les EVs sécrétées par les cellules du SNC jouent un rôle important dans la plasticité synaptique, l'activité neuronale et l'élimination des déchets. La plasticité synaptique des neurones est régulée par des processus spécifiques intervenant une contribution des cellules gliales. La communication vésiculaire entre les neurones et les cellules gliales assure le bon fonctionnement neuronal et favorise la croissance des neurites (Bahrini et al., 2015; Wang et al., 2011). En plus, les EVs permettent une communication et un transfert des molécules des oligodendrocytes vers les neurones favorisant la neuroprotection et le maintien de myéline (Fruhbeis et al., 2013; Kramer-Albers et al., 2007). Malgré le rôle important des EVs dans la physiologie du CNS, ces vésicules nanométriques confèrent aussi une menace représentée par leurs capacités de devenir des outils de propagation d'agents pathogènes, notamment dans les maladies neurodégénératives. Dans le cadre de la MA, les EVs jouent un rôle important dans la propagation d'une variété de protéines impliquées dans la physiopathologie de la maladie comme l'A β et la protéine tau hyperphosphorylée. Il a été montré que des taux élevés d'A β 1-42 sont trouvés dans les EVs neuronales chez des patients atteints de la MA par rapport aux personnes saines (Fiandaca et

al., 2015). De plus, les EVs provenant du cerveau montrent la présence des taux élevés du peptide A β sous la forme oligomérique (Sardar Sinha et al., 2018). Ces vésicules sont capables de provoquer l'agrégation d'A β et ils se trouvent aussi dans les PS des cerveaux des patients atteints de la MA (Dinkins et al., 2016; Rajendran et al., 2006). En plus de la présence d'A β à l'intérieur des EVs, ce peptide peut se lier à la surface des EVs par l'intermédiaire du ganglioside GM1 (Hayashi et al., 2004). D'autre part, des recherches ont supposé que la propagation des ENF peut être expliquée par la diffusion des EVs contenant les protéines tau phosphorylées dans les différentes parties du cerveau (Simon et al., 2012; Wang et al., 2017). De plus, des taux élevés de la forme phosphorylées de tau ont été observés dans les EVs des patients malades (Fiandaca et al., 2015; Mustapic et al., 2017). L'injection des EVs issus des patients atteints de la MA dans les cerveaux des souris provoque la phosphorylation et la formation des agrégations de la protéine tau (Winston et al., 2016). En effet, la transmission de cette protéine des microglies vers les neurones à travers les EVs, induit une altération neuronale et la propagation de sa forme phosphorylée. Cependant, la déplétion des microglies et l'inhibition de la libération des EVs favorisent la suppression de la propagation de tau (Asai et al., 2015). En plus des protéines, les EVs contiennent des miARN qui peuvent affecter le comportement des cellules réceptrices. Les miARN sont des petites séquences nucléotidiques non codantes jouant un rôle de régulateur post transcriptionnel lors de son appariement avec une séquence complémentaire d'ARNm qui sera dégradé (Felicetti et al., 2016). Des recherches ont montré que les taux de plusieurs miARN sont modifiés dans les EVs des patients atteints de MA. Parmi eux, de nombreux miARN sont identifiés comme étant impliqués dans la pathogenèse de cette maladie tels que les miR-29a, b-1, -107 et -195. Ces derniers régulent l'expression de la β -sécrétase qui est une enzyme clé dans la production d'A β (Hebert et al., 2008; Iranifar et al., 2019; McKeever et al., 2018).

Les intérêts sont considérablement augmentés à explorer l'utilisation des EVs comme un outil de diagnostic pour la MA. Généralement, il est admis que le contenu des EVs représente l'état physiologique de la cellule sécrétrice. De plus, la présence de ces vésicules dans les fluides corporels tels que le sang, le LCR et l'urine leur confère une accessibilité pour l'identification des biomarqueurs. Récemment, certains contenus protéiques des EVs dérivés des neurones a été proposé comme biomarqueurs sanguins de la MA. Ces vésicules sont isolées du plasma grâce à la présence de L1CAM (Neural cell adhesion molecule L1 precursor) qui est un marqueur de surface des EVs dérivés du SNC (Lachenal et al., 2011). L'analyse des contenus protéiques de ces vésicules a montré des niveaux plus élevés de peptide A β 1-42, de protéine tau total, et phosphorylé p-T181 et p-S396 chez des patients au stade préclinique de la MA par rapport aux personnes saines (Fiandaca et al., 2015). Une autre étude a montré que le niveau de la forme

phosphorylée du récepteur d'insuline 1 dans les EVs d'origine neurale a présenté une grande précision dans la prédiction du développement de la MA (Kapogiannis et al., 2015). De plus, d'autres études ont montré une augmentation des taux de protéines lysosomales (Cathepsine D et LAMP1) et une diminution des taux de protéines synaptiques (synaptophysine, synaptopodine, synaptotagmin-2 et neurogranine) dans les EVs plasmatiques dérivés des neurones des patients atteints de MA (Goetzl et al., 2015; Goetzl et al., 2016). Cependant, la stratégie d'isolation des EVs provenant du SNC en utilisant L1CAM pourrait être non spécifique puisque cette protéine de surface est exprimée dans d'autres types de cellules (Chen et al., 2018a; Debiec et al., 1998). Par conséquent, l'étude des EVs sanguines totales peut offrir une stratégie pour identifier des marqueurs potentiels liés à la MA.

2 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

Mise en contexte

La MA est une maladie neurodégénérative qui se caractérise par une perte progressive et irréversible des neurones du CNS. Parallèlement au processus de dégénérescence cérébrale, des atteintes cognitives et comportementales et une perte de mémoire s'installent et s'aggravent à fur et à mesure que la maladie progresse. Actuellement, le diagnostic certain de ce type de démence est confirmé qu'à la mort du patient par la visualisation de PS et d'ENF sur des coupes histologiques du cerveau. Le diagnostic probable pourrait être établi en se basant sur l'évaluation des fonctions cognitives du patient en utilisant des tests cognitifs comme (MMSE et MoCA), l'imagerie cérébrale et l'analyse du niveau d'A β et de la protéine tau phosphorylé dans le LCR. Cependant, ce diagnostic reste un événement tardif où le cerveau a déjà subi des dommages irréversibles. De plus, la ponction lombaire utilisée pour le prélèvement du LCR est une méthode invasive et présente un risque pour la santé du patient. L'usage d'imageries cérébrales est également coûteux et son accès est limité. En plus, les biomarqueurs utilisés (A β et tau) ne sont pas spécifiques à la MA puisque leurs taux peuvent varier dans le LCR des personnes atteintes d'autres types de démence. Il devient donc important d'identifier des marqueurs du système périphérique permettant de faire le diagnostic le plus précocement possible. Mais, face à la complexité de la maladie et son mécanisme qui est jusqu'à maintenant inconnu, il est difficile de croire qu'une variation au niveau de concentration d'un seul marqueur puisse permettre le diagnostic certain. Par conséquent, une corrélation entre la variation des taux de quelques marqueurs périphériques et les scores des tests cognitifs pourrait offrir un outil permettant la mise en évidence d'un diagnostic précoce précède le développement de la maladie. Néanmoins, certaines molécules du CNS peuvent être présentes à de très faibles concentrations dans le sang à cause de leur incapacité à traverser la BHE et la possibilité qu'ils soient dégradés par des protéases ou absorbés rapidement par le foie et les cellules immunitaires. Dans ce contexte, les EVs sont des vésicules libérées par différents types de cellules y compris les cellules du CNS. Elles jouent un rôle important dans la communication et le transport de plusieurs molécules (protéines, lipides et acides nucléiques). Ces nano vésicules sont considérés comme un outil prometteur de diagnostic puisqu'ils favorisent la protection des cargos qu'ils transportent. L'investigation du contenu des EVs ouvre de nombreuses perspectives.

Les AGEs représentent un groupe de composés hétérogènes. Ces produits sont présents dans la circulation sanguine et dans divers tissus du corps humain. Ils sont formés généralement suite

à l'interaction d'un sucre réducteur avec la fonction amine de la lysine ou d'arginine des protéines. Cette réaction nommée la glycation non enzymatique n'est pas l'unique voie de formation des AGEs. En effet, l'interaction des protéines avec des produits oxydants comme le MG et le GO favorise leur formation. Dans les cerveaux des patients atteints de la MA, des taux élevés de deux produits de glycation (la pentosidine et le CML) ont été identifiés dans la région de l'hippocampe et surtout au niveau des PS et les ENF. Le niveau cérébral de ces produits augmente avec la progression de la maladie. En plus des modifications structurales et fonctionnelles des protéines affectées, la présence de ces produits provoque le développement d'un état de stress oxydatif intracellulaire et la libération des cytokines pro-inflammatoires suite à la liaison au récepteur RAGE. Bien que les taux cérébraux de ces deux produits soient élevés, on ne connaît pas la relation entre leur abondance sanguine et vésiculaire et le déclin cognitif dans la MA.

Les deux précurseurs des AGEs (MG et GO) et leur enzyme de détoxification (GLO-1) jouent un rôle majeur dans la formation et l'accumulation de ces produits. De plus, ils sont impliqués dans des mécanismes clés dans la physiopathologie de la MA comme le stress oxydatif, l'inflammation, l'hyperphosphorylation de tau et la production d'A β . L'abondance de ces deux dicarboxyles (MG et GO) et la diminution de l'activité de GLO-1 favorisent la formation des AGEs et provoquent des altérations cognitives et une perte de mémoire chez des souris. Cependant, leurs concentrations sériques chez les patients à risque de développer la MA (MCI) et les différents stades de cette maladie restent inconnues. On ne connaît pas non plus l'effet de chaque produit (MG et GO) sur les niveaux neuronaux et vésiculaires des marqueurs neurotrophiques, inflammatoires et neurodégénératifs impliqués dans la physiopathologie de la MA.

Hypothèse :

Nous émettons l'hypothèse qu'un profil sanguin, et en particulier vésiculaire de certains AGEs, leurs précurseurs (MG et GO), leur récepteur RAGE et leur enzyme de détoxification (GLO-1) corrélé à des scores cognitifs pourrait être une signature potentielle pour le diagnostic précoce et pour l'évaluation de la progression de la MA. De plus, le MG et le GO pourraient participer à la neurodégénérescence par l'altération des niveaux neuronaux et vésiculaires des marqueurs neurotrophiques, inflammatoires et neurodégénératifs impliqués dans la physiopathologie de la MA.

Objectifs :

Les objectifs du travail sont décrits ci-dessous:

- 1) Établir le profil sérique et vésiculaire des AGEs (pentosidine, CML), de leur précurseurs (MG, GO), leur récepteur RAGE et leur enzyme de détoxification (GLO-1) chez des sujets contrôles (en santé), des patients MCI et des patients atteints de la MA à différents stades et les corrélés avec les données cliniques et les scores des tests cognitifs (MMSE et MoCA).
- 2) Étudier la libération des AGEs, leur récepteur RAGE et leur enzyme de détoxification (GLO-1) par les neurones à travers les vésicules extracellulaires.
- 3) Étudier l'effet du MG et du GO sur les niveaux neuronaux et vésiculaires des marqueurs neurotrophiques, inflammatoires et neurodégénératifs.

3 CHAPITRE 2 : ARTICLE 1

Circulating and extracellular vesicles levels of N-(1-carboxymethyl)-L-lysine (CML) differentiate early to moderate Alzheimer's disease

Auteurs de l'article : Mohamed Haddad ^{1,2}; Morgane Perrotte ^{1,2}; Sarra Landri ^{1,2}; Aurelie Lepage ³ ; Tamás Fülöp ³; Charles Ramassamy ^{1,2*}

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

2 : Institut sur la Nutrition et les Aliments Fonctionnels, Laval University, Qc, Canada

3: Department of Medicine, Geriatric Division, Research Center on Aging, Sherbrooke University, QC Canada

Statut de l'article : Publié dans le journal of Alzheimer disease, mars 2019.

3.1 Résumé et objectifs de l'article 1

Les deux produits de glycation avancés (AGEs) la N- (1-carboxyméthyl) -L-lysine (CML) et la pentosidine ont été trouvés avec des concentrations élevées dans les cerveaux des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA). En plus, la présence de ces deux produits a été associée aux caractéristiques neuropathologiques de cette maladie. Chez les patients atteints de la MA, les niveaux circulants de ces deux types d'AGEs restent inconnu. Leurs niveaux dans les vésicules extracellulaires périphériques (EVs) et leur association avec le déclin cognitif dans la MA restent également à déterminer. Enfin, il est crucial de savoir si les cellules neuronales peuvent libérer et propager des AGEs à travers les EVs. L'objectif du travail était de déterminer les niveaux circulants et vésiculaires du CML et du pentosidine durant la progression de la MA et leur association avec les scores cognitifs. De plus, nous avons étudié la possibilité que les cellules neuronales éliminent et transfèrent ces AGEs via les EVs. Nos résultats montrent que les niveaux du CML dans les la fraction de protéines sériques sans albumine sont plus élevés au stade précoce de la MA, tandis que les niveaux de pentosidine ne montrent pas des différences entre les groupes. En revanche, les niveaux de CML dans les EVs sont plus faibles au stade modéré de la MA. Fait intéressant, les niveaux du CML dans le sérum sont négativement corrélés avec les scores cognitifs MMSE et MoCA. Pour la première fois, nous montrons que le CML est présent dans les EVs libérés des cellules neuronales en culture. En conclusion, les niveaux vésicules et périphériques du CML peuvent différencier les différents stades de la MA (précoce et modérée). Dans le cerveau, le CML peut se propager de cellule en cellule via des EVs.

3.2 Contribution de l'étudiant à l'article 1

La majorité du travail et des expériences décrites dans cette publication ont été réalisées par moi-même (dosage des protéines totales du sérum, dosage du CML et de pentosidine par des kits ELISA, isolation et caractérisation des EVs et culture cellulaires). La mise au point de la technique d'isolation des vésicules extracellulaires sériques a été réalisée avec l'aide de Morgane Perrotte, une ancienne doctorante dans notre laboratoire. La mesure des niveaux des AGEs a été réalisée avec l'aide Sarra Landri, une étudiante en maîtrise dans notre laboratoire. Le recrutement des patients, la collecte et la préparation des échantillons sanguins ont été réalisés grâce aux efforts d'Aurélié Le Page et son superviseur le professeur Tamas Fulop. J'ai également analysé les résultats et écrit les différentes parties de l'article. Ce dernier a ensuite été révisé et corrigé par le professeur Charles Ramassamy. La réponse aux commentaires et aux questions des évaluateurs de l'article a été réalisée par moi-même sous la supervision du professeur Charles Ramassamy.

3.3 Article 1

Circulating and extracellular vesicles levels of N-(1-carboxymethyl)-L-lysine (CML) differentiate early to moderate Alzheimer's disease

Abstract

Background: Both advanced glycation end-products (AGEs) N-(1-carboxymethyl)-L-lysine (CML) and pentosidine were found in AD brain and were associated with the neuropathological hallmarks of AD. In AD patients, the circulating level of both AGEs remains unknown. Moreover, their levels in peripheral extracellular vesicles (EVs) and their association with AD remain to be determined. Finally, it is not known if neuronal cells can release AGEs via EVs and propagate AGEs.

Objectives: To determine the levels of circulating CML and pentosidine during the progression of AD. Moreover, their levels in circulating EVs were determined and their association with the clinical cognitive scores were analyzed. Finally, we have studied the possibility that neuronal cells eliminate and transfer these AGEs through EVs.

Methods: CML and pentosidine levels were measured in serum and in circulating EVs. Released-EVs from SK-N-SH neuronal cells were isolated and CML levels were also determined.

Results: The levels of CML in albumin-free serum proteins were higher in the early stage of AD while the levels of pentosidine remained unchanged. In contrast, the levels of CML in the EVs were lower in the moderate stage of AD. Interestingly, the levels of CML in serum were negatively

correlated with the clinical cognitive scores MMSE and MoCA. For the first time, we were able to demonstrate that CML was present in EVs released from neuronal cells in culture.

Conclusion: Peripheral and circulating EVs levels of CML can differentiate early to moderate AD. In the brain, neuronal CML can propagate from cell-to-cell via EVs.

Keywords: Alzheimer disease, carboxymethyl lysine (CML), pentosidine, extracellular vesicles, MMSE, MoCA,

1. Introduction

Alzheimer disease (AD) is the most common neurodegenerative disease. It will be estimated that more than 50 million people live with dementia worldwide and its prevalence rise to 152 million in 2050, in the absence of prevention strategies and effective treatments [1]. The amyloid β ($A\beta$)-containing plaques and the phosphorylated tau-containing neurofibrillary tangles (NFTs) represent both neuropathological hallmarks of AD.

It is now well recognized that AD dementia is preceded by a long asymptomatic (preclinical) phase followed by a transitional stage with mild cognitive impairment (MCI) [2]. The transitional stage offers an important opportunity for prevention and therapeutic interventions. Currently, the probable AD diagnosis is based on a combination of cognitive tests, neuroimaging and the p-tau/ $A\beta$ 42 ratio in CSF. However, the specificity and sensitivity of these criteria are relatively limited because the amyloid plaques and neurofibrillary tangles are necessary but not sufficient for the development of AD. In addition, the present diagnosis represents a late stage associated with an irreversible brain damage. Thus, the identification and development of specific biomarkers to detect the disease as early as possible represents a great challenge [3].

Many reports have demonstrated the implication of advanced glycation end products (AGEs) in the pathophysiology of AD. AGEs are implicated in diabetic, metabolic syndromes, in aging and cardiovascular complications which are also well-known risk factors for AD development [4-8]. Accordingly, in AD brain, AGEs were found in pyramidal neurons of human hippocampus with an accumulation in endosomes and lysosomes [9, 10]. The interaction between AGEs and their receptors RAGE induces the generation of intracellular oxidative stress, release of pro-inflammatory cytokines as IL6 and TNF-alpha and increases $A\beta$ production and tau hyperphosphorylation [11]. In animal model, an intracerebroventricular injection of glycated $A\beta$ caused memory deficit in rats [12].

AGEs are heterogeneous class of molecules formed nonenzymatically through a series of Maillard reactions, between glucose, or other reducing sugars, and free amino groups such as

lysine and arginine residues of proteins [13]. Alternatively, these compounds can be formed via the interaction between arginine, lysine, cysteine, or tryptophan residues of different proteins and dicarbonyl compounds such as methylglyoxal or glyoxal [14]. The reaction of methylglyoxal with arginine leads to the formation of cyclic imidazolone adducts [15] and other related structural isomers. Its reaction with lysine residues generates the N-(1-carboxyethyl)-L-lysine (CEL) and N-(1-carboxymethyl)-L-lysine (CML) adducts and the lysine dimer 1,3-di(N-lysino)-4-methylimidazolium (MOLD) [16]. Pentosidine, another AGEs, is mainly formed in reactions of pentoses with lysine and arginine. Both CML and pentosidine are generated by an oxidation-dependent mechanism.

In human brain, CML was found in the cytoplasm of neurons with higher expression in hippocampus than in frontal and temporal cortex. In AD, CML and pentosidine are co-localized with microglia and positive GFAP (glial fibrillary acidic protein) astrocytes [17] with the expression of CML being inversely correlated with the Braak staging [18, 19]. CML was identified in the neuronal perikarya in neuritic plaques but not in the core of amyloid plaques, while pentosidine was present in the core of senile plaque and in the fiber-like structure within the neuropil [20]. Neurons which display diffuse cytosolic AGEs and particularly CML immunoreactivity also contain hyperphosphorylated Tau, suggesting a link between AGEs accumulation with the formation of early neurofibrillary tangles [21]. With age, CML was found to be increased in the four regions of the brain, the cerebral cortex, midbrain, striatum, and hippocampus [22]. In AD, the accumulation of CML and pentosidine in the CA1 region of the hippocampus is higher than in controls [23-25]. Altogether, these specific AGEs formed under oxidative conditions [26, 27] seem to be a major contributor to the initiation and development of age-related AD. Taken together, AGEs and particularly CML and pentosidine could be considered as important factors in the development of AD.

Previous studies have evaluated the levels of pentosidine and CML in the serum and CSF from AD patients. However, the results in CSF were controversial and the quantification of pentosidine and CML levels in the serum was performed in total proteins with albumin [28-31]. Albumin, the most abundant circulating protein in serum, may be exposed to glycooxidation which may lead to the formation of various types of AGEs. Thus, we hypothesize that the quantification of total AGEs in serum containing albumin would not be related to AD pathology.

Extracellular vesicles (EVs) such as exosomes play an important role in the secretion and transport of multilevel information, including signalling factors, misfolding proteins, nucleic acid, and regulatory molecules. EVs are small vesicles secreted by all cell types including neurons,

astrocytes and microglia [32-34]. Several studies have suggested the implication of EVs in the propagation of pathogenic proteins in AD. Other studies have demonstrated the presence of AD hallmarks (A β peptide and phosphorylated tau protein) in peripheral EVs in AD patients [35-38]. However, the presence of AGEs in peripheral EVs and their association with AD remain to be determined. Moreover, the propagation of AGEs and particularly CML and pentosidine, in the brain by neuronal cells-derived EVs remains to be demonstrated.

The aim of present study was designed to compare the circulating levels of pentosidine and CML between controls, MCI and AD patients during the progression of the pathology. Then, the association between these peripheral levels of AGEs with two clinical scores, the Mini-Mental State Examination (MMSE) and the Montreal Cognitive Assessment (MoCA) were analyzed. Furthermore, we have explored the possibility of the release of CML by neuronal cells in culture through EVs.

2. Materials and Methods

2.1. Study design and participants

Serum samples from control subjects, MCI and AD patients were generously given by the Memory Clinic of the Sherbrooke. The main characteristics of the population enrolled in this study are summarized in Table 1. The healthy control subjects were defined according to the SENIEUR protocol [39]. Selection of MCI subjects was based on cognitive test scores and Pertersen criteria [40]. The AD patients were selected depending on criteria developed by the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS_ADRDA) and the fourth edition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) published by the American Psychiatric Association in 1984 [41]. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the University of Sherbrooke and informed written consent was obtained from all participants and/or their representatives (protocol #2010-21/Fülöp). All selected subjects, except for the late AD patients, underwent clinical and neuropsychological evaluation including the MoCA and MMSE [42, 43]. Blood was obtained after overnight fasting in heparin-containing vacuum tubes. Blood samples obtained from selected subjects were centrifuged at 3000 rpm for 10 min at 4°C. Blood glucose, albumin, total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol and triglycerides were measured. Serum were collected and stored at -80 °C until analysis.

2.2. Isolation and characterization of extracellular vesicles from serum samples

Serum EVs were isolated by precipitation method using the Total Exosome Isolation reagent (Invitrogen™ by Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA) [44] with minor modifications. For this, serum samples from all groups were clarified by centrifugation at 10,000 × g for 20 minutes to remove debris. 1/5 volume of exosome isolation reagent was added to supernatant and samples were refrigerated at 4 °C for 30 minutes. Then, after centrifugation at 10,000 × g for 5 minutes, EVs pellets were re-suspended in PBS and purified by a series of filtrations and precipitations. Final EVs preparations were re-suspended in PBS, divided in aliquots and conserved at -80°C for further analysis. EVs proteins were extracted using Radio Immuno Precipitation Assay (RIPA) buffer (50mM Tris buffer, pH 8, 150 mM sodium chloride, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1% Igepal, 1% sodium deoxycholate, 5 mM EDTA, 1% protease and phosphatase inhibitor cocktail). The total protein concentration was measured using bicinchoninic acid (BCA) assay (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific, Inc).

2.1.1. Transmission electron microscopy (TEM)

Transmission electron microscopy was used for morphological examination of isolated EVs. EVs preparations were suspended in 2% paraformaldehyde. Ten microliters of mixture were loaded on Formvar-carbon coated grid for 5 minutes. Grids were negatively stained using 2% uranyl acetate solution for 1 minute. The excess fluid was gently removed and grids were observed using the HITACHI 7100 transmission electron microscope (75 kV) at 15000X-40000X magnification.

2.2.2. Nanoparticle tracking analysis (NTA)

Sizes and concentrations of EVs preparations were analysed using a Nanosight NS300 instrument and the Nanosight NTA 3.2 Analytical Software (Malvern Instruments Company, Nanosight, and Malvern, United Kingdom). Diluted EVs suspensions were illuminated by laser light. The light scattered by the particles was captured using a digital camera. The motion of each particle is tracked from frame to frame by the Nanosight NTA 3.2 Analytical Software.

2.2.3. Immunoblot analysis

Twenty micrograms of total EVs proteins were loaded in 10% polyacrylamide gel for electrophoresis. After the separation of proteins according their molecular weight, gel was transferred onto PVDF membranes using a Trans-Blot Turbo System (Bio-Rad). Membranes were blocked for 60 minutes in TBS (Tris-buffered saline) containing 0.1% Tween 20 with 5% skim milk and incubated with primary antibodies: TSG101(tumor susceptibility gene 101) (MyBiosource; 1/2500) or calnexin (Santa Cruz; 1/500) overnight at 4°C. Then, membranes were washed with

TBS-Tween 0.1% and incubated with the secondary antibody HRP-conjugated anti rabbit (Cell Signaling Technology; 1/5000) and anti-mouse (Cell Signaling Technology; 1/1000) for 60 minutes. Detection was realized with ECL substrate (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) and bands were analysed using the luminescent imaging system FluorChem.

2.3. Cell Culture, isolation and characterisation of extracellular vesicles in culture media

Human neuroblastoma cell line SK-N-SH from ATCC (Manassas, VA, USA) was used to isolate EVs. Cells were cultivated in Eagle's minimal essential medium (EMEM) supplemented with 10% (v/v) Foetal Bovine Serum (FBS), 1% sodium pyruvate (1mM) and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin) in 37 °C with 5% CO₂. Cells were grown to 80% of confluence, washed with PBS and incubated in FBS free media for 24 hours. The day after, cell culture supernatant was collected for EVs isolation and cellular total protein was extracted with RIPA buffer containing a cocktail of protease and phosphatase inhibitors. Total Proteins concentrations were measured using BCA assay.

Dead cells and cell debris were removed from medium by successive centrifugations (300 x g for 10 min, 2000 x g for 10 min and 10000 x g for 30 min). The final supernatant was concentrated and precipitated with the Total Exosome Isolation reagent (Invitrogen™ by Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA) to collect the pellet that contains EVs. The EVs pellet was resuspended in PBS and characterized with TEM, NTA and Western-Blot analysis as described above. Total proteins from SK-N-SH cells and EVs cells were extracted with RIPA buffer containing a cocktail of protease inhibitors and were measured using BCA assay.

2.4. Enzyme – Linked Immunosorbent assay (ELISA)

Levels of pentosidine and CML in serum were determined by competitive ELISA provided by MyBioSource, Inc., according to the manufacturer's instructions. The detection range of pentosidine and CML kits was 6.2 to 400 ng/ml and 15.6 to 1000 ng/ml, respectively. To detect and measure CML levels in EVs from all study groups and from SK-N-SH cells, sandwich ELISA provided by Cusabio Biothech Co., Ltd., was used according to the manufacturer's instructions. Detection range of CML kit was 62.5 – 4000 pg/ml.

2.5. Statistical analysis

Data were expressed as mean ± SEM. Statistical analyses were performed with SPSS program using one-way ANOVA analysis followed by LSD test and Student t-test. The statistical correlation

was determined by a linear regression analysis using the Pearson coefficient of correlation. p value less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Main characteristics of patients and control participants.

The main general characteristics of the five groups of participants are reported in the Table 1. MCI and AD participants are older than controls. Mean and standard error of MMSE and MoCA scores were significantly lower in MCI and AD groups compared to control subjects.

Although blood glucose levels were in the physiological range, they were higher in MCI and in moderate AD participants compared to controls. To note, albumin levels in severe AD participants were lower than in controls but remain in the physiological range of circulating levels. The BMI value, the HDL, LDL, TG and total cholesterol levels were not different between groups.

3.2. Determination of Pentosidine and CML levels in serum

Serum proteins are divided in two groups, high and low abundance circulating proteins with albumin being among the most abundant protein. This circulating protein may be exposed to increased glycoxidation stress leading to the formation of various types of AGEs. Therefore, we have measured and compared pentosidine and CML levels in the total serum and in the low abundance circulating proteins without the albumin fraction (S-Ab).

CML levels in the total serum proteins were not different among the five groups (Fig.1.A). However, CML levels in the S-Ab fraction were significantly higher in AD group (101.6 ± 19.19 ng/mL) and specifically in early AD group (92.6 ± 9.94 ng/mg protein) as compared to the control group (56.95 ± 6.55 ng/mg) (Fig.1.B). Pentosidine levels in the total serum proteins and in S-Ab fraction were not different between the five groups (Fig.2).

Interestingly, CML levels in S-Ab were negatively correlated with the MMSE and MoCA scores (Fig.3.A and B) while pentosidine levels were not (Fig.3.D and E). Pentosidine levels in S-Ab were age-dependent (Fig.3.F) but not CML (Fig.3.C).

3.3. CML levels in EVs from total serum

Circulating EVs were isolated from control subjects, MCI and AD patients. The characterization of EVs was based on the analysis of the morphology by TEM, their sizes distribution by the Nanosight system NTA and the presence of exosomal markers TSG101 by Western Blot (Fig.4). TEM images showed that vesicles were surrounded by a lipid layer with a cup-shaped morphology and a size being between 80 to 100 nm diameter (Fig.4.A). The NTA analysis showed that the

density of the most abundant particles have a diameter ranging between 50 and 150 nm (Fig.4.B). Our EVs fraction contained protein TSG101 while calnexin, a negative marker of EVs was absent. SK-N-SH neuronal cells lysate was used as a positive control for the calnexin expression (Fig.4.C).

Our results showed that circulating EVs contained CML. Moreover, CML levels in EVs were lower in moderate AD as compared to control subjects with 38.52 ± 5.69 pg/mL and 67.31 ± 8.99 pg/mL, respectively (Fig.5). To note, levels of CML were 1000-fold higher in serum as compared to EVs levels.

3.4. Isolation and characterisation of neuronal derived-EVs and CML detection

In order to demonstrate that neuronal cells are able to release CML in EVs, we isolated these vesicles from the human SK-N-SH neuronal cells culture supernatant. As in serum-derived EVs, TEM images revealed that these vesicles are surrounded with a lipid layer producing a cup-shaped morphology (Fig.6.A). The expression of EVsmarker was also confirmed by the presence of TSG101 and the absence of calnexin (Fig.6.B). The size distribution of these extracellular vesicles was similar to those from serum (Fig.6.C). Interestingly, our results demonstrated that neuronal cells can release CML in EVs with CML levels in vesicles being ~2.5 fold lower than in cell lysates (Fig.6.D).

4. Discussion

To date, the absence of validated peripheral blood-based biomarkers of AD limit the early detection, the evaluation of the progression of the disease and the development of efficient pharmacotherapy. The actual challenge is to link peripheral biomarkers to brain pathology and cognitive decline. In the present study, we showed that serum levels of CML in S-Ab were higher in AD patients and particularly in early AD. We found that peripheral CML levels were negatively correlated with both cognitive scores MMSE and MoCA. For the first time, we identified that CML are released in circulating EVs. Moreover, we demonstrated that CML is also present in neuronal cells-derived EVs. In contrast to CML, circulating levels of pentosidine were not different between controls and AD patients and were thus not related to the decline of cognitive scores.

There is an abundant literature suggesting that AGEs play a pivotal role in the development of AD. For instance, in AD brain, the amyloid β ($A\beta$) peptide and tau proteins could be the target of glycation leading to their resistance towards hydrolysis by proteases. $A\beta$ -AGEs were found both *in vitro* and *in vivo* [12] and the nucleation-dependent polymerization of $A\beta$ was significantly accelerated by crosslinking with AGEs [45]. The intrahippocampal injection of AGEs, obtained

from BSA-glucose, induced tau hyperphosphorylation, memory deterioration, decline of synaptic proteins, and impairment of long-term potentiation (LTP) through RAGE-mediated glycogen synthase kinase-3 (GSK3 β) activity [46].

AGEs are heterogeneous class of molecules. The challenge is to determine if some specific AGEs could propagate from cell-to cell and if specific circulating AGEs is elevated in MCI or during the progression of the disease. Among different AGEs, we have focused on CML and pentosidine because both were detected in AD hallmarks [23-25, 47]. For instance, CML has been shown to be intense in NFTs [23] likely because tau is a lysine-rich protein. CML was also abundant and elevated in CSF from AD patients. While, pentosidine levels were decreased or remains unchanged [29, 30]. Finally, CML represents the dominant AGEs in human [48]. Our data showed that circulating CML levels do not differentiate MCI to control patients, but it was increased in AD patients. Our results contrast with the previous study from Bar et al., (2003) likely due to the number of AD patients (15 versus 35 in our study) and to the composition of the AD group. In the previous study [29], AD group included mainly moderate and severe AD and the average MMSE scores was 16.3+6.4 while in the present study the elevation of CML was observed only in early AD with the MMSE score being between 23+0.9. Hence, our results showed that peripheral levels of CML could differentiate AD from controls and particularly early AD but their levels in circulating EVs was lower specifically in moderate AD.

In total serum proteins from AD patients, pentosidine levels remain controversial. They were not different between controls and AD or increased in converted MCI subjects to AD patients and remain elevated in AD [28, 30, 31]. Our results in S-Ab fraction confirm that pentosidine levels were not different between control, MCI and AD groups.

It is well-known that high circulating levels of AGEs represents an overall change of physiological functions with an increase of their formation during various chronic diseases such as inflammation, diabetes, metabolic syndrome, insulin resistance, endothelial dysfunction, cardiovascular complication [4, 49-51] or aging [52-54] and is not specifically related to AD. However, these chronic diseases represent a risk factor for the development of AD. As these chronic diseases were not included in our study, our results indicate that the elevation of peripheral CML in early AD and in AD group could be specifically associated to AD which is reinforced with the negative correlation with the cognitive scores.

The presence of peripheral AGEs depends on several factors, including the metabolic rate, the redox state, the small fraction of dietary absorbed AGEs and the turnover rate of the targeted proteins or cells excretion. The abundance of CML could be explained by the multiple pathways

leading to its formation such as the reaction between glucose, other sugars or glyoxal with amino groups of lysine, or by-product of lipids peroxidation and oxidized proteins while pentosidine (protein cross-link) could be formed by the reaction of ribose, glucose, fructose or ascorbate with lysine and arginine [55]. The elevation of CML in early AD observed in this study could be related to the alteration of the antioxidant/oxidant homeostasis and to oxidative damage recently observed in the same group of patients, with an early decrease of the total antioxidant capacity in MCI and an increase of the protein carbonyls observed in early AD [56]. Similarly, several previous studies have also demonstrated that oxidative-induced damages increased early in AD [57-63]. In addition, CML is also a RAGE receptor ligand. The interaction of CML with RAGE causes the generation of intracellular oxidative stress, release of proinflammatory factors as IL6 and TNF alpha and increase A β production and tau hyperphosphorylation [64, 65]. Hence, the increase of circulating CML could be the consequence of the modification of the redox environment which could, in turn, induce oxidative stress.

Albumin is the major circulating proteins and most of AGEs are composed of glycated albumin protein. Therefore, we have determined the levels of CML and pentosidine in the total serum proteins and compared with their levels in the low abundance circulating proteins without the albumin fraction. Interestingly, our data showed that they are higher in S-Ab. Moreover, when CML levels were determined in the low abundance proteins in serum, they were elevated in early AD and are negatively associated to cognitive decline. Hence, the level of CML in S-Ab is a better representation of the cognitive status than the total circulating CML.

In AD brain, A β peptides and tau protein can be glycated and formed CML. This complex A β -CML or Tau-CML can also efflux through the blood brain barrier (BBB) to the circulation [66]. When AD progress, brain glycated proteins and peptides accumulate and form aggregates that cannot cross the BBB. This property can explain the elevation of circulating CML levels only in early AD and not with the progression of the disease. However, the explanation of the variability of CML and pentosidine levels in blood and brain, need further investigations.

Recently, it has been suggested that EVs released by brain cells are able to cross the BBB and can be detected in blood [67]. As we have demonstrated that the EVs-derived human neuronal cell-line SK-N-SH contained CML, thus we cannot exclude the possibility that a fraction of the CML-containing EVs in the circulation were from the brain. These results are of great interest because more and more studies suggest that the EVs are responsible of the propagation of pathological proteins such as phosphorylated tau, A β peptide or α -synuclein oligomer in neurodegenerative diseases. They can also play a role in communication across the BBB

between the brain and periphery [37, 68-70]. AGEs formation promotes aggregation and intracellular accumulation of proteins. We hypothesize that with AD progression there is an accumulation of glycated proteins and peptides in the brain which form aggregates that cannot to be released by EVs. Therefore, decreased EVs CML in MS of AD can be explained by accumulation of CML-proteins in the brain.

These results strengthen the notion that peripheral EVs might serve as relevant material for developing biomarkers for the central nervous system diseases.

5. Conclusion

In conclusion, the present study demonstrated that the association between the serum/S-Aβ CML levels and cognitive scores. It can be an useful diagnostic markers for early stage of AD. In the brain, some CML can propagate from cells to cells by EVs and further studies are required to better understand the roles of specific AGEs in EVs.

6. Acknowledgements

This work was supported by the Chaire Louise & André Charron on Alzheimer's disease, Fondation Armand-Frappier (CR) and CIHR grant (TF).

7. References

- [1] World Alzheimer Report (2018) The state of the art of dementia research: New frontiers, www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2018.pdf,
- [2] Budson AE, Solomon PR (2012) New criteria for Alzheimer disease and mild cognitive impairment: implications for the practicing clinician. *Neurologist* 18, 356-363.
- [3] Molinuevo JL, Ayton S, Batrla R, Bednar MM, Bittner T, Cummings J, Fagan AM, Hampel H, Mielke MM, Mikulskis A, O'Bryant S, Scheltens P, Sevigny J, Shaw LM, Soares HD, Tong G, Trojanowski JQ, Zetterberg H, Blennow K (2018) Current state of Alzheimer's fluid biomarkers. *Acta Neuropathologica* 136, 821-853.
- [4] Haddad M, Knani I, Bouzidi H, Berriche O, Hammami M, Kerkeni M (2016) Plasma Levels of Pentosidine, Carboxymethyl-Lysine, Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products, and Metabolic Syndrome: The Metformin Effect. *Disease Markers* 2016, 6248264.
- [5] Simm A, Müller B, Nass N, Hofmann B, Bushnaq H, Silber R-E, Bartling B (2015) Protein glycation — Between tissue aging and protection. *Experimental Gerontology* 68, 71-75.

- [6] Simm A (2013) Protein glycation during aging and in cardiovascular disease. *J Proteomics* 92, 248-259.
- [7] Kerkeni M, Saldi A, Bouzidi H, Letaief A, Ben Yahia S, Hammami M (2013) Pentosidine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients. *Diab Vasc Dis Res* 10, 239-245.
- [8] Takeuchi M, Yamagishi S (2009) Involvement of toxic AGEs (TAGE) in the pathogenesis of diabetic vascular complications and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 16, 845-858.
- [9] Takedo A, Yasuda T, Miyata T, Mizuno K, Li M, Yoneyama S, Horie K, Maeda K, Sobue G (1996) Immunohistochemical study of advanced glycation end products in aging and Alzheimer's disease brain. *Neurosci Lett* 221, 17-20.
- [10] Li JJ, Surini M, Catsicas S, Kawashima E, Bouras C (1995) Age-dependent accumulation of advanced glycosylation end products in human neurons. *Neurobiol Aging* 16, 69-76.
- [11] Cai Z, Liu N, Wang C, Qin B, Zhou Y, Xiao M, Chang L, Yan LJ, Zhao B (2016) Role of RAGE in Alzheimer's Disease. *Cell Mol Neurobiol* 36, 483-495.
- [12] Chen C, Li XH, Tu Y, Sun HT, Liang HQ, Cheng SX, Zhang S (2014) Abeta-AGE aggravates cognitive deficit in rats via RAGE pathway. *Neuroscience* 257, 1-10.
- [13] Maillard LC, Acad CR (1912) *Sci. Ser.* 2 154, 66.
- [14] Yang K, Qiang D, Delaney S, Mehta R, Bruce WR, O'Brien PJ (2011) Differences in glyoxal and methylglyoxal metabolism determine cellular susceptibility to protein carbonylation and cytotoxicity. *Chem Biol Interact* 191, 322-329.
- [15] Thornalley PJ, Battah S, Ahmed N, Karachalias N, Agalou S, Babaei-Jadidi R, Dawnay A (2003) Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem J* 375, 581-592.
- [16] Lo TW, Westwood ME, McLellan AC, Selwood T, Thornalley PJ (1994) Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N alpha-acetylarginine, N alpha-acetylcysteine, and N alpha-acetyllysine, and bovine serum albumin. *J Biol Chem* 269, 32299-32305.
- [17] Takeda A, Yasuda T, Miyata T, Goto Y, Wakai M, Watanabe M, Yasuda Y, Horie K, Inagaki T, Doyu M, Maeda K, Sobue G (1998) Advanced glycation end products co-localized with astrocytes and microglial cells in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol* 95, 555-558.

- [18] Luth HJ, Ogunlade V, Kuhla B, Kientsch-Engel R, Stahl P, Webster J, Arendt T, Munch G (2005) Age- and stage-dependent accumulation of advanced glycation end products in intracellular deposits in normal and Alzheimer's disease brains. *Cereb Cortex* 15, 211-220.
- [19] Girones X, Guimera A, Cruz-Sanchez CZ, Ortega A, Sasaki N, Makita Z, Lafuente JV, Kalaria R, Cruz-Sanchez FF (2004) N epsilon-carboxymethyllysine in brain aging, diabetes mellitus, and Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 36, 1241-1247.
- [20] Horie K, Miyata T, Yasuda T, Takeda A, Yasuda Y, Maeda K, Sobue G, Kurokawa K (1997) Immunohistochemical localization of advanced glycation end products, pentosidine, and carboxymethyllysine in lipofuscin pigments of Alzheimer's disease and aged neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 236, 327-332.
- [21] Ko LW, Ko EC, Nacharaju P, Liu WK, Chang E, Kenessey A, Yen SH (1999) An immunochemical study on tau glycation in paired helical filaments. *Brain Res* 830, 301-313.
- [22] Thangthaeng N, Sumien N, Forster MJ (2008) Dissociation of functional status from accrual of CML and RAGE in the aged mouse brain. *Exp Gerontol* 43, 1077-1085.
- [23] Castellani RJ, Harris PL, Sayre LM, Fujii J, Taniguchi N, Vitek MP, Founds H, Atwood CS, Perry G, Smith MA (2001) Active glycation in neurofibrillary pathology of Alzheimer disease: N(epsilon)-(carboxymethyl) lysine and hexitol-lysine. *Free Radic Biol Med* 31, 175-180.
- [24] Jono T, Kimura T, Takamatsu J, Nagai R, Miyazaki K, Yuzuriha T, Kitamura T, Horiuchi S (2002) Accumulation of imidazolone, pentosidine and Nε-(carboxymethyl)lysine in hippocampal CA4 pyramidal neurons of aged human brain. *Pathology International* 52, 563-571.
- [25] Kimura T, Takamatsu J, Miyata T, Miyakawa T, Horiuchi S (1998) Localization of identified advanced glycation end-product structures, N epsilon(carboxymethyl)lysine and pentosidine, in age-related inclusions in human brains. *Pathol Int* 48, 575-579.
- [26] Rofina JE, Singh K, Skoumalova-Vesela A, van Ederen AM, van Asten AJ, Wilhelm J, Gruys E (2004) Histochemical accumulation of oxidative damage products is associated with Alzheimer-like pathology in the canine. *Amyloid* 11, 90-100.
- [27] Kosenko EA, Solomadin IN, Tikhonova LA, Reddy VP, Aliev G, Kaminsky YG (2014) Pathogenesis of Alzheimer disease: role of oxidative stress, amyloid-beta peptides, systemic ammonia and erythrocyte energy metabolism. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 13, 112-119.

- [28] Meli M, Perier C, Ferron C, Parssegny F, Denis C, Gonthier R, Laurent B, Reynaud E, Frey J, Chamson A (2002) Serum pentosidine as an indicator of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 4, 93-96.
- [29] Bar KJ, Franke S, Wenda B, Muller S, Kientsch-Engel R, Stein G, Sauer H (2003) Pentosidine and N(epsilon)-(carboxymethyl)-lysine in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurobiol Aging* 24, 333-338.
- [30] Monacelli F, Borghi R, Pacini D, Serrati C, Traverso N, Odetti P (2014) Pentosidine determination in CSF: a potential biomarker of Alzheimer's disease? *Clin Chem Lab Med* 52, 117-120.
- [31] Monacelli F, Borghi R, Cammarata S, Nencioni A, Piccini A, Tabaton M, Odetti P (2015) Amnesic mild cognitive impairment and conversion to Alzheimer's disease: insulin resistance and glycooxidation as early biomarker clusters. *J Alzheimers Dis* 45, 89-95.
- [32] Yuyama K, Igarashi Y (2016) Physiological and pathological roles of exosomes in the nervous system. *Biomol Concepts* 7, 53-68.
- [33] Quek C, Hill AF (2017) The role of extracellular vesicles in neurodegenerative diseases. *Biochem Biophys Res Commun* 483, 1178-1186.
- [34] Zhang G, Yang P (2018) A novel cell-cell communication mechanism in the nervous system: exosomes. *J Neurosci Res* 96, 45-52.
- [35] Pluta R, Ułamek-Kozioł M, Januszewski S, Czuczwar SJ (2018) Exosomes as possible spread factor and potential biomarkers in Alzheimer's disease: current concepts. *Biomarkers in Medicine* 12, 1025-1033.
- [36] Malm T, Loppi S, Kanninen KM (2016) Exosomes in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International* 97, 193-199.
- [37] Yuyama K, Igarashi Y (2017) Exosomes as Carriers of Alzheimer's Amyloid- β . *Frontiers in Neuroscience* 11.
- [38] Fiandaca MS, Kapogiannis D, Mapstone M, Boxer A, Eitan E, Schwartz JB, Abner EL, Petersen RC, Federoff HJ, Miller BL, Goetzl EJ (2015) Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study. *Alzheimer's & Dementia* 11, 600-607.e601.
- [39] Pawelec G, Ferguson FG, Wikby A (2001) The SENIEUR protocol after 16 years. *Mech Ageing Dev* 122, 132-134.

- [40] Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E (1999) Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* 56, 303-308.
- [41] McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease. Report of the NINCDS-ADRDA Work Group* under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease 34, 939-939.
- [42] Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR (1975) "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12, 189-198.
- [43] Nasreddine ZS, Phillips NA, Bedirian V, Charbonneau S, Whitehead V, Collin I, Cummings JL, Chertkow H (2005) The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *J Am Geriatr Soc* 53, 695-699.
- [44] Li M, Rai AJ, Joel DeCastro G, Zeringer E, Barta T, Magdaleno S, Setterquist R, Vlassov AV (2015) An optimized procedure for exosome isolation and analysis using serum samples: Application to cancer biomarker discovery. *Methods* 87, 26-30.
- [45] Loske C, Gerdemann A, Schepl W, Wycislo M, Schinzel R, Palm D, Riederer P, Munch G (2000) Transition metal-mediated glycooxidation accelerates cross-linking of beta-amyloid peptide. *Eur J Biochem* 267, 4171-4178.
- [46] Li XH, Lv BL, Xie JZ, Liu J, Zhou XW, Wang JZ (2012) AGEs induce Alzheimer-like tau pathology and memory deficit via RAGE-mediated GSK-3 activation. *Neurobiol Aging* 33, 1400-1410.
- [47] Smith MA, Taneda S, Richey PL, Miyata S, Yan SD, Stern D, Sayre LM, Monnier VM, Perry G (1994) Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5710-5714.
- [48] Dunn JA, McCance DR, Thorpe SR, Lyons TJ, Baynes JW (1991) Age-dependent accumulation of N epsilon-(carboxymethyl)lysine and N epsilon-(carboxymethyl)hydroxylysine in human skin collagen. *Biochemistry* 30, 1205-1210.
- [49] Tan KC, Shiu SW, Wong Y, Tam X (2011) Serum advanced glycation end products (AGEs) are associated with insulin resistance. *Diabetes Metab Res Rev* 27, 488-492.
- [50] Tahara N, Yamagishi S, Matsui T, Takeuchi M, Nitta Y, Kodama N, Mizoguchi M, Imaizumi T (2012) Serum levels of advanced glycation end products (AGEs) are independent correlates of insulin resistance in nondiabetic subjects. *Cardiovasc Ther* 30, 42-48.

- [51] Nowotny K, Jung T, Hohn A, Weber D, Grune T (2015) Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules* 5, 194-222.
- [52] Van Puyvelde K, Mets T, Njemini R, Beyer I, Bautmans I (2014) Effect of advanced glycation end product intake on inflammation and aging: a systematic review. *Nutr Rev* 72, 638-650.
- [53] Uribarri J, Cai W, Peppas M, Goodman S, Ferrucci L, Striker G, Vlassara H (2007) Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62, 427-433.
- [54] Fournet M, Bonte F, Desmouliere A (2018) Glycation Damage: A Possible Hub for Major Pathophysiological Disorders and Aging. *Aging Dis* 9, 880-900.
- [55] Vistoli G, De Maddis D, Cipak A, Zarkovic N, Carini M, Aldini G (2013) Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radic Res* 47 Suppl 1, 3-27.
- [56] Perrotte M, Le Page A, Fournet M, Le Sayec M, Rassart E, Fulop T, Ramassamy C (2018) Blood-based redox-signature and their association to the cognitive scores in MCI and Alzheimer's disease patients. *Free Radic Biol Med* 130, 499-511.
- [57] Greilberger J, Koidl C, Greilberger M, Lamprecht M, Schroecksadel K, Leblhuber F, Fuchs D, Oetl K (2008) Malondialdehyde, carbonyl proteins and albumin-disulphide as useful oxidative markers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Free Radic Res* 42, 633-638.
- [58] Puertas MC, Martinez-Martos JM, Cobo MP, Carrera MP, Mayas MD, Ramirez-Exposito MJ (2012) Plasma oxidative stress parameters in men and women with early stage Alzheimer type dementia. *Exp Gerontol* 47, 625-630.
- [59] Ramassamy C, Averill D, Beffert U, Bastianetto S, Theroux L, Lussier-Cacan S, Cohn JS, Christen Y, Davignon J, Quirion R, Poirier J (1999) Oxidative damage and protection by antioxidants in the frontal cortex of Alzheimer's disease is related to the apolipoprotein E genotype. *Free Radic Biol Med* 27, 544-553.
- [60] Barnham KJ, Masters CL, Bush AI (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* 3, 205-214.

- [61] Di Domenico F, Coccia R, Butterfield DA, Perluigi M (2011) Circulating biomarkers of protein oxidation for Alzheimer disease: expectations within limits. *Biochim Biophys Acta* 1814, 1785-1795.
- [62] Zhao Y, Zhao B (2013) Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev* 2013, 316523.
- [63] Di Domenico F, Pupo G, Giraldo E, Badia MC, Monllor P, Lloret A, Schinina ME, Giorgi A, Cini C, Tramutola A, Butterfield DA, Vina J, Perluigi M (2016) Oxidative signature of cerebrospinal fluid from mild cognitive impairment and Alzheimer disease patients. *Free Radic Biol Med* 91, 1-9.
- [64] Barlovic DP, Soro-Paavonen A, Jandeleit-Dahm KA (2011) RAGE biology, atherosclerosis and diabetes. *Clin Sci (Lond)* 121, 43-55.
- [65] Choudhuri S, Dutta D, Sen A, Chowdhury IH, Mitra B, Mondal LK, Saha A, Bhadhuri G, Bhattacharya B (2013) Role of N-epsilon- carboxy methyl lysine, advanced glycation end products and reactive oxygen species for the development of nonproliferative and proliferative retinopathy in type 2 diabetes mellitus. *Mol Vis* 19, 100-113.
- [66] Irazuzta JE, de Courten-Myers G, Zemlan FP, Bekkedal MY, Rossi J, 3rd (2001) Serum cleaved Tau protein and neurobehavioral battery of tests as markers of brain injury in experimental bacterial meningitis. *Brain Res* 913, 95-105.
- [67] Kanninen KM, Bister N, Koistinaho J, Malm T (2016) Exosomes as new diagnostic tools in CNS diseases. *Biochim Biophys Acta* 1862, 403-410.
- [68] Danzer KM, Kranich LR, Ruf WP, Cagsal-Getkin O, Winslow AR, Zhu L, Vanderburg CR, McLean PJ (2012) Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers. *Mol Neurodegener* 7, 42.
- [69] Saman S, Kim W, Raya M, Visnick Y, Miro S, Saman S, Jackson B, McKee AC, Alvarez VE, Lee NC, Hall GF (2012) Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *J Biol Chem* 287, 3842-3849.
- [70] Asai H, Ikezu S, Tsunoda S, Medalla M, Luebke J, Haydar T, Wolozin B, Butovsky O, Kugler S, Ikezu T (2015) Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci* 18, 1584-1593.

Table 1: Characteristics of patients and controls participants.

Parameters	Controls subjects (n=13)	MCI patients (n=14)	AD patients		
			ES (AD) (n=17)	MS (AD) (n=9)	LS (AD) (n=12)
Sex (M/F)	2/11	4/10	3/14	2/7	3/9
Age (years)	69.68 ± 1.15	73.29 ± 1.4 ^a	79.41 ± 1.3 ^c	80.78 ± 1.3 ^c	81.58 ± 1.6 ^c
MMSE scores (/30)	29.62 ± 0.2	27.07 ± 0.52 ^a	23.65 ± 0.9 ^c	21.11 ± 1.3 ^c	ND
MoCA scores (/30)	27.62 ± 0.6	22.71 ± 0.9 ^b	16.8 ± 0.9 ^c	11.11 ± 1.6 ^c	ND
BMI (kg/m ²)	29.06 ± 0.9	26.69 ± 1.1	31.23 ± 2.2	28.77 ± 2.4	26.25 ± 1.59
Glucose (mmol/l)	4.56 ± 0.17	5.07 ± 0.18 ^a	4.87 ± 0.14	5.52 ± 0.3 ^c	4.45 ± 0.13
LDL (mmol/l)	2.88 ± 0.19	3.17 ± 0.31	2.68 ± 0.24	2.54 ± 0.31	2.83 ± 0.3
HDL (mmol/l)	1.53 ± 0.31	1.47 ± 0.12	1.48 ± 0.1	1.37 ± 0.12	1.24 ± 0.07
Triglycerides (mmol/l)	1.64 ± 0.31	1.47 ± 0.15	1.56 ± 0.2	1.87 ± 0.36	1.61 ± 0.24
Total cholesterol (mmol/l)	4.92 ± 0.34	5.32 ± 0.41	4.68 ± 0.29	4.96 ± 0.4	4.61 ± 0.41
Albumin (g/L)	44.26 ± 0.48	43.71 ± 0.77	43.96 ± 0.52	42.9 ± 1.49	38.08 ± 0.82 ^c

Values are mean ± standard error of the mean (SEM). Abbreviations: AD: Alzheimer's disease; ES: early stage of Alzheimer's disease; MS: Moderate-stage of Alzheimer's disease; LS: late-stage of Alzheimer's disease; MMSE. mini-mental state examination; MoCA. Montreal cognitive assessment; BMI: body mass index; HDL: high density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein; ND: not detected.

MMSE and MOCA scores are not detected in LS patients because of their incapacity to accomplish the tests.

Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA followed by LSD test with ^a p < 0.05, ^b p < 0.01, ^c p < 0.001 versus controls subjects.

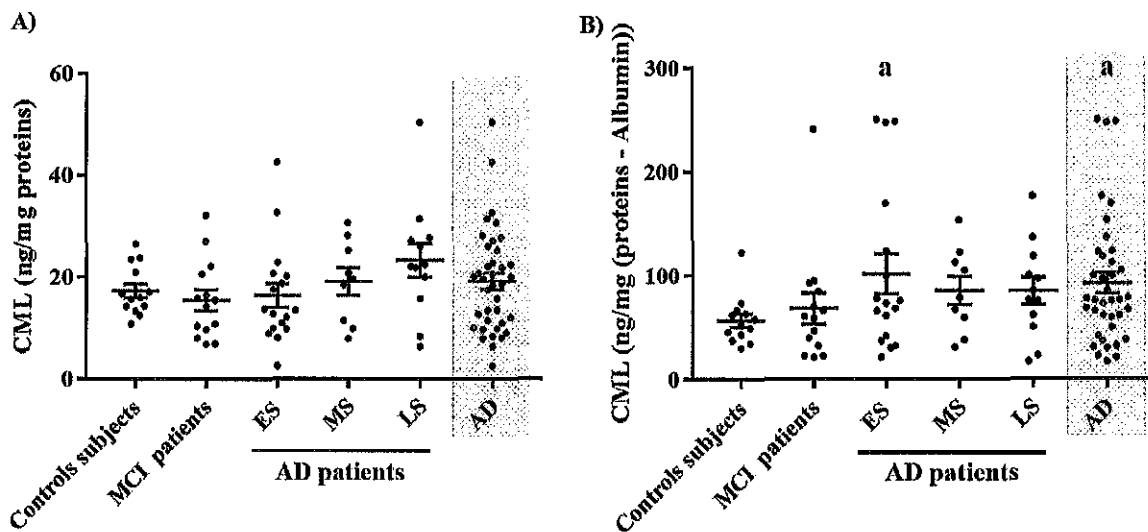


Figure 1. Serum CML levels in controls, MCI and different groups of AD patients. A: CML levels in total serum proteins. B: CML levels expressed in total serum proteins without albumin (S-Ab). Difference between groups were analyzed with one-way ANOVA followed by the LSD post-hoc test. Values are mean \pm S.E.M with ^a: $p < 0.05$ versus Controls subjects.

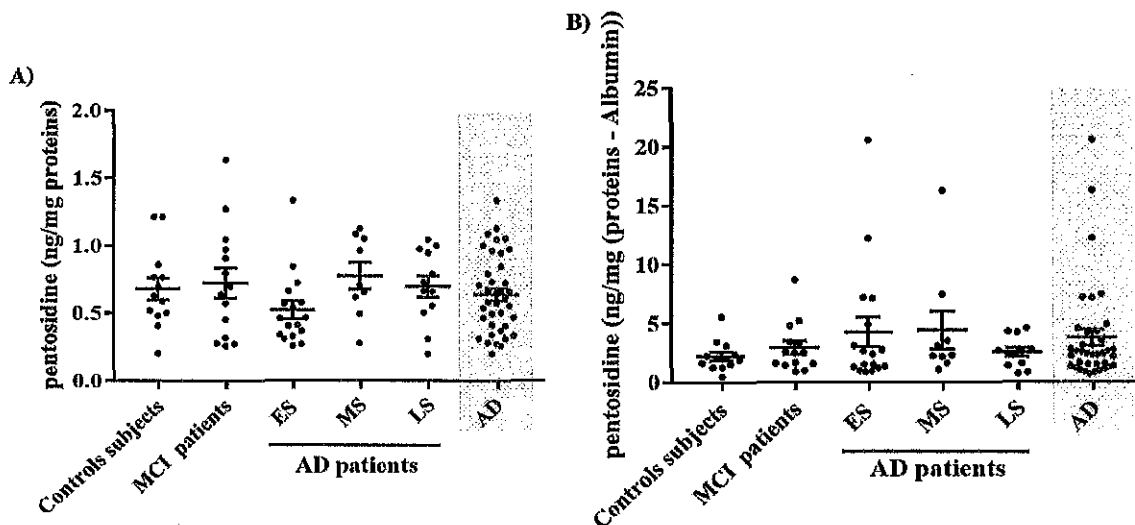


Figure 2. Serum pentosidine levels in control subjects, MCI and AD patients. A: Pentosidine levels in total serum proteins. B: Pentosidine levels expressed in total serum proteins without albumin (S-Ab). Data groups were compared with analysis of variance one-way ANOVA followed by LSD post hoc test. Values are mean \pm standard error of the mean.

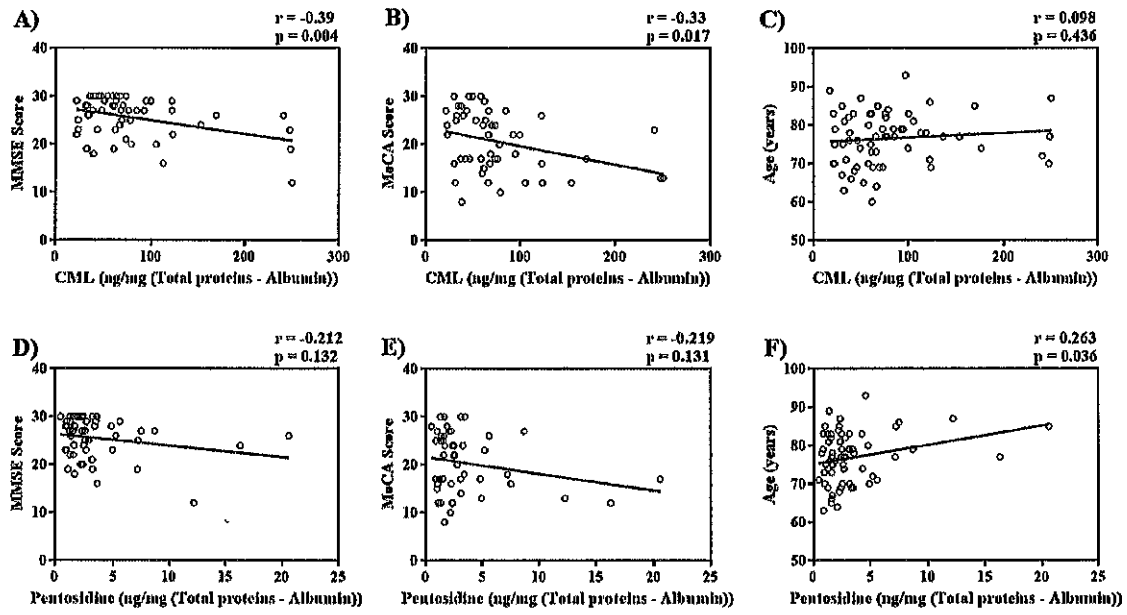


Figure 3. Statistical correlation between CML and pentosidine levels expressed in total serum proteins without albumin (S-Ab) and cognitive scores (MMSE and MoCA) and age (years) obtained with the Pearson correlation.

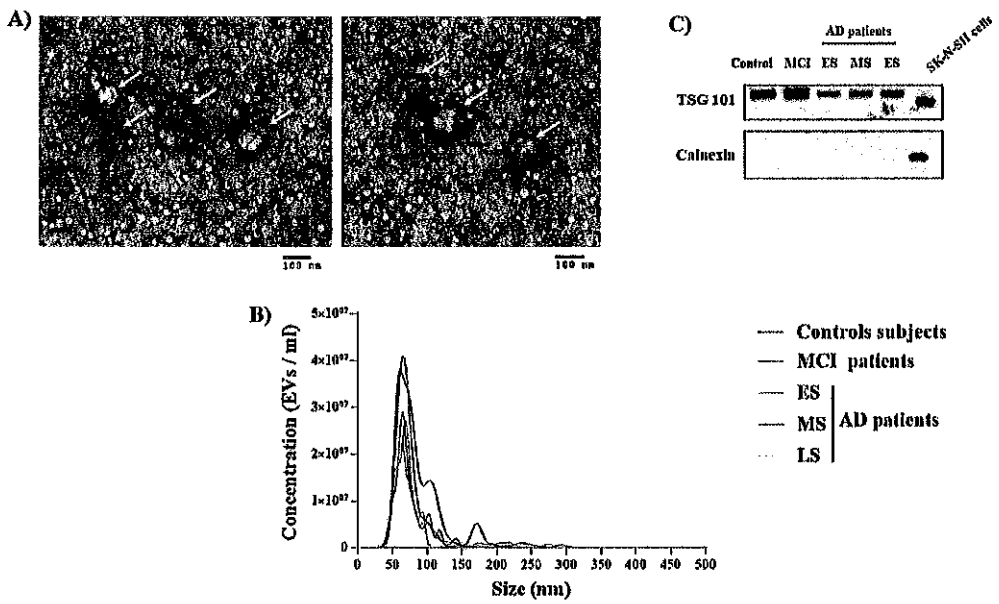


Figure 4. Characterization of EVs isolated from the serum. A: The TEM image depicts the spherical morphology of the isolated particles, bar = 100 nm. B: Determination of concentration and size of isolated EVs in the study population by NTA. C: Representative blot of extracellular vesicles TSG 101 and calnexin in control subjects, MCI and AD patients and in SK-N-SH cells lysate.

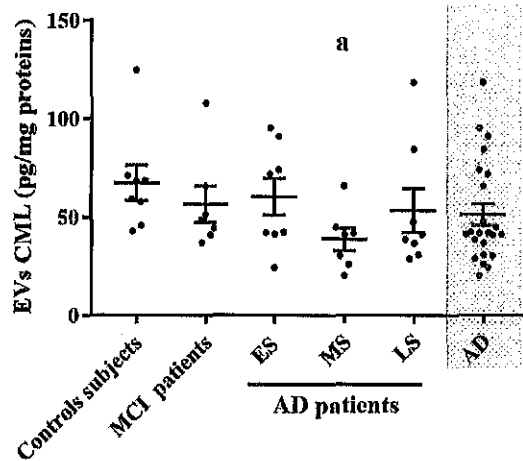


Figure 5. CML levels in EVs from control subjects (n = 8), MCI (n = 7) and AD patients (ES, n = 8; MS, n = 7; LS, n = 8). Data groups were compared with analysis of variance one-way ANOVA followed by LSD post hoc test. Values are mean \pm standard error of the mean. ^a p < 0.05 versus Control subjects.

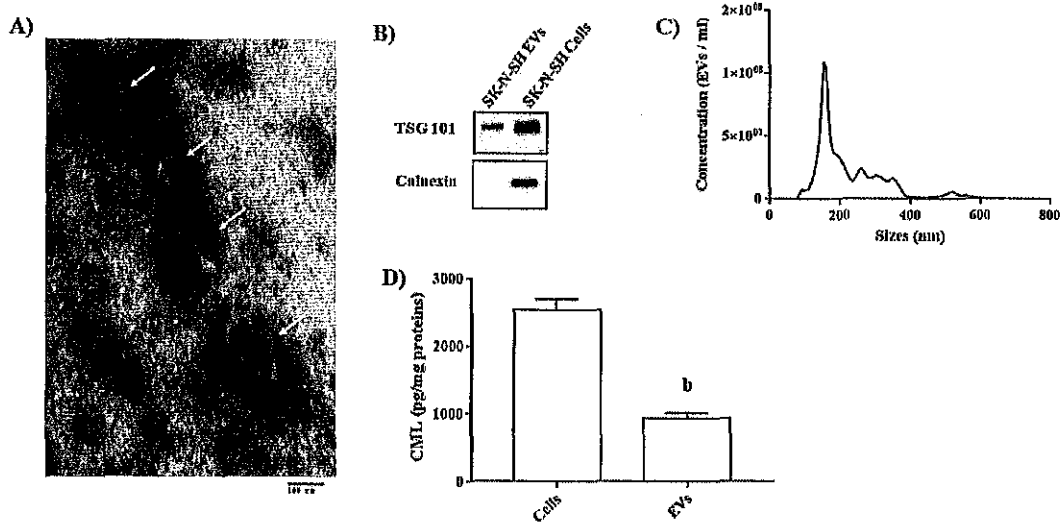


Figure 6. Characterization of cells EVs and CML determination in cells lysate and EVs. A: The TEM image showed the spherical morphology of the isolated particles, bar = 100 nm. B: Representative blot of TSG 101 and Calnexin in EVs from SK-N-SH and cells lysate. C: Concentration and size of isolated EVs by NTA D: CML levels in EVs from SK-N-SH and cells lysate. Comparison between different groups were performed with Student t-test. ^b p < 0.01.

4 CHAPITRE 3 : ARTICLE 2

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.

Auteurs de l'article : Mohamed Haddad ^{1,2}, Morgane Perrotte ^{1,2}, Mohamed Raâfet Ben Khedher ^{1,2}, Clément Demongin¹, Aurélie Lepage ³, Tamás Fülöp ³ and Charles Ramassamy ^{1,2*}

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

2 Institute on Nutrition and Functional Foods, Laval University, QC, Canada

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

Statut de l'article : Publié dans le journal of IJMS (International journal of molecular sciences), septembre 2019.

4.1 Résumé et objectifs de l'article 2

Le méthylglyoxal (MG) et le glyoxal (GO) sont deux produits réactifs et oxydants associés au développement de pathologies neurodégénératives. Cependant, la relation entre leurs niveaux périphériques et le déclin cognitif et leurs effets sur des facteurs neuronaux intervenant dans la neurodégénérescence sont peu étudiés. Le but de cette étude était de déterminer leurs taux sériques chez des patients MCI (mild cognitive impairment) et atteints de la maladie d'Alzheimer (MA), d'analyser leurs effets sur des facteurs neurotrophiques et inflammatoires et neurodégénératifs dans les cellules neuronales et les vésicules extracellulaires dérivées de ces neurones (nEVs). Nos résultats montrent que les niveaux de MG et de GO dans le sérum, déterminés par HPLC, étaient plus élevés chez les patients au stade MCI. L'analyse ROC (receiver-operating characteristic curves) a révélé que les niveaux sériques du MG possèdent une sensibilité plus élevée pour différencier les patients MCI des personnes témoins. En plus, les niveaux sériques de GO différencient les patients MCI des personnes contrôles et des patients atteints de la MA. Les niveaux neuronaux et vésiculaires de BDNF, PRGN, NSE, APP, MMP-9, ANGPTL-4, LCN2, PTX2, S100B, RAGE, A β , pTau T181 et alpha-synucléine ont été quantifiés par dosage Luminex. Le traitement des neurones avec le MG ou le GO a réduit les niveaux cellulaires de NSE, PRGN, APP, MMP-9 et ANGPTL-4 et les niveaux vésiculaires de BDNF,

PRGN et LCN2. Nos résultats suggèrent que le ciblage de MG et de GO peut être une stratégie thérapeutique prometteuse pour prévenir ou retarder la progression de la MA.

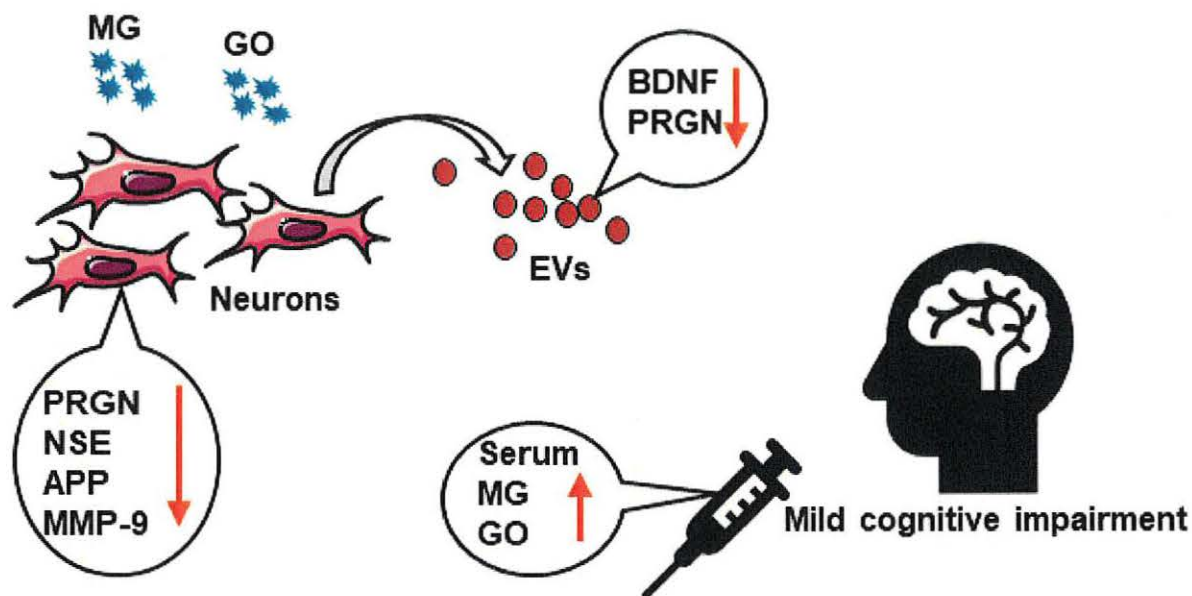
4.2 Contribution de l'étudiant à l'article 2

La majorité du travail et des expériences décrites dans cette publication ont été réalisées par moi-même (dosage des niveaux de MG et de GO par HPLC, culture cellulaires, test de viabilité cellulaires, isolation et caractérisation des EVs, dosage des protéines vésiculaires totales et dosage des marqueurs neurotrophiques, inflammatoire et neurodégénératives dans les EVs par Luminex). Le dosage des différents marqueurs a été réalisé par Luminex avec l'aide de Morgane Perrotte et Mohamed Raâfet Ben Khedher (deux doctorants dans notre laboratoire). La mise au point du dosage des niveaux sériques du MG et du GO a été réalisé avec l'aide de Clément Demongin pendant son stage dans notre laboratoire. Le recrutement des patients, la collecte et la préparation des échantillons sanguins ont été réalisés grâce aux efforts d'Aurélie Le Page et son superviseur le professeur Tamas Fulop. J'ai également analysé les résultats et écrit les différentes parties de l'article. Ce dernier a ensuite été révisé et corrigé par le professeur Charles Ramassamy. La réponse aux commentaires et aux questions des évaluateurs de l'article a été effectué par moi-même sous la supervision du professeur Charles Ramassamy.

4.3 Article 2

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

Graphical Abstract



Abstract: Methylglyoxal (MG) and glyoxal (GO) are suggested to be associated with the development of neurodegenerative pathologies. However, their peripheral levels in relation to cognitive decline and their effects on key factors in neuronal cells are poorly investigated. The aim of this study was to determine their serum levels in MCI (mild cognitive impairment) and Alzheimer's disease (AD) patients, to analyze their effects on the neurotrophic and inflammatory factors, on neurodegenerative markers in neuronal cells and in neuronal derived-extracellular vesicles (nEVs). Our results show that MG and GO levels in serum, determined by HPLC, were higher in MCI. ROC (receiver-operating characteristic curves) analysis showed that the levels of MG in serum have higher sensitivity to differentiate MCI from controls but not from AD. Meanwhile, serum GO levels differentiate MCI from control and AD groups. Cells and nEVs levels of BDNF, PRGN, NSE, APP, MMP-9, ANGPTL-4, LCN2, PTX2, S100B, RAGE, A β peptide, pTau T181 and alpha-synuclein were quantified by luminex assay. Treatment of neuronal cells with MG or GO reduced the cellular levels of NSE, PRGN, APP, MMP-9 and ANGPTL-4 and the nEVs levels of BDNF, PRGN and LCN2. Our findings suggest that targeting MG and GO may be a promising therapeutic strategy to prevent or delay the progression of AD.

Keywords: Alzheimer's disease; mild cognitive impairment; extracellular vesicles; advanced glycation products; Growth; inflammatory and vascular factors

Introduction

Dementia affects more than 50 million people and this number will triple in 30 years in the absence of preventive strategy and new effective treatments [1]. Alzheimer's disease (AD), the most common form of dementia (60–70% of all cases), is clinically characterized by cognitive decline and behavioral disturbances with a complex and heterogeneous pathophysiology [2]. In addition to both neuropathological hallmarks of AD, the accumulation of the amyloid beta peptide ($A\beta$) in senile plaques and the neurofibrillary tangles (NFTs), there are also imbalances in many cerebral proteins such as neurotransmitters, neuroprotective, neurotrophic and inflammatory factors [3-7]. To date, the diagnosis of AD represents a late stage of the disease and is associated with irreversible brain damage [8]. Therefore, the identification of early AD biomarkers is crucial to prevent or delay the onset of the disease and to slow the progression of this brain disorder. It has been shown that the diagnosis of AD at the earlier stage may prolong survival [9].

Mild cognitive impairment (MCI) is considered as a transitional state between normal aging and dementia associated with memory and cognitive impairment (greater of what is observed for aged individuals) that does not interfere notably with activities of daily life [10]. The prevalence of MCI is estimated to be between 15% and 20% beyond 60 years [11–13]. MCI was associated with an increased risk of progression to dementia and particularly AD [14]. The pathophysiology of MCI remains unclear, but it is suggested that metabolic, neurologic and psychiatric disorders largely contribute to this early cognitive impairment [15]. Currently, the diagnosis of MCI is based on cognitive tests, the determination of the ratio p-tau/ $A\beta$ 42 in cerebrospinal fluid (CSF) and neuroimaging analysis [16]. However, the routine application of these criteria is relatively limited and difficult because of the high costs of imaging, the invasive nature of CSF collection and the clinical heterogeneity of the MCI patients. Therefore, there is a need to identify blood-based biomarkers related to neurodegenerative process and associated with MCI stage that enable an early diagnosis of the disease with reduced costs.

Advanced glycation end products (AGEs) are heterogeneous class of molecules termed by the interaction of reducing sugars or dicarbonyl compounds such as methylglyoxal (MG) or glyoxal (GO) with amino groups in proteins through a series of Maillard reactions [17]. Interestingly, increased levels of AGEs were reported in brains of AD patients and were also found to be associated with the amyloid plaques and NFTs [18–21]. MG and GO are the precursors of many AGEs such as N-(1-carboxymethyl)-L-lysine (CML), glyoxal-lysine dimer (GOLD), N-

(carboxyethyl)-L-lysine (CEL) and methylglyoxal-lysine dimer (MOLD). MG and GO are two reactive intermediates of cellular metabolism produced by several different pathways [22,23]. Many studies have reported the capacity of these reactive intermediates to induce cellular damage and contribute to the pathogenesis of many neurodegenerative diseases. For instance, increased intracellular reactive oxygen species production, tau hyperphosphorylation, mitochondrial dysfunction [24–26], expression of cleaved caspase-3, apoptosis and decreased Bcl-2/Bax ratio were observed in neuronal cells following MG treatment [27]. The intracerebroventricular (ICV) administration of MG induced tau hyperphosphorylation and caused hippocampal damage and memory impairment in mice [28]. Elevation of the levels of MG in streptozotocin-induced diabetic rats was associated with cognitive impairments in memory and learning [29]. ICV administration of MG induces cognitive deficit and neurochemical alterations in the hippocampus of rat brain [30]. Recently, we demonstrated that the serum levels of CML, a by-product of MG and GO, increased early in AD and correlated with the cognitive scores of Mini Mental State Examination (MMSE) and Montreal Cognitive Assessment (MoCA) tests [31].

Therefore, AGEs precursors (MG and GO) could be considered as strong candidates for MCI diagnosis. However, neurotoxic effects of these metabolites especially on the neuroprotective, neurotrophic factors, inflammatory and neurodegenerative markers remain to be determined.

Extracellular vesicles (EVs) are whole membrane-bound vesicles such as exosomes and microvesicles. EVs play a fundamental role in intercellular communication by transferring heterogeneous biological materials including signaling factors, misfolding proteins, nucleic acid, and regulatory molecules [32]. Many cells in the central nervous system such as neurons, astrocytes and microglia release EVs [33–35]. Several studies have suggested the implication of EVs in AD and showed that these vesicles contain a variety of implicated proteins in the disease [36–38]. However, the effects of MG and GO on the levels of neuroprotective, neurotrophic factors, inflammatory and neurodegenerative markers in neuronal derived-EVs (nEVs) are still unknown.

The first aim of the present work was to measure the serum levels of MG and GO in controls, MCI and AD patients. The second aim was to study the effects of these AGEs precursors on the neuronal expression of neuroprotectors and neurotrophic factors such as BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), progranulin (PRGN), NSE (neuron specific enolase), APP (amyloid precursor protein) and MMP-9 (matrix metalloproteinase 9), proteins implicated in the inflammatory process (ANGPTL-4 (Angiopoietin Like 4), lipocalin-2 (LCN2), pentraxin-2 (PTX2), S100B (calcium binding protein B), AGEs (CML), and RAGEs (receptor for advanced glycation end

products)), and neurodegenerative markers (A β peptide, pTau T181, and alpha synuclein). Finally, the neuronal levels of these proteins were compared to their nEVS levels. This study addressed a complete panel of the effects of MG and GO on neuronal cells.

Results

2.1. Main Characteristics of Study Population

The clinical characteristics and glucose levels of controls, MCI and AD groups are shown in Table 1. The mean age, and the clinical scores of MMSE and MoCA were significantly different among controls, MCI and AD patients. MMSE and MoCA scores were not available for LS patients, probably because they were unable to answer or complete the questionnaire due to their severe cognitive impairment. Although blood glucose levels in moderate AD patients were higher compared to controls, the values remain in the physiological range of circulating levels.

Table 1. Characteristics of control subjects, MCI and AD patients.

Parameters	Controls Subjects (n = 15)	MCI patients (n = 16)	AD patients		
			ES (AD) (n = 19)	MS (AD) (n = 14)	LS (AD) (n = 16)
Sex (M/F)	3/12	4/12	3/16	2/12	5/11
Age (years)	69.4 \pm 1.17	73.63 \pm 1.24 *	79.68 \pm 1.2 ***	79.73 \pm 1.3 ***	80.13 \pm 1.6 ***
MMSE scores (/30)	29.67 \pm 0.15	27.19 \pm 0.47 *	23.79 \pm 0.8 ***	21.73 \pm 1.16 ***	ND
MoCA scores (/30)	27.53 \pm 0.51	22.94 \pm 0.79 **	17.06 \pm 0.9 ***	12.55 \pm 1.6 ***	ND
Glucose (mmol/l)	4.64 \pm 0.15	4.95 \pm 0.17	4.85 \pm 0.13	5.3 \pm 0.28 *	4.45 \pm 0.13

Values are mean \pm standard error of the mean (S.E.M). Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA followed by LSD test with * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus controls subjects. Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; ES, Early stage of Alzheimer's disease; MS, Moderate-stage of Alzheimer's disease; LS, Late-stage of Alzheimer's disease; MMSE, Mini-mental state examination; MoCA, Montreal cognitive assessment; ND, Not detected.

2.2. MG and GO Serum Levels in Control Subjects, in MCI and AD Patients

The results show that MG levels were significantly higher in MCI and AD patients compared to the control subjects. Moreover, MG levels in MS group of AD patients were lower than in the MCI group (Figure 1A). The GO levels were significantly increased only in MCI patients compared to the control and AD's groups (Figure 1B).

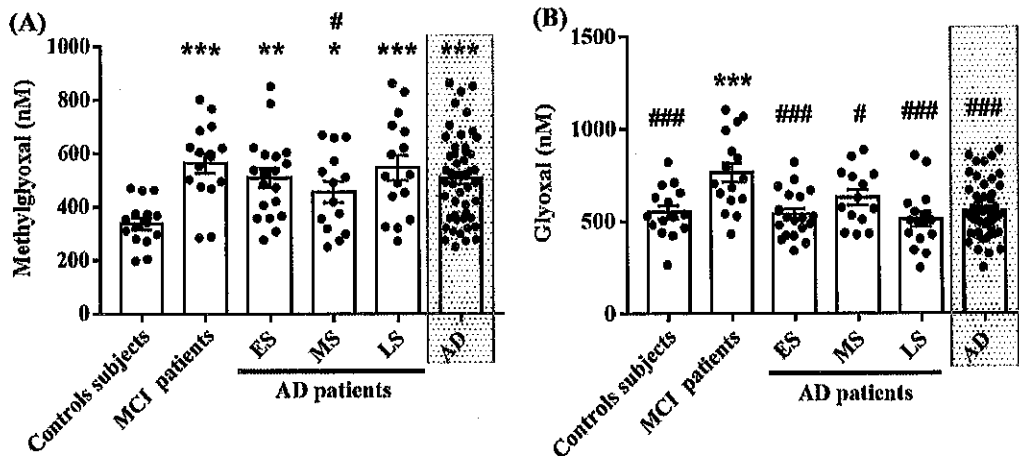


Figure 1. Levels of MG and GO in serum from control, MCI and different AD groups. MG (A) and GO (B) serum levels are expressed in nM. Each point represents the value obtained from one patient or control subject. The difference between groups was analyzed with one-way ANOVA followed by the LSD post hoc test. Values are mean \pm S.E.M with * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus control subjects. # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ versus MCI patients.

The ability of the MG and GO serum levels to distinguish control subjects from MCI and AD groups was assessed using the ROC analysis. The levels of MG and GO provide a fair classification of the control group and MCI patients with an area under the curve (AUC) of 0.904 (95% CI: 0.78–1.02, $p = 0.0001$) and 0.804 (95% CI: 0.64–0.995, $p = 0.0039$), respectively (Figure 2A,D). The optimal cut-off value of MG and GO levels to differentiate MCI patients from control subjects was 463.2 nM, with 87.5% sensitivity and 93.33% specificity, for MG and 652.2 nM, with 68.75% sensitivity and 80% specificity, for GO (Table 2). To distinguish MCI from ES or all AD patients, ROC curves for MG levels had an AUC of 0.628 (95% CI: 0.43–0.81, $p = 0.196$) and 0.619 (95% CI: 0.46–0.77, $p = 0.152$), respectively, indicating that MG levels have low classification accuracy (Figure 2B,C). Interestingly, when ROC curves were applied for GO levels for these same groups, we obtained an AUC of 0.832 (95% CI: 0.69–0.96, $p = 0.0008$) and 0.794 (95% CI: 0.67–0.91, $p = 0.0004$), respectively, indicating that GO levels have high classification accuracy (Figure 2E,F). The optimal cut-off value of GO levels to predict MCI patients from ES or all AD patients was <588.6 nM, with 68.42% sensitivity and 81.25% specificity, and <605 nM, with 67.35% sensitivity and 81.25% specificity, respectively (Table 2).

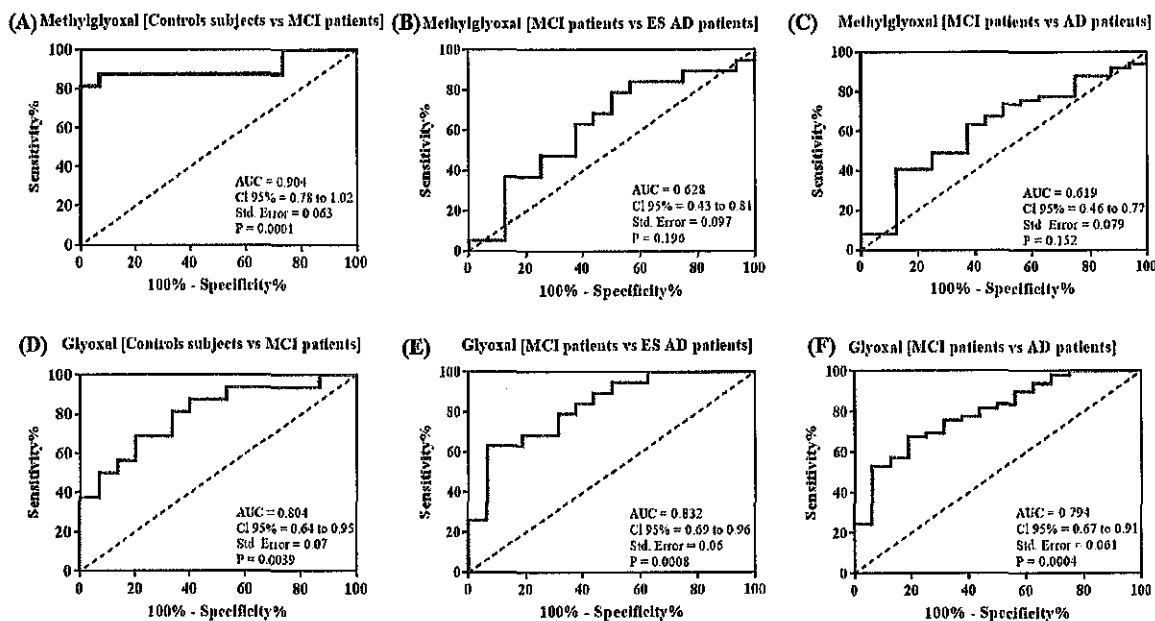


Figure 2. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. The plots represent the performance of MG and GO serum levels to differentiate MCI patients to control subjects (A,D) and to early AD patients (B,E) and all AD patients (C,F). Area under the curve (AUC) values, 95% confidence intervals (CI 95%), standard error (Std. Error) and *p* values are indicated on the curve.

Table 2. Cutoff values to separate MCI patients to control subjects and early and all AD patients.

Groups	Cutt off (nM)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Methylglyoxal [Controls subjects vs MCI patients]	> 463.2	87.5	93.33
Methylglyoxal [MCI patients vs ES AD patients]	< 545.1	63.16	62.5
Methylglyoxal [MCI patients vs AD patients]	< 545.1	63.27	62.5
Glyoxal [Controls subjects vs MCI patients]	> 652.2	68.75	80
Glyoxal [MCI patients vs ES AD patients]	< 588.6	68.42	81.25
Glyoxal [MCI patients vs AD patients]	< 605	67.35	81.25

2.3. Effects of MG and GO on SK-N-SH cells Viability

The neurotoxicity of MG and GO was performed on SK-N-SH cells. Our results show that, after 24 h of treatment, MG and GO were not toxic until 0.8 mM (Figure 3). The concentration of 0.5 mM was thus selected for further experiments for both MG and GO.

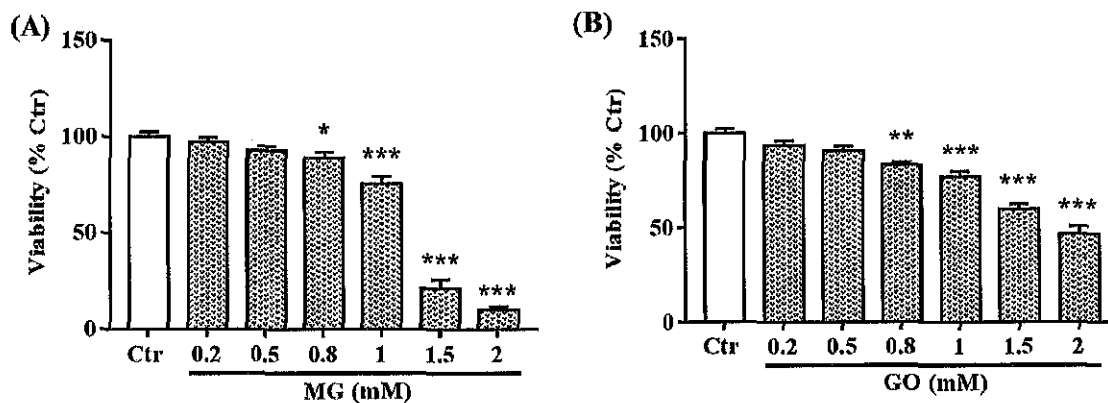


Figure 3. Effects of MG and GO on the survival of SK-N-SH neuronal cells. Cells were treated for 24 h with different concentrations (0.2–2 mM) of MG (A) and GO (B). Cell survival was analyzed by Resazurin assay. The results are expressed as a percentage of control, non-treated cells (considered as 100%). Values are mean \pm S.E.M from at least three separate experiments performed in sextuplicate in each group with * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus control cells. Data groups were compared with one-way ANOVA followed by the Dunnett's post hoc test.

2.4. Effects of MG and GO on the Size and Density of Extracellular Vesicles Released by the SK-N-SH Neuronal Cells

Neuronal SK-N-SH cells derived-EVs (nEVs) were isolated as previously described [31]. Different approaches were used to characterize EVs. TEM images revealed that the isolated EVs were surrounded with a lipid layer producing a cup-shaped morphology (Figure 4A). In addition, Western blot analysis revealed the presence of EVs marker (TSG101), the presence of GAPDH and the absence of calnexin (a negative EVs marker) (Figure 4B). Size distribution and concentration of nEVs were measured by Nanosight NS300. Our results show that the size distribution of nEVs was not different in control and treated cells with the majority of isolated nEVs being between 50 and 400 nm (Figure 4C,D and E). Finally, the concentrations of total isolated nEVs were also similar in controls ($9.6 \times 10^9 \pm 1.18 \times 10^9$) and in cells treated with MG ($6.7 \times 10^9 \pm 1.4 \times 10^9$) and GO ($1.13 \times 10^{10} \pm 2.6 \times 10^9$) (Figure 4F).

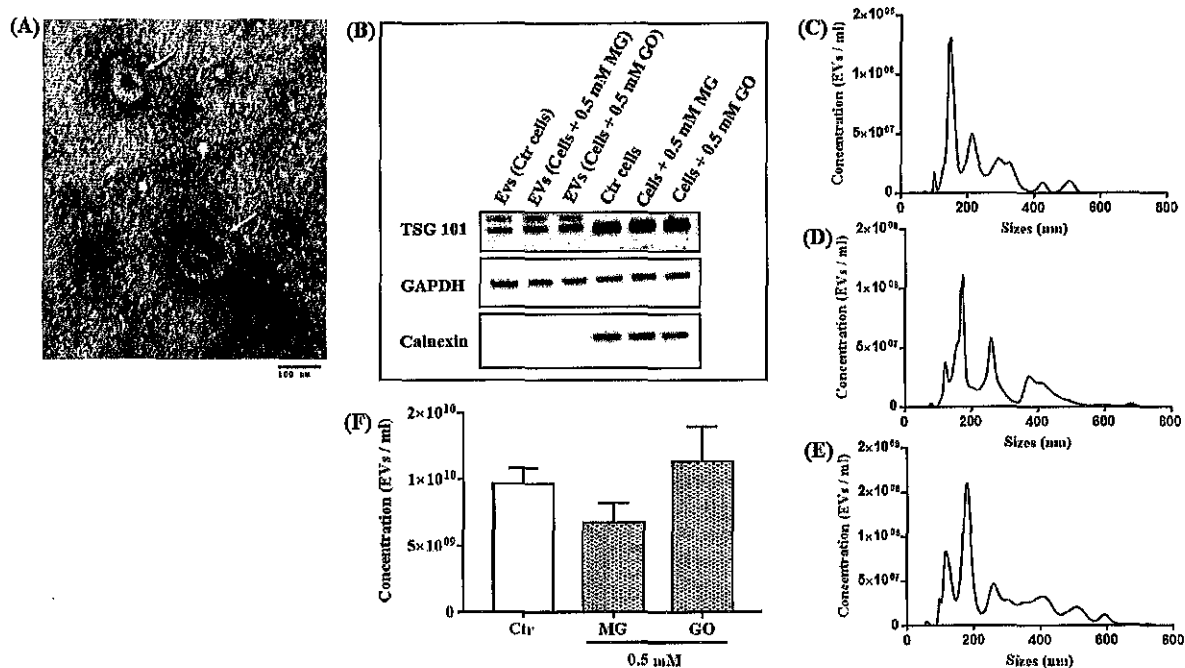


Figure 4. Characterization of nEVs isolated from controls and treated cells. The TEM image revealed the spherical morphology of the isolated particles (White arrow), bar = 100 nm (A). Expressions of EVs marker (TSG101), the presence of GAPDH and the negative control (Calnexin) analyzed by Western blot on protein lysates from EVs and SK-N-SH cells (B). Concentrations and size of isolated EVs from control cells (C), MG-treated cells (D) and GO-treated cells (E) were analyzed by NTA using Nanosight NS300 system. The concentrations of isolated EVs from control and treated cells with (MG and GO) were not different (F). Values are mean \pm S.E.M (from three separate experiments) and data groups were compared with one-way ANOVA followed by the Dunnett's post hoc test.

2.5. Effects of MG and GO Treatments on the Levels of BDNF, PRGN, NSE, APP and MMP-9 in Cells and in nEVs

The effects of MG and GO on the levels of BDNF, PRGN, NSE, APP and MMP-9 in SK-N-SH cells and in nEVs were analyzed following 24 h of treatment.

BDNF was not affected by MG and GO while PRGN, NSE, APP and MMP-9 levels were differently reduced by MG and/or GO (Figures 5A,C,E and 6A,C).

Interestingly, neuronal cells can release and transfer these proteins via nEVs. We found that MG or GO treatment reduced the levels of BDNF and PRGN in nEVs without affecting NSE, APP and MMP-9 (Figures 5B,D,E and 6B,D).

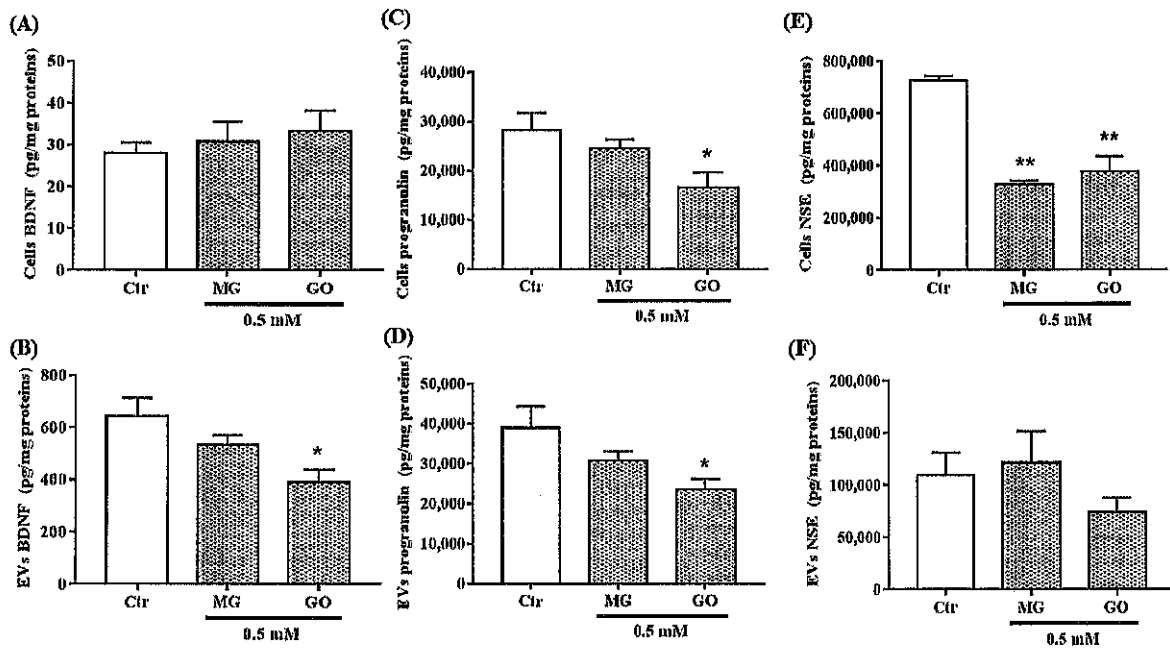


Figure 5. BDNF, PRGN and NSE levels in nEVs and in SK-N-SH cells exposed or not to MG and GO. The level of each marker was normalized using total protein concentration. The bar graphs show BDNF, PRGN and NSE levels in SK-N-SH cells (A, C, E) and in/on EVs (B, D, F). Values are mean \pm S.E.M (from three separate experiments) and data groups were compared with one-way ANOVA followed by the Dunnett's post hoc test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus control cells.

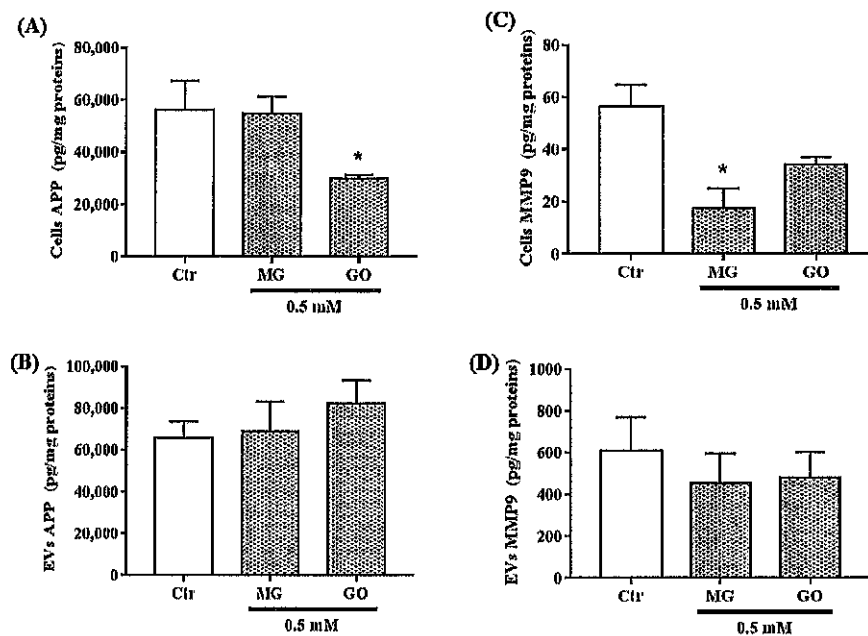


Figure 6. APP and MMP9 levels in nEVs and in SK-N-SH exposed or not to MG and GO. The level of each marker was normalized using total protein concentration. The bar graphs show APP and MMP9 levels in SK-N-SH cells (A, C) and in nEVs (B, D). Values are mean \pm S.E.M (from three separate experiments) and data groups were compared with one-way ANOVA followed by the Dunnett's post hoc test. * $p < 0.05$ versus control cells.

2.6. Effects of MG and GO Treatments on the Levels of ANGPTL-4, LCN2, PTX2, S100B and RAGE in Cells and nEVs

AGEs are known to induce neuroinflammation. The effects of MG and GO on the expression and secretion of inflammatory proteins remain to be studied. We analyzed their effects on the neuronal level of proteins involved in inflammation such as ANGPTL-4, LCN2, PTX2, S100B and RAGE. We found that only the levels of ANGPTL-4 were affected by MG and GO with a differential effect between MG and GO (Figures 7A,C,E and S1A,C). We also showed that SK-N-SH neuronal cells can propagate these proteins through nEVs. MG and GO greatly decreased the release of LCN2 in nEVs but did not modify the nEVs content of other proteins (Figures 7B,D,F and S1B,D).

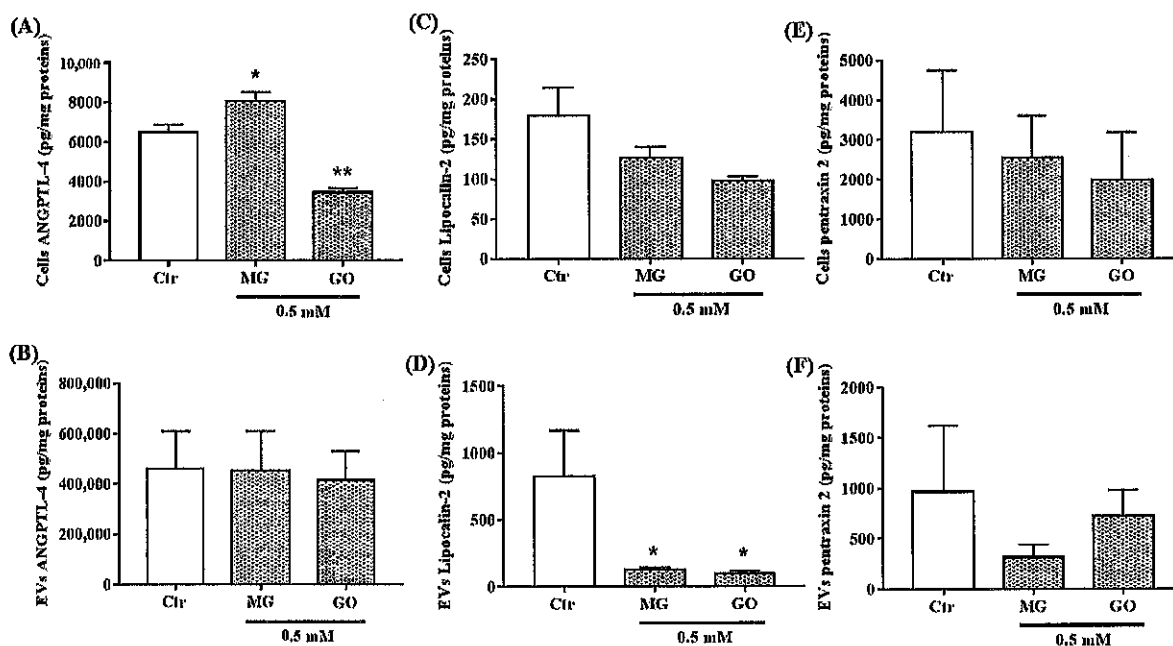


Figure 7. ANGPTL-4, LCN2 and PTX2 levels in nEVs and in SK-N-SH cells exposed or not to MG and GO. The level of each marker was normalized using total protein concentration. The bar graphs show ANGPTL-4, LCN2 and PTX2 levels in SK-N-SH cells (A, C, E) and in nEVs (B, D, F). Values are mean \pm S.E.M (from three separate experiments) and data groups were compared with one-way ANOVA followed by the Dunnett's post hoc test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus controls cells.

2.7. Effects of MG and GO Treatments on the Levels of A β 1-40, A β 1-42, pTau T181 and α -Synuclein in Cells and nEVs

To determine whether MG and GO treatments affect the expression of neurodegenerative markers, levels of A β peptide, pTau T181 and alpha synuclein were determined in cells and in nEVs. We showed that cells treated with nontoxic dose of MG and GO did not affect the neuronal levels of A β 1-40 (Figure S2A) as well as neuronal and nEVs levels of A β 1-42 (Figure S2C,D), alpha-synuclein (Figure S2E,F) and pTau (Figure S3). A β 1-40 was not detected in nEVs, suggesting that A β 1-40 is secreted at very low level in nEVs (Figure S2B).

2.8. Effects of MG and GO on the Levels of the AGE Product CML and on the Deglycase Enzyme DJ-1.

To investigate whether the effects observed following the MG and GO treatments were mediated through the AGEs formation, we evaluated the levels of CML, a by-product of MG and GO, and DJ-1, a deglycation protein in neuronal cells and in nEVs. Our results show that neither MG nor GO modified the expressions of CML and DJ-1 (Figure 8). These results suggest that the effects observed following the treatments of MG and GO are not related to AGEs formation.

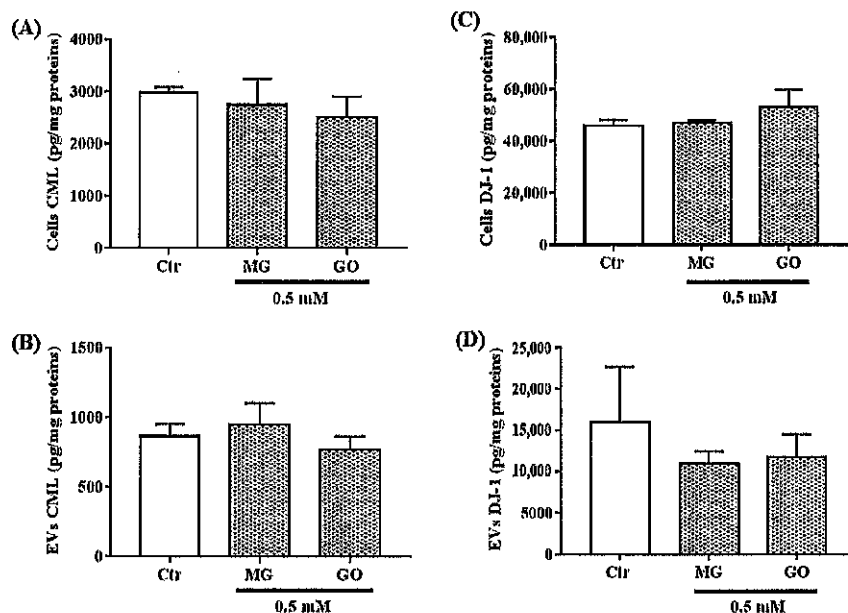


Figure 8. CML and DJ-1 levels in nEVs and in SK-N-SH cells exposed or not to MG and GO. The level of each marker is normalized using total protein concentration. The bar graphs show CML (A, B) and DJ-1 levels (C, D) in SK-N-SH cells (A, C) and nEVs (B, D). Values are mean \pm S.E.M (from three separate experiments) and data groups were compared with one-way ANOVA followed by the Dunnett's post hoc test

3. Discussion

Glycation of proteins is involved in the pathophysiology of AD through both extensive protein cross-linking and oxidative stress [39–42]. In the present study, we analyzed the variations of peripheral levels of two reactive precursors of AGEs with respect to cognitive decline, in MCI and in AD from the early to the late stage of AD. We showed that the levels of MG in serum were higher in MCI patients than in control subjects. ROC analysis demonstrated that its serum levels have a higher probability to differentiate MCI patients from controls but not from AD patients. Interestingly, the serum levels of GO can differentiate controls from MCI and AD patients. MG and GO are known to be present in the brain but their effects on some key target proteins involved in the pathophysiology of various neurodegenerative diseases such as AD remain to be studied. We found that both AGEs precursors, at nontoxic concentration, reduced the neuronal level of NSE with no effect on BDNF, PTRX-2, LCN-2, DJ-1, neurodegenerative markers and CML. GO decreased the levels of PRGN, APP, and ANGPL-4, while MG reduced and induced the expressions of MMP-9 and ANGPL-4, respectively.

nEVs are known to contribute to the progression of AD [43,44]. We found that MG and GO differently affect the content of some protein cargoes in/on nEVs. Our data show that MG and GO greatly reduced the release of LCN-2 by neuronal cells in/on nEVs. BDNF and PRGN in/on nEVs were reduced in the presence of GO. Neither MG nor GO modified the release of NSE, APP, MMP9, AGNTL-4, PTX-2, DJ-1, A β , pTau and CML in nEVs.

MG is known to be one of the most potent precursors of AGEs and its presence is correlated with increase of oxidative stress in AD. Many studies strongly suggest that MG and MG-derived AGEs may play a key role in the etiopathogenesis of AD. Indeed, MG induced hyperphosphorylation of tau and post-translational modification of neurofilaments and can also decrease PP2 [45,46]. However, the levels of MG in biofluids are poorly investigated. In CSF, the levels of MG were found to be higher in AD and were inversely associated to the MMSE scores [47]. In serum, Beerli et al. previously demonstrated that higher levels of MG were associated with a faster rate of cognitive decline [48], with lower memory and reduced grey matter volume in elderly people [49]. In line with these observations, our data show higher MG and GO serum levels in MCI patients. These clinical studies suggest that MG and GO could easily be used in medical analysis routinely. In serum, the elevation of MG and GO levels could be from different sources. In plasma, the conversion of aminoacetone to MG and H₂O₂ is insured by the semicarbazidesensitive amine oxidase (SSAO), an enzyme that can be detected in cell membranes and plasma [50]. Accordingly, SSAO activity was shown to be elevated in plasma from AD patients [51,52]. Recently, the circulating SSAO activity was shown to be associated to the alteration of the blood brain barrier observed during the progression of AD [53].

Glycation of circulating proteins and the formation of AGEs by non-enzymatic reaction may also contribute to MG and GO production [54]. Moreover, MG and GO could be released from healthy or injured cells, or supplied exogenously by food intake [55]. On the other hand, the detoxification of MG and GO is dependent on the glyoxalase system, which is composed of two enzymes, glyoxalase-1 and -2 (GLO-1 and GLO-2). This detoxification system requires the antioxidant glutathione (GSH) to form hemithioacetal then S-lactoylglutathione. GLO-2 catalyzes the transformation of S-lactoylglutathione into D-lactate and recycling GSH [56]. However, the decrease of circulating GSH in AD [57,58] could limit the glyoxalase activity.

In the human brain, the protein and RNA expressions as well as the activity of GLO-1 in astroglia cells and neurons were found to be elevated before 55 years of age and then gradually decreased. This increase may represent a compensatory mechanism against high dicarbonyl levels and the accumulation of AGEs with aging [59]. In the AD brain, GLO-1 RNA levels and enzymatic activity

were upregulated in the early stages of the disease but gradually downregulated in the middle and late stages of the disease [60]. Therefore, the number of AGE-positive neurons increases with the progression of the disease. MG and GO could thus accumulate in neurons with the progression of the disease and particularly in endosomal and lysosomal vesicles of pyramidal neurons in the hippocampus, the dentate gyrus, and in different cortical and entorhinal layers [61].

The accumulation of MG and GO is associated with free radical production, the increase of the activity of prooxidant enzymes, the decrease of antioxidant activities, and mitochondrial dysfunction, leading to cell death [62,63]. These dicarbonyls are able to increase the production of A β , oligomers and protofibrils as well as the sizes of aggregates [64,65] and modulate several signaling pathways that play a causative role in AD development [66]. Neurons which show diffuse cytosolic AGEs immunoreactivity also contain hyperphosphorylated tau [18].

We studied the effects of MG and GO on the expression of some proteins involved in growth factors, inflammation and on the repair of glycated proteins in neuronal cells. These proteins also play a prominent role in modulating cognition and memory by promoting neuronal survival and development and by regulating synaptic plasticity [3,4,67–70]. Our data demonstrate that MG or GO, by decreasing the expression of NSE, PRGN, MMP-9 and APP, can reduce the neurotrophic properties, neuritic growth, synaptogenesis, anti-inflammatory activity, and ability of neurons to degrade A β , as well as modify the lysosome regulatory properties of neuronal cells [71–74]. In the brain, ANGPTL-4 is mainly expressed by reactive astrocytes but its regulation in neuronal cells is poorly described. We found that MG and GO differently regulate the neuronal expression of ANGPTL-4. Considering that ANGPTL-4 is a secreted protein with important function in the regulation of brain lipid and glucose metabolism, hypoxia-induced factor, inflammatory responses, angiogenesis, vascular permeability and remodeling [75], our results suggest that MG and GO could have an impact on several functions, particularly on vascular properties.

MG and GO did not have any effect on the levels of other proteins (BDNF, LCN2, and PTX2), also involved in cell survival, inflammatory responses, insulin sensitivity, cognitive function and oxidative stress [76–81]. In contrast to proBDNF, which could be glycated by MG and GO at the free amino groups of Lys, Arg and Cys residues [82], BDNF was not glycated by MG and GO. These results suggest that the targeted proteins are differently vulnerable to glycation induced by MG or GO. Some of them are not modified by nontoxic concentrations of MG or GO. Surprisingly, MG or GO did not modify the level of CML or up regulate the deglycase enzyme DJ-1 [83,84].

Neuronal cells are known to actively secrete nEVs to eliminate or communicate with other cells. EVs contained various protein cargoes that interfere with neuroprotective mechanisms, nerve

regeneration, neuronal development or synaptic plasticity [85]. PTRX-2 [86] and DJ-1 [87] were recently shown to be present in nEVs. For the first time, we demonstrated that neuronal cells can release BDNF, NSE, LCN-2 and MMP-9 through nEVs.

Thus, another aim of our study was to decipher the role of MG and GO on the release and transfer of these proteins by neuronal cells. We showed that MG and GO did not modify the release of PTRX-2, APP, MMP-9, ANGTL-4, DJ-1, A β , pTau and CML in nEVs but reduced the secretion of BDNF, PRGN, and LCN-2 in nEVs. These protein cargoes could be inside or associated to the surface of nEVs. These reductions were not the consequences of the abnormal formation and/or release of nEVs as the quantity and the size distribution of EVs were similar following different treatments. These results suggest that neuronal cells reduce the transfer of some proteins related to neurotrophic, neurogenesis or inflammation (BDNF, PRGN, and LCN-2) to other cells to counteract the effects of MG or GO. It is interesting to note that concentrations of BDNF, PRGN, MMP-9, ANGTL-4, LCN-2, and S100B were much higher in nEVs than their cellular levels, while the concentrations NSE, CML and DJ-1 were lower in nEVs.

MG and GO, at nontoxic concentrations, did not alter cells or nEVs levels of some neurodegenerative markers (A β peptide, pTau, and alpha synuclein) and some proinflammatory markers (S100B and RAGE) (Figures S1–S3). These observations could be explained by the fact that the concentration of dicarbonyls compounds used in this study did not increase the formation of AGEs such as CML which are implicated in the modulation of neurodegenerative and proinflammatory markers.

MG and GO have the same dicarbonyl structure except the presence of a methyl group on the carbon skeleton of MG. The differential effect between MG and GO may be due to the fact that GO is considered as a poor substrate for the glyoxalase system since it binds to the α -NH₂ group or to the cysteine residue of GSH [88,89]. Furthermore, GO but not MG can form glycolate which is oxidized to glyoxylate with the release of H₂O₂ [90]. GO is also able to react with hydroxyl radical to form a GO radical and this reaction is three times faster than the reaction between MG and hydroxyl radicals [91,92]. The induction of oxidative stress is a possible mechanism that explains the differential effects of MG and GO.

4. Materials and Methods

4.1. Clinical Study

The present study was performed on serum samples from control subjects, MCI and AD patients recruited from the Memory Clinic of Sherbrooke. The study protocol was approved by the Ethics

Committee of the University of Sherbrooke and informed written consent was obtained from all participants and/or their representatives (protocol #2010-21/Fülöp approved 12 Novembre 2010). The AD patients at different stage (early, moderate and last stage) were selected relatively to the criteria of the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS_ADRDA) and the fourth edition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) published by the American Psychiatric Association in 1984 [93]. Clinical selection of MCI patients was performed depending on cognitive test scores and Pertersen criteria [94]. The healthy control subjects were defined according to the SENIEUR protocol [95]. All selected subjects underwent clinical and neuropsychological evaluation included the MoCA and MMSE [96,97]. Serum samples were obtained from selected subjects after overnight fasting and stored at -80°C until analysis.

4.2. Serum Methylglyoxal and Glyoxal Measurement by High-Performance Liquid Chromatographic (HPLC)

MG and GO levels were determined from serum by HPLC (Beckman system Gold) with UV-Visible detector according to the authors of [98] with some modifications. One hundred microliters of serum from different groups were incubated with trichloroacetic acid (TCA) (Sigma Aldrich, Foster City, CA, USA) for 10 min. The precipitated protein was removed from the mixture by centrifugation at 12,000 rpm for 15 min at 4°C . O-Phenylenediamine (O-PD) (10 mM final concentration) (Sigma Aldrich) was added to the supernatant and the mixture was incubated during 24 h at room temperature to derivatize MG and GO. After 10 min of centrifugation at 12,000 rpm, 40 μL of supernatant with known concentration of the internal standard 5-methylquinoxaline (5-MQ) (Sigma Aldrich) were injected into HPLC. The running program was performed with 20% acetonitrile (kept at 100%) for running the samples and 80% methanol used for washing the column and lines with a constant flow rate set at 1 mL/min. The quantification of MG was based on the determination of its derivative compound 2-methylquinoxaline (2-MQ) (Sigma Aldrich) which absorbed at 315 nm. Different concentrations of 2-MQ external standard were used to define the retention time via C18 column (150 mm \times 4.6 mm and 5- μm particle size). To determine GO retention time, different concentrations of GO solution (Sigma Aldrich, CA) were incubated with O-PD and injected into the HPLC.

4.3. Neuronal Cells Culture, Treatment and Viability Assay

SK-N-SH (Human neuroblastoma) cell line from ATCC (Manassas, VA, USA) were cultivated in Eagle's minimal essential medium (EMEM) supplemented with 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS), 1% sodium pyruvate (1 mM) and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

streptomycin) in a humidified incubator at 37 °C with 5% CO₂ to 80% confluence. SK-N-SH cells were selected in this study because they are brain-derived neuronal cells from human. We previously and repeatedly demonstrated that these cells contain several signaling pathways involved in neuronal functions.

SK-N-SH cells were plated at a density of 2×10^4 cells per well in 96-well plates and incubated for 24 h at 37 °C, and then the media was completely removed and cells were kept in FBS free media. Cells were treated with different concentrations of MG and GO (0.2–2 mM) for 24 h. Cells survival was assessed using the Tox-8 (Resazurin-based) following the manufacturer's instructions.

4.4. Isolation of Extracellular Vesicles from Culture Media

Neuronal derived-EVs (nEVs) from culture media were isolated as previously described [31]. Briefly, SK-N-SH cells were grown to 80% of confluence, washed with PBS and incubated in FBS free media with MG and GO (0.5 mM) for 24 h. Supernatant were collected from five 125 cm² flasks and centrifuged to remove dead cells and cell debris. The final supernatant was precipitated with the total exosome isolation reagent from (Invitrogen™ by Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA). The nEVs pellet was resuspended in PBS and stored at –80 °C until analysis. Total proteins from SK-N-SH cells and nEVs were extracted with RIPA buffer (50mM Tris buffer, pH 8, 150 mM sodium chloride, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1% Igepal, 1% sodium deoxycholate, 5 mM EDTA) containing a cocktail of protease and phosphatase inhibitors and were measured using bicinchoninic acid (BCA) assay (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific, Inc, Waltham, MA, USA).

4.5. Characterization of Extracellular Vesicles

The characterization of nEVs from culture media was based on the analysis of the morphology by transmission electron microscopy (TEM), their sizes distribution by the Nanosight system (NS300), the presence of some EVs markers (TSG101(tumor susceptibility gene 101) and GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)) and the absence of endoplasmic reticulum marker Calnexin by Western blot.

4.5.1. Transmission Electron Microscopy

EVs preparations were mixed with 2% paraformaldehyde (final concentration), and then applied onto Formvar-carbon coated grid. After 5 min, grids were negatively stained with 2% uranyl acetate solution. The excess fluid was removed and grids were observed using HITACHI 7100 TEM at 75 kV and 15,000×-40,000× magnification.

4.5.2. Nanoparticles Tracking Analysis

The Nanosight NS300 instrument and Nanosight NTA 3.2 Analytical Software (Malvern Instruments Company, Nanosight, and Malvern, United Kingdom) were used for size and concentration analyses of isolated nEVs. Diluted nEVs suspensions (1/200 in water) were illuminated by laser light and their movement under Brownian motion was captured for 60 s using a digital camera. Three videos were then analyzed using the Nanosight NTA 3.2 Analytical Software to provide nanoparticle concentrations and size distribution profiles.

4.5.3. Western Blot Analysis

The same amount of extract nEVs and cells proteins (20 µg) were separated in 10% SDS-polyacrylamide gel for electrophoresis according their molecular weight. The proteins separated in gel were transferred onto PVDF membranes using a Trans-Blot Turbo System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Nonspecific binding sites in the membrane were blocked for 1 h in TBS (Tris-buffered saline) containing 5% non-fat dry milk and 0.1% Tween 20. The blot was incubated overnight at 4 °C with primary antibodies: TSG101 (1/2500) (MyBiosource, San Diego, CA, USA), GAPDH (1/5000) (Santa Cruz) and calnexin (1/500) (Santa Cruz). After three washing steps with TBS-Tween 0.1%, the membrane was incubated during 1 h with the corresponding secondary antibody HRP-conjugated anti rabbit (1/5000) (Cell Signaling Technology) and anti-mouse (1/1000) (Cell Signaling Technology). The membrane blots were revealed with ECL substrate (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) and bands were analyzed using luminescent imaging system FluorChem.

4.6. Determination of Cellular and nEVs Proteins

Cellular and nEVs concentrations of BDNF, PRGN, NSE, APP, MMP9, ANGPTL-4, LCN2, PTX2, S100B, RAGE, DJ-1 and alpha synuclein were determined by a Luminex assay from R&D Systems, Inc.. Aβ1-40, Aβ1-42, pTau T181 and total tau levels were measured also with luminex assay from EMD Millipore Corp., (Burlington, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Fifty microliters of each diluted sample were added to pre-coated beads with antibodies of interest. After the addition of biotinylated detection antibodies and phycoerythrin (PE)-conjugated streptavidin, beads were read using the Luminex 100/200 and data were analyzed using Xponent 4.2 software (Massachusetts, MO, USA) Concentrations of all markers in/on EVs and cells were normalized with the total protein amount. Assay sensitivities (minimum detectable concentrations in pg/mL) for all markers are presented in Table S1.

4.7. CML Determination

To measure CML levels in nEVs and SK-N-SH cells, sandwich ELISA provided by Cusabio Biothech Co., Ltd. was used according to the manufacturer's instructions. CML values in nEVs and cells were normalized with the total protein amount. Assay sensitivity (minimum detectable concentrations in pg/mL) was 15.6 pg/mL (Table S1).

4.8. Statistical Analysis

Data were expressed as mean \pm S.E.M using the SPSS or GraphPad Prism program. A p value less than 0.05 was considered statistically significant. For the clinical study, statistical analyses were performed using one-way ANOVA analysis followed by LSD test to test differences between groups. Receiver-operating characteristic (ROC) curves and the area under the ROC curve (AUC) were used to determine the ability of MG and GO serum levels to differentiate between the diseased and control populations. For the data obtained by nEVs and cell analyses, one-way ANOVA analysis followed by Dunnett's test was used for the comparison between control and treated conditions.

5. Conclusion

The present study demonstrated that the serum levels of MG and GO increase in MCI patients and can be used as a peripheral marker for the diagnosis of this early stage of AD. Thus, cognitive decline associated with AD might be linked to an increase in MG levels due to the impairment of the dicarbonyls detoxification or production.

At the neuronal level, MG and GO affect neurotrophic, neuroprotective factors (BDNF, PRGN, NSE, APP and MMP-9) and modulator of inflammatory factors (ANGPTL-4 and LCN2) levels in neurons and nEVs. Our data suggest that targeting MG and GO may be a promising therapeutic strategy to prevent AD. From a clinical point of view, the reduction of MG and GO accumulation due to hyperglycemic conditions or impaired glucose metabolism, and the enhancement of dicarbonyls scavenging system may provide new therapeutic target opportunities to reduce the pathophysiological modifications related to carbonyl stress in AD.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at www.mdpi.com/xxx/s1.

Author Contributions: M.H and C.R designed research; M.H, M.P, M.R.B.K and C.D performed research; M.H analyzed data; M.H and C.R wrote the paper; and A.L and T.F contributed new reagents or analytic tools.

Funding: This work was supported by the Chaire Louise & André on Alzheimer's disease, Fondation Armand-Frappier and MRIF (C.R.) and CIHR grant (T.F.). David Chatenet's lab are acknowledged for their technical assistance on HPLC.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflicts of interests.

Abbreviations

AD: Alzheimer's disease

A β : Amyloid beta peptide

AGEs: Advanced glycation end products

ALDH: Aldehyde dehydrogenase

ANGPTL-4: Angiopoietin Like 4

APP: Amyloid precursor protein

BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor

CEL: N-(carboxyethyl)-L-lysine

CML: N-(1-carboxymethyl)-L-lysine

CSF: Cerebrospinal fluid

ES: Early stage of Alzheimer's disease

EVs: Extracellular vesicles

GO: Glyoxal

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GSH: Reduced glutathione

GLO: Glyoxalase

GOLD: Glyoxal-lysine dimer

HPLC: High-performance liquid chromatographic

icv: Intracerebroventricular

LGN2: Lipocalin-2

LS: Late stage of Alzheimer's disease

LSD: Least significant difference

2-MQ: 2-methylquinoxaline

5-MQ: 5-methylquinoxaline

MCI: Mild cognitive impairment

MMP-9: Matrix metalloproteinase 9

MG: Methylglyoxal

MMSE: Mini-Mental State Examination

MoCA: Montreal Cognitive Assessment

MOLD: Methylglyoxal-lysine dimer

MS: Moderate stage of Alzheimer's disease

NFTs: Neurofibrillary tangles

NSE: Neuron specific enolase

nEVs: Neuronal derived-extracellular vesicles

O-PD: O-Phenylenediamine

PRGN: Progranulin

PTX2: Pentraxin 2

RAGE: Receptor for advanced glycation end products

ROC: Receiver-operating characteristic curves

SSAO: Semicarbazidesensitive amine oxidase

TEM: Transmission electron microscopy

TSG101: Tumor susceptibility gene 101

References

1. Hachinski, V. Dementia: Paradigm shifting into high gear. *Alzheimers Dement*. 2019, 15, 985–994 [10.1016/j.jalz.2019.01.006](https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.01.006), doi:10.1016/j.jalz.2019.01.006.
2. World Alzheimer Report 2018 The state of the art of dementia research:New frontiers. Available online: www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2018.pdf (accessed on September 2018).
3. Benussi, L.; Binetti, G.; Ghidoni, R. Loss of Neuroprotective Factors in Neurodegenerative Dementias: The End or the Starting Point? *Frontiers in neuroscience* 2017, 11, 672–672, doi:10.3389/fnins.2017.00672.
4. Diniz, B.S.; Teixeira, A.L. Brain-derived neurotrophic factor and Alzheimer's disease: Physiopathology and beyond. *Neuromolecular Med*. 2011, 13, 217–222, doi:10.1007/s12017-011-8154-x.
5. Schmidt, F.M.; Mergl, R.; Stach, B.; Jahn, I.; Gertz, H.J.; Schonknecht, P. Elevated levels of cerebrospinal fluid neuron-specific enolase (NSE) in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2014, 570, 81-85, doi:10.1016/j.neulet.2014.04.007.
6. Serrano-Pozo, A.; Frosch, M.P.; Masliah, E.; Hyman, B.T. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011, 1, a006189, doi:10.1101/cshperspect.a006189.
7. Kinney, J.W.; Bemiller, S.M.; Murtishaw, A.S.; Leisgang, A.M.; Salazar, A.M.; Lamb, B.T. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: Transl. Res. Clin. Interv*. 2018, 4, 575–590, doi:<https://doi.org/10.1016/j.trci.2018.06.014>.
8. Atri, A. The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management. *Med. Clin. North. Am*. 2019, 103, 263–293, doi:<https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.10.009>.
9. Bruandet, A.; Richard, F.; Bombois, S.; Muraige, C.A.; Deramecourt, V.; Lebert, F.; Amouyel, P.; Pasquier, F. Alzheimer disease with cerebrovascular disease and vascular dementia: Clinical features and course compared with Alzheimer disease. *J. Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009, 80, 133–139, doi:10.1136/jnnp.2007.137851.
10. Sanford, A.M. Mild Cognitive Impairment. *Clin. Geriatr. Med*. 2017, 33, 325–337, doi:10.1016/j.cger.2017.02.005.

11. Unverzagt, F.W.; Gao, S.; Baiyewu, O.; Ogunniyi, A.O.; Gureje, O.; Perkins, A.; Emsley, C.L.; Dickens, J.; Evans, R.; Musick, B., et al. Prevalence of cognitive impairment: Data from the Indianapolis Study of Health and Aging. *Neurology* 2001, 57, 1655–1662.
12. Manly, J.J.; Tang, M.X.; Schupf, N.; Stern, Y.; Vonsattel, J.P.; Mayeux, R. Frequency and course of mild cognitive impairment in a multiethnic community. *Ann. Neurol.* 2008, 63, 494–506, doi:10.1002/ana.21326.
13. Ganguli, M.; Chang, C.C.; Snitz, B.E.; Saxton, J.A.; Vanderbilt, J.; Lee, C.W. Prevalence of mild cognitive impairment by multiple classifications: The Monongahela-Youghiogheny Healthy Aging Team (MYHAT) project. *Am. J. Geriatr Psychiatry* 2010, 18, 674–683, doi:10.1097/JGP.0b013e3181cdee4f.
14. Bachurin, S.O.; Gavrilova, S.I.; Samsonova, A.; Barreto, G.E.; Aliev, G. Mild cognitive impairment due to Alzheimer disease: Contemporary approaches to diagnostics and pharmacological intervention. *Pharm. Res.* 2018, 129, 216–226, doi:10.1016/j.phrs.2017.11.021.
15. Lopez, O.L. Mild cognitive impairment. *Contin. (Minneap. Minn.)* 2013, 19, 411–424, doi:10.1212/01.CON.0000429175.29601.97.
16. Behrman, S.; Valkanova, V.; Allan, C.L. Diagnosing and managing mild cognitive impairment. *Practitioner* 2017, 261, 17–20.
17. Maillard, L.C.; Action des acides amines sur les sucres: Formation des melanoidines par voie methodique. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 1912, 154, 66–68.
18. Luth, H.J.; Ogunlade, V.; Kuhla, B.; Kientsch-Engel, R.; Stahl, P.; Webster, J.; Arendt, T.; Munch, G. Age- and stage-dependent accumulation of advanced glycation end products in intracellular deposits in normal and Alzheimer's disease brains. *Cereb. Cortex* 2005, 15, 211–220, doi:10.1093/cercor/bhh123.
19. Girones, X.; Guimera, A.; Cruz-Sanchez, C.Z.; Ortega, A.; Sasaki, N.; Makita, Z.; Lafuente, J.V.; Kalaria, R.; Cruz-Sanchez, F.F. N epsilon-carboxymethyllysine in brain aging, diabetes mellitus, and Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 2004, 36, 1241–1247, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.006.
20. Horie, K.; Miyata, T.; Yasuda, T.; Takeda, A.; Yasuda, Y.; Maeda, K.; Sobue, G.; Kurokawa, K. Immunohistochemical localization of advanced glycation end products, pentosidine, and carboxymethyllysine in lipofuscin pigments of Alzheimer's disease and aged neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, 236, 327–332, doi:10.1006/bbrc.1997.6944.

21. Castellani, R.J.; Harris, P.L.; Sayre, L.M.; Fujii, J.; Taniguchi, N.; Vitek, M.P.; Founds, H.; Atwood, C.S.; Perry, G.; Smith, M.A. Active glycation in neurofibrillary pathology of Alzheimer disease: N(epsilon)-(carboxymethyl) lysine and hexitol-lysine. *Free Radic. Biol. Med.* 2001, 31, 175–180.
22. Vistoli, G.; De Maddis, D.; Cipak, A.; Zarkovic, N.; Carini, M.; Aldini, G. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): An overview of their mechanisms of formation. *Free Radic. Res.* 2013, 47, 3–27, doi:10.3109/10715762.2013.815348.
23. Thornalley, P.J. Pharmacology of methylglyoxal: Formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification—a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen. Pharm.* 1996, 27, 565–573.
24. Li, X.H.; Xie, J.Z.; Jiang, X.; Lv, B.L.; Cheng, X.S.; Du, L.L.; Zhang, J.Y.; Wang, J.Z.; Zhou, X.W. Methylglyoxal induces tau hyperphosphorylation via promoting AGEs formation. *Neuromolecular Med.* 2012, 14, 338–348, doi:10.1007/s12017-012-8191-0.
25. Tajés, M.; Eraso-Pichot, A.; Rubio-Moscardo, F.; Guivernau, B.; Bosch-Morato, M.; Valls-Comamala, V.; Munoz, F.J. Methylglyoxal reduces mitochondrial potential and activates Bax and caspase-3 in neurons: Implications for Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 2014, 580, 78–82, doi:10.1016/j.neulet.2014.07.047.
26. de Arriba, S.G.; Krugel, U.; Regenthal, R.; Vissiennon, Z.; Verdaguer, E.; Lewerenz, A.; Garcia-Jorda, E.; Pallas, M.; Camins, A.; Munch, G.; et al. Carbonyl stress and NMDA receptor activation contribute to methylglyoxal neurotoxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 2006, 40, 779–790, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.09.038.
27. Chen, Y.J.; Huang, X.B.; Li, Z.X.; Yin, L.L.; Chen, W.Q.; Li, L. Tenuigenin protects cultured hippocampal neurons against methylglyoxal-induced neurotoxicity. *Eur. J. Pharm.* 2010, 645, 1–8, doi:10.1016/j.ejphar.2010.06.034.
28. Qi, L.; Chen, Z.; Wang, Y.; Liu, X.; Liu, X.; Ke, L.; Zheng, Z.; Lin, X.; Zhou, Y.; Wu, L.; et al. Subcutaneous liraglutide ameliorates methylglyoxal-induced Alzheimer-like tau pathology and cognitive impairment by modulating tau hyperphosphorylation and glycogen synthase kinase-3 β . *Am. J. Transl. Res.* 2017, 9, 247–260.
29. Huang, X.; Wang, F.; Chen, W.; Chen, Y.; Wang, N.; von Maltzan, K. Possible link between the cognitive dysfunction associated with diabetes mellitus and the neurotoxicity of methylglyoxal. *Brain Res.* 2012, 1469, 82–91, doi:https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.06.011.

30. Hansen, F.; Pandolfo, P.; Galland, F.; Torres, F.V.; Dutra, M.F.; Batassini, C.; Guerra, M.C.; Leite, M.C.; Gonçalves, C.-A. Methylglyoxal can mediate behavioral and neurochemical alterations in rat brain. *Physiol. Behav.* 2016, 164, 93–101, doi:<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.05.046>.
31. 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, 751–762, doi:[10.3233/jad-181272](https://doi.org/10.3233/jad-181272).
32. Iraci, N.; Leonardi, T.; Gessler, F.; Vega, B.; Pluchino, S. Focus on Extracellular Vesicles: Physiological Role and Signalling Properties of Extracellular Membrane Vesicles. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 171, doi:[10.3390/ijms17020171](https://doi.org/10.3390/ijms17020171).
33. Zhang, G.; Yang, P. A novel cell-cell communication mechanism in the nervous system: Exosomes. *J. Neurosci. Res.* 2018, 96, 45–52, doi:[10.1002/jnr.24113](https://doi.org/10.1002/jnr.24113).
34. Yuyama, K.; Igarashi, Y. Physiological and pathological roles of exosomes in the nervous system. *Biomol. Concepts* 2016, 7, 53–68, doi:[10.1515/bmc-2015-0033](https://doi.org/10.1515/bmc-2015-0033).
35. Janas, A.M.; Sapon, K.; Janas, T.; Stowell, M.H.; Janas, T. Exosomes and other extracellular vesicles in neural cells and neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 2016, 1858, 1139–1151, doi:[10.1016/j.bbamem.2016.02.011](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.02.011).
36. Coleman, B.M.; Hill, A.F. Extracellular vesicles--Their role in the packaging and spread of misfolded proteins associated with neurodegenerative diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2015, 40, 89–96, doi:[10.1016/j.semcdb.2015.02.007](https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.007).
37. Quek, C.; Hill, A.F. The role of extracellular vesicles in neurodegenerative diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017, 483, 1178–1186, doi:[10.1016/j.bbrc.2016.09.090](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.090).
38. Karlawish, J.; Jack, C.R., Jr.; Rocca, W.A.; Snyder, H.M.; Carrillo, M.C. Alzheimer's disease: The next frontier-Special Report 2017. *Alzheimers Dement.* 2017, 13, 374–380, doi:[10.1016/j.jalz.2017.02.006](https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.02.006).
39. Munch, G.; Thome, J.; Foley, P.; Schinzel, R.; Riederer, P. Advanced glycation endproducts in ageing and Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1997, 23, 134–143.
40. Srikanth, V.; Maczurek, A.; Phan, T.; Steele, M.; Westcott, B.; Juskiw, D.; Munch, G. Advanced glycation endproducts and their receptor RAGE in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2011, 32, 763–777, doi:[10.1016/j.neurobiolaging.2009.04.016](https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.04.016).

41. Ko, S.Y.; Ko, H.A.; Chu, K.H.; Shieh, T.M.; Chi, T.C.; Chen, H.I.; Chang, W.C.; Chang, S.S. The Possible Mechanism of Advanced Glycation End Products (AGEs) for Alzheimer's Disease. *PLoS ONE* 2015, 10, e0143345, doi:10.1371/journal.pone.0143345.
42. Vicente Miranda, H.; El-Agnaf, O.M.A.; Outeiro, T.F. Glycation in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Mov. Disord.* 2016, 31, 782–790, doi:10.1002/mds.26566.
43. Xiao, T.; Zhang, W.; Jiao, B.; Pan, C.-Z.; Liu, X.; Shen, L. The role of exosomes in the pathogenesis of Alzheimer' disease. *Transl. Neurodegener* 2017, 6, 3–3, doi:10.1186/s40035-017-0072-x.
44. 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.
45. Smith, M.A.; Rudnicka-Nawrot, M.; Richey, P.L.; Praprotnik, D.; Mulvihill, P.; Miller, C.A.; Sayre, L.M.; Perry, G. Carbonyl-Related Posttranslational Modification of Neurofilament Protein in the Neurofibrillary Pathology of Alzheimer's Disease. *J. Neurochem.* 1995, 64, 2660–2666, doi:10.1046/j.1471-4159.1995.64062660.x.
46. Kuhla, B.; Haase, C.; Flach, K.; Lüth, H.-J.; Arendt, T.; Münch, G. Effect of Pseudophosphorylation and Cross-linking by Lipid Peroxidation and Advanced Glycation End Product Precursors on Tau Aggregation and Filament Formation. *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 6984–6991, doi:10.1074/jbc.M609521200.
47. Ahmed, N.; Ahmed, U.; Thornalley, P.J.; Hager, K.; Fleischer, G.; Münch, G. Protein glycation, oxidation and nitration adduct residues and free adducts of cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease and link to cognitive impairment. *J. Neurochem.* 2005, 92, 255–263, doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02864.x.
48. Beerli, M.S.; Moshier, E.; Schmeidler, J.; Godbold, J.; Uribarri, J.; Reddy, S.; Sano, M.; Grossman, H.T.; Cai, W.; Vlassara, H.; et al. Serum concentration of an inflammatory glycotoxin, methylglyoxal, is associated with increased cognitive decline in elderly individuals. *Mech. Ageing Dev.* 2011, 132, 583–587, doi:https://doi.org/10.1016/j.mad.2011.10.007.
49. Srikanth, V.; Westcott, B.; Forbes, J.; Phan, T.G.; Beare, R.; Venn, A.; Pearson, S.; Greenaway, T.; Parameswaran, V.; Münch, G. Methylglyoxal, cognitive function and cerebral

atrophy in older people. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2013, 68, 68–73, doi:10.1093/gerona/gls100.

50. Obata, T. Diabetes and semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) activity: A review. *Life Sci.* 2006, 79, 417–422, doi:10.1016/j.lfs.2006.01.017.

51. del Mar Hernandez, M.; Esteban, M.; Szabo, P.; Boada, M.; Unzeta, M. Human plasma semicarbazide sensitive amine oxidase (SSAO), beta-amyloid protein and aging. *Neurosci. Lett.* 2005, 384, 183–187, doi:10.1016/j.neulet.2005.04.074.

52. Unzeta, M.; Solé, M.; Boada, M.; Hernández, M. Semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) and its possible contribution to vascular damage in Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm.* 2007, 114, 857–862, doi:10.1007/s00702-007-0701-0.

53. Sole, M.; Esteban-Lopez, M.; Taltavull, B.; Fabregas, C.; Fado, R.; Casals, N.; Rodriguez-Alvarez, J.; Minano-Molina, A.J.; Unzeta, M. Blood-brain barrier dysfunction underlying Alzheimer's disease is induced by an SSAO/VAP-1-dependent cerebrovascular activation with enhanced Abeta deposition. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2019, 1865, 2189–2202, doi:10.1016/j.bbadis.2019.04.016.

54. Thornalley, P.J.; Langborg, A.; Minhas, H.S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem. J.* 1999, 344 Pt 1, 109-116.

55. Kalapos, M.P. Where does plasma methylglyoxal originate from? *Diabetes Res. Clin. Pr.* 2013, 99, 260–271, doi:10.1016/j.diabres.2012.11.003.

56. Sousa Silva, M.; Gomes, R.A.; Ferreira, A.E.; Ponces Freire, A.; Cordeiro, C. The glyoxalase pathway: The first hundred years. and beyond. *Biochem. J.* 2013, 453, 1–15, doi:10.1042/bj20121743.

57. Bermejo, P.; Martin-Aragon, S.; Benedi, J.; Susin, C.; Felici, E.; Gil, P.; Ribera, J.M.; Villar, A.M. Peripheral levels of glutathione and protein oxidation as markers in the development of Alzheimer's disease from Mild Cognitive Impairment. *Free Radic. Res.* 2008, 42, 162–170, doi:10.1080/10715760701861373.

58. Puertas, M.C.; Martinez-Martos, J.M.; Cobo, M.P.; Carrera, M.P.; Mayas, M.D.; Ramirez-Exposito, M.J. Plasma oxidative stress parameters in men and women with early stage Alzheimer type dementia. *Exp. Gerontol.* 2012, 47, 625–630, doi:10.1016/j.exger.2012.05.019.

59. Kuhla, B.; Boeck, K.; Luth, H.J.; Schmidt, A.; Weigle, B.; Schmitz, M.; Ogunlade, V.; Munch, G.; Arendt, T. Age-dependent changes of glyoxalase I expression in human brain. *Neurobiol. Aging* 2006, 27, 815–822, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.04.006.
60. Kuhla, B.; Boeck, K.; Schmidt, A.; Ogunlade, V.; Arendt, T.; Munch, G.; Luth, H.J. Age- and stage-dependent glyoxalase I expression and its activity in normal and Alzheimer's disease brains. *Neurobiol. Aging* 2007, 28, 29–41, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.11.007.
61. Munch, G.; Westcott, B.; Menini, T.; Gugliucci, A. Advanced glycation endproducts and their pathogenic roles in neurological disorders. *Amino Acids* 2012, 42, 1221–1236, doi:10.1007/s00726-010-0777-y.
62. Di Loreto, S.; Caracciolo, V.; Colafarina, S.; Sebastiani, P.; Gasbarri, A.; Amicarelli, F. Methylglyoxal induces oxidative stress-dependent cell injury and up-regulation of interleukin-1beta and nerve growth factor in cultured hippocampal neuronal cells. *Brain Res.* 2004, 1006, 157–167, doi:10.1016/j.brainres.2004.01.066.
63. Di Loreto, S.; Zimmitti, V.; Sebastiani, P.; Cervelli, C.; Falone, S.; Amicarelli, F. Methylglyoxal causes strong weakening of detoxifying capacity and apoptotic cell death in rat hippocampal neurons. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2008, 40, 245–257, doi:https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.07.019.
64. Chen, K.; Maley, J.; Yu, P.H. Potential implications of endogenous aldehydes in beta-amyloid misfolding, oligomerization and fibrillogenesis. *J. Neurochem.* 2006, 99, 1413–1424, doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04181.x.
65. Emendato, A.; Milordini, G.; Zacco, E.; Sicorello, A.; Dal Piaz, F.; Guerrini, R.; Thorogate, R.; Picone, D.; Pastore, A. Glycation affects fibril formation of Aβ peptides. *J. Biol. Chem.* 2018, 293, 13100–13111, doi:10.1074/jbc.RA118.002275.
66. Angeloni, C.; Zambonin, L.; Hrelia, S. Role of methylglyoxal in Alzheimer's disease. *Biomed. Res. Int.* 2014, 2014, 238485–238485, doi:10.1155/2014/238485.
67. Acheson, A.; Conover, J.C.; Fandl, J.P.; DeChiara, T.M.; Russell, M.; Thadani, A.; Squinto, S.P.; Yancopoulos, G.D.; Lindsay, R.M. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature* 1995, 374, 450–453, doi:10.1038/374450a0.
68. Lu, B.; Nagappan, G.; Guan, X.; Nathan, P.J.; Wren, P. BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 2013, 14, 401–416, doi:10.1038/nrn3505.

69. Fragkouli, A.; Tsilibary, E.C.; Tzinia, A.K. Neuroprotective role of MMP-9 overexpression in the brain of Alzheimer's 5xFAD mice. *Neurobiol. Dis.* 2014, 70, 179–189, doi:10.1016/j.nbd.2014.06.021.
70. O'Brien, R.J.; Wong, P.C. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 2011, 34, 185–204, doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113613.
71. Haque, A.; Polcyn, R.; Matzelle, D.; Banik, N.L. New Insights into the Role of Neuron-Specific Enolase in Neuro-Inflammation, Neurodegeneration, and Neuroprotection. *Brain Sci.* 2018, 8, 33.
72. Zheng, H.; Koo, E.H. The amyloid precursor protein: Beyond amyloid. *Mol. Neurodegener* 2006, 1, 5, doi:10.1186/1750-1326-1-5.
73. Kaminari, A.; Tsilibary, E.C.; Tzinia, A. A New Perspective in Utilizing MMP-9 as a Therapeutic Target for Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes Mellitus. *J. Alzheimer's Dis.* 2018, 1–16.
74. Mendsaikhan, A.; Tooyama, I.; Walker, D.G. Microglial Progranulin: Involvement in Alzheimer's Disease and Neurodegenerative Diseases. *Cells* 2019, 8, doi:10.3390/cells8030230.
75. Vienberg, S.G.; Kleinridders, A.; Suzuki, R.; Kahn, C.R. Differential effects of angiotensin-like 4 in brain and muscle on regulation of lipoprotein lipase activity. *Mol. Metab.* 2014, 4, 144–150, doi:10.1016/j.molmet.2014.11.003.
76. Song, J.; Kim, O.Y. Perspectives in Lipocalin-2: Emerging Biomarker for Medical Diagnosis and Prognosis for Alzheimer's Disease. *Clin. Nutr. Res.* 2018, 7, 1–10, doi:10.7762/cnr.2018.7.1.1.
77. Ishii, T.; Warabi, E.; Mann, G.E. Circadian control of BDNF-mediated Nrf2 activation in astrocytes protects dopaminergic neurons from ferroptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 2019, 133, 169–178, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.002.
78. Lee, S.; Lee, W.H.; Lee, M.S.; Mori, K.; Suk, K. Regulation by lipocalin-2 of neuronal cell death, migration, and morphology. *J. Neurosci. Res.* 2012, 90, 540–550, doi:10.1002/jnr.22779.
79. Lee, S.; Kim, J.H.; Kim, J.H.; Seo, J.W.; Han, H.S.; Lee, W.H.; Mori, K.; Nakao, K.; Barasch, J.; Suk, K. Lipocalin-2 Is a chemokine inducer in the central nervous system: Role of chemokine ligand 10 (CXCL10) in lipocalin-2-induced cell migration. *J. Biol. Chem.* 2011, 286, 43855–43870, doi:10.1074/jbc.M111.299248.

80. Law, I.K.M.; Xu, A.; Lam, K.S.L.; Berger, T.; Mak, T.W.; Vanhoutte, P.M.; Liu, J.T.C.; Sweeney, G.; Zhou, M.; Yang, B.; et al. Lipocalin-2 deficiency attenuates insulin resistance associated with aging and obesity. *Diabetes* 2010, 59, 872–882, doi:10.2337/db09-1541.
81. Ferreira, A.C.; Pinto, V.; Da Mesquita, S.; Novais, A.; Sousa, J.C.; Correia-Neves, M.; Sousa, N.; Palha, J.A.; Marques, F. Lipocalin-2 is involved in emotional behaviors and cognitive function. *Front. Cell Neurosci.* 2013, 7, 122, doi:10.3389/fncel.2013.00122.
82. Fleitas, C.; Pinol-Ripoll, G.; Marfull, P.; Rocandio, D.; Ferrer, I.; Rampon, C.; Egea, J.; Espinet, C. proBDNF is modified by advanced glycation end products in Alzheimer's disease and causes neuronal apoptosis by inducing p75 neurotrophin receptor processing. *Mol Brain* 2018, 11, 68, doi:10.1186/s13041-018-0411-6.
83. Mihoub, M.; Abdallah, J.; Gontero, B.; Dairou, J.; Richarme, G. The DJ-1 superfamily member Hsp31 repairs proteins from glycation by methylglyoxal and glyoxal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015, 463, 1305–1310, doi:10.1016/j.bbrc.2015.06.111.
84. Sharma, N.; Rao, S.P.; Kalivendi, S.V. The deglycase activity of DJ-1 mitigates alpha-synuclein glycation and aggregation in dopaminergic cells: Role of oxidative stress mediated downregulation of DJ-1 in Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 2019, 135, 28–37, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.02.014.
85. Kalani, A.; Tyagi, A.; Tyagi, N. Exosomes: Mediators of Neurodegeneration, Neuroprotection and Therapeutics. *Mol. Neurobiol.* 2014, 49, 590–600, doi:10.1007/s12035-013-8544-1.
86. Goetzl, E.J.; Abner, E.L.; Jicha, G.A.; Kapogiannis, D.; Schwartz, J.B. Declining levels of functionally specialized synaptic proteins in plasma neuronal exosomes with progression of Alzheimer's disease. *FASEB J.* 2018, 32, 888–893, doi:10.1096/fj.201700731R.
87. Zhao, Z.H.; Chen, Z.T.; Zhou, R.L.; Zhang, X.; Ye, Q.Y.; Wang, Y.Z. Increased DJ-1 and alpha-Synuclein in Plasma Neural-Derived Exosomes as Potential Markers for Parkinson's Disease. *Front. Aging Neurosci.* 2018, 10, 438, doi:10.3389/fnagi.2018.00438.
88. Baba, S.P.; Barski, O.A.; Ahmed, Y.; O'Toole, T.E.; Conklin, D.J.; Bhatnagar, A.; Srivastava, S. Reductive metabolism of AGE precursors: A metabolic route for preventing AGE accumulation in cardiovascular tissue. *Diabetes* 2009, 58, 2486–2497, doi:10.2337/db09-0375.
89. Nomi, Y.; Aizawa, H.; Kurata, T.; Shindo, K.; Nguyen, C.V. Glutathione reacts with glyoxal at the N-terminal. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2009, 73, 2408–2411, doi:10.1271/bbb.90340.

90. Yang, K.; Qiang, D.; Delaney, S.; Mehta, R.; Bruce, W.R.; O'Brien, P.J. Differences in glyoxal and methylglyoxal metabolism determine cellular susceptibility to protein carbonylation and cytotoxicity. *Chem. Biol. Interact.* 2011, 191, 322–329, doi:10.1016/j.cbi.2011.02.012.
91. da Silva, G. Hydroxyl radical regeneration in the photochemical oxidation of glyoxal: Kinetics and mechanism of the HC(O)CO + O₂ reaction. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2010, 12, 6698–6705, doi:10.1039/B927176G.
92. Galano, A.; Alvarez-Ldaboy, J.R.; Ruiz-Santoyo, M.E.; Vivier-Bunge, A. Mechanism and kinetics of the reaction of OH radicals with glyoxal and methylglyoxal: A quantum chemistry + CVT/SCT approach. *Chemphyschem* 2004, 5, 1379–1388, doi:10.1002/cphc.200400127.
93. McKhann, G.; Drachman, D.; Folstein, M.; Katzman, R.; Price, D.; Stadlan, E.M. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984, 34, 939–944.
94. Petersen, R.C.; Smith, G.E.; Waring, S.C.; Ivnik, R.J.; Tangalos, E.G.; Kokmen, E. Mild cognitive impairment: Clinical characterization and outcome. *Arch. Neurol.* 1999, 56, 303–308.
95. Pawelec, G.; Ferguson, F.G.; Wikby, A. The SENIEUR protocol after 16 years. *Mech. Ageing Dev.* 2001, 122, 132–134.
96. Folstein, M.F.; Folstein, S.E.; McHugh, P.R. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. Psychiatr. Res.* 1975, 12, 189–198.
97. Nasreddine, Z.S.; Phillips, N.A.; Bedirian, V.; Charbonneau, S.; Whitehead, V.; Collin, I.; Cummings, J.L.; Chertkow, H. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: A brief screening tool for mild cognitive impairment. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2005, 53, 695–699, doi:10.1111/j.1532-5415.2005.53221.x.
98. Dhar, A.; Desai, K.; Liu, J.; Wu, L. Methylglyoxal, protein binding and biological samples: Are we getting the true measure? *J. Chromatogr. B* 2009, 877, 1093–1100, doi:https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.02.055.

Supplementary Materials

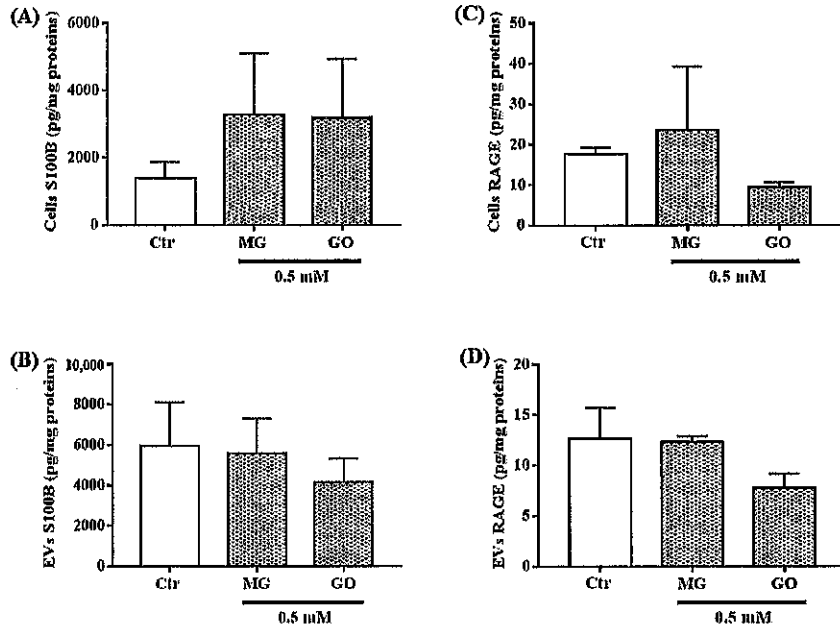


Figure S1. S100 B and RAGE levels in EVs and SK-N-SH controls cells and exposed to MG and GO. The level of each marker is normalized using total protein concentration. The graphed showed S 100B (A and B) and RAGE levels (C and D) in SK-N-SH cells and EVs. Values are mean \pm S.E.M (from three separate experiments) and data groups were compared with one-way ANOVA followed by the Dunnett's post hoc test.

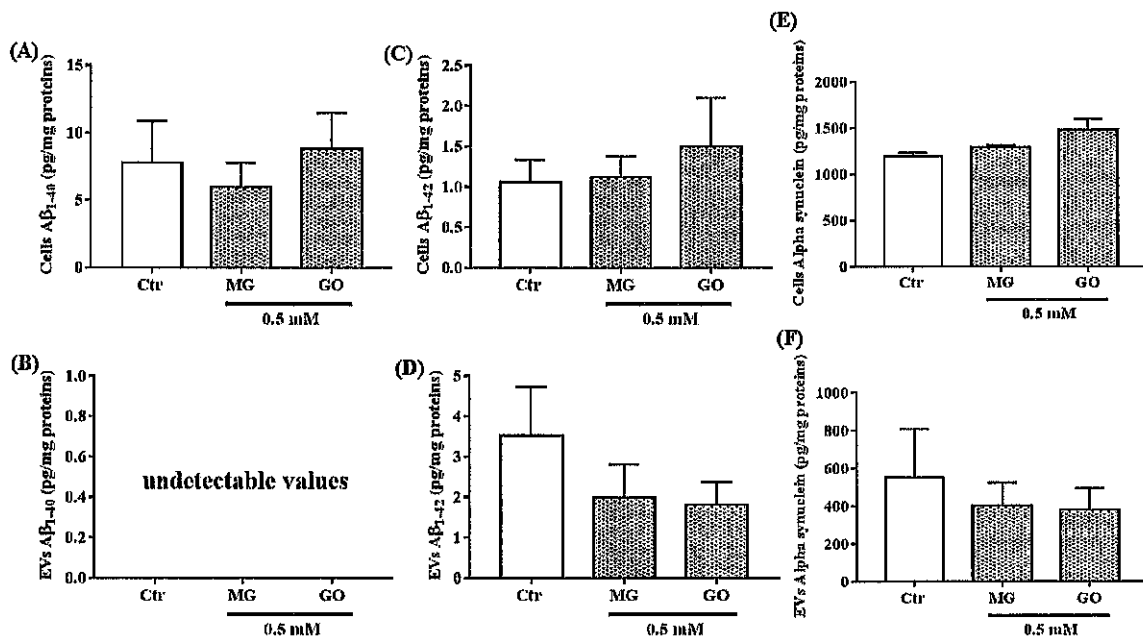


Figure S2. A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂ and alpha synuclein levels in EVs and SK-N-SH controls cells and exposed to MG and GO. The level of each marker is normalized using total protein concentration. The graphed showed A β ₁₋₄₀ (A and B), A β ₁₋₄₂ (C and D) and alpha synuclein levels (E and F) in SK-N-SH cells and EVs. Values are mean \pm S.E.M (from three separate experiments) and data groups were compared with one-way ANOVA followed by the Dunnett's post hoc test.

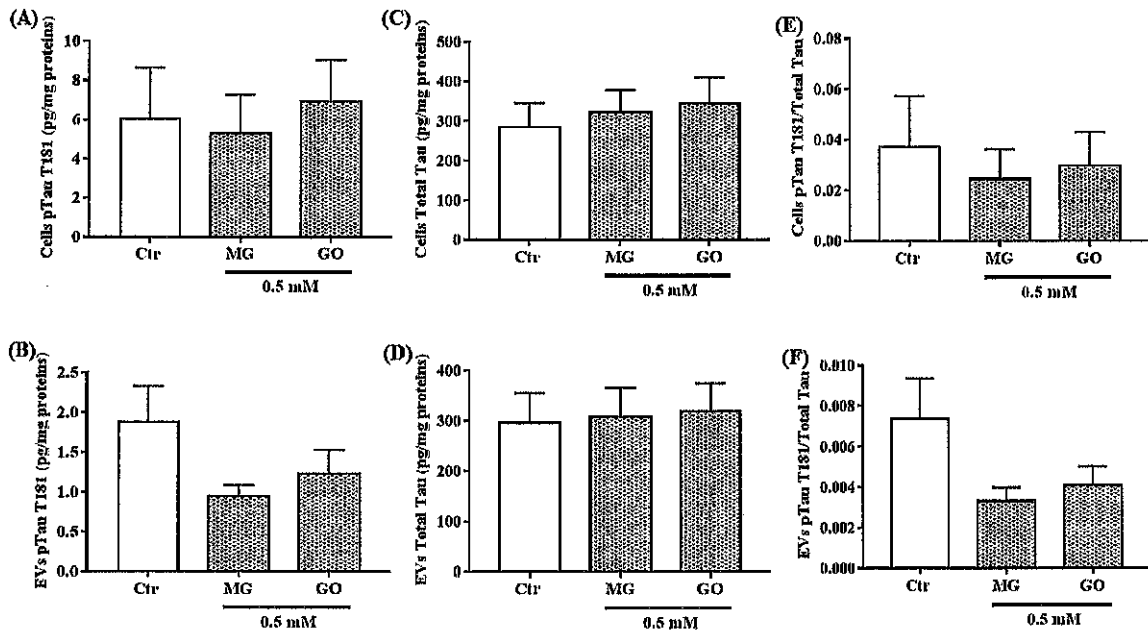


Figure S3. Phosphorylated tau T181 and total tau levels in EVs and SK-N-SH controls cells and exposed to MG and GO. The level of each marker is normalized using total protein concentration. The graphed showed ptau T181 (A and B), total tau levels (C and D) and ratio of ptau and total tau (E and F) in SK-N-SH cells and EVs. Values are mean \pm S.E.M (from three separate experiments) and data groups were compared with one-way ANOVA followed by the Dunnett's post hoc test.

Table S1. Assay sensitivities for all markers (minimum detectable concentrations) in pg/ml.

Markers	Assay sensitivity (minimum detectable concentrations in pg/ml)
BDNF	0.32
PRGN	195
NSE	140
APP	349
MMP9	13.6
ANGPTL-4	86
LCN2	29.2
PTX2	1.66
S100B	4.34
RAGE	7.2
DJ-1	49.1
Alpha synuclein	5.16
A β ₁₋₄₀	6.2
A β ₁₋₄₂	1.3
pTau T181	0.7
Total tau	8.9
CML	15,6

5 CHAPITRE 4 : ARTICLE 3

Levels of receptor for advanced glycation end products and glyoxalase-1 in the total circulating extracellular vesicles predict the progression of Alzheimer's disease

Auteurs de l'article : Mohamed Haddad ¹, Morgane Perrotte ^{1,2}, Mohamed Raâfet Ben Khedher ^{1,2}, Elise Madec ¹, Aurelie Lepage ³, Tamás Fülöp ³, Charles Ramassamy ^{1,2*}

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

2 Réseau Québécois de Recherche sur le Vieillissement, Montréal, QC, Canada

3 Department of Medicine, Geriatric Division, Research Center on Aging, Sherbrooke

*Correspondence: Charles.Ramassamy@iaf.inrs.ca

Statut de l'article : Soumis dans le journal of IJMS (International Journal of Molecular Sciences).

5.1 Résumé et objectifs de l'article 3

Plusieurs études confirment que le récepteur des produits de glycation avancés (RAGE), la protéine gliale (GFAP) et l'enzyme glyoxalase 1 (GLO-1) sont impliqués dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer (MA). Les vésicules extracellulaires (EVs) de la périphérie sont considérées comme un outil d'identification des biomarqueurs de diagnostic de la MA. Les niveaux vésiculaires de RAGE, GFAP et GLO-1 chez des patients MCI (mild cognitive impairment) et atteints de la MA ainsi que leur association avec les fonctions cognitives n'ont pas été étudiés. De plus, la possibilité que les neurones libèrent l'enzyme GLO-1 à travers les EVs demeure inconnue. Dans cette étude, nous avons mesuré les niveaux vésiculaires de RAGE par Luminex. De plus, les taux sériques et vésiculaires de GFAP et de GLO-1 ont été déterminés par Western blot et leur association avec les scores cognitifs a été analysée. Enfin, nous avons étudié la possibilité que les cellules neuronales transfèrent le GLO-1 à travers les EV. Nos données ont montré une augmentation des niveaux vésiculaires de RAGE chez les patients du stade sévère de la MA par rapport à des patients MCI et atteint de la maladie au stade précoce et modéré. Les niveaux vésiculaires de GLO-1 ont été significativement inférieurs chez des patients au stade léger de la MA par rapport aux sujets témoins et aux patients MCI. Cependant, les niveaux de GLO-1 dans le sérum et les niveaux vésiculaires et sériques de GFAP n'ont pas montré de différences entre les groupes. Fait intéressant, les niveaux vésiculaires de RAGE, GLO-1 et

GFAP ont été corrélés avec les scores cognitifs indépendamment de l'âge. Pour la première fois, nous avons démontré la présence de GLO-1 dans les EVs libérés par les cellules neuronales. Les niveaux d'EVs périphériques de GLO-1 et de RAGE pourraient donc être utilisés comme signature clinique pour la progression de la MA.

5.2 Contribution de l'étudiant à l'article 3

L'article est soumis dans le journal IJMS (International Journal of Molecular Sciences). La majorité du travail et des expériences décrites dans cette publication ont été réalisées par moi-même (dosage des protéines totales du sérum et des EVs, dosage vésiculaire de récepteur RAGE par luminex, dosage de GLO-1 et GFAP par Western blot, isolation et caractérisation des EVs et culture cellulaires). Le dosage des niveaux vésiculaires de RAGE a été réalisé par Luminex avec l'aide de Morgane Perrotte et Mohamed Raâfet Ben Khedher (deux doctorants dans notre laboratoire). Le dosage des niveaux sériques et vésiculaires de GLO-1 et de GFAP a été réalisé avec l'aide d'Élise Madec pendant son stage dans notre laboratoire. Le recrutement des patients, la collecte et la préparation des échantillons sanguins ont été réalisés grâce aux efforts d'Aurélié Le Page et son superviseur le professeur Tamas Fulop. J'ai également analysé les résultats et écrit les différentes parties de l'article. Ce dernier a ensuite été révisé et corrigé par le professeur Charles Ramassamy.

5.3 Article 3

Levels of receptor for advanced glycation end products and glyoxalase-1 in the total circulating extracellular vesicles predict the progression of Alzheimer's disease

Abstract

Growing evidence support that receptor for advanced glycation end products (RAGE), glial fibrillary acidic protein (GFAP) and glyoxalase 1 (GLO-1) are implicated in the pathophysiology of Alzheimer's disease (AD). Extracellular vesicles (EVs) are nanovesicles secreted by almost all cell types, contribute in cell-to-cell communication and are implicated in the pathology of AD. Recently, EVs are considered as promising tools to identify reliable biomarkers in AD. The aim of our study was to determine the levels of RAGE, GFAP and GLO-1 in circulating EVs from MCI (mild cognitive impairment) and AD patients and to analyse their correlation with the clinical MMSE and MoCA scores. EVs RAGE levels were measured by Luminex assay while EVs and serum levels of GFAP and GLO-1 by Western blot. Finally, we have studied the possibility that neuronal cells could release and transfer GLO-1 through EVs. Our data showed higher levels of

EVs RAGE in late stage of AD patients while EVs GLO-1 levels were significantly decreased in early AD as compared to control subjects and MCI. GLO-1 in serum and GFAP levels in both serum and EVs were not different between different groups. Interestingly, EVs RAGE, GLO-1 and GFAP levels were correlated with the clinical cognitive scores independently of age. For the first time, we demonstrate that GLO-1 was present in EVs released from neuronal cells. Thus, our results suggest that peripheral EVs levels of GLO-1 and RAGE can be used as a clinical signature for AD progression.

Keywords: Alzheimer's disease, Mild cognitive impairment, Extracellular vesicles, Receptor for advanced glycation end products (RAGE), Glyoxalase 1,

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia and its prevalence continue to increase worldwide in the absence of prevention strategies and effective treatments [1]. AD is pathologically characterized by the accumulation of the amyloid beta ($A\beta$) plaques and hyperphosphorylation of tau proteins that forms neurofibrillary tangles (NFTs) [2]. Clinically, AD is defined by a progressive decline in cognitive function and memory loss as well as behavior changes [3]. To date, AD diagnosis is based on the patient history, the clinical scores on cognitive assays which could be completed with the phosphorylated tau and $A\beta$ 1-42 ratio in the cerebrospinal fluid (CSF) combined with the morphology and functional brain imaging [4]. However, the relative invasiveness of the CSF sample collection and the high costs of $A\beta$ and tau brain-imaging limit their usefulness for routine clinical testing and for follow-up assessments. Therefore, there is a growing need to identify peripheral biomarkers which are able to predict AD progression [5].

Accumulating evidence support the implication of receptor for advanced glycation end products (RAGE), glial fibrillary acidic protein (GFAP) and glyoxalase 1 (GLO-1) in the pathophysiology of AD. RAGE can bind a variety of ligands such as advanced glycation end products (AGEs), $A\beta$, high mobility group box-1 protein (HMGB1) and several S100 family proteins [6]. In CNS, the binding of AGEs as well as $A\beta$ to RAGE induce pathophysiological and cellular responses including oxidative stress, release of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6 via the NF- κ B activation, BACE1 overexpression, $A\beta$ generation and senile plaques formation, tau hyperphosphorylation and glial cells activation [7-11]. RAGE also plays a key role as cargo transporter by facilitating the influx of circulating blood $A\beta$ across the blood brain barrier (BBB) [12,13]. In contrast to RAGE, its soluble form (sRAGE), that is generated by a proteolytic cleavage of RAGE located at the membrane surface or by alternative splicing, can interact with circulating

ligands and prevent their neurotoxicity [14]. In AD and MCI patients, there is a decrease of circulating RAGE levels [15-17]. In AD brain, the expression of RAGE was found to be higher in neuronal and glial cells in hippocampus and cortex as compared to control brains [18]. In glial cells, RAGE can activate the transcription factor NF- κ B and the expression of TNF- α and GFAP [19].

GFAP is defined as the major component of the intermediate filament family proteins which are expressed in most of mature astrocytes. Intermediate filaments are dynamic structures that are involved in a range of cellular processes during homeostasis and stress [20]. Indeed, in response to damages inflicted on the CNS, astrocytes can undergo an activation step named astrogliosis that is characterized by an increase in the GFAP expression, morphological alterations and functional changes [21,22]. In AD brain, GFAP expression is highly associated with early A β plaques and NFTs formation suggesting that astrogliosis reactions may be an early marker of AD neurodegenerative processes and a potential predictor of the disease progression [23,24]. A strong upregulation of GFAP in both hippocampus and CSF was described in AD brain [25,26].

GLO-1, a cytosolic protein, is the unique scavenging enzyme of methylglyoxal (MG) and glyoxal (GO) which are the most important precursors of AGEs. GLO-1 catalyzes the conversion of MG to S-D-lactoylglutathione with reduced glutathione (GSH) as a cofactor [27]. MG and GO induced cellular damages by increasing the intracellular reactive oxygen species production, tau hyperphosphorylation, mitochondrial dysfunction, A β release and could therefore contribute to the pathogenesis of neurodegenerative diseases [28]. In peripheral, we have recently demonstrated that the serum levels of MG and GO were increased in MCI patients [29]. In AD brain, GLO-1 expression is upregulated in the early stages of AD but is gradually downregulated in the middle and late stages of AD [30].

Extracellular vesicles (EVs), a set of various membrane-bound particles such as exosomes and microvesicles, are secreted by all cells and contains a variety of membrane and intracellular proteins as well as lipids and nucleic acids [31]. EVs are implicated in cell-to-cell communication by transferring many biological materials from donor cells and participate in physiological and pathogenic processes in recipient cells [32,33]. In the brain, EVs are key players of the intercellular communication between neurons, astrocytes, oligodendrocytes and microglia [34,35]. Many studies have demonstrated the implication of EVs in AD pathogenesis by their capacity to deliver and propagate misfolded proteins related to AD such as A β and hyperphosphorylated tau [36-38]. Moreover, EVs have attracted attention as a potential reservoir of biomarkers for neurodegenerative diseases due to their ability to cross the blood-brain barrier

(BBB) in both directions [39-41]. Some recent studies have indicated that neuronal-derived exosomes can be isolated from the blood, using a surface located protein, L1-cell adhesion molecule (L1CAM) [42-45]. However, this strategy could be non-specific for the detection of neuronal exosomes, since L1CAM are expressed in other cell types such as kidney [46,47]. The objectives of this study were to demonstrate that the total circulating EVs could also offer an interesting tool to identify potential AD markers. The aim of this study was to compare the circulating levels of RAGE, GFAP and GLO-1 in EVs and serum between controls, MCI and AD patients and to evaluate their association with MMSE and MoCA cognitive tests. Furthermore, we have explored the possibility of the release of GLO-1 by neuronal cells in culture through EVs.

2. Results

2.1. Controls subjects, MCI and AD patients' characteristics

Gender, age and scores of cognitive tests (MMSE and MoCA) of participants are presented in the table 1. Significant differences were observed on the mean age between control subjects, MCI and AD patients. MMSE scores were significantly lower in AD groups as compared to control subjects. However, the mean and standard error of MoCA scores were significantly lower in MCI patients and AD groups as compared to control subjects. LS (AD) patients were not able to answer or complete the questions of MMSE and MoCA tests.

Table 1. Clinical characteristics of the study population.

Parameters	Controls subjects (n=10)	MCI patients (n=10)	AD patients		
			ES (AD) (n=10)	MS (AD) (n=10)	LS (AD) (n=10)
Female gender	8	9	10	7	8
Age (years)	69.6 ± 1.6	76.8 ± 0.6***	76.3 ± 1.4***	79.4 ± 1.1***	82.4 ± 1.5***
MMSE scores (/30)	29.4 ± 0.3	27.4 ± 0.5	24.7 ± 0.7***	19.4 ± 1.3***	ND
MoCA scores (/30)	27.8 ± 0.6	22.6 ± 1.3**	19.3 ± 1.5***	13.2 ± 1.2***	ND

Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA followed by LSD test with * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus control subjects. Values are mean ± standard error of the mean (SEM). Abbreviations: AD: Alzheimer disease; ES: early stage of Alzheimer disease; MS: Moderate-stage of Alzheimer disease; LS: late-stage of Alzheimer disease; MMSE. Mini-Mental State Examination; MoCA. Montreal Cognitive Assessment; ND: not detected.

2.2. RAGE levels in peripheral EVs

Circulating EVs from control subjects, MCI and AD patients were isolated and characterized as previously described [48,49]. Our results showed that peripheral EVs contained RAGE and its levels were not different between controls, MCI and AD groups except for the late stage of AD which expressed higher levels as compared to other groups (Fig 1).

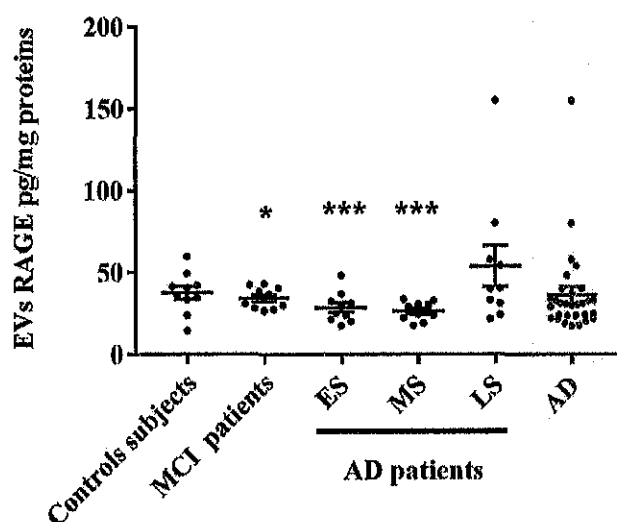


Figure 1. EVs RAGE levels in control subjects, MCI and different groups of AD patients. Each point represents the value for one patient or control subject. Difference between groups were analyzed with the one-way ANOVA followed by LSD test. Values are mean \pm SEM with * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ versus LS AD patients. Abbreviations: AD: Alzheimer disease; ES: early stage of Alzheimer disease; MS: Moderate-stage of Alzheimer disease; LS: late-stage of Alzheimer disease; EVs: Extracellular vesicles.

2.3. GFAP and GLO-1 levels in serum and EVs

GFAP and GLO-1 were detected in both serum and circulating EVs. Molecular weight of detected GFAP in serum and EVs is 50 KDa, the same as in the brain. We found no significant difference in the serum or EVs GFAP levels between different groups of subjects (Fig 2A-D). Interestingly, the comparison between GFAP levels in serum and EVs showed around 10-fold higher levels in EVs than in serum (Fig 2E). Without stratification of different AD groups, the levels of GFAP was not different between control and AD group (Fig 2B and D).

Dimeric form of GLO-1 (46 KDa) was detected in serum and EVs of all groups (Fig 3A-C). GLO-1 levels in serum were not different among five groups (Fig 3B). Interestingly EVs GLO-1 levels were significantly decreased in AD group and specifically in early AD group as compared to control subjects and MCI patients (Fig 3D). To note, EVs GLO-1 levels were four-fold higher in EVs than in serum suggesting that, in EVs, GLO-1 are protected from degradation (Fig 3E).

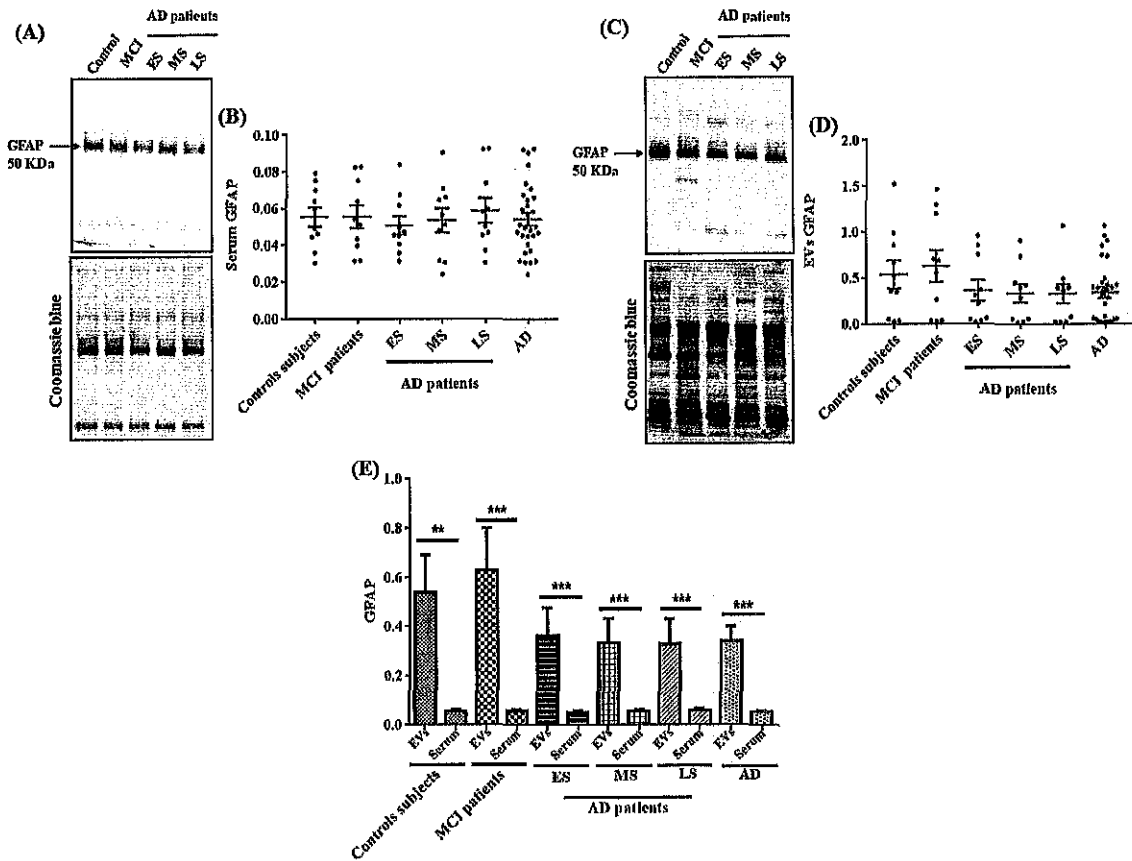


Figure 2. Evaluation of serum and EVs GFAP levels from control, MCI and different AD groups by Western blot. (A, C): Representative Western blot of GFAP detection in serum (A) and in EVs (C). Coomassie blue stained total proteins was used as the loading control of serum and EVs samples. (B, D): Quantitative results of normalized GFAP in serum (B) and in EVs (D) to their respective loading total proteins. Each point represents the value obtained from one patient or control subject. The difference between groups was analyzed with one-way ANOVA followed by the LSD post hoc test. (E): Comparison between serum and EVs GFAP levels in different study groups. The difference in each group was analyzed with Student-t test. Values are mean \pm S.E.M with ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

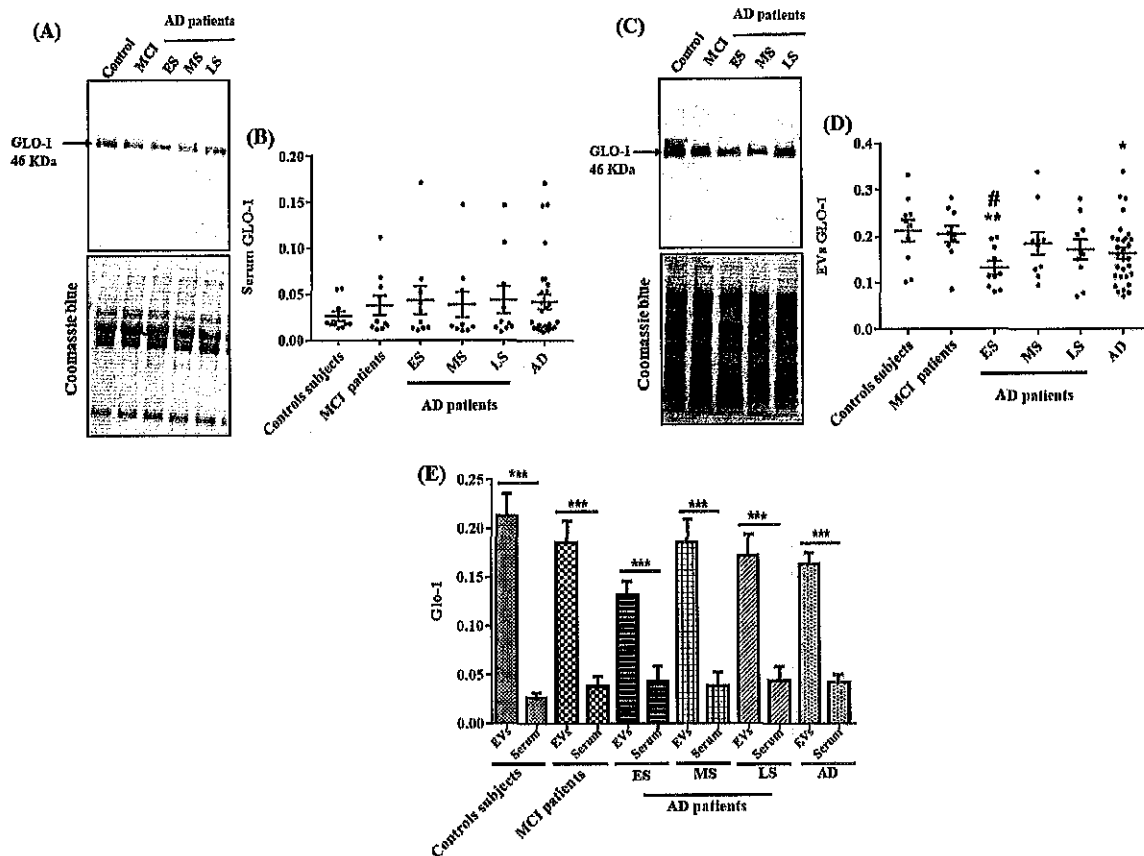


Figure 3. Evaluation of serum and EVs GLO-1 levels from control, MCI and different AD groups by Western blot. **(A, C):** Representative Western blot of GLO-1 detection in serum **(A)** and in EVs **(C)**. Coomassie blue stained total proteins was used as the loading control of serum and EVs samples. **(B, D):** Quantitative results of the normalized of GLO-1 in serum **(B)** and in EVs **(D)** to their respective loading total proteins. Each point represents the value obtained from one patient or control subject. The difference between groups was analyzed with one-way ANOVA followed by the LSD post hoc test. Values are mean \pm S.E.M with $** p < 0.01$, $*** p < 0.001$ versus control subjects. $\# p < 0.05$, versus MCI patients. **(E):** Comparison between serum and EVs GLO-1 levels in different study groups. The difference in each group was analyzed with Student-t test. Values are mean \pm S.E.M with $*** p < 0.001$.

2.4. RAGE and GLO-1 levels in EVs differentiate stage of AD

The ability of the RAGE and GLO-1 EVs levels to distinguish different AD stages from MCI patients and control subjects was assessed using the ROC analysis. We found that RAGE levels in EVs provide a fair classification of the LS AD patients from ES and MS AD patients with an area under the curve (AUC) of 0.79 (95% CI: 0.58–0.99, $p = 0.02$) and 0.83 (95% CI: 0.63–1.02, $p = 0.01$), respectively (Fig 4A, B).

To distinguish ES AD patients from control subjects and MCI patients, ROC curves for GLO-1 levels in EVs show high classification accuracy with AUC of 0.82 (95% CI: 0.62–1.01, $p = 0.015$) and 0.85(95% CI: 0.67–1.02, $p = 0.008$), respectively (Fig 4C, D).

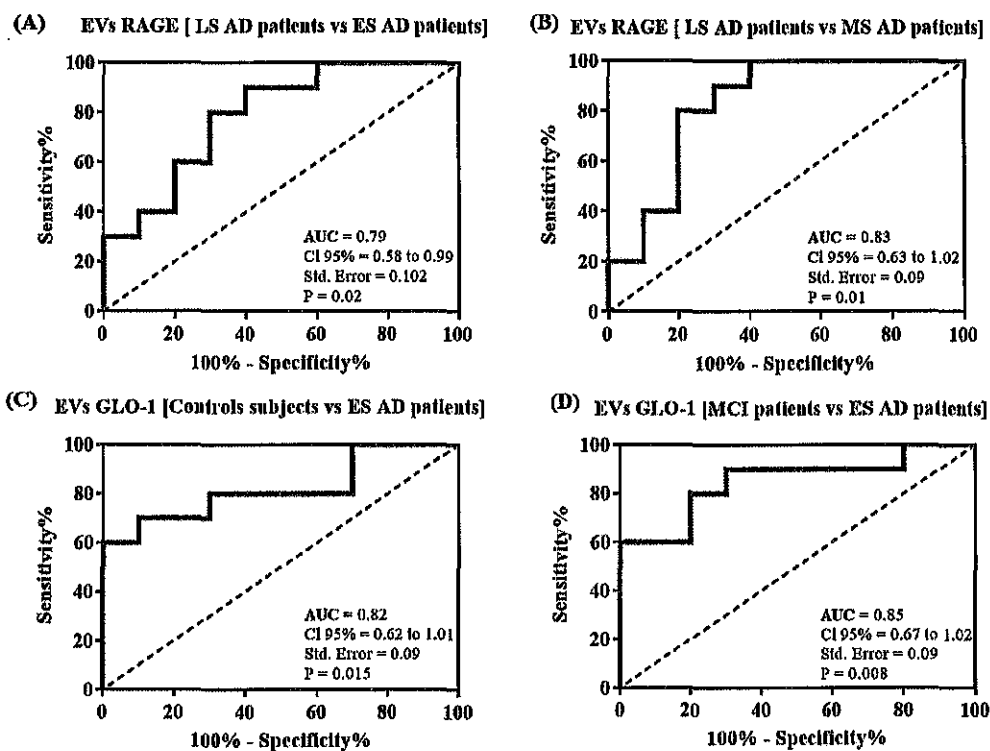


Figure 4. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. The plots represent the performance of RAGE levels in EVs to differentiate LS AD patients to ES and MS AD patients (A, B) and the performance of GLO-1 levels in EVs to differentiate ES AD patients to MCI and control subjects (C, D). Area under the curve (AUC) values, 95% confidence intervals (CI 95%), standard error (Std. Error) and p values are indicated on the curve.

2.5. Correlation between RAGE, GFAP and GLO-1 levels and cognitive scores

Pearson correlation was used to analyze the correlation between RAGE, GFAP, GLO-1 levels and the cognitive scores (MMSE and MoCA). We found a correlation between the RAGE levels in EVs and the MMSE but not with the MoCA scores (Fig 5A, B) while the GLO-1 levels in EVs were correlated with the MoCA and not with MMSE scores (Fig 5C, D). However, no correlation was found between the serum GLO-1 levels and both the MMSE and MoCA scores (Fig 5E, F). GFAP levels in serum and EVs were correlated with the MoCA scores (Fig 5G, J). Levels of RAGE, GFAP and GLO-1 were not age-dependent (Fig S1).

We found a positive correlation between GLO-1 and GFAP levels in EVs and serum (Fig 6A, B), between EVs RAGE and serum GFAP levels (Fig 6C), a negative correlation between EVs GLO-1 and serum levels was shown (Fig 6D). However, there was no correlation between EVs RAGE and GLO-1 in EVs or serum, or between RAGE and GFAP levels in EVs. In addition, levels of GFAP in serum and in EVs were not correlated (Fig S2).

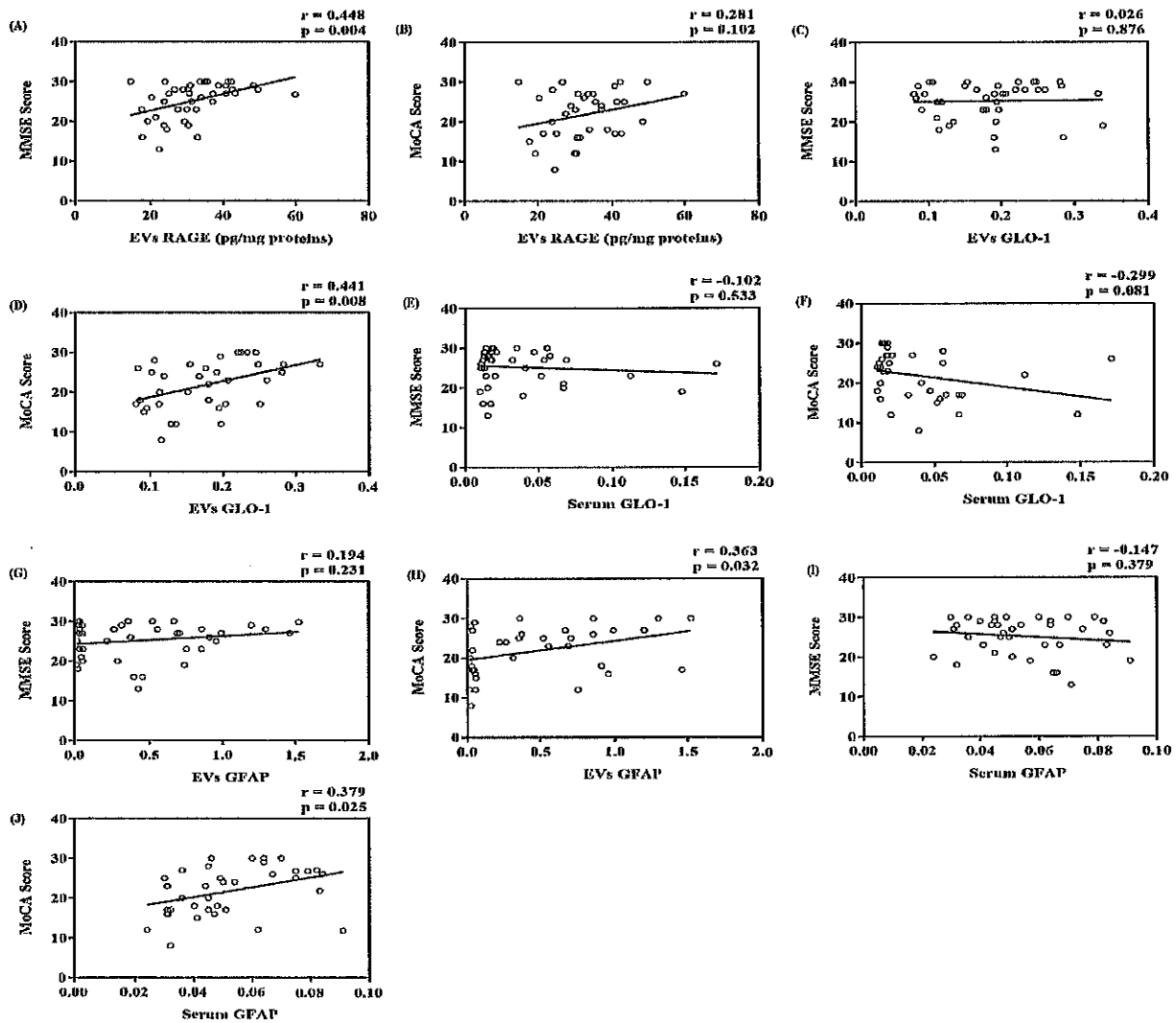


Figure 5. Correlation between RAGE, GFAP and GLO-1 levels and the cognitive scores (MMSE and MoCA) analyzed by the Pearson correlation:

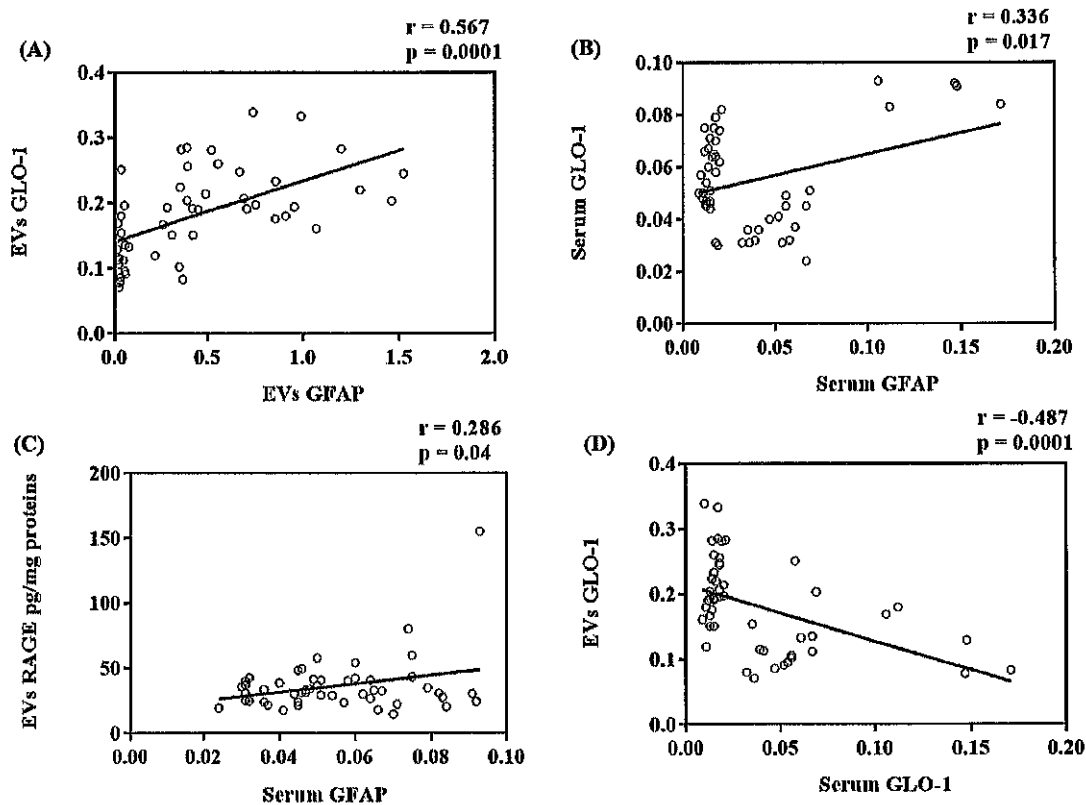


Figure 6. Statistical correlation between the RAGE, GFAP and GLO-1 levels: analyzed by the Pearson correlation.

2.6. Detection of GLO-1 in neuronal EVs

The release of GLO-1 in EVs by neuronal cells remains to be demonstrated. For this, we have isolated EVs from the neuronal SK-N-SH cell line and analyzed the presence of GLO-1. We have identified two forms of GLO-1, the monomeric 21 kD and the dimeric forms 46 kD. To note, both forms were present in neuronal and in neuronal derived-EVs but not in peripheral EVs from patients which have only the dimeric form (Fig 7A). Also, the levels of both forms of GLO-1 in neuronal-derived EVs represent only a small fraction of the total neuronal GLO-1 (Fig 7B, C).

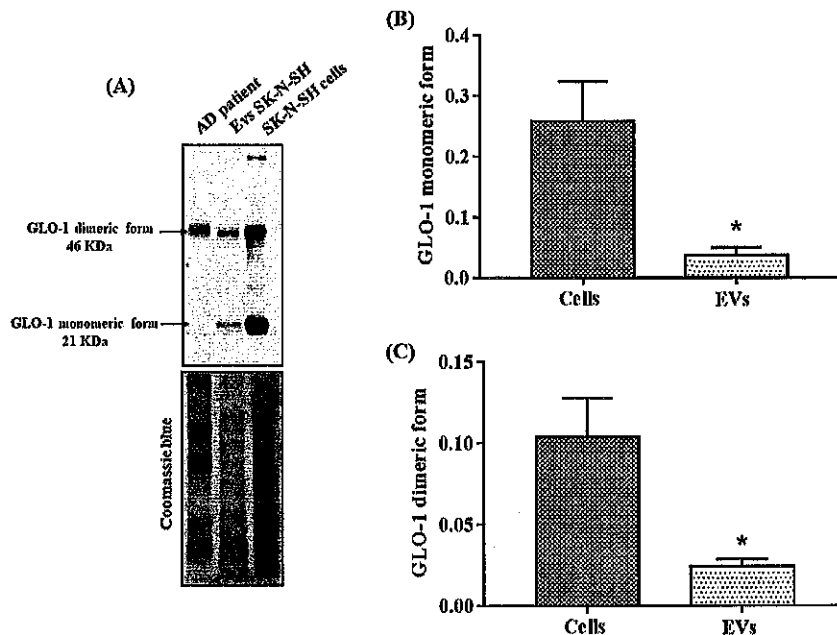


Figure 7. Identification of the presence of GLO-1 in neuronal EVs. **(A):** Representative Western blot of GLO-1 in EVs from AD patients, in neuronal EVs and in SK-N-SH cells. Coomassie blue stained total proteins was used as the loading control. **(B, C)** Comparison between cells and EVs GLO-1 monomeric **(B)** and dimeric form **(C)** levels. The difference in each group was analyzed with the Student t-test. Values are mean \pm S.E.M with * $p < 0.05$.

3. Discussion

Multiple studies suggest that AD is a systemic disorder with an active crosstalk between brain and periphery where multiple pathways altered in the brain cells are also affected in peripheral cells and in plasma [50]. In addition, some abnormal systemic changes might not only develop secondary to brain dysfunction but might also have a crucial role in the development and progression of AD. The aim of this study was to assess to what extent RAGE, GLO-1 and GFAP levels in peripheral EVs can be associated with cognitive decline, in MCI and in AD from the early to the late stage of AD. We demonstrated that the EVs GLO-1 levels were significantly decreased in AD and particularly in the early stage of the disease as compared to control and MCI while the levels of EVs RAGE increased in the late AD stage. However, GLO-1 levels in serum and GFAP levels in both serum and EVs were not different in controls, MCI and AD groups. Interestingly,

EVs RAGE and GLO-1 were correlated with clinical cognitive scores independently of age. Moreover, ROC analysis demonstrated that EVs GLO-1 levels can differentiate ES AD patients from MCI patients and control subjects while EVs RAGE have a higher probability to differentiate LS AD patients from other AD groups. For the first time, we identified that GLO-1 was released from neuronal cells-derived EVs.

There is an abundant literature suggesting that RAGE plays a pivotal role in the development of AD [51]. In the brain, RAGE contributes to the pathological features of AD by stimulating A β production [52], activates intracellular signaling pathways that are associated with oxidative stress and the release of inflammatory factors which are involved in the progression of AD [53]. In the circulation, RAGE regulates the influx of circulating A β across the blood-brain barrier [12]. The scrambled form of RAGE, sRAGE interacts and promotes A β elimination in liver and other organs or blocks the influx of A β 1-42 into the brain [54]. Some studies described a decrease of the sRAGE in plasma/serum from MCI and AD patients [15-17] and were associated with cognitive function and impairment [55]. To date, the presence and implication of RAGE in circulating EVs was poorly investigated. Only one study had detected the presence of RAGE on neuronal-derived exosomes in the circulation with some limitations [56]. They had estimated that the levels of RAGE in plasma exosomes may represent approximately 13% of that found in the plasma fraction [56].

RAGE is a cell-surface receptor expressed in different peripheral cell types [57] and it is regulated in response to metabolic changes for instances during aging, diabetes and hyperlipidemia [58]. As circulating EVs represent a mixture of vesicles released from different cell-type from peripheral [59], thus the circulating EVs RAGE represents an indicator of a systemic metabolism. With the presence of GFAP and neuronal markers, we showed that a fraction of the circulating EVs origins from the brain. Thus, EVs RAGE could represent detoxifying mechanism to eliminate AGEs and other ligands from the brain during the progression of AD. As EVs were suggested to be able to cross the BBB in both directions EVs RAGE could be an important player in the propagation of peripheral A β and inflammatory molecules to the brain through the BBB because RAGE also has the capacity to bind many pro-inflammatory ligands. Further studies are required to better understand the biological significance of the expression of RAGEs on EVs as a detoxifying mechanism or the propagation pathological ligands. Our findings showed that peripheral EVs RAGE could be considered as late marker in the progression of AD.

Many evidence suggested that impaired GLO-1 activity is implicated in the pathogenesis of neurodegenerative disorders like AD [60]. For instance, in the overexpressing human tau P301L mice which display hyperphosphorylation of tau protein and memory deficits, GLO-1 is strongly

expressed in many brain areas, including cortex, hippocampus and amygdala and GLO-1 is the unique up-regulated gene in the whole brain [61]. These results suggest that GLO-1 is up-regulated in response to tau aggregation. In addition, the restoration of GLO-1 activity restored cognitive capacity in a mouse model of AD [62]. In AD brain, the decrease of GLO-1 levels correlates with the increase of the AGEs deposition and with the disease progression [30,63]. As GLO-1 represents the limiting enzyme in the detoxification of MG, the decrease of GLO-1 activity contributes to the MG accumulation, to cellular oxidative stress raising and AGEs formation. GLO-1 is upregulated in the early stage of AD but is downregulated in the other stages of AD [30]. In peripheral, plasma level of GLO-II was found to be increased in MCI and AD patients [64], but the levels of GLO-I remain to be determined. Our results revealed that the serum GLO-I levels were not different in MCI and AD. Interestingly, we have evidenced the presence of GLO-1 in peripheral EVs which were decreased in the early stage of AD and correlated with the MoCA scores. The peripheral EVs contains only the dimeric form while the EVs-derived human neuronal cell-line SK-N-SH contain both the dimeric and monomeric forms of GLO-1. These data are in line with our previous study demonstrating that human neuronal-derived EVs contain DJ-1 which is considered as a human homolog of a novel type of glyoxalase, that converts MG to lactic acid in the absence of GSH [29]. Finally, considering the role of GLO-1 in the glycemic control, in vascular function, in obesity, in cardiometabolic diseases or in insulin resistance [65-67], our results strengthen the notion of the loss of systemic homeostasis in early stage of AD which is a particularly aggressive form with rates of progression typically exceeding those in late AD [68].

Over the past two decades, there is accumulating data demonstrating that astrocytic activities have important implications in AD pathology. The increase of GFAP associated to reactive astrocytes and neuroinflammation was described in the vicinity of A β plaques and NFTs formation in the early stages of the AD [69,70]. In CSF, GFAP was also elevated in AD patients compared to controls [71-73] and in patients with other disorders such as Creutzfeldt-Jakob disease [74], stroke [75] and traumatic brain injury [76,77]. In plasma, the levels of the astrocytic marker GFAP was poorly analyzed. Recently, using ELISA assays, GFAP levels were found to be elevated in plasma from early and to a lesser extent in late onset AD and were associated with degree of white matter injury and with the MMSE scores [78,79]. In contrast to these studies, our data obtained by Western Blotting showed that in serum and in EVs, GFAP levels do not differentiate MCI and AD to control subjects. In peripheral, GFAP is also secreted by the glucagon secreting cells of pancreas. These cells are known to play a critical role in diabetes [80]. As diabetes patients were not included in our participants, the elevation of plasma GFAP observed in recent studies could be caused by diabetes.

Overall, our findings support the notion that the total circulating EVs could be considered as emerging tools to complement the clinical scores in AD. The identification of the cargo signature with a define cargo-molecular fingerprint for each stage of the disease will allow the improvement of the predictive diagnostic power of circulating EVs. To date, the development of early therapeutic intervention for AD is hampered by the lack of early, validated and easily accessible pattern of blood-based biomarkers. The development of specific EVs molecular profiles will also open promising perspectives in cure improvement.

4. Materials and Methods

4.1. Study population

Venous blood samples were collected from control subjects, MCI and different stage of AD patients (early stage, moderate stage and late stage). Blood samples were collected after overnight fasting and centrifuged to collect serum fraction which were stored at -80 °C until analysis. Patients recruitment was performed by the Memory Clinic of Sherbrooke and a written informed consent was provided prior to blood and data collection. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the University of Sherbrooke (protocol #2010-21/Fülöp). For all participants, the global cognitive function was assessed by the he Mini Mental State Examination (MMSE) and the Montreal Cognitive Assessment (MoCA) [81,82]. Control subjects were defined according to the SENIEUR protocol [83]. Cognitive test scores and Pertersen criteria were performed for MCI selection [84]. The criteria of the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS_ADRDA) and the fourth edition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) were used for AD patient selection [85]. The inclusion and exclusion criteria used in the study were indicated in table S1.

4.2. Isolation and characterization of EVs from serum samples and neuronal SK-N-SH culture media

EVs from serum and SK-N-SH culture media were isolated by precipitation method using the Total Exosome Isolation reagent (Invitrogen™ by Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA) and characterized by transmission electron microscopy, nanoparticle tracking analysis and Western blot analysis as previously described [29,48,49].

4.3. Determination of RAGE, GFAP and GLO-1 levels

The levels of serum EVs RAGE was measured using a Luminex assay (R&D Systems, Inc., USA) according to the manufacturer's instructions. Diluted samples from all participants were added to

pre-coated beads with specific human RAGE antibodies. After the addition of biotinylated detection antibodies and phycoerythrin (PE)-conjugated streptavidin, beads were read using the Luminex 100/200 and data were analyzed using Xponent 4.2 software. Concentrations of RAGE in EVs were normalized with the total protein amount in EVs.

The levels of GFAP and GLO-1 were evaluated by Western blot. Briefly, 20 µg of serum or EVs protein were heated at 95 °C in the presence of loading buffer. The mixture was separated using 10% SDS-PAGE. After proteins separation, gel was transferred to PVDF membranes and the membranes were blocked for 1 h at room temperature with TBS containing 5% BSA. Then, we incubated each membrane with correspondent primary antibody GFAP (1/5000) (EMD Millipore, MA, USA) GLO-1 (1/2000) (MyBiosource Inc, San Diego, CA USA) in TBS with 5% BSA and incubated overnight at 4 °C. After 3 washes for 5 min, HRP-conjugated anti-rabbit antibodies (1/2000) (Cell Signaling Technologie) were incubated in TBS with 5% BSA. Finally, the membrane was washed 3 times for 5 min and were visualized by chemiluminescence detection using ECL substrate (Biorad) and their level was analyzed with the luminescent imaging system FluorChem. Total proteins stained with Coomassie blue were used as a loading control.

To evaluate the presence and the amount of GLO-1 in neuronal SK-N-SH cells and EVs, total proteins from SK-N-SH cells and EVs were extracted with RIPA buffer containing a cocktail of protease and phosphatase inhibitors and were measured using BCA assay. The same proteins amount (20 µg) were used western blot to determine GLO-1 as described above by Western blot.

4.4. Statistical and correlation analysis

SPSS or GraphPad Prism programs were performed for data analysis. All data were presented as mean ± SEM. p value less than 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses between groups of clinical study and cell analyses were performed using one-way ANOVA analysis followed by LSD post-hoc test and Student-t test. Correlation analyses were performed by the linear regression analysis using the Pearson coefficient of correlation. Receiver-operating characteristic (ROC) curves and the area under the ROC curve (AUC) were used to determine the ability of RAGE, GFAP and GLO-1 levels to differentiate between groups of patients.

5. Conclusion

In conclusion, our study showed that serum EVs levels of RAGE and GLO-1 were different in MCI and AD patients and were associated with cognitive scores. These data suggest the use of these EVs cargos levels as a clinical signature for AD progression and especially for separation between

different AD-stages. Further studies are still needed to explain the mechanistic implication of RAGE and GLO-1 EVs in AD physiopathology.

Acknowledgements: This work was supported by the Chaire Louise & André on Alzheimer's disease, Fondation Armand-Frappier (CR) and CIHR grant (TF).

Author Contributions: M.H and C.R designed research; M.H and M.P, M.B.K and E.M performed research; M.H analyzed data; M.H and C.R wrote the paper; A.L and T.F contributed new reagents or analytic tools.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflicts of interests.

Abbreviations:

AD: Alzheimer disease

AGEs: Advanced glycation end products

AUC: Area under the curve

A β : Amyloid beta

BACE1: Beta-site APP cleaving enzyme 1

BBB: Blood-brain barrier

CML: N-(1-carboxymethyl)-L-lysine

CNS: Central nervous system

CSF: Cerebrospinal fluid

EVs: Extracellular vesicles

GFAP: Glial fibrillary acidic protein

GLO-1: Glyoxalase 1

GSH: Reduced glutathione

HMGB1: High-mobility group box-1 protein

IL-6: Interleukin-6

L1CAM: L1-cell adhesion molecule

MCI: Mild cognitive impairment

MMSE: Mini-Mental State Examination

MoCA: Montreal Cognitive Assessment

NFTs: Neurofibrillary tangles

NF- κ B: Nuclear factor kappa-B

RAGE: Receptor for advanced glycation end products

ROC: Receiver operating characteristic

sRAGE: Soluble form of receptor for advanced glycation end products

TNF- α : Tumor necrosis factor-alpha

References

1. Prince, M.; Bryce, R.; Albanese, E.; Wimo, A.; Ribeiro, W.; Ferri, C.P. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement* 2013, 9, 63-75 e62, doi:10.1016/j.jalz.2012.11.007.
2. Barthelemy, N.R.; Li, Y.; Joseph-Mathurin, N.; Gordon, B.A.; Hassenstab, J.; Benzinger, T.L.S.; Buckles, V.; Fagan, A.M.; Perrin, R.J.; Goate, A.M., et al. A soluble phosphorylated tau signature links tau, amyloid and the evolution of stages of dominantly inherited Alzheimer's disease. *Nat Med* 2020, 26, 398-407, doi:10.1038/s41591-020-0781-z.
3. Lashley, T.; Schott, J.M.; Weston, P.; Murray, C.E.; Wellington, H.; Keshavan, A.; Foti, S.C.; Foiani, M.; Toombs, J.; Rohrer, J.D., et al. Molecular biomarkers of Alzheimer's disease: progress and prospects. *Disease Models & Mechanisms* 2018, 11, dmm031781, doi:10.1242/dmm.031781.
4. Dubois, B.; Feldman, H.H.; Jacova, C.; Hampel, H.; Molinuevo, J.L.; Blennow, K.; DeKosky, S.T.; Gauthier, S.; Selkoe, D.; Bateman, R., et al. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol* 2014, 13, 614-629, doi:10.1016/s1474-4422(14)70090-0.
5. Molinuevo, J.L.; Ayton, S.; Batrla, R.; Bednar, M.M.; Bittner, T.; Cummings, J.; Fagan, A.M.; Hampel, H.; Mielke, M.M.; Mikulskis, A., et al. Current state of Alzheimer's fluid biomarkers. *Acta Neuropathol* 2018, 136, 821-853, doi:10.1007/s00401-018-1932-x.
6. Koch, M.; Chitayat, S.; Dattilo, B.M.; Schiefner, A.; Diez, J.; Chazin, W.J.; Fritz, G. Structural basis for ligand recognition and activation of RAGE. *Structure* 2010, 18, 1342-1352, doi:10.1016/j.str.2010.05.017.

7. Yan, S.D.; Chen, X.; Fu, J.; Chen, M.; Zhu, H.; Roher, A.; Slattery, T.; Zhao, L.; Nagashima, M.; Morser, J., et al. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 1996, 382, 685-691, doi:10.1038/382685a0.
8. Arancio, O.; Zhang, H.P.; Chen, X.; Lin, C.; Trinchese, F.; Puzzo, D.; Liu, S.; Hegde, A.; Yan, S.F.; Stern, A., et al. RAGE potentiates Abeta-induced perturbation of neuronal function in transgenic mice. *EMBO J* 2004, 23, 4096-4105, doi:10.1038/sj.emboj.7600415.
9. Bourne, K.Z.; Ferrari, D.C.; Lange-Dohna, C.; Rossner, S.; Wood, T.G.; Perez-Polo, J.R. Differential regulation of BACE1 promoter activity by nuclear factor-kappaB in neurons and glia upon exposure to beta-amyloid peptides. *J Neurosci Res* 2007, 85, 1194-1204, doi:10.1002/jnr.21252.
10. Li, X.H.; Du, L.L.; Cheng, X.S.; Jiang, X.; Zhang, Y.; Lv, B.L.; Liu, R.; Wang, J.Z.; Zhou, X.W. Glycation exacerbates the neuronal toxicity of beta-amyloid. *Cell Death Dis* 2013, 4, e673, doi:10.1038/cddis.2013.180.
11. Chen, C.; Li, X.H.; Tu, Y.; Sun, H.T.; Liang, H.Q.; Cheng, S.X.; Zhang, S. A β -AGE aggravates cognitive deficit in rats via RAGE pathway. *Neuroscience* 2014, 257, 1-10, doi:10.1016/j.neuroscience.2013.10.056.
12. Deane, R.; Du Yan, S.; Subramanian, R.K.; LaRue, B.; Jovanovic, S.; Hogg, E.; Welch, D.; Manness, L.; Lin, C.; Yu, J., et al. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med* 2003, 9, 907-913, doi:10.1038/nm890.
13. Deane, R.; Wu, Z.; Zlokovic, B.V. RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke* 2004, 35, 2628-2631, doi:10.1161/01.STR.0000143452.85382.d1.
14. Yan, S.F.; Ramasamy, R.; Schmidt, A.M. Soluble RAGE: therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic disease and aging. *Biochem Pharmacol* 2010, 79, 1379-1386, doi:10.1016/j.bcp.2010.01.013.
15. Emanuele, E.; D'Angelo, A.; Tomaino, C.; Binetti, G.; Ghidoni, R.; Politi, P.; Bernardi, L.; Maletta, R.; Bruni, A.C.; Geroldi, D. Circulating levels of soluble receptor for advanced glycation end products in Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch Neurol* 2005, 62, 1734-1736, doi:10.1001/archneur.62.11.1734.
16. Xu, X.-Y.; Deng, C.-Q.; Wang, J.; Deng, X.-J.; Xiao, Q.; Li, Y.; He, Q.; Fan, W.-H.; Quan, F.-Y.; Zhu, Y.-P., et al. Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products in

Alzheimer's disease. *International Journal of Neuroscience* 2017, 127, 454-458, doi:10.1080/00207454.2016.1193861.

17. Ghidoni, R.; Benussi, L.; Glionna, M.; Franzoni, M.; Geroldi, D.; Emanuele, E.; Binetti, G. Decreased plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products in mild cognitive impairment. *Journal of Neural Transmission* 2008, 115, 1047-1050, doi:10.1007/s00702-008-0069-9.

18. Sasaki, N.; Toki, S.; Chowei, H.; Saito, T.; Nakano, N.; Hayashi, Y.; Takeuchi, M.; Makita, Z. Immunohistochemical distribution of the receptor for advanced glycation end products in neurons and astrocytes in Alzheimer's disease. *Brain Res* 2001, 888, 256-262.

19. Han, C.; Lu, Y.; Wei, Y.; Wu, B.; Liu, Y.; He, R. D-ribosylation induces cognitive impairment through RAGE-dependent astrocytic inflammation. *Cell death & disease* 2014, 5, e11117-e11117, doi:10.1038/cddis.2014.89.

20. Middeldorp, J.; Hol, E.M. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol* 2011, 93, 421-443, doi:10.1016/j.pneurobio.2011.01.005.

21. Assefa, B.T.; Gebre, A.K.; Altaye, B.M. Reactive Astrocytes as Drug Target in Alzheimer's Disease. *BioMed Research International* 2018, 2018, 10, doi:10.1155/2018/4160247.

22. Pekny, M.; Nilsson, M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 2005, 50, 427-434, doi:10.1002/glia.20207.

23. Muramori, F.; Kobayashi, K.; Nakamura, I. A quantitative study of neurofibrillary tangles, senile plaques and astrocytes in the hippocampal subdivisions and entorhinal cortex in Alzheimer's disease, normal controls and non-Alzheimer neuropsychiatric diseases. *Psychiatry Clin Neurosci* 1998, 52, 593-599, doi:10.1111/j.1440-1819.1998.tb02706.x.

24. Wharton, S.B.; O'Callaghan, J.P.; Savva, G.M.; Nicoll, J.A.; Matthews, F.; Simpson, J.E.; Forster, G.; Shaw, P.J.; Brayne, C.; Ince, P.G. Population variation in glial fibrillary acidic protein levels in brain ageing: relationship to Alzheimer-type pathology and dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2009, 27, 465-473, doi:10.1159/000217729.

25. Noppe, M.; Crols, R.; Andries, D.; Lowenthal, A. Determination in human cerebrospinal fluid of glial fibrillary acidic protein, S-100 and myelin basic protein as indices of non-specific or specific central nervous tissue pathology. *Clin Chim Acta* 1986, 155, 143-150, doi:10.1016/0009-8981(86)90275-5.

26. Ross, G.W.; O'Callaghan, J.P.; Sharp, D.S.; Petrovitch, H.; Miller, D.B.; Abbott, R.D.; Nelson, J.; Launer, L.J.; Foley, D.J.; Burchfiel, C.M., et al. Quantification of regional glial fibrillary acidic protein levels in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* 2003, 107, 318-323, doi:10.1034/j.1600-0404.2003.02098.x.
27. Maessen, D.E.; Stehouwer, C.D.; Schalkwijk, C.G. The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases. *Clin Sci (Lond)* 2015, 128, 839-861, doi:10.1042/cs20140683.
28. Angeloni, C.; Zambonin, L.; Hrelia, S. Role of methylglyoxal in Alzheimer's disease. *Biomed Res Int* 2014, 2014, 238485, doi:10.1155/2014/238485.
29. Haddad, M.; Perrotte, M.; Khedher, M.R.B.; Demongin, C.; Lepage, A.; Fulop, 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.
30. Kuhla, B.; Boeck, K.; Schmidt, A.; Ogunlade, V.; Arendt, T.; Munch, G.; Luth, H.J. Age- and stage-dependent glyoxalase I expression and its activity in normal and Alzheimer's disease brains. *Neurobiol Aging* 2007, 28, 29-41, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.11.007.
31. Raposo, G.; Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013, 200, 373-383, doi:10.1083/jcb.201211138.
32. Colombo, M.; Raposo, G.; Thery, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014, 30, 255-289, doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
33. Yamamoto, S.; Azuma, E.; Muramatsu, M.; Hamashima, T.; Ishii, Y.; Sasahara, M. Significance of Extracellular Vesicles: Pathobiological Roles in Disease. *Cell Struct Funct* 2016, 41, 137-143, doi:10.1247/csf.16014.
34. Zhang, G.; Yang, P. A novel cell-cell communication mechanism in the nervous system: exosomes. *J Neurosci Res* 2018, 96, 45-52, doi:10.1002/jnr.24113.
35. Yuyama, K.; Igarashi, Y. Physiological and pathological roles of exosomes in the nervous system. *Biomol Concepts* 2016, 7, 53-68, doi:10.1515/bmc-2015-0033.

36. Coleman, B.M.; Hill, A.F. Extracellular vesicles--Their role in the packaging and spread of misfolded proteins associated with neurodegenerative diseases. *Semin Cell Dev Biol* 2015, 40, 89-96, doi:10.1016/j.semcdb.2015.02.007.
37. Quek, C.; Hill, A.F. The role of extracellular vesicles in neurodegenerative diseases. *Biochem Biophys Res Commun* 2017, 483, 1178-1186, doi:10.1016/j.bbrc.2016.09.090.
38. 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.
39. Junichi, M.; Tessandra, S.; William, A.B.; Jing, Z. The Transport Mechanism of Extracellular Vesicles at the Blood-Brain Barrier. *Current Pharmaceutical Design* 2017, 23, 6206-6214, doi:http://dx.doi.org/10.2174/1381612823666170913164738.
40. Chen, C.C.; Liu, L.; Ma, F.; Wong, C.W.; Guo, X.E.; Chacko, J.V.; Farhoodi, H.P.; Zhang, S.X.; Zimak, J.; Segaliny, 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.
41. Alvarez-Erviti, L.; Seow, Y.; Yin, H.; Betts, C.; Lakhai, S.; Wood, M.J.A. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature Biotechnology* 2011, 29, 341, doi:10.1038/nbt.1807
<https://www.nature.com/articles/nbt.1807#supplementary-information>.
42. Fiandaca, M.S.; Kapogiannis, D.; Mapstone, M.; Boxer, A.; Eitan, E.; Schwartz, J.B.; Abner, E.L.; Petersen, R.C.; Federoff, H.J.; Miller, B.L., et al. Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study. *Alzheimers Dement* 2015, 11, 600-607 e601, doi:10.1016/j.jalz.2014.06.008.
43. Goetzl, E.J.; Kapogiannis, D.; Schwartz, J.B.; Lobach, I.V.; Goetzl, L.; Abner, E.L.; Jicha, G.A.; Karydas, A.M.; Boxer, A.; Miller, B.L. Decreased synaptic proteins in neuronal exosomes of frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *FASEB J* 2016, 30, 4141-4148, doi:10.1096/fj.201600816R.
44. Abner, E.L.; Jicha, G.A.; Shaw, L.M.; Trojanowski, J.Q.; Goetzl, E.J. Plasma neuronal exosomal levels of Alzheimer's disease biomarkers in normal aging. *Ann Clin Transl Neurol* 2016, 3, 399-403, doi:10.1002/acn3.309.
45. Winston, C.N.; Goetzl, E.J.; Akers, J.C.; Carter, B.S.; Rockenstein, E.M.; Galasko, D.; Masliah, E.; Rissman, R.A. Prediction of conversion from mild cognitive impairment to dementia

with neuronally derived blood exosome protein profile. *Alzheimers Dement (Amst)* 2016, 3, 63-72, doi:10.1016/j.dadm.2016.04.001.

46. Debiec, H.; Christensen, E.I.; Ronco, P.M. The cell adhesion molecule L1 is developmentally regulated in the renal epithelium and is involved in kidney branching morphogenesis. *The Journal of cell biology* 1998, 143, 2067-2079, doi:10.1083/jcb.143.7.2067.

47. Chen, J.; Gao, F.; Liu, N. L1CAM promotes epithelial to mesenchymal transition and formation of cancer initiating cells in human endometrial cancer. *Exp Ther Med* 2018, 15, 2792-2797, doi:10.3892/etm.2018.5747.

48. 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, 751-762, doi:10.3233/jad-181272.

49. Perrotte, M.; Haddad, M.; Le Page, A.; Frost, E.H.; 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, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2019.10.010.

50. Trushina, E. Alzheimer's disease mechanisms in peripheral cells: Promises and challenges. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* 2019, 5, 652-660, doi:10.1016/j.trci.2019.06.008.

51. Cai, Z.; Liu, N.; Wang, C.; Qin, B.; Zhou, Y.; Xiao, M.; Chang, L.; Yan, L.-J.; Zhao, B. Role of RAGE in Alzheimer's Disease. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2016, 36, 483-495, doi:10.1007/s10571-015-0233-3.

52. Vitek, M.P.; Bhattacharya, K.; Glendening, J.M.; Stopa, E.; Vlassara, H.; Bucala, R.; Manogue, K.; Cerami, A. Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1994, 91, 4766-4770, doi:10.1073/pnas.91.11.4766.

53. Cai, Z.; Liu, N.; Wang, C.; Qin, B.; Zhou, Y.; Xiao, M.; Chang, L.; Yan, L.J.; Zhao, B. Role of RAGE in Alzheimer's Disease. *Cell Mol Neurobiol* 2016, 36, 483-495, doi:10.1007/s10571-015-0233-3.

54. Sugihara, T.; Munesue, S.; Yamamoto, Y.; Sakurai, S.; Akhter, N.; Kitamura, Y.; Shiba, K.; Watanabe, T.; Yonekura, H.; Hayashi, Y., et al. Endogenous secretory receptor for advanced

glycation end-products inhibits amyloid-beta1-42 uptake into mouse brain. *J Alzheimers Dis* 2012, 28, 709-720, doi:10.3233/jad-2011-110776.

55. Chen, G.; Cai, L.; Chen, B.; Liang, J.; Lin, F.; Li, L.; Lin, L.; Yao, J.; Wen, J.; Huang, H. Serum Level of Endogenous Secretory Receptor for Advanced Glycation End Products and Other Factors in Type 2 Diabetic Patients With Mild Cognitive Impairment. *Diabetes Care* 2011, 34, 2586, doi:10.2337/dc11-0958.

56. Patterson, S.A.; Deep, G.; Brinkley, T.E. Detection of the receptor for advanced glycation endproducts in neuronally-derived exosomes in plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 2018, 500, 892-896, doi:10.1016/j.bbrc.2018.04.181.

57. Ott, C.; Jacobs, K.; Haucke, E.; Navarrete Santos, A.; Grune, T.; Simm, A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol* 2014, 2, 411-429, doi:10.1016/j.redox.2013.12.016.

58. Vlassara, H. The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Metab Res Rev* 2001, 17, 436-443, doi:10.1002/dmrr.233.

59. Kanninen, K.M.; Bister, N.; Koistinaho, J.; Malm, T. Exosomes as new diagnostic tools in CNS diseases. *Biochim Biophys Acta* 2016, 1862, 403-410, doi:10.1016/j.bbadis.2015.09.020.

60. Maessen, D.E.M.; Stehouwer, C.D.A.; Schalkwijk, C.G. The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases. *Clinical Science* 2015, 128, 839-861, doi:10.1042/cs20140683.

61. Chen, F.; Wollmer, M.A.; Hoerndli, F.; Munch, G.; Kuhla, B.; Rogaeve, E.I.; Tsolaki, M.; Papassotiropoulos, A.; Gotz, J. Role for glyoxalase I in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101, 7687-7692, doi:10.1073/pnas.0402338101.

62. More, S.S.; Vartak, A.P.; Vince, R. Restoration of glyoxalase enzyme activity precludes cognitive dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *ACS chemical neuroscience* 2013, 4, 330-338.

63. Lüth, H.-J.; Ogunlade, V.; Kuhla, B.; Kientsch-Engel, R.; Stahl, P.; Webster, J.; Arendt, T.; Münch, G. Age- and Stage-dependent Accumulation of Advanced Glycation End Products in Intracellular Deposits in Normal and Alzheimer's Disease Brains. *Cerebral Cortex* 2005, 15, 211-220, doi:10.1093/cercor/bhh123.

64. Whelan, C.D.; Mattsson, N.; Nagle, M.W.; Vijayaraghavan, S.; Hyde, C.; Janelidze, S.; Stomrud, E.; Lee, J.; Fitz, L.; Samad, T.A., et al. Multiplex proteomics identifies novel CSF and

plasma biomarkers of early Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications* 2019, 7, 169, doi:10.1186/s40478-019-0795-2.

65. Xue, M.; Weickert, M.O.; Qureshi, S.; Kandala, N.B.; Anwar, A.; Waldron, M.; Shafie, A.; Messenger, D.; Fowler, M.; Jenkins, G., et al. Improved Glycemic Control and Vascular Function in Overweight and Obese Subjects by Glyoxalase 1 Inducer Formulation. *Diabetes* 2016, 65, 2282-2294, doi:10.2337/db16-0153.

66. Nigro, C.; Leone, A.; Raciti, G.A.; Longo, M.; Mirra, P.; Formisano, P.; Beguinot, F.; Miele, C. Methylglyoxal-Glyoxalase 1 Balance: The Root of Vascular Damage. *Int J Mol Sci* 2017, 18, doi:10.3390/ijms18010188.

67. Mey, J.T.; Haus, J.M. Dicarbonyl Stress and Glyoxalase-1 in Skeletal Muscle: Implications for Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Front Cardiovasc Med* 2018, 5, 117-117, doi:10.3389/fcvm.2018.00117.

68. Elahi, F.M.; Casaletto, K.B.; La Joie, R.; Walters, S.M.; Harvey, D.; Wolf, A.; Edwards, L.; Rivera-Contreras, W.; Karydas, A.; Cobigo, Y., et al. Plasma biomarkers of astrocytic and neuronal dysfunction in early- and late-onset Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* 2019, <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.09.004>, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.09.004>.

69. Porchet, R.; Probst, A.; Bouras, C.; Dráberová, E.; Dráber, P.; Riederer, B.M. Analysis of glial acidic fibrillary protein in the human entorhinal cortex during aging and in Alzheimer's disease. *PROTEOMICS: International Edition* 2003, 3, 1476-1485.

70. Wharton, S.; O'Callaghan, J.; Savva, G.; Nicoll, J.; Matthews, F.; Simpson, J.; Forster, G.; Shaw, P.; Brayne, C.; Ince, P. Population variation in glial fibrillary acidic protein levels in brain ageing: relationship to Alzheimer-type pathology and dementia. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 2009, 27, 465-473.

71. Fukuyama, R.; Izumoto, T.; Fushiki, S. The cerebrospinal fluid level of glial fibrillary acidic protein is increased in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients and correlates with severity of dementia. *Eur Neurol* 2001, 46, 35-38, doi:10.1159/000050753.

72. Rosengren, L.E.; Wikkelso, C.; Hagberg, L. A sensitive ELISA for glial fibrillary acidic protein: application in CSF of adults. *J Neurosci Methods* 1994, 51, 197-204, doi:10.1016/0165-0270(94)90011-6.

73. Jesse, S.; Steinacker, P.; Cepek, L.; Arnim, C.V.; Tumani, H.; Lehnert, S.; Kretschmar, H.A.; Baier, M.; Otto, M. Glial fibrillary acidic protein and protein S-100B: different concentration

pattern of glial proteins in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and Creutzfeldt-Jakob disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 2009, 17, 541-551.

74. van Eijk, J.J.; van Everbroeck, B.; Abdo, W.F.; Kremer, B.P.; Verbeek, M.M. CSF neurofilament proteins levels are elevated in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Alzheimers Dis* 2010, 21, 569-576, doi:10.3233/jad-2010-090649.

75. Brouns, R.; De Vli, B.; Cras, P.; De Surgeloose, D.; Marien, P.; De Deyn, P.P. Neurobiochemical markers of brain damage in cerebrospinal fluid of acute ischemic stroke patients. *Clin Chem* 2010, 56, 451-458, doi:10.1373/clinchem.2009.134122.

76. Fraser, D.D.; Close, T.E.; Rose, K.L.; Ward, R.; Mehl, M.; Farrell, C.; Lacroix, J.; Creery, D.; Kesselman, M.; Stanimirovic, D., et al. Severe traumatic brain injury in children elevates glial fibrillary acidic protein in cerebrospinal fluid and serum. *Pediatr Crit Care Med* 2011, 12, 319-324, doi:10.1097/PCC.0b013e3181e8b32d.

77. Bogoslovsky, T.; Wilson, D.; Chen, Y.; Hanlon, D.; Gill, J.; Jeromin, A.; Song, L.; Moore, C.; Gong, Y.; Kenney, K. Increases of plasma levels of glial fibrillary acidic protein, tau, and amyloid β up to 90 days after traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma* 2017, 34, 66-73.

78. Oeckl, P.; Halbgebauer, S.; Anderl-Straub, S.; Steinacker, P.; Huss, A.M.; Neugebauer, H.; von Arnim, C.A.F.; Diehl-Schmid, J.; Grimmer, T.; Kornhuber, J., et al. Glial Fibrillary Acidic Protein in Serum is Increased in Alzheimer's Disease and Correlates with Cognitive Impairment. *J Alzheimers Dis* 2019, 67, 481-488, doi:10.3233/jad-180325.

79. Elahi, F.M.; Casaletto, K.B.; La Joie, R.; Walters, S.M.; Harvey, D.; Wolf, A.; Edwards, L.; Rivera-Contreras, W.; Karydas, A.; Cobigo, Y., et al. Plasma biomarkers of astrocytic and neuronal dysfunction in early- and late-onset Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2019, 10.1016/j.jalz.2019.09.004, doi:10.1016/j.jalz.2019.09.004.

80. Bertelli, E.; Regoli, M.; Gambelli, F.; Lucattelli, M.; Lungarella, G.; Bastianini, A. GFAP Is Expressed as a Major Soluble Pool Associated with Glucagon Secretory Granules in A-cells of Mouse Pancreas. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2000, 48, 1233-1242, doi:10.1177/002215540004800907.

81. Folstein, M.F.; Folstein, S.E.; McHugh, P.R. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975, 12, 189-198, doi:10.1016/0022-3956(75)90026-6.

82. Nasreddine, Z.S.; Phillips, N.A.; Bedirian, V.; Charbonneau, S.; Whitehead, V.; Collin, I.; Cummings, J.L.; Chertkow, H. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *J Am Geriatr Soc* 2005, 53, 695-699, doi:10.1111/j.1532-5415.2005.53221.x.
83. Pawelec, G.; Ferguson, F.G.; Wikby, A. The SENIEUR protocol after 16 years. *Mech Ageing Dev* 2001, 122, 132-134.
84. Petersen, R.C.; Smith, G.E.; Waring, S.C.; Ivnik, R.J.; Tangalos, E.G.; Kokmen, E. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* 1999, 56, 303-308, doi:10.1001/archneur.56.3.303.
85. McKhann, G.; Drachman, D.; Folstein, M.; Katzman, R.; Price, D.; Stadlan, E.M. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984, 34, 939-944.

Supplementary Materials

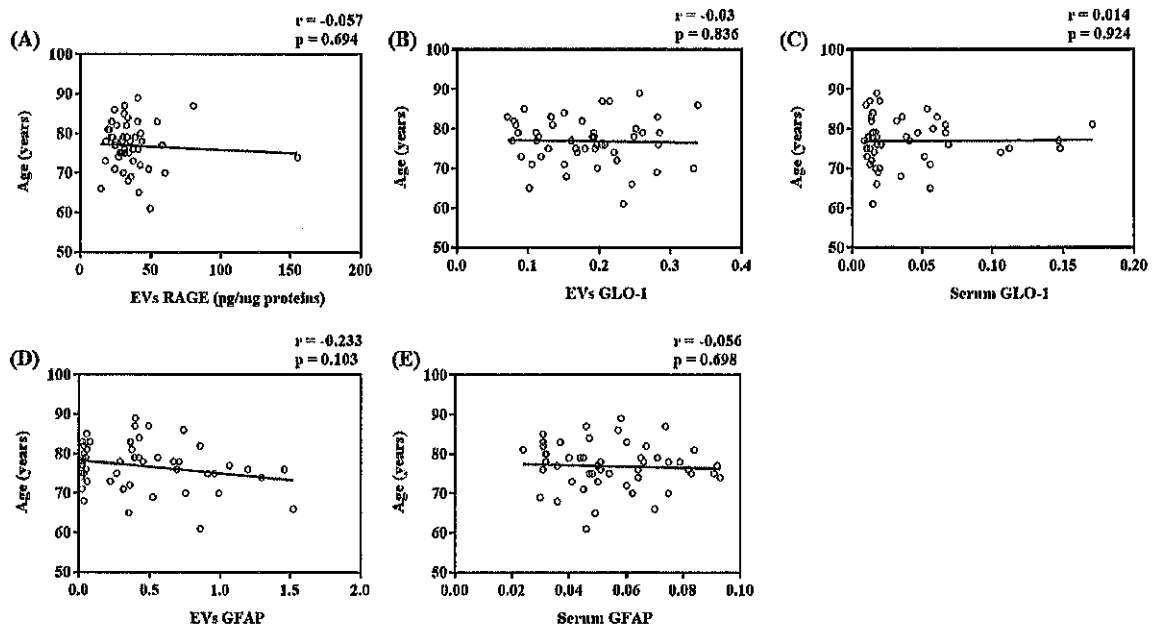


Figure S1. Statistical correlation between RAGE, GFAP, GLO-1 levels and age (years): analyzed by the Pearson correlation.

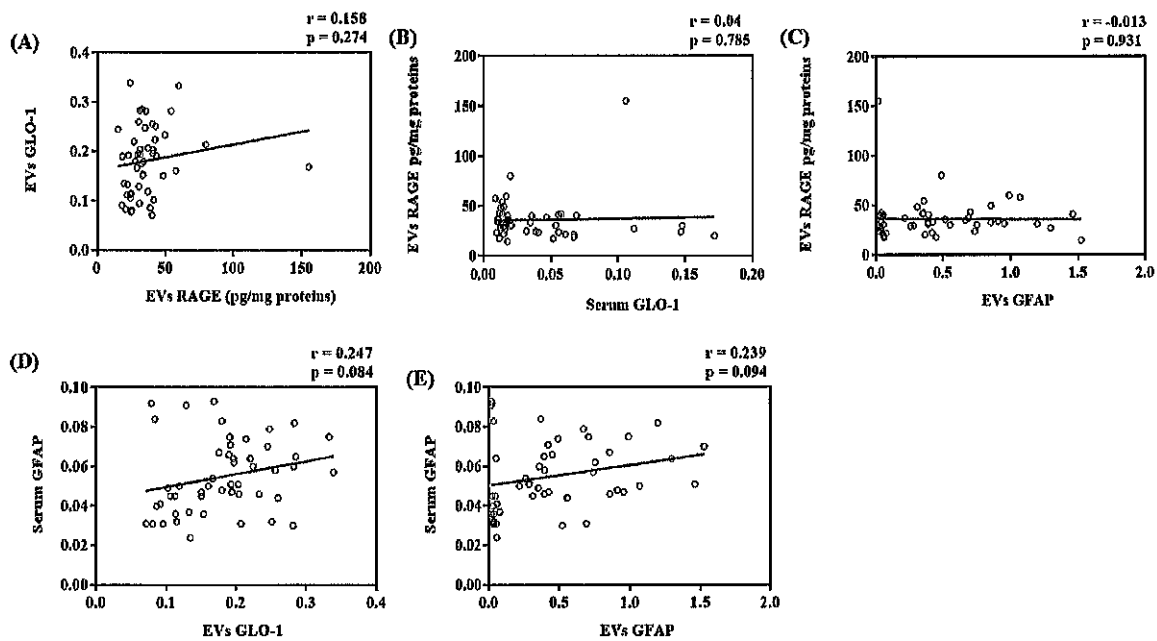


Figure S2. Statistical correlation between RAGE, GFAP and GLO-1 levels: analyzed by the Pearson correlation.

Table S1. Inclusion and exclusion criteria used in the study and characteristics of patients and controls

Criteria	Inclusion	Exclusion
	Age > 65 years old	Smoker
	Without cognitive impairments	Alcohol-dependent or withdrawal
	Mild cognitive impairments (MCI) with MMSE \geq 26	Others neurodegenerative disease
	Alzheimer with Mild (MMSE 25-22)	History of psychiatric illness (depression, schizophrenia, ...)
	Moderate (MMSE 21-14)	Epilepsy
	Severe (MMSE < 14).	Stroke
		Inflammatory disease
		Immunosuppressive
		Anti-inflammatory therapy
		Diabetes
		Dyslipidemia treated or not
		Cholesterol > 6.5

6 CHAPITRE 5 : DISCUSSION GÉNÉRALE

De nos jours, il est estimé que plus de 50 millions de personnes sont atteintes de maladies neurodégénératives. On estime que le nombre des sujets atteint arrivera à 152 millions en 2050, en l'absence de stratégies de prévention et de traitements efficaces (Association, 2019). La MA est une maladie neurodégénérative classée la plus fréquente dans le monde. La physiopathologie de cette maladie est complexe et mal connue. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la pathogenèse de la MA. Ces mécanismes, y compris la cascade d'A β , l'hyperphosphorylation de la protéine Tau, le stress oxydatif, l'inflammation, le dysfonctionnement synaptique et d'autres mécanismes ne semblent pas être la cause principale de cette maladie, puisqu' aucun d'entre eux ne s'est révélé être une cible pour un traitement efficace (Sharma *et al.*, 2019b). Il est donc admis que la pathogenèse de ce type de démence opère sur plusieurs années avant le début des premiers signes cliniques. Le diagnostic de la MA reste un événement tardif correspondant à un stade où le cerveau a déjà subi des dommages importants et irréversibles. Actuellement, le diagnostic possible ou probable est restreint en routine clinique, car l'analyse du LCR est une méthode invasive et peu sensible, les imageries cérébrales sont des techniques coûteuses et leur accès est limité. De plus, les biomarqueurs utilisés ne sont pas à 100% spécifiques de cette maladie. Les recherches sont donc dirigées vers l'identification des marqueurs biologiques du système périphérique permettant de faire le diagnostic le plus précoce possible.

L'identification des biomarqueurs sanguins pour le diagnostic de la MA demeure un objectif majeur. La comparaison entre les marqueurs du LCR et du sang révèle une liste d'avantages pour l'utilisation du système sanguin dans tel diagnostic. La prise du sang est une méthode non invasive, courante et ne présente pas un risque pour la santé du patient. De plus, elle est facilement introduite dans l'environnement clinique (O'Bryant *et al.*, 2017). Malgré ces avantages, l'identification d'un biomarqueur sanguin pour une maladie complexe dont le mécanisme est mal connu présente plusieurs défis. En premier lieu, le sang contient une variété de différentes molécules comme des protéines, des peptides, des lipides, des sucres, d'acides nucléiques, et des métabolites cellulaires. Ces molécules peuvent être détectées dans le plasma et/ou sérum, dans les EVs et dans les cellules sanguines comme les érythrocytes, les cellules immunitaires et les plaquettes. Chacun de ces types cellulaires peut être une source potentielle de biomarqueurs (Lista *et al.*, 2013). En deuxième lieu, chaque molécule du sang peut être une source pertinente de diagnostic soit par sa concentration, son activité et la présence des isoformes et des modifications post-traductionnelles (Thambisetty & Lovestone, 2010). De plus, le CNS est un

environnement protégé et n'est pas en contact direct avec la circulation sanguine. Certaines molécules du CNS peuvent être présentes à de très faibles concentrations dans le sang à condition qu'elles traversent la BHE (Henriksen et al., 2014). Cependant, il existe certaines preuves qui confirment que les altérations de la BHE durant le vieillissement et la progression de la MA permettent le passage des molécules qui sont incapables de la traverser dans les conditions normales (Montagne et al., 2015; Zipser et al., 2007). Enfin, d'autres facteurs peuvent réduire considérablement la présence de la molécule recherchée dans le sang. Une fois dans le sang, la molécule peut être dégradée directement par des protéases, captée et dégradée dans le foie ou par des cellules sanguines. De plus, cette molécule peut adhérer aux protéines plasmatiques ou même être sécrétée dans les urines par les reins (Hampel et al., 2018). Cela semble être un problème pour le dosage de la protéine tau et ses formes hyperphosphorylées qui ont une demi-vie dans le sang très court de l'ordre de 10 heures (Zetterberg, 2017). Pour ces raisons, il est important de bien choisir les biomarqueurs candidats pour le diagnostic de la MA.

6.1 Les limites de biomarqueurs candidats de la MA

Les marqueurs plasmatiques les plus étudiés pour le diagnostic de la MA sont reliés à la physiopathologie de la maladie telles l'A β , la protéine tau, la protéine axonale NF-L (neurofilament light) et l'activité enzymatique de β -sécrétase (O'Bryant et al., 2017; Zetterberg, 2019).

Le dosage plasmatique de peptide A β 1-42 et A β 1-40 et leur rapport ont été réalisés en premier lieu par la technique immuno-enzymatique (ELISA) (Pannee et al., 2014). Les résultats observés montrent l'absence de différence statistiquement significative ou la présence d'une différence mineure entre les patients atteints de la MA et les groupes témoins (Mehta et al., 2000; Olsson et al., 2016). Ensuite, l'utilisation d'une méthode immunologique ultrasensible permet de détecter une diminution significative des taux plasmatiques d'A β 1-42, A β 1-40 et du rapport A β 1-42/A β 1-40 chez des patients atteints de la MA par rapport à des personnes saines ou des patients MCI (Janelidze et al., 2016). De plus, l'utilisation d'une autre technique qui combine l'immunoprécipitation et la spectroscopie de masse montre une diminution des taux d'A β 1-42 et A β 1-42/A β 1-40 chez les patients atteints de la MA par rapport aux personnes saines (Pannee et al., 2014). Dans les mêmes lignes que les études citées précédemment, l'utilisation de la méthodologie qui se basent sur la digestion protéolytique des peptides A β avant la spectrométrie de masse ont révélé que les taux plasmatiques de ce peptide sont réduits chez les sujets qui montrent une accumulation d'A β dans leurs cerveaux (Ovod et al., 2017). Cependant, d'autres travaux suggèrent que le dosage plasmatique d'A β ne semble pas être un marqueur discriminatif

de la MA, surtout que les concentrations plasmatiques de ce peptide peuvent être affectées par des maladies métaboliques, cardiovasculaires et cérébrovasculaires (Hilal et al., 2017; Lewczuk et al., 2010; Lopez et al., 2008; Roeben et al., 2016). De plus, les plaquettes et les érythrocytes sont capables de libérer ce peptide dans le sang ce qui pourrait remettre en question l'origine de la présence d'A β dans la circulation sanguine (Canobbio et al., 2015; Kiko et al., 2012).

En plus de l'A β , les taux plasmatiques de la protéine tau ont également été quantifiés en utilisant des techniques hautement sensibles. Les résultats observés montrent que les concentrations plasmatiques de cette protéine et de ses formes phosphorylées augmentent chez des patients atteints de la MA par rapport aux personnes saines (Mattsson et al., 2016; Tzen et al., 2014; Zetterberg et al., 2013). Cependant, les valeurs détectées chez les personnes contrôles chevauchent avec celles observées chez les malades, ce qui remet en question l'utilité de considérer le dosage de tau comme un biomarqueur de la MA.

Une autre protéine a été une candidate pour le diagnostic de la MA, il s'agit de la protéine axonale NF-L. Une augmentation des taux plasmatiques de cette protéine a été observée chez les patients atteints de la forme sporadique et familiale de la MA et les personnes MCI (Mattsson et al., 2017; Sanchez-Valle et al., 2018; Weston et al., 2017). Cependant, l'augmentation de la concentration de la NF-L ne semble pas être spécifique à la MA puisqu'une augmentation similaire est observée dans plusieurs autres maladies neurodégénératives, y compris la démence frontotemporale, la paralysie supranucléaire progressive et le syndrome corticobasal (Hansson et al., 2017; Rohrer et al., 2016; Rojas et al., 2016).

L'activité enzymatique de la β -sécrétase a été dosée dans le plasma des patients atteints de la MA en utilisant la méthode immuno-enzymatique ELISA. Les résultats montrent une augmentation de l'activité de cette enzyme chez des patients atteints de la MA et des personnes MCI par rapport aux contrôles (Shen et al., 2018; Wu et al., 2012). Cependant, le dosage plasmatique de l'activité de cette enzyme montre plusieurs limites. Ces études se sont limitées à des petites populations. De plus, il y a de chevauchement entre les valeurs obtenues dans le groupe de personnes contrôles et le groupe de personnes malades. Aussi, l'augmentation de l'activité enzymatique chez les patients atteints de la MA n'est pas corrélée avec les scores cognitifs.

6.2 Les AGEs et leurs précurseurs comme marqueurs précoces de la MA ?

L'intérêt actuel dans le domaine de la recherche des biomarqueurs de la MA est le diagnostic précoce de la maladie. La stratégie se base sur l'identification des personnes les plus à risque de développer la MA. Une personne avec un déficit cognitif léger (MCI) se classe dans la catégorie de pré-Alzheimer puisque ce groupe se caractérise par un risque accru de développer la MA. La découverte des marqueurs liés à ce stade présente un énorme potentiel visant à prévenir la progression du stade MCI vers le stade de la MA.

La pentosidine et le CML sont les deux AGEs les plus accumulés dans les cerveaux des patients atteints de la MA. L'accumulation de ces deux AGEs dans la région de l'hippocampe est plus élevée dans les cerveaux des malades que dans les cerveaux des personnes témoins (Jono et al., 2002). En plus, ces AGEs s'accumulent dans les PS et les ENF (Kimura et al., 1998).

Certaines études ont évalué les niveaux de la pentosidine et du CML dans le sérum et le LCR des patients MCI et atteints de la MA. Mais, ces études montrent plusieurs limitations. Meli et al ont montré une augmentation des taux sériques de la pentosidine chez les patients atteints de la MA par rapport aux sujets contrôles. Cependant, les taux de ce type des AGEs dans cette étude sont plus élevés chez les personnes diabétiques que les patients atteints de la MA (Meli et al., 2002). Dans l'étude de Bar et al, les auteurs ont montré que les taux sériques du CML diminuent chez les patients atteints de la MA. Alors que les taux de cette molécule augmentent significativement dans le LCR de ces mêmes patients. Dans cette étude, la concentration de pentosidine dans le sérum et le LCR augmente uniquement chez les personnes atteintes de démence vasculaire par rapport aux personnes saines (Bar et al., 2003). Dans leur première étude, Monacelli et al, ont montré que les taux de pentosidine dans le CSF corrélaient avec l'âge chez des patients qui souffrent de différentes pathologies neurodégénératives. En plus, les taux de ce type d'AGEs diminuent chez un groupe de patients atteints de la MA qui est composé juste de quatre personnes par rapport aux autres types de démences. Cependant, les taux du CML ne montrent pas de différence entre les groupes, ni de corrélation avec l'âge (Monacelli et al., 2014). Dans une deuxième étude, l'équipe de Monacelli et al, a montré que les taux plasmatiques de pentosidine augmentent chez les personnes MCI converties en MA par rapport aux contrôles sains (Monacelli et al., 2015). Toutes ces études montrent des divergences dans les résultats observés et cela est peut-être dû aux techniques de dosage utilisés, aux nombres de patients limités et au regroupement des différents stades de la MA dans le même groupe. De plus, ces études ont dosé le CML et la pentosidine dans les protéines totales du sérum. Par contre, l'originalité de notre étude est d'avoir pris en compte les différents stades de la démence et de

les avoir comparés avec le stage précoce (MCI) et des contrôles sains. En plus, nous avons évalué les taux du pentosidine et du CML dans les protéines totales du sérum et dans la proportion des protéines sans la fraction d'albumine (S-Ab). Nos résultats montrent que les taux sériques du CML dans la fraction (S-Ab) sont plus élevés chez les patients atteints de MA et particulièrement dans le stade léger de la maladie par rapport aux sujets contrôles. Au contraire, les niveaux sériques de pentosidine ne montrent pas des différences significatives entre les témoins et les patients atteints de la MA.

La quantification de pentosidine et du CML dans les protéines totales du sérum peut ne pas être spécifique au diagnostic de la MA puisqu'une augmentation des taux sériques de ces deux AGEs a été observée dans plusieurs autres maladies comme le diabète de type 2, le syndrome métabolique et les maladies cardiovasculaires (Haddad et al., 2016; Kerkeni et al., 2013; Simm, 2013). Aussi, l'albumine tant la protéine la plus abondante dans le sérum, elle peut être exposée à une glycoxydation accrue qui peut conduire à la formation de divers types d'AGEs et par conséquence masquer la détection d'une variation possible au niveau de la glycation des protéines minoritairement présentes dans le sang. La glycation d'albumine sérique est d'ailleurs considérée un biomarqueur permettant le suivi de l'équilibre glycémique des patients diabétiques (Anguizola et al., 2013).

La présence de CML et de pentosidine en périphérie dépend de plusieurs facteurs y compris, les multiples voies de formation, l'état redox sanguin, la proportion de l'apport alimentaire, la libération par des cellules et la dégradation et l'élimination. La pentosidine peut être formée par la réaction du ribose, du glucose, du fructose ou de l'ascorbate avec la lysine et l'arginine de deux protéines différentes, tandis que, le CML se forme par l'interaction entre le glucose, d'autres sucres ou le glyoxal avec les groupements amines des lysines. De plus, il est issu de la peroxydation lipidique et l'oxydation des protéines (Vistoli et al., 2013). L'augmentation du CML au stade léger de la MA peut être liée à l'altération de l'homéostasie redox et à l'accumulation des dommages oxydatifs récemment observées dans le même groupe de patients. Une étude effectuée dans notre laboratoire a montré une diminution précoce de la capacité antioxydante totale chez les patients MCI suivis d'une augmentation des protéines carbonylées au premier stade de la MA (Perrotte et al., 2019). D'autres études ont montré l'augmentation plasmatique des produits de la peroxydation lipidiques et des protéines oxydées chez des patients atteints de la MA (Di Domenico et al., 2011; Greilberger et al., 2008; Puertas et al., 2012). Récemment, il a été montré que le microbiote intestinal assure la dégradation et la métabolisation du CML issue de l'alimentation (Bui et al., 2019; Hellwig et al., 2019). Par ailleurs, une altération de ce système

microbien a été associé au développement de la MA (Kowalski & Mulak, 2019). Ce dysfonctionnement microbien pourrait être impliqué dans l'augmentation des taux du CML issus de l'alimentation et qui peuvent se trouver dans la circulation sanguine. Cela pourrait augmenter les concentrations du CML sériques mesurées dans la fraction (S-Ab).

La MA se caractérise cliniquement par une perte de la mémoire et un déficit cognitif. Cette altération cognitive peut être mise en évidence grâce à des scores de tests cognitifs. Dans notre étude, l'évaluation de l'état cognitif des patients a été déterminé par les tests MMSE et MoCA. Fait intéressant, nous avons pu montré une corrélation négative des taux sériques du CML dans la fraction (S-Ab) avec les scores des deux tests cognitifs et indépendamment de l'âge. Par contre, les taux sériques de la pentosidine ne corrèlent pas avec les scores cognitifs et se sont associés positivement avec l'âge. Notre étude a pu trancher sur la capacité de taux sérique de ces deux AGEs à diagnostiquer la MA. On a pu aussi établir qu'il est très important de séparer les différents stades de la maladie puisque la variation de taux du CML n'est observée que chez les patients du stade léger. Des évidences suggèrent que des prises alimentaires contenues des concentrations élevées d'AGEs provoquent une altération des fonctions cognitives (Cai et al., 2014; Lubitz et al., 2016; Perrone & Grant, 2015). Malgré que le mécanisme qui figure derrière la relation entre les taux des AGEs périphériques et le déclin cognitif reste peu étudié, une récente étude a montré qu'une alimentation riche en AGEs induits un déficit cognitif, l'hyperphosphorylation de tau, la production d'A β et l'inflammation chez des souris (Yang et al., 2020). En plus, il est admis que l'interaction entre les AGEs (spécifiquement le CML) et le récepteur RAGE induit du stress oxydatif, la libération de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF- α et augmente la production d'A β et l'hyperphosphorylation tau dans les cellules (Cai et al., 2016). Chez des rats, une injection en ICV d'A β glyqué a provoqué un déficit de mémoire et une altération structurale de l'hippocampe (Chen *et al.*, 2014b). Cependant, d'autres recherches sont nécessaires pour mieux comprendre la relation entre le déclin cognitif et les niveaux du CML périphérique.

Le MG et le GO sont considérés les précurseurs de la formation du CML. L'interaction du GO avec les protéines favorise directement la formation de ce type d'AGEs. Il a également été démontré que le MG, en favorisant le stress oxydatif, pourrait indirectement contribuer à la formation du CML (Ahmed et al., 1997; Yang et al., 2018). Dans ce contexte, des taux sériques élevés du MG et du GO pourraient favoriser la formation du CML. Dans un même ordre d'idées, nous avons montré que les taux du MG dans le sérum sont plus élevés chez les patients MCI et atteints de la MA que chez les sujets contrôles. L'analyse ROC a démontré que les niveaux du

MG ont une susceptibilité élevée de différencier les patients MCI des sujets témoins, mais pas les patients atteints de la MA. Fait intéressant, les niveaux sériques du GO sont élevés seulement chez les patients MCI. Les niveaux du GO ont une probabilité élevée de différencier les patients MCI des sujets contrôle et atteints de la MA. Ces résultats supportent la possibilité de définir le MG et le GO comme des marqueurs du stade MCI (le stade précoce de la MA). Ces résultats sont appuyés par des études antérieures qui ont montré que dans le LCR, les taux des produits dérivés du MG sont plus élevés chez les patients atteints de la MA par rapport aux sujets témoins (Ahmed *et al.*, 2005a). Une autre étude a montré que les niveaux du MG chez les patients atteints de la MA sont deux fois plus élevés que chez les sujets témoins, mais cette différence n'était pas significative en raison des grandes variations intergroupes et de la petite taille de la population ciblée (Kuhla *et al.*, 2005). De plus, chez des personnes âgées, des taux sériques élevés de MG sont associés à un déficit de mémoire, à un volume de matière grise plus faible (Srikanth *et al.*, 2013) et un plus grand déclin cognitif par rapport aux personnes qui ont des faibles taux de ce dicarbonyl (Beerli *et al.*, 2011). De plus, des études *in vivo* ont montré que la présence d'une concentration élevée du MG est associée au développement des problèmes cognitifs et de mémoire. L'injection en ICV du MG chez des souris a induit une hyperphosphorylation de tau ainsi que des dommages au niveau d'hippocampe et des troubles de la mémoire (Qi *et al.*, 2017). Les mêmes troubles cognitifs sont observés chez des rats suite à l'injection du MG en ICV (Hansen *et al.*, 2016). À la suite d'une injection de la streptozotocine chez des rats, l'augmentation des taux du MG a été associée à des altérations cognitives, de la mémoire et d'apprentissage (Huang *et al.*, 2012).

L'augmentation des niveaux du MG et du GO pourrait être d'origine exogène (l'alimentation) ou endogène des dommages cellulaires et de la conversion de l'acétoacétone en MG et H_2O_2 par la semicarbazide amine oxydase (SSAO) (Kalapos, 2013; Obata, 2006). L'activité plasmatique de SSAO est révélée élevée chez des patients atteints de la MA (Unzeta *et al.*, 2007). De plus, le dysfonctionnement du système glyoxalase le responsable de la dégradation de ces dicarbonyls et la diminution des taux du GSH pourraient favoriser leur abondance. Il a été montré que les taux plasmatiques du GSH diminuent chez des patients atteints de la MA (Bermejo *et al.*, 2008). Dans un état d'inflammation comme c'est le cas chez des patients atteints de la MA, l'interféron γ provoque une augmentation de la production du MG au sein des macrophages (Dhananjayan *et al.*, 2017). Généralement, il est estimé que les niveaux normaux du MG sont de l'ordre de 50 à 300 nM dans le plasma humain (Rabbani & Thornalley, 2014). Dans un état pathologique comme le diabète, les niveaux plasmatiques du MG sont plus élevés que la normale et varient

entre 600 et 900 nM (Bierhaus et al., 2012). Cependant, le MG et le GO sont très réactifs et leur demi-vie est courte dans des conditions physiologiques et par conséquent, les quantités libres détectées ne présentent pas la totalité des concentrations d'origine. Il serait intéressant de doser les concentrations sériques de ces deux produits dans différentes prises de sang pour s'assurer de leurs stabilités et l'efficacité de les considérer comme des biomarqueurs. De plus, et malgré les avantages de notre étude, sa limite majeure réside essentiellement dans le nombre d'échantillons utilisés qui ne semble pas être assez grand.

6.3 Les EVs périphériques outil de diagnostic de la MA

Plusieurs arguments font des EVs un outil prometteur de diagnostic. Ces vésicules sont libérées par les différents types de cellules dans le corps. De plus, ils sont présents dans tous les biofluides de l'organisme et leur contenu moléculaire varie en fonction du type et de l'état physiopathologique de la cellule sécrétrice. Les EVs sont également capables de protéger leurs contenus de la dégradation (Jia et al., 2014). Les EVs provenant du CNS peuvent se retrouver dans la circulation sanguine. Malgré le fait que les mécanismes qui figurent derrière l'efflux des EVs du cerveau vers le sang restent inconnus, ces vésicules pourraient poursuivre différentes routes afin de se déplacer du SNC vers la circulation systémique (Thompson et al., 2016). L'identification de la présence des EVs provenant du CNS dans la circulation sanguine a suscité un intérêt pour leur utilisation comme source de biomarqueur facilement accessible. Pour ces raisons, plusieurs études se sont intéressées à étudier les différentes protéines altérées dans le cerveau dans le cadre de la MA en isolant des EVs provenant des neurones ou d'astrocytes (Fiandaca et al., 2015; Goetzl et al., 2015; Goetzl et al., 2016; Goetzl et al., 2018; Kapogiannis et al., 2015). L'isolation des EVs neuronaux de la circulation sanguine était basée sur la présence de L1CAM qui est décrite comme un marqueur majoritairement neuronal (Lachenal et al., 2011). Cependant, l'utilisation de L1CAM pourrait être non spécifique juste pour l'isolation des EVs neuronaux puisque cette protéine de surface est exprimée chez d'autres types de cellules et pourrait, par conséquent, se trouver dans leur EVs libérées (Chen *et al.*, 2018a; Debiec *et al.*, 1998). De plus, la relation entre le déclin cognitif et les niveaux de marqueurs des EVs neuronaux n'a pas été abordée dans la majorité des études. Ces limites apportent de plus en plus l'incertitude d'utilisation de contenu des EVs L1CAM positives comme des biomarqueurs du CNS dans le cadre de la MA. Cependant, l'utilisation des EVs totaux de la périphérie offre une meilleure stratégie pour identifier des marqueurs potentiels de la MA, et ce pour différentes raisons tels que leur capacité de franchir la BHE et de perturber l'homéostasie du SNC. Dans ce sens, plusieurs études ont montré que ces vésicules circulatoires peuvent traverser la BHE et rejoindre le

cerveau. En plus, ces nano transporteurs sont capables de transférer des molécules actives, comme des enzymes ou des séquences d'ARN, aux neurones du SNC (Alvarez-Erviti et al., 2011; Cooper et al., 2014; Kojima et al., 2018; Matsumoto et al., 2017; Ridder et al., 2014). En plus, il a été montré que l'injection des EVs périphériques de la souris dans l'hippocampe provoque l'activation des microglies (Zheng et al., 2017). Récemment, des études ont montré que l'injection des EVs périphériques des souris dans la circulation sanguine induit un état de neuroinflammation avec une activation des microglies et des astrocytes et une sécrétion des cytokines pro-inflammatoires dans le CNS (Li et al., 2018a; Morales-Prieto et al., 2018).

Dans cette perspective, nous avons isolé et caractérisé les EVs totaux du sérum de sujets sains et des patients MCI et de différents stades de la MA. Nous avons identifié pour la première fois la présence du CML dans les EVs. Les niveaux de ce type d'AGEs montrent une diminution au sein du stade modéré de la MA par rapport aux personnes contrôles. Ces résultats pourraient être expliqués par le fait que les agrégats intracellulaires des AGEs et surtout du CML formés ne peuvent pas être libérés par les EVs et s'accumulent dans les cellules. L'accumulation intracellulaire du CML a été observée dans la MA et tout au long de sa progression (Srikanth et al., 2011).

La formation des AGEs provoque une altération au niveau de la structure et de la fonction protéique. De plus, les AGEs formés se fixent sur leur récepteur RAGE et favorisent un ensemble de mécanismes néfastes qui amènent à la mort cellulaire (Cai et al., 2016). Contrairement à la forme membranaire de RAGE, la forme soluble de ce récepteur (sRAGE), qui est générée par le clivage protéolytique de la forme membranaire ou par épissage alternatif, peut interagir avec les ligands circulants comme les AGEs et l'A β et empêcher leurs effets toxiques (Yan et al., 2010). Certaines études se sont intéressées à doser les niveaux périphériques de sRAGE, leurs résultats montrent une diminution des taux de cette forme circulante chez les patients MCI et atteints de la MA par rapport aux sujets contrôles (Emanuele et al., 2005; Ghidoni et al., 2008; Xu et al., 2017). Dans notre étude, nous avons montré la présence d'une autre forme de RAGE circulant qui se trouve dans les EVs périphériques. La présence de RAGE dans les vésicules circulatoires a été montrée pour la première fois dans l'étude de Patterson et al. (Patterson et al., 2018). Les auteurs de ce travail ont isolé des EVs dérivés de neurones de 8 personnes âgées et obèses et ils ont démontré par western blot et ELISA que ces vésicules isolées contiennent RAGE. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la présence de ce récepteur dans les EVs circulatoires totaux et à la comparaison de son niveau dans les patients MCI et atteint de la MA à différents stades. Nos résultats montrent que les taux de cette nouvelle

forme diminuent chez les patients MCI, et les patients atteints de la MA au stade léger et modéré de la maladie par rapport au stade avancé. De plus, les niveaux du RAGE vésiculaire corréleront positivement avec le score cognitif du test MMSE. Le rôle du RAGE vésiculaire sera déterminé par sa position qui pourrait être sur la surface ou à l'intérieur de la vésicule. Dans le cas où ce récepteur se trouve à la surface des EVs, il pourrait capter des ligands circulants et empêcher leur liaison au RAGE cellulaire. D'autres recherches sont nécessaires afin de déterminer le rôle et l'implication de la forme vésiculaire du RAGE dans la pathogenèse de la MA.

En plus de l'implication du récepteur RAGE dans la physiopathologie de la MA, l'altération de l'activité de GLO-1 est impliquée dans la pathogenèse de la MA. Alors, le profil vésiculaire de cette enzyme pourrait aussi être un marqueur cible du diagnostic de la MA. Dans ce contexte, les niveaux du GLO-1 dans les EVs sériques montrent une diminution chez les patients de stade précoce de la MA par rapport au sujet MCI et contrôles. En plus, les niveaux vésiculaires de cette enzyme corréleront avec le score cognitif de test MoCA. Cette diminution pourrait être expliquée par le fait que les cellules ont besoin de garder cette enzyme pour détoxifier le MG et le GO.

En outre, il a été montré que dans le cerveau, les EVs libérés permettent une communication et un transfert des molécules entre les différentes cellules du CNS favorisant la neuroprotection (Fruhbeis et al., 2013). Le GLO-1 joue un rôle de neuroprotection contre les effets néfastes de l'accumulation des AGEs, la présence et le transfert de cette enzyme dans les EVs neuronaux peuvent être un mécanisme important du maintien de l'hémostase neuronale. Dans notre étude, nous avons montré que les EVs sécrétés par les neurones contiennent l'enzyme GLO-1. Ceci, maintient l'idée que ces vésicules pourraient jouer un rôle majeur dans la neuroprotection.

Le profil des différents taux du CML, du RAGE et du GLO-1 dans les EVs périphériques permet de différencier les stades de la MA. Cependant, le développement d'un biomarqueur vésiculaire valide pour le diagnostic de la MA présente plusieurs défis. Ces derniers se résument à l'efficacité de l'isolement, la pureté de l'extraction, la reproductibilité dans des grandes cohortes et la corrélation des biomarqueurs vésiculaires avec d'autres marqueurs cérébraux, et/ou avec les scores cognitifs (Lee et al., 2019). Il existe différentes méthodes pour l'isolation des EVs dont la chromatographie d'exclusion, l'ultracentrifugation, l'utilisant des anticorps et la précipitation. L'ultracentrifugation et la précipitation avec des kits commercialisés sont les plus utilisées dans les études puisque leur rendement d'isolation est supérieur aux autres techniques. Cependant, la contamination avec d'autres molécules extracellulaires comme les lipoprotéines ou les agrégats protéiques pourrait interférer avec l'identification d'un biomarqueur valide (Konoshenko

et al., 2018). Dans notre étude, nous avons mis au point une méthode d'isolation qui se base sur l'utilisation d'un volume bien précis de kit de précipitation commercialisé suivi de différentes étapes de filtration pour éliminer le maximum des contaminants. Le nombre réduit des patients dans chaque groupe est l'une des limites de l'étude. De plus, l'utilisation de sérum pour isoler les EVs pourrait être un autre point limite de cette étude puisque les EVs dérivés des plaquettes pendant le processus de formation de caillots seront présents dans le sérum (Gemmell et al., 1993). Par conséquent, le nombre et la nature des EVs isolés du sérum peuvent être différents de ceux extraits du plasma (George et al., 1982). Alors, des études supplémentaires sont nécessaires pour clarifier les différences entre les EVs plasmatique et sérique afin de déterminer le meilleur biofluide pour la découverte des marqueurs vésiculaires pour le diagnostic de la MA.

6.4 Les AGEs et leurs précurseurs au cœur de développement de la MA

À ce jour, la cause de développement de la MA reste mal connue. Mais, plusieurs mécanismes sont impliqués dans la physiopathologie de cette maladie qui se déclenche des années avant l'apparition des premiers symptômes. Dans ce contexte, les AGEs et leur précurseur (MG et GO) sont considérés comme des acteurs impliqués directement ou indirectement dans la physiopathologie de la MA. Dans le cerveau, il a été montré que la production de radicaux libres pendant la formation et la dégradation de MG et du GO suivi de l'installation d'un état de stress oxydatif pourrait induire la mort des cellules neuronales (Di Loreto et al., 2004; Huang et al., 2012). Ces dicarbonyls sont capables d'augmenter la production d'A β , la formation d'oligomères et de protofibrilles ainsi que la taille des agrégats (Chen et al., 2006; Emendato et al., 2018). De plus, ils ont la capacité de moduler plusieurs voies de signalisation qui jouent un rôle causal dans le développement de la MA (Angeloni et al., 2014). L'interaction du MG et du GO avec les protéines favorise la formation des AGEs. Ces derniers peuvent se lier au récepteur des AGEs (RAGE) et induire la production de stress oxydatif et d'A β concomitant à la libération de facteurs pro-inflammatoires et à l'hyperphosphorylation de tau (Walker et al., 2015). Dans le cerveau des patients atteints de la MA, les ENF et les PS apparaissent tout d'abord dans la région trans-entorhinale, puis s'étendent vers d'autres zones du cerveau (Braak & Braak, 1991). Cette propagation pathologique pourrait être menée par les EVs. En effet, il a été montré que ces derniers contiennent de la protéine tau hyperphosphorylée et de l'A β et assure la propagation des protéines pathologiques entre les cellules de différentes régions du cerveau (Coleman & Hill, 2015; Quek & Hill, 2017). Par ailleurs, les peptides A β et la protéine tau pourrait être glyqués et forment des complexes A β -CML ou Tau-CML. Il a été montré que la forme glyquée d'A β est plus neurotoxique que celle non glyquée (Li et al., 2013b). La propagation d'A β ou tau glyqué pourrait

alors accélérer la pathologie de la maladie. Dans ce contexte, nous avons montré que les cellules neuronales sont capables de propager les AGEs et spécifiquement le CML à travers les EVs. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre les rôles des AGEs vésiculaires dans le développement de la MA.

L'accumulation d'A β sous forme des PS et la formation d'ENF suite à l'hyperphosphorylation de la protéine tau sont considérées comme les caractéristiques physiopathologiques dans les cerveaux des patients atteints de la MA. Cependant, les patients souffrent également d'une altération qui touche les taux d'expression de facteurs neuroprotecteurs et neurotrophiques. Ces facteurs, tels que BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), PRGN (progranuline), NSE (enolase spécifique de neurone), APP et MMP-9 (Métalloprotéase matricielle 9), jouent un rôle important dans la modulation de la cognition et de la mémoire en favorisant la survie et le développement des neurones et en régulant la plasticité synaptique (Acheson et al., 1995; Benussi et al., 2017; Diniz & Teixeira, 2011; O'Brien & Wong, 2011).

Nos données démontrent que le MG ou le GO provoquent une diminution au niveau d'expression de NSE, PRGN, MMP-9 et d'APP dans les cellules neuronales. Une altération de ces facteurs entraîne une réduction des propriétés neurotrophiques cellulaires, une perturbation de croissance neuritique et de synaptogenèse ainsi qu'une diminution d'activité anti-inflammatoire et de la capacité à dégrader l'A β (Haque et al., 2018; Kaminari et al., 2018; Mendsaikhani et al., 2019; Zheng & Koo, 2006). De plus, on a remarqué que ces deux dicarbonyls changent le niveau d'expression d'ANGPTL4 (angiopoïétine like 4), l'une des protéines impliquées dans la régulation de métabolisme lipidique et glucidique, l'inflammation et la perméabilisation vasculaire (Guo et al., 2014; Vienberg et al., 2014). Par ailleurs, l'homéostasie interneuronale dépend d'une communication et transfert des éléments neuroprotecteurs et neurotrophiques. Les EVs libérés des neurones assurent l'échange des facteurs impliqués dans des mécanismes de neuroprotection, de développement neuronal et de plasticité synaptique (Kalani et al., 2014). La perturbation de cette communication pourrait altérer l'homéostasie cellulaire dans le cerveau (Holm et al., 2018). Les protéines PRGN et BDNF sont classées parmi les facteurs neurotrophiques les plus importants, de fait qu'ils sont impliqués dans plusieurs mécanismes assurant le maintien d'homéostasie cellulaire dans le cerveau (Chitramuthu et al., 2017; Kowiański et al., 2018). De plus, ces deux protéines sont fortement exprimées dans l'hippocampe et sont impliquées dans la plasticité synaptique et la régulation de la mémoire (Daniel et al., 2000; Miranda et al., 2019; Neeper et al., 1996). Il a été montré que l'ARNm du BDNF diminue dans l'hippocampe des patients atteints de la MA (Phillips et al., 1991). L'injection en ICV d'anticorps

dirigé contre la forme circulatoire du BDNF entraîne aussi des altérations au niveau de la mémoire spatiale et de l'apprentissage chez des rats (Mu et al., 1999). Par ailleurs, les données d'études cliniques suggèrent que les niveaux sériques du BDNF sont diminués chez les patients MCI et atteints de la MA (Ng et al., 2019) et sont corrélés avec un déficit de mémoire et une diminution du volume hippocampique (Erickson et al., 2010). D'un autre côté, une déficience en PRGN entraîne une augmentation des dépôts d'A β , une hyperphosphorylation de tau, une activation microgliale et astrocytaire, ainsi qu'une augmentation d'expression des cytokines pro-inflammatoires (Minami et al., 2014; Takahashi et al., 2017; Yin et al., 2010).

Notre étude a montré pour la première fois que les neurones sont capables de libérer ces deux facteurs neurotrophiques dans les EVs. Les neurones pourraient alors communiquer entre elles ces facteurs à travers les EVs. Nous avons également montré aussi que le GO diminue les niveaux de ces deux protéines dans les EVs dérivées de neurones. De plus, nous avons remarqué une baisse des taux vésiculaires de la lipocaline 2 (LCN-2) lors du traitement avec les deux dicarbonyls (MG et GO). La LCN-2 est une protéine qui joue un rôle important dans la survie cellulaire, aux réponses inflammatoires et à la sensibilité à l'insuline (Song & Kim, 2018). La LCN-2 est un facteur de protection contre l'inflammation dans le SNC (Kang et al., 2017). Cette protéine joue aussi un rôle important en tant que modulateur des fonctions cognitives et du comportement (Ferreira et al., 2013). Les réductions des taux de ces protéines ne sont pas la conséquence d'un défaut de libération ou de formation des EVs puisque la quantité et la distribution de taille de ces vésicules sont similaires en présence ou absence de MG ou du GO. Ces résultats suggèrent que les cellules neuronales réduisent le transfert de certaines protéines (BDNF, PRGN et LCN-2) liées à des mécanismes clés comme la survie cellulaire, la plasticité synaptique, la neurogenèse ou l'inflammation vers d'autres cellules pour contrer les effets néfastes du MG ou du GO.

Dans le SNC, à part l'implication des AGEs et leur précurseur (MG et GO) dans des mécanismes physiopathologiques de la MA, la présence des concentrations élevées de ces produits en périphérie pourrait contribuer au développement de la MA. Des études *in vitro* ont montré, des concentrations élevées du MG induisent une altération structurale et augmentent la perméabilité des modèles du BHE. Le MG induit la glycation des protéines de jonctions serrées, la production du stress oxydatif, la perturbation du statut redox et surtout la diminution du glutathion cellulaire ainsi qu'un état de dysfonctionnement mitochondrial suivi de la mort des cellules endothéliales par apoptose (Li et al., 2013a; Okouchi et al., 2009; Tóth et al., 2014). De plus, le MG et/ou le GO périphérique favorisent la glycation des protéines circulatoires qui pourrait altérer la perméabilité du BHE. Les AGEs provoquent une diminution d'expression des jonctions serrées ainsi qu'une

augmentation de libération du métalloprotéase -2 (MMP-2) (Shimizu et al., 2013). *In vitro*, l'insuline glyquée induit un état de stress oxydatif suivi de la perturbation de la perméabilité du BHE (Shahriyary et al., 2018). Par le biais de techniques d'imageries, des études cliniques ont montré que les patients MCI et atteints de la MA souffrent d'une altération au niveau de l'intégrité et le fonctionnement de la BHE (Montagne et al., 2016; van de Haar et al., 2016; Wang et al., 2006). Ce dysfonctionnement permet le passage des éléments qui figurent dans la circulation comme la plasmine, la thrombine, le fibrinogène et l'albumine et les cellules immunitaires vers le cerveau (Cullen et al., 2005; Miners et al., 2018). Ces éléments sont neurotoxiques et favorisent un déséquilibre homéostatique au niveau du SNC et, par conséquent, la mort des neurones et le développement des maladies neurodégénératives (Sweeney et al., 2018).

Selon leur contenu, les EVs de la périphérie pourraient être des éléments toxiques pour le CNS. Le matériel biologique renfermé dans les EVs isolé du sang est le responsable de la toxicité de ces vésicules. Partant du fait que les EVs du système périphérique sont majoritairement libérés par les lymphocytes, les érythrocytes et les plaquettes, l'état physiologique de ces derniers pourrait influencer leur contenus (Arraud et al., 2016; Arraud et al., 2014; Zarà et al., 2019). Dans la MA, il a été montré que le statut oxydatif et enzymatique dans ces cellules sont perturbés. De plus, l'expression d'A β dans les érythrocytes et les plaquettes des patients atteints de la MA est plus élevée que celle des personnes saines (Pluta & Ulamek-Kozioł, 2019; Wojsiat et al., 2017). Dans ce contexte, il a été montré que le MG provoque une activation des macrophages et des lymphocytes avec l'augmentation du stress oxydatif et la production des cytokines pro inflammatoires (Bhattacharyya et al., 2008; Pal et al., 2009). De plus, l'interaction AGEs-RAGE provoque l'altération des voies de signalisations, la production de certaines cytokines et radicaux libres conduisant à des dérégulations fonctionnelles dans les cellules immunitaires (Teodorowicz et al., 2018). Ces altérations au niveau de ces cellules pourraient entraîner un changement au niveau de contenu vésiculaire libéré et les rendent plus vulnérables. D'un autre côté, la présence des AGEs dans les EVs périphériques pourrait être un moyen de toxicité présent dans ces vésicules. Cependant, on ne sait pas si les AGEs se trouvent à la surface et/ou à l'intérieur des vésicules et s'il y a d'autres AGEs, à part le CML, dans ces vésicules.

6.5 Combattre la formation des AGEs prévient le développement de la MA

Les AGEs et leurs précurseurs jouent un rôle dans plusieurs mécanismes physiopathologiques impliqués dans la MA. De plus, la concentration élevée du MG et du GO favorise la formation des AGEs et induit différentes altérations au niveau périphérique et central amenant au

développement de la MA. Alors, la diminution des concentrations de ces deux dicarboxyles limitera la formation des AGEs et serait une stratégie préventive contre le développement de la MA. Il existe différentes molécules naturelles et synthétiques qui sont connues pour leur capacité anti-glycation. L'aminoguanidine est considéré comme l'un des puissants anti glycants. Il permet le captage et le piégeage des produits réactifs comme le MG et le GO. De plus, il inhibe la transformation des composés issus des étapes précoces de la glycation (base de schiff et produit d'Amadori) vers les produits terminaux (Brownlee et al., 1986; Thornalley, 2003). Cependant, les essais cliniques sur cette molécule ont été interrompus en raison de nombreux effets indésirables tels que des troubles gastro-intestinaux, une vascularite et une anémie (Freedman et al., 1999). Le metformin est un médicament utilisé dans le traitement du DT2 qui possède une capacité anti-glycation grâce à sa structure chimique apparentée à celle d'aminoguanidine. En effet, cette molécule réagit comme un capteur des dicarboxyles. À titre d'exemple, la liaison du metformine avec le MG permet la formation d'un produit nommé triazépinone et par conséquent empêche la formation des AGEs (Beisswenger & Ruggiero-Lopez, 2003). Les polyphénols regroupent un grand nombre de substances chimiques dont les principales sources sont les légumes et les fruits. Ces substances se caractérisent par une grande capacité de capter les composés réactifs comme le MG et les radicaux libres et, par conséquent, limiter la formation des AGEs (Yeh et al., 2017). *In vitro*, le cyanidine inhibe la glycation de l'albumine et de l'ADN causé par le MG. L'effet inhibiteur de ce polyphénol a été attribué à sa capacité de piéger directement le MG (Thilavech et al., 2016). De plus, il a été montré que le curcumin, L'épigallocatechine gallate et la quercétine possèdent une capacité de piéger le MG et le GO . En outre, l'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide chlorogénique et l'acide férulique peuvent inhiber la glycation des protéines causé par le glucose (Khan et al., 2020). *In vitro*, le resvératrol protège les cellules contre les dommages induit par le MG et le stress oxydatif (Seo et al., 2014). De plus, ce polyphénole diminue l'expression du récepteur RAGE et il joue un rôle dans l'atténuation de l'inflammation (Khazaei et al., 2016; Le et al., 2019). L'utilisation de ces composés pourrait diminuer les effets néfastes des AGEs et leurs précurseurs.

7 CHAPITRE 7 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La MA se caractérise par un chevauchement de mécanismes moléculaires et cellulaires complexes qui ne sont pas totalement élucidés. Cette complexité pose un problème devant la détermination d'un traitement efficace et un diagnostic de certitude. Pour cela, la compréhension des mécanismes de cette maladie et la détection des marqueurs de diagnostic précoces sont d'une grande importance.

Dans ce contexte, ce projet s'est intéressé à la détermination de l'implication des AGEs et leurs précurseurs (MG et GO) dans des mécanismes liés au développement de la MA. De plus, l'identification de nouveaux biomarqueurs périphériques potentiels pour le diagnostic précoce et l'évaluation de la progression de la maladie à différents stades.

En premier lieu, notre étude a montré des variations dans les taux des AGEs, leur récepteur RAGE et leur enzyme de détoxification (GLO-1) qui permettent de distinguer les différents stades de la maladie. Le profil sérique et vésiculaire du CML différencie le stade léger du stade modéré de la MA. En effet, la concentration de ce produit de glycation dans la fraction des protéines sérique sans l'albumine a montré une augmentation au stade léger. D'un autre côté, la concentration de ce même produit dans les EVs sériques diminue au stade modéré. De plus, les taux vésiculaires du récepteur RAGE montrent une augmentation au stade sévère par rapport aux autres stades. Les taux de GLO-1 dans les EVs sont aussi plus faibles au stade léger. Fait intéressant, la variation des profils du CML, RAGE et GLO-1 est corrélé avec les scores des tests cognitifs (MMSE et MoCA). En deuxième lieu, ce travail a montré que les taux sériques des précurseurs des AGEs (MG et GO) augmentent au stade précoce (stade MCI) et peuvent différencier les patients de ce stade à ceux atteints de la MA ou les personnes saines.

Au cours de ce travail, nous avons montré pour la première fois que les neurones sont capables de libérer les AGEs (CML), RAGE et GLO-1 et d'autres protéines neurotrophiques et inflammatoires par les EVs mais d'autres recherches sont nécessaires pour établir les rôles des AGEs et ces protéines vésiculaires dans la physiopathologie de la MA. De plus, le MG et le GO altèrent les taux neuronaux et vésiculaires de certains facteurs neurotrophiques et inflammatoires impliqués dans la physiopathologie de la MA.

Ce projet nous amène à de nombreuses perspectives dans le domaine des AGEs, leurs récepteurs et leurs précurseurs, dans la MA au niveau des mécanismes pathologiques et l'approfondissement de l'étude clinique. Premièrement, il serait intéressant d'évaluer et comparer

le potentiel de diagnostic du CML et d'autres AGEs, de RAGE et de GLO-1 dans le sérum et les EVs périphériques de différents types de démences comme la démence frontotemporale, la démence vasculaire, la démence à corps de Lewy et la maladie de Parkinson.

En plus, il serait avantageux d'augmenter le nombre de patients par groupe pour une meilleure puissance statistique. Deuxièmement, il serait important d'étudier la glycation des EVs et son implication dans la physiopathologie de la MA. Dans ce sens, l'injection des EVs glyqués dans le cerveau des souris et l'exploration de leurs dispersions et leur impact sur la neuro-inflammation, le stress oxydatif, le mort neuronal et d'autres mécanismes liés à la maladie ainsi que le développement d'une perte de mémoire seraient étudiés. De plus, il serait intéressant d'étudier le passage des EVs périphériques glyqués à travers le BHE et son impact sur l'hémostase des neurones dans un modèle *in vitro*. Enfin, il serait pertinent d'incorporer des principes actifs anti glycation comme l'aminoguanidine, le metformine ou même des polyphénols dans les EVs qui vont servir comme des véhicules pour protéger, limiter les effets secondaires et transporter ces derniers avec des taux suffisants vers le cerveau.

8 BIBLIOGRAPHIE

- Abels ER & Breakefield XO (2016) Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol* 36(3):301-312.
- Acheson A, Conover JC, Fandl JP, DeChiara TM, Russell M, Thadani A, Squinto SP, Yancopoulos GD, Lindsay RM (1995) A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature* 374(6521):450-453.
- Ahmed MU, Brinkmann Frye E, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW (1997) N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem J* 324 (Pt 2):565-570.
- Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW (1986) Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J Biol Chem* 261(11):4889-4894.
- Ahmed N, Ahmed U, Thornalley PJ, Hager K, Fleischer G, Münch G (2005a) Protein glycation, oxidation and nitration adduct residues and free adducts of cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease and link to cognitive impairment. *Journal of Neurochemistry* 92(2):255-263.
- Ahmed N, Mirshekar-Syahkal B, Kennish L, Karachalias N, Babaei-Jadidi R, Thornalley PJ (2005b) Assay of advanced glycation endproducts in selected beverages and food by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Mol Nutr Food Res* 49(7):691-699.
- Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC (2013) Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol* 113(1):1-11.
- Aksenov MY, Aksenova MV, Butterfield DA, Geddes JW, Markesbery WR (2001) Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 103(2):373-383.
- Akuma P, Okagu OD, Udenigwe CC (2019) Naturally Occurring Exosome Vesicles as Potential Delivery Vehicle for Bioactive Compounds. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 3(23).
- Al-Robaiy S, Weber B, Simm A, Diez C, Rolewska P, Silber RE, Bartling B (2013) The receptor for advanced glycation end-products supports lung tissue biomechanics. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 305(7):L491-500.
- Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, Gamst A, Holtzman DM, Jagust WJ, Petersen RC, Snyder PJ, Carrillo MC, Thies B, Phelps CH (2011) The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7(3):270-279.
- Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhai S, Wood MJ (2011) Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature Biotechnology* 29(4):341-345.
- Amadori M (1929) The product of the condensation of glucose and p-phenetidine. *Atti Reale Accad Nazl Lincei* 9:68-73.
- Angeloni C, Zambonin L, Hrelia S (2014) Role of methylglyoxal in Alzheimer's disease. *Biomed Res Int* 2014:238485.

- Anguizola J, Matsuda R, Barnaby OS, Hoy KS, Wa C, DeBolt E, Koke M, Hage DS (2013) Review: Glycation of human serum albumin. *Clin Chim Acta* 425:64-76.
- Araki N, Higashi T, Mori T, Shibayama R, Kawabe Y, Kodama T, Takahashi K, Shichiri M, Horiuchi S (1995) Macrophage scavenger receptor mediates the endocytic uptake and degradation of advanced glycation end products of the Maillard reaction. *Eur J Biochem* 230(2):408-415.
- Arancio O, Zhang HP, Chen X, Lin C, Trinchese F, Puzzo D, Liu S, Hegde A, Yan SF, Stern A, Luddy JS, Lue LF, Walker DG, Roher A, Buttini M, Mucke L, Li W, Schmidt AM, Kindy M, Hyslop PA, Stern DM, Du Yan SS (2004) RAGE potentiates A β -induced perturbation of neuronal function in transgenic mice. *EMBO J* 23(20):4096-4105.
- Arellano-Anaya ZE, Huor A, Leblanc P, Lehmann S, Provansal M, Raposo G, Andreoletti O, Vilette D (2015) Prion strains are differentially released through the exosomal pathway. *Cell Mol Life Sci* 72(6):1185-1196.
- Arnold SE, Arvanitakis Z, Macauley-Rambach SL, Koenig AM, Wang H-Y, Ahima RS, Craft S, Gandy S, Buettner C, Stoekel LE, Holtzman DM, Nathan DM (2018) Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums. *Nature Reviews Neurology* 14(3):168-181.
- Arraud N, Gounou C, Turpin D, Brisson AR (2016) Fluorescence triggering: A general strategy for enumerating and phenotyping extracellular vesicles by flow cytometry. *Cytometry Part A* 89(2):184-195.
- Arraud N, Linares R, Tan S, Gounou C, Pasquet J-M, Mornet S, Brisson AR (2014) Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 12(5):614-627.
- Arthur JR (2000) The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci* 57(13-14):1825-1835.
- Asai H, Ikezu S, Tsunoda S, Medalla M, Luebke J, Haydar T, Wolozin B, Butovsky O, Kugler S, Ikezu T (2015) Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci* 18(11):1584-1593.
- Association As (2019) 2019 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* 15(3):321-387.
- Atai NA, Balaj L, van Veen H, Breakefield XO, Jarzyna PA, Van Noorden CJ, Skog J, Maguire CA (2013) Heparin blocks transfer of extracellular vesicles between donor and recipient cells. *J Neurooncol* 115(3):343-351.
- Atwood CS, Scarpa RC, Huang X, Moir RD, Jones WD, Fairlie DP, Tanzi RE, Bush AI (2000) Characterization of copper interactions with Alzheimer amyloid β peptides: identification of an attomolar-affinity copper binding site on amyloid β 1-42. *J Neurochem* 75(3):1219-1233.
- Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 84(2):361-384.
- Bachurin SO, Gavrilova SI, Samsonova A, Barreto GE, Aliev G (2018) Mild cognitive impairment due to Alzheimer disease: Contemporary approaches to diagnostics and pharmacological intervention. *Pharmacol Res* 129:216-226.
- Bagyinszky E, Giau VV, Shim K, Suk K, An SSA, Kim S (2017) Role of inflammatory molecules in the Alzheimer's disease progression and diagnosis. *J Neurol Sci* 376:242-254.

- Bahrini I, Song JH, Diez D, Hanayama R (2015) Neuronal exosomes facilitate synaptic pruning by up-regulating complement factors in microglia. *Sci Rep* 5:7989.
- Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, Melchior A, Degeest G, Geeraerts A, Ivarsson Y, Depoortere F, Coomans C, Vermeiren E, Zimmermann P, David G (2012) Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol* 14(7):677-685.
- Bar KJ, Franke S, Wenda B, Muller S, Kientsch-Engel R, Stein G, Sauer H (2003) Pentosidine and N(epsilon)-(carboxymethyl)-lysine in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurobiol Aging* 24(2):333-338.
- Baranello RJ, Bharani KL, Padmaraju V, Chopra N, Lahiri DK, Greig NH, Pappolla MA, Sambamurti K (2015) Amyloid-beta protein clearance and degradation (ABCD) pathways and their role in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 12(1):32-46.
- Barnett PA, Gonzalez RG, Chylack LT, Jr., Cheng HM (1986) The effect of oxidation on sorbitol pathway kinetics. *Diabetes* 35(4):426-432.
- Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H (1994) Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 269(33):20807-20810.
- Barron M, Gartlon J, Dawson LA, Atkinson PJ, Pardon MC (2017) A state of delirium: Deciphering the effect of inflammation on tau pathology in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 94:103-107.
- Bartling B, Hofmann HS, Weigle B, Silber RE, Simm A (2005) Down-regulation of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) supports non-small cell lung carcinoma. *Carcinogenesis* 26(2):293-301.
- Beeri MS, Moshier E, Schmeidler J, Godbold J, Uribarri J, Reddy S, Sano M, Grossman HT, Cai W, Vlassara H, Silverman JM (2011) Serum concentration of an inflammatory glycotoxin, methylglyoxal, is associated with increased cognitive decline in elderly individuals. *Mechanisms of Ageing and Development* 132(11):583-587.
- Begg DP (2015) Chapter Eight - Insulin Transport into the Brain and Cerebrospinal Fluid. *Vitamins & Hormones*, Litwack G (Édit.) Academic Press, Vol 98. p 229-248.
- Beisswenger P & Ruggiero-Lopez D (2003) Metformin inhibition of glycation processes. *Diabetes Metab* 29(4 Pt 2):6S95-103.
- Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW (2010) Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 23(4):213-227.
- Belkacemi A & Ramassamy C (2012) Time sequence of oxidative stress in the brain from transgenic mouse models of Alzheimer's disease related to the amyloid- β cascade. *Free Radical Biology and Medicine* 52(3):593-600.
- Benussi L, Binetti G, Ghidoni R (2017) Loss of Neuroprotective Factors in Neurodegenerative Dementias: The End or the Starting Point? *Frontiers in neuroscience* 11:672-672.
- Bermejo P, Martin-Aragon S, Benedi J, Susin C, Felici E, Gil P, Ribera JM, Villar AM (2008) Peripheral levels of glutathione and protein oxidation as markers in the development of Alzheimer's disease from Mild Cognitive Impairment. *Free Radic Res* 42(2):162-170.
- Bertram L, Lill CM, Tanzi RE (2010) The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron* 68(2):270-281.

- Bhattacharyya N, Pal A, Patra S, Haldar AK, Roy S, Ray M (2008) Activation of macrophages and lymphocytes by methylglyoxal against tumor cells in the host. *Int Immunopharmacol* 8(11):1503-1512.
- Bierhaus A, Fleming T, Stoyanov S, Leffler A, Babes A, Neacsu C, Sauer SK, Eberhardt M, Schnölzer M, Lasitschka F (2012) Methylglyoxal modification of Nav1.8 facilitates nociceptive neuron firing and causes hyperalgesia in diabetic neuropathy. *Nature medicine* 18(6):926.
- Biessels GJ, Staekenborg S, Brunner E, Brayne C, Scheltens P (2006) Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol* 5(1):64-74.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012) Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization Journal* 5(1):9-19.
- Black SE, Doody R, Li H, McRae T, Jambor KM, Xu Y, Sun Y, Perdomo CA, Richardson S (2007) Donepezil preserves cognition and global function in patients with severe Alzheimer disease. *Neurology* 69(5):459-469.
- Blasko I, Veerhuis R, Stampfer-Kountchev M, Saurwein-Teissl M, Eikelenboom P, Grubeck-Loebenstein B (2000) Costimulatory effects of interferon-gamma and interleukin-1beta or tumor necrosis factor alpha on the synthesis of Abeta1-40 and Abeta1-42 by human astrocytes. *Neurobiol Dis* 7(6 Pt B):682-689.
- Blennow K (2004) Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *NeuroRx* 1(2):213-225.
- Bomfim TR, Forny-Germano L, Sathler LB, Brito-Moreira J, Houzel JC, Decker H, Silverman MA, Kazi H, Melo HM, McClean PL, Holscher C, Arnold SE, Talbot K, Klein WL, Munoz DP, Ferreira ST, De Felice FG (2012) An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated Abeta oligomers. *J Clin Invest* 122(4):1339-1353.
- Bondoc FY, Bao Z, Hu WY, Gonzalez FJ, Wang Y, Yang CS, Hong JY (1999) Acetone catabolism by cytochrome P450 2E1: studies with CYP2E1-null mice. *Biochem Pharmacol* 58(3):461-463.
- Bourne KZ, Ferrari DC, Lange-Dohna C, Rossner S, Wood TG, Perez-Polo JR (2007) Differential regulation of BACE1 promoter activity by nuclear factor-kappaB in neurons and glia upon exposure to beta-amyloid peptides. *J Neurosci Res* 85(6):1194-1204.
- Braak H & Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82(4):239-259.
- Bradley MA, Markesbery WR, Lovell MA (2010) Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein in the brain in preclinical Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 48(12):1570-1576.
- Bradley MA, Xiong-Fister S, Markesbery WR, Lovell MA (2012) Elevated 4-hydroxyhexenal in Alzheimer's disease (AD) progression. *Neurobiol Aging* 33(6):1034-1044.
- Bravo R, Parra V, Gatica D, Rodriguez AE, Torrealba N, Paredes F, Wang ZV, Zorzano A, Hill JA, Jaimovich E, Quest AFG, Lavandero S (2013) Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *International review of cell and molecular biology* 301:215-290.
- Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, Nowygrod R, Neeper M, Przysiecki C, Shaw A, et al. (1993) Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol* 143(6):1699-1712.

- Brisslert M, Amu S, Pullerits R (2013) Intra-peritoneal sRAGE treatment induces alterations in cellular distribution of CD19(+), CD3 (+) and Mac-1 (+) cells in lymphoid organs and peritoneal cavity. *Cell Tissue Res* 351(1):139-148.
- Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, Ulrich P, Cerami A (1986) Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science* 232(4758):1629-1632.
- Budson AE & Solomon PR (2012) New criteria for Alzheimer disease and mild cognitive impairment: implications for the practicing clinician. *The neurologist* 18(6):356-363.
- Bui TPN, Troise AD, Fogliano V, de Vos WM (2019) Anaerobic Degradation of N-ε-Carboxymethyllysine, a Major Glycation End-Product, by Human Intestinal Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67(23):6594-6602.
- Butterfield DA & Pocernich CB (2003) The glutamatergic system and Alzheimer's disease: therapeutic implications. *CNS Drugs* 17(9):641-652.
- Cai H, Reinisch K, Ferro-Novick S (2007) Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev Cell* 12(5):671-682.
- Cai W, He JC, Zhu L, Lu C, Vlassara H (2006) Advanced glycation end product (AGE) receptor 1 suppresses cell oxidant stress and activation signaling via EGF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(37):13801-13806.
- Cai W, Uribarri J, Zhu L, Chen X, Swamy S, Zhao Z, Grosjean F, Simonaro C, Kuchel GA, Schnaider-Beeri M, Woodward M, Striker GE, Vlassara H (2014) Oral glycotoxins are a modifiable cause of dementia and the metabolic syndrome in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(13):4940-4945.
- Cai Z, Liu N, Wang C, Qin B, Zhou Y, Xiao M, Chang L, Yan L-J, Zhao B (2016) Role of RAGE in Alzheimer's Disease. *Cellular and Molecular Neurobiology* 36(4):483-495.
- Calvo-Flores Guzman B, Vinnakota C, Govindpani K, Waldvogel HJ, Faull RLM, Kwakowsky A (2018) The GABAergic system as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *J Neurochem* 146(6):649-669.
- Canobbio I, Abubaker AA, Visconte C, Torti M, Pula G (2015) Role of amyloid peptides in vascular dysfunction and platelet dysregulation in Alzheimer's disease. *Frontiers in cellular neuroscience* 9:65-65.
- Castellani R, Hirai K, Aliev G, Drew KL, Nunomura A, Takeda A, Cash AD, Obrenovich ME, Perry G, Smith MA (2002) Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 70(3):357-360.
- Chandrasekaran K, Giordano T, Brady DR, Stoll J, Martin LJ, Rapoport SI (1994) Impairment in mitochondrial cytochrome oxidase gene expression in Alzheimer disease. *Brain Res Mol Brain Res* 24(1-4):336-340.
- Chang Y-T, Chang W-N, Tsai N-W, Huang C-C, Kung C-T, Su Y-J, Lin W-C, Cheng B-C, Su C-M, Chiang Y-F, Lu C-H (2014) The roles of biomarkers of oxidative stress and antioxidant in Alzheimer's disease: a systematic review. *BioMed Research International* 2014:182303-182303.
- Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, Schneider D, Witte S, Linn T, Nagashima M, Morser J, Arnold B, Preissner KT, Nawroth PP (2003) The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J Exp Med* 198(10):1507-1515.

- Chen C, Li XH, Tu Y, Sun HT, Liang HQ, Cheng SX, Zhang S (2014a) Abeta-AGE aggravates cognitive deficit in rats via RAGE pathway. *Neuroscience* 257:1-10.
- Chen C, Li XH, Tu Y, Sun HT, Liang HQ, Cheng SX, Zhang S (2014b) A β -AGE aggravates cognitive deficit in rats via RAGE pathway. *Neuroscience* 257:1-10.
- Chen G-f, Xu T-h, Yan Y, Zhou Y-r, Jiang Y, Melcher K, Xu HE (2017) Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica* 38(9):1205-1235.
- Chen J, Gao F, Liu N (2018a) L1CAM promotes epithelial to mesenchymal transition and formation of cancer initiating cells in human endometrial cancer. *Experimental and therapeutic medicine* 15(3):2792-2797.
- Chen K, Maley J, Yu PH (2006) Potential implications of endogenous aldehydes in beta-amyloid misfolding, oligomerization and fibrillogenesis. *J Neurochem* 99(5):1413-1424.
- Chen W, Chan Y, Wan W, Li Y, Zhang C (2018b) Abeta1-42 induces cell damage via RAGE-dependent endoplasmic reticulum stress in bEnd.3 cells. *Exp Cell Res* 362(1):83-89.
- Chen YJ, Huang XB, Li ZX, Yin LL, Chen WQ, Li L (2010) Tenuigenin protects cultured hippocampal neurons against methylglyoxal-induced neurotoxicity. *Eur J Pharmacol* 645(1-3):1-8.
- Cheng G, Huang C, Deng H, Wang H (2012) Diabetes as a risk factor for dementia and mild cognitive impairment: a meta-analysis of longitudinal studies. *Intern Med J* 42(5):484-491.
- Chernomordik LV & Kozlov MM (2008) Mechanics of membrane fusion. *Nature structural & molecular biology* 15(7):675.
- Chiaruttini N, Redondo-Morata L, Colom A, Humbert F, Lenz M, Scheuring S, Roux A (2015) Relaxation of Loaded ESCRT-III Spiral Springs Drives Membrane Deformation. *Cell* 163(4):866-879.
- Chiasserini D, van Weering JR, Piersma SR, Pham TV, Malekzadeh A, Teunissen CE, de Wit H, Jimenez CR (2014) Proteomic analysis of cerebrospinal fluid extracellular vesicles: a comprehensive dataset. *J Proteomics* 106:191-204.
- Chitramuthu BP, Bennett HPJ, Bateman A (2017) Progranulin: a new avenue towards the understanding and treatment of neurodegenerative disease. *Brain* 140(12):3081-3104.
- Clementi ME, Marini S, Coletta M, Orsini F, Giardina B, Misiti F (2005) A β (31-35) and A β (25-35) fragments of amyloid beta-protein induce cellular death through apoptotic signals: Role of the redox state of methionine-35. *FEBS Letters* 579(13):2913-2918.
- Coleman BM & Hill AF (2015) Extracellular vesicles--Their role in the packaging and spread of misfolded proteins associated with neurodegenerative diseases. *Semin Cell Dev Biol* 40:89-96.
- Colombo M, Moita C, van Niel G, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, Manel N, Moita LF, Thery C, Raposo G (2013) Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci* 126(Pt 24):5553-5565.
- Conn PJ & Pin JP (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:205-237.
- Cooper JM, Wiklander PO, Nordin JZ, Al-Shawi R, Wood MJ, Vithlani M, Schapira AH, Simons JP, El-Andaloussi S, Alvarez-Erviti L (2014) Systemic exosomal siRNA delivery reduced

- alpha-synuclein aggregates in brains of transgenic mice. *Movement Disorders* 29(12):1476-1485.
- Cooper RA (1984) Metabolism of methylglyoxal in microorganisms. *Annu Rev Microbiol* 38:49-68.
- Corbo RM & Scacchi R (1999) Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE*4 a 'thrifty' allele? *Ann Hum Genet* 63(Pt 4):301-310.
- Cossetti C, Iraci N, Mercer TR, Leonardi T, Alpi E, Drago D, Alfaro-Cervello C, Saini HK, Davis MP, Schaeffer J, Vega B, Stefanini M, Zhao C, Muller W, Garcia-Verdugo JM, Mathivanan S, Bachi A, Enright AJ, Mattick JS, Pluchino S (2014) Extracellular vesicles from neural stem cells transfer IFN-gamma via Ifngr1 to activate Stat1 signaling in target cells. *Mol Cell* 56(2):193-204.
- Costa RO, Ferreira E, Cardoso SM, Oliveira CR, Pereira CM (2010) ER stress-mediated apoptotic pathway induced by Aβ peptide requires the presence of functional mitochondria. *J Alzheimers Dis* 20(2):625-636.
- Cottrell DA, Borthwick GM, Johnson MA, Ince PG, Turnbull DM (2002) The role of cytochrome c oxidase deficient hippocampal neurones in Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 28(5):390-396.
- Counts SE, Ikonovic MD, Mercado N, Vega IE, Mufson EJ (2017) Biomarkers for the Early Detection and Progression of Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics* 14(1):35-53.
- Crescitelli R, Lässer C, Szabó TG, Kittel A, Eldh M, Dianzani I, Buzás EI, Lötvall J (2013) Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *Journal of Extracellular Vesicles* 2(1):20677.
- Crismon ML (1994) Tacrine: first drug approved for Alzheimer's disease. *Ann Pharmacother* 28(6):744-751.
- Cullen KM, Kocsi Z, Stone J (2005) Pericapillary haem-rich deposits: evidence for microhaemorrhages in aging human cerebral cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 25(12):1656-1667.
- D'Andrea MR, Cole GM, Ard MD (2004) The microglial phagocytic role with specific plaque types in the Alzheimer disease brain. *Neurobiol Aging* 25(5):675-683.
- Dafre AL, Goldberg J, Wang T, Spiegel DA, Maher P (2015) Methylglyoxal, the foe and friend of glyoxalase and Trx/TrxR systems in HT22 nerve cells. *Free Radic Biol Med* 89:8-19.
- Dani JA & Bertrand D (2007) Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:699-729.
- Daniel R, He Z, Carmichael KP, Halper J, Bateman A (2000) Cellular localization of gene expression for progranulin. *J Histochem Cytochem* 48(7):999-1009.
- Dasuri K, Zhang L, Keller JN (2013) Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radic Biol Med* 62:170-185.
- Davidek T, Robert F, Devaud S, Vera FA, Blank I (2006) Sugar fragmentation in the maillard reaction cascade: formation of short-chain carboxylic acids by a new oxidative alpha-dicarbonyl cleavage pathway. *J Agric Food Chem* 54(18):6677-6684.
- Davies P & Maloney AJ (1976) Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2(8000):1403.

- de Arriba SG, Stuchbury G, Yarin J, Burnell J, Loske C, Munch G (2007a) Methylglyoxal impairs glucose metabolism and leads to energy depletion in neuronal cells—protection by carbonyl scavengers. *Neurobiol Aging* 28(7):1044-1050.
- de Arriba SG, Stuchbury G, Yarin J, Burnell J, Loske C, Münch G (2007b) Methylglyoxal impairs glucose metabolism and leads to energy depletion in neuronal cells—protection by carbonyl scavengers. *Neurobiology of aging* 28(7):1044-1050.
- de la Monte SM (2014) Type 3 diabetes is sporadic Alzheimers disease: mini-review. *Eur Neuropsychopharmacol* 24(12):1954-1960.
- De Lazzari F & Bisaglia M (2017) DJ-1 as a deglycating enzyme: A unique function to explain a multifaceted protein? *Neural Regeneration Research* 12(11):1797-1798.
- de Rivero Vaccari JP, Lotocki G, Marcillo AE, Dietrich WD, Keane RW (2008) A molecular platform in neurons regulates inflammation after spinal cord injury. *J Neurosci* 28(13):3404-3414.
- Deane R, Bell RD, Sagare A, Zlokovic BV (2009) Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS & neurological disorders drug targets* 8(1):16-30.
- Deane R, Du Yan S, Subramanian RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, Welch D, Manness L, Lin C, Yu J, Zhu H, Ghiso J, Frangione B, Stern A, Schmidt AM, Armstrong DL, Arnold B, Liliensiek B, Nawroth P, Hofman F, Kindy M, Stern D, Zlokovic B (2003) RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med* 9(7):907-913.
- Debiec H, Christensen EI, Ronco PM (1998) The cell adhesion molecule L1 is developmentally regulated in the renal epithelium and is involved in kidney branching morphogenesis. *The Journal of Cell Biology* 143(7):2067-2079.
- Delgado-Andrade C (2016) Carboxymethyl-lysine: thirty years of investigation in the field of AGE formation. *Food & Function* 7(1):46-57.
- Demling N, Ehrhardt C, Kasper M, Laue M, Knels L, Rieber EP (2006) Promotion of cell adherence and spreading: a novel function of RAGE, the highly selective differentiation marker of human alveolar epithelial type I cells. *Cell Tissue Res* 323(3):475-488.
- Dhananjayan K, Gunawardena D, Hearn N, Sonntag T, Moran C, Gyengesi E, Srikanth V, Munch G (2017) Activation of Macrophages and Microglia by Interferon-gamma and Lipopolysaccharide Increases Methylglyoxal Production: A New Mechanism in the Development of Vascular Complications and Cognitive Decline in Type 2 Diabetes Mellitus? *J Alzheimers Dis* 59(2):467-479.
- Di Domenico F, Coccia R, Butterfield DA, Perluigi M (2011) Circulating biomarkers of protein oxidation for Alzheimer disease: expectations within limits. *Biochim Biophys Acta* 1814(12):1785-1795.
- Di Loreto S, Caracciolo V, Colafarina S, Sebastiani P, Gasbarri A, Amicarelli F (2004) Methylglyoxal induces oxidative stress-dependent cell injury and up-regulation of interleukin-1beta and nerve growth factor in cultured hippocampal neuronal cells. *Brain Res* 1006(2):157-167.
- Di Loreto S, Zimmiti V, Sebastiani P, Cervelli C, Falone S, Amicarelli F (2008) Methylglyoxal causes strong weakening of detoxifying capacity and apoptotic cell death in rat hippocampal neurons. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40(2):245-257.

- Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM (2016) Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev* 2016:1245049.
- Ding Q & Keller JN (2005a) Evaluation of rage isoforms, ligands, and signaling in the brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1746(1):18-27.
- Ding Q & Keller JN (2005b) Evaluation of rage isoforms, ligands, and signaling in the brain. *Biochim Biophys Acta* 1746(1):18-27.
- Ding Q & Keller JN (2005c) Splice variants of the receptor for advanced glycosylation end products (RAGE) in human brain. *Neurosci Lett* 373(1):67-72.
- Diniz BS & Teixeira AL (2011) Brain-derived neurotrophic factor and Alzheimer's disease: physiopathology and beyond. *Neuromolecular Med* 13(4):217-222.
- Dinkins MB, Enasko J, Hernandez C, Wang G, Kong J, Helwa I, Liu Y, Terry AV, Jr., Bieberich E (2016) Neutral Sphingomyelinase-2 Deficiency Ameliorates Alzheimer's Disease Pathology and Improves Cognition in the 5XFAD Mouse. *J Neurosci* 36(33):8653-8667.
- Duarte AI, Moreira PI, Oliveira CR (2012) Insulin in Central Nervous System: More than Just a Peripheral Hormone. *Journal of Aging Research* 2012:384017.
- Durazzo TC, Mattsson N, Weiner MW (2014) Smoking and increased Alzheimer's disease risk: a review of potential mechanisms. *Alzheimers Dement* 10(3 Suppl):S122-145.
- Dyer DG, Blackledge JA, Thorpe SR, Baynes JW (1991) Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of proteins by glucose. Identification of glucose and other carbohydrates as possible precursors of pentosidine in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 266(18):11654-11660.
- Emanuele E, D'Angelo A, Tomaino C, Binetti G, Ghidoni R, Politi P, Bernardi L, Maletta R, Bruni AC, Geroldi D (2005) Circulating levels of soluble receptor for advanced glycation end products in Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch Neurol* 62(11):1734-1736.
- Emendato A, Milordini G, Zacco E, Sicorello A, Dal Piaz F, Guerrini R, Thorogate R, Picone D, Pastore A (2018) Glycation affects fibril formation of Aβ peptides. *J Biol Chem* 293(34):13100-13111.
- Emi M, Asaoka H, Matsumoto A, Itakura H, Kurihara Y, Wada Y, Kanamori H, Yazaki Y, Takahashi E, Lepert M, et al. (1993) Structure, organization, and chromosomal mapping of the human macrophage scavenger receptor gene. *J Biol Chem* 268(3):2120-2125.
- Erickson KI, Prakash RS, Voss MW, Chaddock L, Heo S, McLaren M, Pence BD, Martin SA, Vieira VJ, Woods JA, McAuley E, Kramer AF (2010) Brain-derived neurotrophic factor is associated with age-related decline in hippocampal volume. *J Neurosci* 30(15):5368-5375.
- Escrevente C, Keller S, Altevogt P, Costa J (2011) Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer* 11(1):108.
- Evans DA (1996) The epidemiology of dementia and Alzheimer's disease: an evolving field. *J Am Geriatr Soc* 44(12):1482-1483.
- Fader CM, Sanchez DG, Mestre MB, Colombo MI (2009) TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochim Biophys Acta* 1793(12):1901-1916.

- Falguières T, Luyet PP, Bissig C, Scott CC, Velluz MC, Gruenberg J (2008) In vitro budding of intraluminal vesicles into late endosomes is regulated by Alix and Tsg101. *Mol Biol Cell* 19(11):4942-4955.
- Felicetti F, De Feo A, Coscia C, Puglisi R, Pedini F, Pasquini L, Bellenghi M, Errico MC, Pagani E, Care A (2016) Exosome-mediated transfer of miR-222 is sufficient to increase tumor malignancy in melanoma. *J Transl Med* 14:56.
- Ferreira AC, Pinto V, Da Mesquita S, Novais A, Sousa JC, Correia-Neves M, Sousa N, Palha JA, Marques F (2013) Lipocalin-2 is involved in emotional behaviors and cognitive function. *Frontiers in cellular neuroscience* 7:122.
- 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 pre-clinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally-derived blood exosomes: a case-control study. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 11(6):600-607.e601.
- Fica-Contreras SM, Shuster SO, Durfee ND, Bowe GJK, Henning NJ, Hill SA, Vrla GD, Stillman DR, Suralik KM, Sandwick RK, Choi S (2017) Glycation of Lys-16 and Arg-5 in amyloid-beta and the presence of Cu(2+) play a major role in the oxidative stress mechanism of Alzheimer's disease. *J Biol Inorg Chem* 22(8):1211-1222.
- Fitzner D, Schnaars M, van Rossum D, Krishnamoorthy G, Dibaj P, Bakhti M, Regen T, Hanisch UK, Simons M (2011) Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J Cell Sci* 124(Pt 3):447-458.
- 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.
- Freedman BI, Wuerth JP, Cartwright K, Bain RP, Dippe S, Hershon K, Mooradian AD, Spinowitz BS (1999) Design and baseline characteristics for the aminoguanidine Clinical Trial in Overt Type 2 Diabetic Nephropathy (ACTION II). *Control Clin Trials* 20(5):493-510.
- Fritz G (2011) RAGE: a single receptor fits multiple ligands. *Trends Biochem Sci* 36(12):625-632.
- Fruhbeis C, Frohlich D, Kramer-Albers EM (2012) Emerging roles of exosomes in neuron-glia communication. *Front Physiol* 3:119.
- Fruhbeis C, Frohlich D, Kuo WP, Amphornrat J, Thilemann S, Saab AS, Kirchhoff F, Mobius W, Goebbels S, Nave KA, Schneider A, Simons M, Klugmann M, Trotter J, Kramer-Albers EM (2013) Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS Biol* 11(7):e1001604.
- Fujioka K & Shibamoto T (2006) Determination of toxic carbonyl compounds in cigarette smoke. *Environ Toxicol* 21(1):47-54.
- Galano A, Alvarez-Ldaboy JR, Ruiz-Santoyo ME, Vivier-Bunge A (2004) Mechanism and kinetics of the reaction of OH radicals with glyoxal and methylglyoxal: a quantum chemistry + CVT/SCT approach. *Chemphyschem* 5(9):1379-1388.
- Ganguli M, Chang CC, Snitz BE, Saxton JA, Vanderbilt J, Lee CW (2010) Prevalence of mild cognitive impairment by multiple classifications: The Monongahela-Youghiogheny Healthy Aging Team (MYHAT) project. *Am J Geriatr Psychiatry* 18(8):674-683.
- Gemmell CH, Sefton MV, Yeo EL (1993) Platelet-derived microparticle formation involves glycoprotein IIb-IIIa. Inhibition by RGDS and a Glanzmann's thrombasthenia defect. *J Biol Chem* 268(20):14586-14589.

- George JN, Thoi LL, McManus LM, Reimann TA (1982) Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. *Blood* 60(4):834-840.
- Ghanem AA, Elewa A, Arafa LF (2011) Pentosidine and N-carboxymethyl-lysine: biomarkers for type 2 diabetic retinopathy. *Eur J Ophthalmol* 21(1):48-54.
- Ghidoni R, Benussi L, Glionna M, Franzoni M, Geroldi D, Emanuele E, Binetti G (2008) Decreased plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products in mild cognitive impairment. *J Neural Transm (Vienna)* 115(7):1047-1050.
- Gibson GE, Sheu KF, Blass JP (1998) Abnormalities of mitochondrial enzymes in Alzheimer disease. *J Neural Transm (Vienna)* 105(8-9):855-870.
- Girones X, Guimera A, Cruz-Sanchez CZ, Ortega A, Sasaki N, Makita Z, Lafuente JV, Kalaria R, Cruz-Sanchez FF (2004) N epsilon-carboxymethyllysine in brain aging, diabetes mellitus, and Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 36(10):1241-1247.
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (1989) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3(4):519-526.
- Goetzl EJ, Boxer A, Schwartz JB, Abner EL, Petersen RC, Miller BL, Kapogiannis D (2015) Altered lysosomal proteins in neural-derived plasma exosomes in preclinical Alzheimer disease. *Neurology* 85(1):40-47.
- 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. *FASEB J* 30(12):4141-4148.
- Goetzl EJ, Schwartz JB, Abner EL, Jicha GA, Kapogiannis D (2018) High complement levels in astrocyte-derived exosomes of Alzheimer disease. *Annals of neurology* 83(3):544-552.
- Goldberg T, Cai W, Peppas M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J, Vlassara H (2004) Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc* 104(8):1287-1291.
- Gralle M & Ferreira ST (2007) Structure and functions of the human amyloid precursor protein: the whole is more than the sum of its parts. *Prog Neurobiol* 82(1):11-32.
- Grant BD & Donaldson JG (2009) Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(9):597-608.
- Greilberger J, Koidl C, Greilberger M, Lamprecht M, Schroecksnadel K, Leblhuber F, Fuchs D, Oettl K (2008) Malondialdehyde, carbonyl proteins and albumin-disulphide as useful oxidative markers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Free Radic Res* 42(7):633-638.
- Grimm S, Ernst L, Grotzinger N, Hohn A, Breusing N, Reinheckel T, Grune T (2010) Cathepsin D is one of the major enzymes involved in intracellular degradation of AGE-modified proteins. *Free Radic Res* 44(9):1013-1026.
- Grimm S, Horlacher M, Catalgol B, Hoehn A, Reinheckel T, Grune T (2012) Cathepsins D and L reduce the toxicity of advanced glycation end products. *Free Radic Biol Med* 52(6):1011-1023.
- Gu X, Trigatti B, Xu S, Acton S, Babitt J, Krieger M (1998) The efficient cellular uptake of high density lipoprotein lipids via scavenger receptor class B type I requires not only receptor-mediated surface binding but also receptor-specific lipid transfer mediated by its extracellular domain. *J Biol Chem* 273(41):26338-26348.

- Guerrero-Muñoz MJ, Gerson J, Castillo-Carranza DL (2015) Tau Oligomers: The Toxic Player at Synapses in Alzheimer's Disease. *Frontiers in cellular neuroscience* 9:464-464.
- Guescini M, Genedani S, Stocchi V, Agnati LF (2010) Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *J Neural Transm (Vienna)* 117(1):1-4.
- Guo L, Li SY, Ji FY, Zhao YF, Zhong Y, Lv XJ, Wu XL, Qian GS (2014) Role of Angptl4 in vascular permeability and inflammation. *Inflamm Res* 63(1):13-22.
- Haddad M, Knani I, Bouzidi H, Berriche O, Hammami M, Kerkeni M (2016) Plasma Levels of Pentosidine, Carboxymethyl-Lysine, Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products, and Metabolic Syndrome: The Metformin Effect. *Disease markers* 2016:6248264-6248264.
- Haeusler RA, McGraw TE, Accili D (2018) Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 19(1):31-44.
- Hempel H, O'Bryant SE, Molinuevo JL, Zetterberg H, Masters CL, Lista S, Kiddle SJ, Batra R, Blennow K (2018) Blood-based biomarkers for Alzheimer disease: mapping the road to the clinic. *Nature reviews. Neurology* 14(11):639-652.
- Hansen F, Pandolfo P, Galland F, Torres FV, Dutra MF, Batassini C, Guerra MC, Leite MC, Gonçalves C-A (2016) Methylglyoxal can mediate behavioral and neurochemical alterations in rat brain. *Physiology & Behavior* 164:93-101.
- Hansson O, Janelidze S, Hall S, Magdalinou N, Lees AJ, Andreasson U, Norgren N, Linder J, Forsgren L, Constantinescu R, Zetterberg H, Blennow K (2017) Blood-based NFL: A biomarker for differential diagnosis of parkinsonian disorder. *Neurology* 88(10):930-937.
- Haque A, Polcyn R, Matzelle D, Banik NL (2018) New Insights into the Role of Neuron-Specific Enolase in Neuro-Inflammation, Neurodegeneration, and Neuroprotection. *Brain Sci* 8(2).
- Hardy J & Allsop D (1991) Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12(10):383-388.
- Hayashi H, Kimura N, Yamaguchi H, Hasegawa K, Yokoseki T, Shibata M, Yamamoto N, Michikawa M, Yoshikawa Y, Terao K, Matsuzaki K, Lemere CA, Selkoe DJ, Naiki H, Yanagisawa K (2004) A seed for Alzheimer amyloid in the brain. *J Neurosci* 24(20):4894-4902.
- He C, Sabol J, Mitsuhashi T, Vlassara H (1999) Dietary glycotoxins: inhibition of reactive products by aminoguanidine facilitates renal clearance and reduces tissue sequestration. *Diabetes* 48(6):1308-1315.
- Hebert SS, Horre K, Nicolai L, Papadopoulou AS, Mandemakers W, Silaharoglu AN, Kauppinen S, Delacourte A, De Strooper B (2008) Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(17):6415-6420.
- Hellwig M, Auerbach C, Müller N, Samuel P, Kammann S, Beer F, Gunzer F, Henle T (2019) Metabolization of the Advanced Glycation End Product N-epsilon-Carboxymethyllysine (CML) by Different Probiotic E. coli Strains. *J Agric Food Chem* 67(7):1963-1972.
- Heneka MT, Golenbock DT, Latz E (2015) Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Immunol* 16(3):229-236.
- Henriksen K, O'Bryant SE, Hempel 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.
- Hetz C (2012) The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(2):89-102.
- Hickman SE, Allison EK, El Khoury J (2008) Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci* 28(33):8354-8360.
- Hilal S, Akoudad S, van Duijn CM, Niessen WJ, Verbeek MM, Vanderstichele H, Stoops E, Ikram MA, Vernooij MW (2017) Plasma Amyloid-beta Levels, Cerebral Small Vessel Disease, and Cognition: The Rotterdam Study. *J Alzheimers Dis* 60(3):977-987.
- Himmler A, Drechsel D, Kirschner MW, Martin DW, Jr. (1989) Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol Cell Biol* 9(4):1381-1388.
- Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, Johnson AB, Kress Y, Vinters HV, Tabaton M, Shimohama S, Cash AD, Siedlak SL, Harris PL, Jones PK, Petersen RB, Perry G, Smith MA (2001) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21(9):3017-3023.
- Hodge JE (1953) Dehydrated Foods, Chemistry of Browning Reactions in Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1(15):928-943.
- Hodgkinson CP, Mander A, Sale GJ (2005) Identification of 80K-H as a protein involved in GLUT4 vesicle trafficking. *Biochem J* 388(Pt 3):785-793.
- Holm MM, Kaiser J, Schwab ME (2018) Extracellular Vesicles: Multimodal Envoys in Neural Maintenance and Repair. *Trends Neurosci* 41(6):360-372.
- Homoki-Farkas P, Örsi F, Kroh LW (1997) Methylglyoxal determination from different carbohydrates during heat processing. *Food Chemistry* 59(1):157-163.
- Hoozemans JJ, Veerhuis R, Van Haastert ES, Rozemuller JM, Baas F, Eikelenboom P, Scheper W (2005) The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 110(2):165-172.
- Horie K, Miyata T, Yasuda T, Takeda A, Yasuda Y, Maeda K, Sobue G, Kurokawa K (1997) Immunohistochemical localization of advanced glycation end products, pentosidine, and carboxymethyllysine in lipofuscin pigments of Alzheimer's disease and aged neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 236(2):327-332.
- Hsieh CL, Koike M, Spusta SC, Niemi EC, Yenari M, Nakamura MC, Seaman WE (2009) A role for TREM2 ligands in the phagocytosis of apoptotic neuronal cells by microglia. *J Neurochem* 109(4):1144-1156.
- Hsu C, Morohashi Y, Yoshimura S, Manrique-Hoyos N, Jung S, Lauterbach MA, Bakhti M, Gronborg M, Mobius W, Rhee J, Barr FA, Simons M (2010) Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J Cell Biol* 189(2):223-232.
- Huang X, Wang F, Chen W, Chen Y, Wang N, von Maltzan K (2012) Possible link between the cognitive dysfunction associated with diabetes mellitus and the neurotoxicity of methylglyoxal. *Brain Research* 1469:82-91.
- Huang X, Yuan T, Tschannen M, Sun Z, Jacob H, Du M, Liang M, Dittmar RL, Liu Y, Liang M (2013) Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC genomics* 14(1):319.

- Hurley JH (2010) The ESCRT complexes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45(6):463-487.
- Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R, Rauvala H (2000) Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem* 275(51):40096-40105.
- Iqbal K, Liu F, Gong CX, Alonso Adel C, Grundke-Iqbal I (2009) Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathol* 118(1):53-69.
- Iqbal K, Liu F, Gong CX, Grundke-Iqbal I (2010) Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr Alzheimer Res* 7(8):656-664.
- Iranifard E, Seresht BM, Momeni F, Fadaei E, Mehr MH, Ebrahimi Z, Rahmati M, Kharazinejad E, Mirzaei H (2019) Exosomes and microRNAs: New potential therapeutic candidates in Alzheimer disease therapy. *J Cell Physiol* 234(3):2296-2305.
- Jahn R, Lang T, Südhof TC (2003) Membrane fusion. *Cell* 112(4):519-533.
- Jaisson S & Gillery P (2018) Les produits de glycation avancée des protéines. *Revue Francophone des Laboratoires* 2018(502):48-55.
- James OG, Doraiswamy PM, Borges-Neto S (2015) PET Imaging of Tau Pathology in Alzheimer's Disease and Tauopathies. *Frontiers in neurology* 6:38-38.
- Jana A & Pahan K (2010) Fibrillar amyloid-beta-activated human astroglia kill primary human neurons via neutral sphingomyelinase: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 30(38):12676-12689.
- Janelidze S, Stomrud E, Palmqvist S, Zetterberg H, van Westen D, Jeromin A, Song L, Hanlon D, Tan Hehir CA, Baker D, Blennow K, Hansson O (2016) Plasma beta-amyloid in Alzheimer's disease and vascular disease. *Sci Rep* 6:26801.
- Jia S, Zocco D, Samuels ML, Chou MF, Chammas R, Skog J, Zarovni N, Momen-Heravi F, Kuo WP (2014) Emerging technologies in extracellular vesicle-based molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 14(3):307-321.
- John WG & Lamb EJ (1993) The Maillard or browning reaction in diabetes. *Eye (Lond)* 7 (Pt 2):230-237.
- Jono T, Kimura T, Takamatsu J, Nagai R, Miyazaki K, Yuzuriha T, Kitamura T, Horiuchi S (2002) Accumulation of imidazolone, pentosidine and N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in hippocampal CA4 pyramidal neurons of aged human brain. *Pathol Int* 52(9):563-571.
- Jonsson T, Stefansson H, Steinberg S, Jonsdottir I, Jonsson PV, Snaedal J, Bjornsson S, Huttenlocher J, Levey AI, Lah JJ, Rujescu D, Hampel H, Giegling I, Andreassen OA, Engedal K, Ulstein I, Djurovic S, Ibrahim-Verbaas C, Hofman A, Ikram MA, van Duijn CM, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K (2013) Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 368(2):107-116.
- Kalani A, Tyagi A, Tyagi N (2014) Exosomes: mediators of neurodegeneration, neuroprotection and therapeutics. *Mol Neurobiol* 49(1):590-600.
- Kalapos MP (1999) Methylglyoxal in living organisms: Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicology Letters* 110(3):145-175.
- Kalapos MP (2013) Where does plasma methylglyoxal originate from? *Diabetes Res Clin Pract* 99(3):260-271.

- Kalaria RN, Andorn AC, Tabaton M, Whitehouse PJ, Harik SI, Unnerstall JR (1989) Adrenergic receptors in aging and Alzheimer's disease: increased beta 2-receptors in prefrontal cortex and hippocampus. *J Neurochem* 53(6):1772-1781.
- Kalra H, Drummen GP, Mathivanan S (2016) Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *Int J Mol Sci* 17(2):170.
- Kaminari A, Tsilibary EC, Tzinia A (2018) A New Perspective in Utilizing MMP-9 as a Therapeutic Target for Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Alzheimer's Disease* (Preprint):1-16.
- Kanai M, Goke M, Tsunekawa S, Podolsky DK (1997) Signal transduction pathway of human fibroblast growth factor receptor 3. Identification of a novel 66-kDa phosphoprotein. *J Biol Chem* 272(10):6621-6628.
- Kang SS, Ren Y, Liu CC, Kurti A, Baker KE, Bu G, Asmann Y, Fryer JD (2017) Lipocalin-2 protects the brain during inflammatory conditions. *Molecular Psychiatry* 23:344.
- Kapogiannis D, Boxer A, Schwartz JB, Abner EL, Biragyn A, Masharani U, Frassetto L, Petersen RC, Miller BL, Goetzl EJ (2015) Dysfunctionally phosphorylated type 1 insulin receptor substrate in neural-derived blood exosomes of preclinical Alzheimer's disease. *FASEB J* 29(2):589-596.
- Karch CM & Goate AM (2015) Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biol Psychiatry* 77(1):43-51.
- Kasper M & Funk RH (2001) Age-related changes in cells and tissues due to advanced glycation end products (AGEs). *Arch Gerontol Geriatr* 32(3):233-243.
- Katsinelos T, Zeidler M, Dimou E, Karakatsani A, Muller HM, Nachman E, Steringer JP, Ruiz de Almodovar C, Nickel W, Jahn TR (2018) Unconventional Secretion Mediates the Trans-cellular Spreading of Tau. *Cell Rep* 23(7):2039-2055.
- Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, Al Saffar H, Anand S, Zhao K, Samuel M, Pathan M, Jois M, Chilamkurti N, Gangoda L, Mathivanan S (2016) ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J Mol Biol* 428(4):688-692.
- Kerkeni M, Saidi A, Bouzidi H, Letaief A, Ben Yahia S, Hammami M (2013) Pentosidine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients. *Diab Vasc Dis Res* 10(3):239-245.
- Kersten PJ & Kirk TK (1987) Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *J Bacteriol* 169(5):2195-2201.
- Khan M, Liu H, Wang J, Sun B (2020) Inhibitory effect of phenolic compounds and plant extracts on the formation of advanced glycation end products: A comprehensive review. *Food Research International* 130:108933.
- Khazaei M, Karimi J, Sheikh N, Goodarzi MT, Saidijam M, Khodadadi I, Moridi H (2016) Effects of Resveratrol on Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Expression and Oxidative Stress in the Liver of Rats with Type 2 Diabetes. *Phytother Res* 30(1):66-71.
- Kierdorf K & Fritz G (2013) RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. *J Leukoc Biol* 94(1):55-68.
- Kiko T, Nakagawa K, Satoh A, Tsuduki T, Furukawa K, Arai H, Miyazawa T (2012) Amyloid β levels in human red blood cells. *PLoS One* 7(11):e49620-e49620.

- Kim D-K, Kang B, Kim OY, Choi D-s, Lee J, Kim SR, Go G, Yoon YJ, Kim JH, Jang SC (2013) EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles* 2(1):20384.
- Kim J, Basak JM, Holtzman DM (2009) The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* 63(3):287-303.
- Kimura N (2016) Diabetes Mellitus Induces Alzheimer's Disease Pathology: Histopathological Evidence from Animal Models. *Int J Mol Sci* 17(4):503.
- Kimura T, Takamatsu J, Miyata T, Miyakawa T, Horiuchi S (1998) Localization of identified advanced glycation end-product structures, N epsilon(carboxymethyl)lysine and pentosidine, in age-related inclusions in human brains. *Pathol Int* 48(8):575-579.
- Kinney JW, Bemiller SM, Murtishaw AS, Leisgang AM, Salazar AM, Lamb BT (2018) Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* 4:575-590.
- Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, Du Yan S, Hofmann M, Yan SF, Pischetsrieder M, Stern D, Schmidt AM (1999) N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J Biol Chem* 274(44):31740-31749.
- Kobayashi H, Ohnishi T, Nakagawa R, Yoshizawa K (2016) The comparative efficacy and safety of cholinesterase inhibitors in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: a Bayesian network meta-analysis. *Int J Geriatr Psychiatry* 31(8):892-904.
- Kodama T, Freeman M, Rohrer L, Zabrecky J, Matsudaira P, Krieger M (1990) Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature* 343(6258):531-535.
- Kojima R, Bojar D, Rizzi G, Charpin-El Hamri G, 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):1-10.
- Konoshenko MY, Lekhnov EA, Vlassov AV, Laktionov PP (2018) Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *Biomed Res Int* 2018:8545347.
- Koo EH, Park L, Selkoe DJ (1993) Amyloid beta-protein as a substrate interacts with extracellular matrix to promote neurite outgrowth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(10):4748-4752.
- Kook SY, Hong HS, Moon M, Ha CM, Chang S, Mook-Jung I (2012) A beta(1)-(4)(2)-RAGE interaction disrupts tight junctions of the blood-brain barrier via Ca(2)(+)-calcineurin signaling. *J Neurosci* 32(26):8845-8854.
- Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buenting C, Heitmann K, Vlassara H (1997) Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(12):6474-6479.
- Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Prindal-Bengtson B, Dingli F, Loew D, Tkach M, Thery 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.
- Kowalski K & Mulak A (2019) Brain-Gut-Microbiota Axis in Alzheimer's Disease. *Journal of neurogastroenterology and motility* 25(1):48-60.

- Kowiański P, Lietzau G, Czuba E, Waśkow M, Steliga A, Moryś J (2018) BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cellular and Molecular Neurobiology* 38(3):579-593.
- Koychev I, Gunn RN, Firouzian A, Lawson J, Zamboni G, Ridha B, Sahakian BJ, Rowe JB, Thomas A, Rochester L, Ffytche D, Howard R, Zetterberg H, MacKay C, Lovestone S, Deep, Frequent Phenotyping study t (2017) PET Tau and Amyloid- β Burden in Mild Alzheimer's Disease: Divergent Relationship with Age, Cognition, and Cerebrospinal Fluid Biomarkers. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 60(1):283-293.
- Kramer-Albers EM, Bretz N, Tenzer S, Winterstein C, Mobius W, Berger H, Nave KA, Schild H, Trotter J (2007) Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? *Proteomics Clin Appl* 1(11):1446-1461.
- Kuhla B, Boeck K, Luth HJ, Schmidt A, Weigle B, Schmitz M, Ogunlade V, Munch G, Arendt T (2006) Age-dependent changes of glyoxalase I expression in human brain. *Neurobiol Aging* 27(6):815-822.
- Kuhla B, Boeck K, Schmidt A, Ogunlade V, Arendt T, Munch G, Luth HJ (2007a) Age- and stage-dependent glyoxalase I expression and its activity in normal and Alzheimer's disease brains. *Neurobiol Aging* 28(1):29-41.
- Kuhla B, Haase C, Flach K, Lüth H-J, Arendt T, Münch G (2007b) Effect of Pseudophosphorylation and Cross-linking by Lipid Peroxidation and Advanced Glycation End Product Precursors on Tau Aggregation and Filament Formation. *Journal of Biological Chemistry* 282(10):6984-6991.
- Kuhla B, Luth HJ, Haferburg D, Boeck K, Arendt T, Munch G (2005) Methylglyoxal, glyoxal, and their detoxification in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1043:211-216.
- Kumar DK, Choi SH, Washicosky KJ, Eimer WA, Tucker S, Ghofrani J, Lefkowitz A, McColl G, Goldstein LE, Tanzi RE, Moir RD (2016) Amyloid-beta peptide protects against microbial infection in mouse and worm models of Alzheimer's disease. *Sci Transl Med* 8(340):340ra372.
- Kumar K, Kumar A, Keegan RM, Deshmukh R (2018) Recent advances in the neurobiology and neuropharmacology of Alzheimer's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 98:297-307.
- Kuniyasu A, Ohgami N, Hayashi S, Miyazaki A, Horiuchi S, Nakayama H (2003) CD36-mediated endocytic uptake of advanced glycation end products (AGE) in mouse 3T3-L1 and human subcutaneous adipocytes. *FEBS Lett* 537(1-3):85-90.
- Kunkel HG & Wallenius G (1955) New hemoglobin in normal adult blood. *Science* 122(3163):288.
- Kuntz S, Rudloff S, Ehl J, Bretzel RG, Kunz C (2009) Food derived carbonyl compounds affect basal and stimulated secretion of interleukin-6 and -8 in Caco-2 cells. *Eur J Nutr* 48(8):499-503.
- Lachenal G, Pernet-Gallay K, Chivet M, Hemming FJ, Belly A, Bodon G, Blot B, Haase G, Goldberg Y, Sadoul R (2011) Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Mol Cell Neurosci* 46(2):409-418.
- Lassegue B & Clempus RE (2003) Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285(2):R277-297.

- Lasser C, Jang SC, Lotvall J (2018) Subpopulations of extracellular vesicles and their therapeutic potential. *Mol Aspects Med* 60:1-14.
- Le K, Chibaatar Daliv E, Wu S, Qian F, Ali AI, Yu D, Guo Y (2019) SIRT1-regulated HMGB1 release is partially involved in TLR4 signal transduction: A possible anti-neuroinflammatory mechanism of resveratrol in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Int Immunopharmacol* 75:105779.
- Lee JY, Song J, Kwon K, Jang S, Kim C, Baek K, Kim J, Park C (2012) Human DJ-1 and its homologs are novel glyoxalases. *Hum Mol Genet* 21(14):3215-3225.
- Lee S, Mankhong S, Kang J-H (2019) Extracellular Vesicle as a Source of Alzheimer's Biomarkers: Opportunities and Challenges. *International journal of molecular sciences* 20(7):1728.
- Lewczuk P, Kornhuber J, Vanmechelen E, Peters O, Heuser I, Maier W, Jessen F, Burger K, Hampel H, Frolich L, Henn F, Falkai P, Ruther E, Jahn H, Luckhaus C, Perneczky R, Schmidtke K, Schroder J, Kessler H, Pantel J, Gertz HJ, Vanderstichele H, de Meyer G, Shapiro F, Wolf S, Bibl M, Wiltfang J (2010) Amyloid beta peptides in plasma in early diagnosis of Alzheimer's disease: A multicenter study with multiplexing. *Exp Neurol* 223(2):366-370.
- Li JJ, Surini M, Catsicas S, Kawashima E, Bouras C (1995) Age-dependent accumulation of advanced glycosylation end products in human neurons. *Neurobiology of Aging* 16(1):69-76.
- Li JJ, Wang B, Kodali MC, Chen C, Kim E, Patters BJ, Lan L, Kumar S, Wang X, Yue J, Liao F-F (2018a) In vivo evidence for the contribution of peripheral circulating inflammatory exosomes to neuroinflammation. *Journal of neuroinflammation* 15(1):8.
- Li K, Wei Q, Liu F-F, Hu F, Xie A-j, Zhu L-Q, Liu D (2018b) Synaptic Dysfunction in Alzheimer's Disease: A β , Tau, and Epigenetic Alterations. *Molecular Neurobiology* 55(4):3021-3032.
- Li W, Maloney RE, Circu ML, Alexander JS, Aw TY (2013a) Acute carbonyl stress induces occludin glycation and brain microvascular endothelial barrier dysfunction: role for glutathione-dependent metabolism of methylglyoxal. *Free Radic Biol Med* 54:51-61.
- Li X, Song D, Leng SX (2015) Link between type 2 diabetes and Alzheimer's disease: from epidemiology to mechanism and treatment. *Clin Interv Aging* 10:549-560.
- Li XH, Du LL, Cheng XS, Jiang X, Zhang Y, Lv BL, Liu R, Wang JZ, Zhou XW (2013b) Glycation exacerbates the neuronal toxicity of beta-amyloid. *Cell Death Dis* 4:e673.
- Li XH, Lv BL, Xie JZ, Liu J, Zhou XW, Wang JZ (2012a) AGEs induce Alzheimer-like tau pathology and memory deficit via RAGE-mediated GSK-3 activation. *Neurobiol Aging* 33(7):1400-1410.
- Li XH, Xie JZ, Jiang X, Lv BL, Cheng XS, Du LL, Zhang JY, Wang JZ, Zhou XW (2012b) Methylglyoxal induces tau hyperphosphorylation via promoting AGEs formation. *Neuromolecular Med* 14(4):338-348.
- Li Y, Liu L, Barger SW, Griffin WS (2003) Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway. *J Neurosci* 23(5):1605-1611.
- Li YM, Mitsuhashi T, Wojciechowicz D, Shimizu N, Li J, Stitt A, He C, Banerjee D, Vlassara H (1996) Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(20):11047-11052.

- Liliensiek B, Weigand MA, Bierhaus A, Nicklas W, Kasper M, Hofer S, Plachky J, Grone HJ, Kurschus FC, Schmidt AM, Yan SD, Martin E, Schleicher E, Stern DM, Hammerling GG, Nawroth PP, Arnold B (2004) Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *J Clin Invest* 113(11):1641-1650.
- Lindwall G & Cole RD (1984) Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem* 259(8):5301-5305.
- Lista S, Faltraco F, Prvulovic D, Hampel H (2013) Blood and plasma-based proteomic biomarker research in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 101-102:1-17.
- Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX (2005) Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci* 22(8):1942-1950.
- Liu L & Chan C (2014) The role of inflammasome in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 15:6-15.
- Liu L, Martin R, Chan C (2013) Palmitate-activated astrocytes via serine palmitoyltransferase increase BACE1 in primary neurons by sphingomyelinases. *Neurobiol Aging* 34(2):540-550.
- Llorente A, Skotland T, Sylvanne T, Kauhanen D, Rog 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.
- Lopez OL, Kuller LH, Mehta PD, Becker JT, Gach HM, Sweet RA, Chang YF, Tracy R, DeKosky ST (2008) Plasma amyloid levels and the risk of AD in normal subjects in the Cardiovascular Health Study. *Neurology* 70(19):1664-1671.
- Lorenzi M (2007) The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient. *Experimental diabetes research* 2007:61038-61038.
- Loske C, Gerdemann A, Schepl W, Wycislo M, Schinzel R, Palm D, Riederer P, Munch G (2000) Transition metal-mediated glycooxidation accelerates cross-linking of beta-amyloid peptide. *Eur J Biochem* 267(13):4171-4178.
- Lovell MA & Markesbery WR (2007) Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res* 35(22):7497-7504.
- Lovell MA, Soman S, Bradley MA (2011) Oxidatively modified nucleic acids in preclinical Alzheimer's disease (PCAD) brain. *Mech Ageing Dev* 132(8-9):443-448.
- Lubitz I, Rigny J, Atrakchi-Baranes D, Shemesh C, Kravitz E, Liraz-Zaltsman S, Maksin-Matveev A, Cooper I, Leibowitz A, Uribarri J, Schmeidler J, Cai W, Kristofikova Z, Ripova D, LeRoith D, Schnaider-Beerli M (2016) High dietary advanced glycation end products are associated with poorer spatial learning and accelerated Abeta deposition in an Alzheimer mouse model. *Ageing Cell* 15(2):309-316.
- Lüth H-J, Ogunlade V, Kuhla B, Kientsch-Engel R, Stahl P, Webster J, Arendt T, Münch G (2005) Age- and Stage-dependent Accumulation of Advanced Glycation End Products in Intracellular Deposits in Normal and Alzheimer's Disease Brains. *Cerebral Cortex* 15(2):211-220.
- Lyles GA (1996) Mammalian plasma and tissue-bound semicarbazide-sensitive amine oxidases: biochemical, pharmacological and toxicological aspects. *Int J Biochem Cell Biol* 28(3):259-274.

- Macias MP, Gonzales AM, Siniard AL, Walker AW, Corneveaux JJ, Huentelman MJ, Sabbagh MN, Decourt B (2014) A cellular model of amyloid precursor protein processing and amyloid- β peptide production. *Journal of neuroscience methods* 223:114-122.
- Maddalena A, Papassotiropoulos A, Muller-Tillmanns B, Jung HH, Hegi T, Nitsch RM, Hock C (2003) Biochemical diagnosis of Alzheimer disease by measuring the cerebrospinal fluid ratio of phosphorylated tau protein to beta-amyloid peptide42. *Arch Neurol* 60(9):1202-1206.
- 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.
- Manini P, La Pietra P, Panzella L, Napolitano A, d'Ischia M (2006) Glyoxal formation by Fenton-induced degradation of carbohydrates and related compounds. *Carbohydr Res* 341(11):1828-1833.
- Manly JJ, Tang MX, Schupf N, Stern Y, Vonsattel JP, Mayeux R (2008) Frequency and course of mild cognitive impairment in a multiethnic community. *Ann Neurol* 63(4):494-506.
- Martini-Stoica H, Cole AL, Swartzlander DB, Chen F, Wan YW, Bajaj L, Bader DA, Lee VMY, Trojanowski JQ, Liu Z, Sardiello M, Zheng H (2018) TFEB enhances astroglial uptake of extracellular tau species and reduces tau spreading. *J Exp Med* 215(9):2355-2377.
- Martorana A & Koch G (2014) "Is dopamine involved in Alzheimer's disease?". *Frontiers in aging neuroscience* 6:252-252.
- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C (2005) Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 16(10):577-586.
- Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ (2010) Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 73(10):1907-1920.
- Matsumoto J, Stewart T, Sheng L, Li N, Bullock K, Song N, Shi M, Banks WA, Zhang J (2017) Transmission of α -synuclein-containing erythrocyte-derived extracellular vesicles across the blood-brain barrier via adsorptive mediated transcytosis: another mechanism for initiation and progression of Parkinson's disease? *Acta Neuropathologica Communications* 5(1):71.
- Mattson MP (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430(7000):631-639.
- 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, 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 (2016) Plasma tau in Alzheimer disease. *Neurology* 87(17):1827-1835.
- McKee AC, Kosik KS, Kennedy MB, Kowall NW (1990) Hippocampal neurons predisposed to neurofibrillary tangle formation are enriched in type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *J Neuropathol Exp Neurol* 49(1):49-63.
- McKee PM, Schneider R, Taghdiri F, Weichert A, Multani N, Brown RA, Boxer AL, Karydas A, Miller B, Robertson J, Tartaglia MC (2018) MicroRNA Expression Levels Are Altered in the

- Cerebrospinal Fluid of Patients with Young-Onset Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* 55(12):8826-8841.
- Mecca C, Giambanco I, Donato R, Arcuri C (2018) Microglia and Aging: The Role of the TREM2-DAP12 and CX3CL1-CX3CR1 Axes. *Int J Mol Sci* 19(1).
- Mecocci P, MacGarvey U, Beal MF (1994) Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 36(5):747-751.
- Mehta PD, Pirttila T, Mehta SP, Sersen EA, Aisen PS, Wisniewski HM (2000) Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid beta proteins 1-40 and 1-42 in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 57(1):100-105.
- Meli M, Perier C, Ferron C, Parsseigny F, Denis C, Gonthier R, Laurent B, Reynaud E, Frey J, Chamson A (2002) Serum pentosidine as an indicator of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 4(2):93-96.
- Melling GE, Carollo E, Conlon R, Simpson JC, Carter DRF (2019) The Challenges and Possibilities of Extracellular Vesicles as Therapeutic Vehicles. *Eur J Pharm Biopharm* 144:50-56.
- Meltzer CC, Smith G, DeKosky ST, Pollock BG, Mathis CA, Moore RY, Kupfer DJ, Reynolds CF, 3rd (1998) Serotonin in aging, late-life depression, and Alzheimer's disease: the emerging role of functional imaging. *Neuropsychopharmacology* 18(6):407-430.
- Mendsaikhon A, Tooyama I, Walker DG (2019) Microglial Progranulin: Involvement in Alzheimer's Disease and Neurodegenerative Diseases. *Cells* 8(3).
- MERAZ RIOS MA, TORAL-RIOS D, FRANCO-BOCANEGRA D, VILLEDIA-HERNÁNDEZ J, CAMPOS-PEÑA V (2013) Inflammatory process in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Integrative Neuroscience* 7(59).
- Minami SS, Min SW, Krabbe G, Wang C, Zhou Y, Asgarov R, Li Y, Martens LH, Elia LP, Ward ME, Mucke L, Farese RV, Jr., Gan L (2014) Progranulin protects against amyloid beta deposition and toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Nat Med* 20(10):1157-1164.
- Miners JS, Schulz I, Love S (2018) Differing associations between A β accumulation, hypoperfusion, blood-brain barrier dysfunction and loss of PDGFRB pericyte marker in the precuneus and parietal white matter in Alzheimer's disease. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 38(1):103-115.
- Miranda M, Morici JF, Zanoni MB, Bekinschtein P (2019) Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Key Molecule for Memory in the Healthy and the Pathological Brain. *Frontiers in cellular neuroscience* 13(363).
- Miyazaki A, Nakayama H, Horiuchi S (2002) Scavenger receptors that recognize advanced glycation end products. *Trends Cardiovasc Med* 12(6):258-262.
- Molin P & Rockwood K (2016) The New Criteria for Alzheimer's Disease - Implications for Geriatricians. *Canadian geriatrics journal : CGJ* 19(2):66-73.
- Momen-Heravi F, Getting SJ, Moschos SA (2018) Extracellular vesicles and their nucleic acids for biomarker discovery. *Pharmacol Ther* 192:170-187.
- Monacelli F, Borghi R, Cammarata S, Nencioni A, Piccini A, Tabaton M, Odetti P (2015) Amnesic mild cognitive impairment and conversion to Alzheimer's disease: insulin resistance and glycooxidation as early biomarker clusters. *J Alzheimers Dis* 45(1):89-95.

- Monacelli F, Borghi R, Pacini D, Serrati C, Traverso N, Odetti P (2014) Pentosidine determination in CSF: a potential biomarker of Alzheimer's disease? *Clin Chem Lab Med* 52(1):117-120.
- Monnier VM & Cerami A (1981) Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins. *Science* 211(4481):491-493.
- Montagne A, Barnes SR, Sweeney MD, Halliday MR, Sagare AP, Zhao Z, Toga AW, Jacobs RE, Liu CY, Amezcua L, Harrington MG, Chui HC, Law M, Zlokovic BV (2015) Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron* 85(2):296-302.
- Montagne A, Nation DA, Pa J, Sweeney MD, Toga AW, Zlokovic BV (2016) Brain imaging of neurovascular dysfunction in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 131(5):687-707.
- Morales-Prieto DM, Stojiljkovic M, Diezel C, Streicher P-E, Röstel F, Lindner J, Weis S, Schmeer C, Marz M (2018) Peripheral blood exosomes pass blood-brain-barrier and induce glial cell activation. *bioRxiv* 10.1101/471409:471409.
- Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, Sullivan ML, Stolz DB, Papworth GD, Zahorchak AF, Logar AJ, Wang Z, Watkins SC, Falo LD, Jr., Thomson AW (2004) Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* 104(10):3257-3266.
- Morgan C, Colombres M, Nunez MT, Inestrosa NC (2004) Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 74(6):323-349.
- Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Yoshida H, Titani K, Ihara Y (1995) Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J Biol Chem* 270(2):823-829.
- Morley JE & Farr SA (2014) The role of amyloid-beta in the regulation of memory. *Biochem Pharmacol* 88(4):479-485.
- Mu JS, Li WP, Yao ZB, Zhou XF (1999) Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats. *Brain Res* 835(2):259-265.
- Mufson EJ, Counts SE, Perez SE, Ginsberg SD (2008) Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Expert review of neurotherapeutics* 8(11):1703-1718.
- Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF (2014) Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracellular Vesicles* 3(1):24641.
- Muralidharan-Chari V, Clancy J, Plou C, Romao M, Chavrier P, Raposo G, D'Souza-Schorey C (2009) ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol* 19(22):1875-1885.
- Mustapic M, Eitan E, Werner Jr JK, 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. *Frontiers in neuroscience* 11:278.
- Nabhan JF, Hu R, Oh RS, Cohen SN, Lu Q (2012) Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(11):4146-4151.
- Nagy Z, Esiri MM, LeGris M, Matthews PM (1999) Mitochondrial enzyme expression in the hippocampus in relation to Alzheimer-type pathology. *Acta Neuropathol* 97(4):346-354.

- Nakata A, Nakagawa Y, Nishida M, Nozaki S, Miyagawa J, Nakagawa T, Tamura R, Matsumoto K, Kameda-Takemura K, Yamashita S, Matsuzawa Y (1999) CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly expressed on lipid-laden macrophages in human atherosclerotic aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(5):1333-1339.
- 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.
- Nava-Mesa MO, Jimenez-Diaz L, Yajeya J, Navarro-Lopez JD (2014) GABAergic neurotransmission and new strategies of neuromodulation to compensate synaptic dysfunction in early stages of Alzheimer's disease. *Frontiers in cellular neuroscience* 8:167.
- Neeper SA, Gomez-Pinilla F, Choi J, Cotman CW (1996) Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res* 726(1-2):49-56.
- Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, Castellani RJ, Crain BJ, Davies P, Del Tredici K, Duyckaerts C, Frosch MP, Haroutunian V, Hof PR, Hulette CM, Hyman BT, Iwatsubo T, Jellinger KA, Jicha GA, Kovari E, Kukull WA, Leverenz JB, Love S, Mackenzie IR, Mann DM, Masliah E, McKee AC, Montine TJ, Morris JC, Schneider JA, Sonnen JA, Thal DR, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Wisniewski T, Woltjer RL, Beach TG (2012) Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol* 71(5):362-381.
- Nelson PT, Jicha GA, Schmitt FA, Liu H, Davis DG, Mendiondo MS, Abner EL, Markesbery WR (2007) Clinicopathologic Correlations in a Large Alzheimer Disease Center Autopsy Cohort: Neuritic Plaques and Neurofibrillary Tangles "Do Count" When Staging Disease Severity. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 66(12):1136-1146.
- Neth BJ & Craft S (2017) Insulin Resistance and Alzheimer's Disease: Bioenergetic Linkages. *Frontiers in aging neuroscience* 9:345-345.
- Ng TKS, Ho CSH, Tam WWS, Kua EH, Ho RC (2019) Decreased Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Levels in Patients with Alzheimer's Disease (AD): A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci* 20(2).
- Nicholl ID & Bucala R (1998) Advanced glycation endproducts and cigarette smoking. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 44(7):1025-1033.
- Nicholl ID, Stitt AW, Moore JE, Ritchie AJ, Archer DB, Bucala R (1998) Increased levels of advanced glycation endproducts in the lenses and blood vessels of cigarette smokers. *Mol Med* 4(9):594-601.
- Noble W, Hanger DP, Miller CC, Lovestone S (2013) The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases. *Front Neurol* 4:83.
- Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA (2001) Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60(8):759-767.
- O'Brien RJ & Wong PC (2011) Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annual review of neuroscience* 34:185-204.
- O'Bryant SE, Mielke MM, Rissman RA, Lista S, Vanderstichele H, Zetterberg H, Lewczuk P, Posner H, Hall J, Johnson L, Fong YL, Luthman J, Jeromin A, Batrla-Utermann R, Villarreal A, Britton G, Snyder PJ, Henriksen K, Grammas P, Gupta V, Martins R, Hampel

- H (2017) Blood-based biomarkers in Alzheimer disease: Current state of the science and a novel collaborative paradigm for advancing from discovery to clinic. *Alzheimers Dement* 13(1):45-58.
- Obata T (2006) Diabetes and semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) activity: a review. *Life Sci* 79(5):417-422.
- Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, Arai H, Miyazaki A, Hakamata H, Horiuchi S, Nakayama H (2002) CD36, serves as a receptor for advanced glycation endproducts (AGE). *J Diabetes Complications* 16(1):56-59.
- Ohgami N, Nagai R, Miyazaki A, Ikemoto M, Arai H, Horiuchi S, Nakayama H (2001) Scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation end products. *J Biol Chem* 276(16):13348-13355.
- Okouchi M, Okayama N, Aw TY (2009) Preservation of cellular glutathione status and mitochondrial membrane potential by N-acetylcysteine and insulin sensitizers prevent carbonyl stress-induced human brain endothelial cell apoptosis. *Curr Neurovasc Res* 6(4):267-278.
- Olsson B, Lautner R, Andreasson U, Öhrfelt A, Portelius E, Bjerke M, Hölltå M, Rosén C, Olsson C, Strobel G (2016) CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Neurology* 15(7):673-684.
- Olsson F, Schmidt S, Althoff V, Munter LM, Jin S, Rosqvist S, Lendahl U, Multhaup G, Lundkvist J (2014) Characterization of intermediate steps in amyloid beta (A β) production under near-native conditions. *J Biol Chem* 289(3):1540-1550.
- Ortner M, Drost R, Hedderich D, Goldhardt O, Müller-Sarnowski F, Diehl-Schmid J, Forstl H, Yakushev I, Grimmer T (2019) Amyloid PET, FDG-PET or MRI? - the power of different imaging biomarkers to detect progression of early Alzheimer's disease. *BMC Neurol* 19(1):264.
- Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, Moita CF, Schauer K, Hume AN, Freitas RP (2010) Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature cell biology* 12(1):19.
- Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A (2014) Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox biology* 2:411-429.
- Oth C, Concha, II, Arendt T, Stieler J, Schliebs R, Gonzalez-Billault C, Maccioni RB (2002) A β PP induces cdk5-dependent tau hyperphosphorylation in transgenic mice Tg2576. *J Alzheimers Dis* 4(5):417-430.
- Ovod V, Ramsey KN, Mawuenyega KG, Bollinger JG, Hicks T, Schneider T, Sullivan M, Paumier K, Holtzman DM, Morris JC, Benzinger T, Fagan AM, Patterson BW, Bateman RJ (2017) Amyloid beta concentrations and stable isotope labeling kinetics of human plasma specific to central nervous system amyloidosis. *Alzheimers Dement* 13(8):841-849.
- Pal A, Bhattacharya I, Bhattacharya K, Mandal C, Ray M (2009) Methylglyoxal induced activation of murine peritoneal macrophages and surface markers of T lymphocytes in sarcoma-180 bearing mice: involvement of MAP kinase, NF-kappa beta signal transduction pathway. *Mol Immunol* 46(10):2039-2044.
- Pannee J, Tornqvist U, Westerlund A, Ingelsson M, Lannfelt L, Brinkmalm G, Persson R, Gobom J, Svensson J, Johansson P, Zetterberg H, Blennow K, Portelius E (2014) The amyloid-beta degradation pattern in plasma--a possible tool for clinical trials in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 573:7-12.

- Patel B, Patel J, Cho J, Manne S, Bonala S, Henske E, Roegiers F, Markiewski M, Karbowniczek M (2016) Exosomes mediate the acquisition of the disease phenotypes by cells with normal genome in tuberous sclerosis complex. *Oncogene* 35(23):3027.
- Pathan M, Fonseka P, Chitti SV, Kang T, Sanwlani R, Van Deun J, Hendrix A, Mathivanan S (2019) Vesiclepedia 2019: a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. *Nucleic Acids Res* 47(D1):D516-D519.
- Patterson SA, Deep G, Brinkley TE (2018) Detection of the receptor for advanced glycation endproducts in neuronally-derived exosomes in plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 500(4):892-896.
- Pendlebury ST & Rothwell PM (2009) Prevalence, incidence, and factors associated with pre-stroke and post-stroke dementia: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 8(11):1006-1018.
- Permanne B, Adessi C, Saborio GP, Fraga S, Frossard MJ, Van Dorpe J, Dewachter I, Banks WA, Van Leuven F, Soto C (2002) Reduction of amyloid load and cerebral damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by treatment with a beta-sheet breaker peptide. *FASEB J* 16(8):860-862.
- Perrone L & Grant WB (2015) Observational and ecological studies of dietary advanced glycation end products in national diets and Alzheimer's disease incidence and prevalence. *J Alzheimers Dis* 45(3):965-979.
- Perrotte M, Le Page A, Fournet M, Le Sayec M, Rassart E, 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.
- Petersen RC (2016) Mild Cognitive Impairment. *Continuum (Minneapolis, Minn.)* 22(2 Dementia):404-418.
- Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E (1999) Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* 56(3):303-308.
- Phillips HS, Hains JM, Armanini M, Laramie GR, Johnson SA, Winslow JW (1991) BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron* 7(5):695-702.
- Picklo MJ, Olson SJ, Markesbery WR, Montine TJ (2001) Expression and activities of aldo-keto oxidoreductases in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60(7):686-695.
- Pluta R & Ulamek-Kozioł M (2019) Lymphocytes, Platelets, Erythrocytes, and Exosomes as Possible Biomarkers for Alzheimer's Disease Clinical Diagnosis. *Adv Exp Med Biol* 1118:71-82.
- Pols MS & Klumperman J (2009) Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp Cell Res* 315(9):1584-1592.
- Pooler AM, Phillips EC, Lau DH, Noble W, Hanger DP (2013) Physiological release of endogenous tau is stimulated by neuronal activity. *EMBO Rep* 14(4):389-394.
- Poulsen MW, Hedegaard RV, Andersen JM, de Courten B, Bügel S, Nielsen J, Skibsted LH, Dragsted LO (2013) Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. *Food and Chemical Toxicology* 60:10-37.
- Pricci F, Leto G, Amadio L, Iacobini C, Romeo G, Cordone S, Gradini R, Barsotti P, Liu FT, Di Mario U, Pugliese G (2000) Role of galectin-3 as a receptor for advanced glycosylation end products. *Kidney Int Suppl* 77:S31-39.

- Proserpio P, Arnaldi D, Nobili F, Nobili L (2018) Integrating Sleep and Alzheimer's Disease Pathophysiology: Hints for Sleep Disorders Management. *J Alzheimers Dis* 63(3):871-886.
- Puertas MC, Martinez-Martos JM, Cobo MP, Carrera MP, Mayas MD, Ramirez-Exposito MJ (2012) Plasma oxidative stress parameters in men and women with early stage Alzheimer type dementia. *Exp Gerontol* 47(8):625-630.
- Qi L, Chen Z, Wang Y, Liu X, Liu X, Ke L, Zheng Z, Lin X, Zhou Y, Wu L, Liu L (2017) Subcutaneous liraglutide ameliorates methylglyoxal-induced Alzheimer-like tau pathology and cognitive impairment by modulating tau hyperphosphorylation and glycogen synthase kinase-3 β . *American journal of translational research* 9(2):247-260.
- Qu Z, Jiao Z, Sun X, Zhao Y, Ren J, Xu G (2011) Effects of streptozotocin-induced diabetes on tau phosphorylation in the rat brain. *Brain Res* 1383:300-306.
- Quek C & Hill AF (2017) The role of extracellular vesicles in neurodegenerative diseases. *Biochem Biophys Res Commun* 483(4):1178-1186.
- Rabbani N & Thornalley PJ (2014) Measurement of methylglyoxal by stable isotopic dilution analysis LC-MS/MS with corroborative prediction in physiological samples. *Nature protocols* 9(8):1969.
- Raiborg C & Stenmark H (2009) The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 458(7237):445-452.
- Rajendran L, Honsho 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.
- Raposo G & Stoorvogel W (2013) Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 200(4):373-383.
- Raucci A, Cugusi S, Antonelli A, Barabino SM, Monti L, Bierhaus A, Reiss K, Saftig P, Bianchi ME (2008) A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J* 22(10):3716-3727.
- Ray B, Gaskins DL, Sajdyk TJ, Spence JP, Fitz SD, Shekhar A, Lahiri DK (2011) Restraint stress and repeated corticotrophin-releasing factor receptor activation in the amygdala both increase amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta peptide but have divergent effects on brain-derived neurotrophic factor and pre-synaptic proteins in the prefrontal cortex of rats. *Neuroscience* 184:139-150.
- Ray PD, Huang BW, Tsuji Y (2012) Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 24(5):981-990.
- Reaven GM (2003) The insulin resistance syndrome. *Curr Atheroscler Rep* 5(5):364-371.
- Resende R, Moreira PI, Proenca T, Deshpande A, Busciglio J, Pereira C, Oliveira CR (2008) Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 44(12):2051-2057.

- Ricciarelli R, Canepa E, Marengo B, Marinari UM, Poli G, Pronzato MA, Domenicotti C (2012) Cholesterol and Alzheimer's disease: a still poorly understood correlation. *IUBMB Life* 64(12):931-935.
- Richards D & Sabbagh MN (2014) Florbetaben for PET Imaging of Beta-Amyloid Plaques in the Brain. *Neurology and therapy* 3(2):79-88.
- Ridder K, Keller S, Dams M, Rupp A-K, Schlaudraff J, Del Turco D, Starmann J, Macas J, Karpova D, Devraj K (2014) Extracellular vesicle-mediated transfer of genetic information between the hematopoietic system and the brain in response to inflammation. *PLoS biology* 12(6).
- Roberts R & Knopman DS (2013) Classification and epidemiology of MCI. *Clinics in geriatric medicine* 29(4):753-772.
- Roeben B, Maetzler W, Vanmechelen E, Schulte C, Heinzel S, Stellos K, Godau J, Huber H, Brockmann K, Wurster I, Gaenslen A, Gruner E, Niebler R, Eschweiler GW, Berg D (2016) Association of Plasma Aβ40 Peptides, But Not Aβ42, with Coronary Artery Disease and Diabetes Mellitus. *J Alzheimers Dis* 52(1):161-169.
- Rohrer JD, Woollacott IO, Dick KM, Brotherhood E, Gordon E, Fellows A, Toombs J, Drueyeh R, Cardoso MJ, Ourselin S, Nicholas JM, Norgren N, Mead S, Andreasson U, Blennow K, Schott JM, Fox NC, Warren JD, Zetterberg H (2016) Serum neurofilament light chain protein is a measure of disease intensity in frontotemporal dementia. *Neurology* 87(13):1329-1336.
- Rojas JC, Karydas A, Bang J, Tsai RM, Blennow K, Liman V, Kramer JH, Rosen H, Miller BL, Zetterberg H, Boxer AL (2016) Plasma neurofilament light chain predicts progression in progressive supranuclear palsy. *Ann Clin Transl Neurol* 3(3):216-225.
- Rubio-Perez JM & Morillas-Ruiz JM (2012) A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal* 2012:756357.
- Rudy CC, Hunsberger HC, Weitzner DS, Reed MN (2015) The role of the tripartite glutamatergic synapse in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Aging and disease* 6(2):131-148.
- 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.
- Sanchez-Valle R, Heslegrave A, Foiani MS, Bosch B, Antonell A, Balasa M, Llado A, Zetterberg H, Fox NC (2018) Serum neurofilament light levels correlate with severity measures and neurodegeneration markers in autosomal dominant Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 10(1):113.
- Sanford AM (2017) Mild Cognitive Impairment. *Clin Geriatr Med* 33(3):325-337.
- Sano H, Higashi T, Matsumoto K, Melkko J, Jinnouchi Y, Ikeda K, Ebina Y, Makino H, Smedsrod B, Horiuchi S (1998) Insulin enhances macrophage scavenger receptor-mediated endocytic uptake of advanced glycation end products. *J Biol Chem* 273(15):8630-8637.
- Santos LE & Ferreira ST (2018) Crosstalk between endoplasmic reticulum stress and brain inflammation in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 136(Pt B):350-360.
- Sardar Sinha M, Ansell-Schultz A, Civitelli L, Hildesjo 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.

- Sasaki N, Toki S, Chowei H, Saito T, Nakano N, Hayashi Y, Takeuchi M, Makita Z (2001) Immunohistochemical distribution of the receptor for advanced glycation end products in neurons and astrocytes in Alzheimer's disease. *Brain Res* 888(2):256-262.
- Schalkwijk CG, Stehouwer CD, van Hinsbergh VW (2004) Fructose-mediated non-enzymatic glycation: sweet coupling or bad modification. *Diabetes Metab Res Rev* 20(5):369-382.
- Schechter R, Holtzclaw L, Sadiq F, Kahn A, Devaskar S (1988) Insulin synthesis by isolated rabbit neurons. *Endocrinology* 123(1):505-513.
- Schlueter C, Hauke S, Flohr AM, Rogalla P, Bullerdiek J (2003) Tissue-specific expression patterns of the RAGE receptor and its soluble forms—a result of regulated alternative splicing? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1630(1):1-6.
- Schrijvers EM, Direk N, Koudstaal PJ, Kirschbaum C, Hofman A, Tiemeier H, Breteler MM (2011) Associations of serum cortisol with cognitive function and dementia: the Rotterdam Study. *J Alzheimers Dis* 25(4):671-677.
- Scibior D & Czeczot H (2006) [Catalase: structure, properties, functions]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 60:170-180.
- Selkoe DJ & Hardy J (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO molecular medicine* 8(6):595-608.
- Sell DR & Monnier VM (1989) Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *J Biol Chem* 264(36):21597-21602.
- Seo K, Seo S, Han JY, Ki SH, Shin SM (2014) Resveratrol attenuates methylglyoxal-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis by Sestrin2 induction. *Toxicology and applied pharmacology* 280(2):314-322.
- Shahriyari L, Riazi G, Lornejad MR, Ghezlou M, Bigdeli B, Delavari B, Mamashli F, Abbasi S, Davoodi J, Saboury AA (2018) Effect of glycated insulin on the blood-brain barrier permeability: An in vitro study. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 647:54-66.
- Shangari N & O'Brien PJ (2004) The cytotoxic mechanism of glyoxal involves oxidative stress. *Biochem Pharmacol* 68(7):1433-1442.
- Sharma N, Rao SP, Kalivendi SV (2019a) The deglycase activity of DJ-1 mitigates alpha-synuclein glycation and aggregation in dopaminergic cells: Role of oxidative stress mediated downregulation of DJ-1 in Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 135:28-37.
- Sharma P, Srivastava P, Seth A, Tripathi PN, Banerjee AG, Shrivastava SK (2019b) Comprehensive review of mechanisms of pathogenesis involved in Alzheimer's disease and potential therapeutic strategies. *Progress in Neurobiology* 174:53-89.
- Sheehan B (2012) Assessment scales in dementia. *Therapeutic advances in neurological disorders* 5(6):349-358.
- Shen Y, Wang H, Sun Q, Yao H, Keegan AP, Mullan M, Wilson J, Lista S, Leyhe T, Laske C, Rujescu D, Levey A, Wallin A, Blennow K, Li R, Hampel H (2018) Increased Plasma Beta-Secretase 1 May Predict Conversion to Alzheimer's Disease Dementia in Individuals With Mild Cognitive Impairment. *Biol Psychiatry* 83(5):447-455.
- Shimada IS, LeComte MD, Granger JC, Quinlan NJ, Spees JL (2012) Self-renewal and differentiation of reactive astrocyte-derived neural stem/progenitor cells isolated from the cortical peri-infarct area after stroke. *J Neurosci* 32(23):7926-7940.

- Shimizu F, Sano Y, Tominaga O, Maeda T, Abe M-a, Kanda T (2013) Advanced glycation end-products disrupt the blood–brain barrier by stimulating the release of transforming growth factor– β by pericytes and vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase–2 by endothelial cells in vitro. *Neurobiology of aging* 34(7):1902-1912.
- Šimić G, Babić Leko M, Wray S, Harrington C, Delalle I, Jovanov-Milošević N, Bažadona D, Buée L, de Silva R, Di Giovanni G, Wischik C, Hof PR (2016) Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies. *Biomolecules* 6(1):6-6.
- Simm A (2013) Protein glycation during aging and in cardiovascular disease. *J Proteomics* 92:248-259.
- Simon D, Garcia-Garcia E, Gomez-Ramos A, Falcon-Perez JM, Diaz-Hernandez M, Hernandez F, Avila J (2012) Tau overexpression results in its secretion via membrane vesicles. *Neurodegener Dis* 10(1-4):73-75.
- Simons M & Raposo G (2009) Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Current opinion in cell biology* 21(4):575-581.
- Singh M, Dang TN, Arseneault M, Ramassamy C (2010) Role of by-products of lipid oxidation in Alzheimer's disease brain: a focus on acrolein. *J Alzheimers Dis* 21(3):741-756.
- Skoog I & Gustafson D (2006) Update on hypertension and Alzheimer's disease. *Neurol Res* 28(6):605-611.
- Skotland T, Hessvik NP, Sandvig K, Llorente A (2019) Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology. *J Lipid Res* 60(1):9-18.
- Snowden JS, Thompson JC, Stopford CL, Richardson AM, Gerhard A, Neary D, Mann DM (2011) The clinical diagnosis of early-onset dementias: diagnostic accuracy and clinicopathological relationships. *Brain* 134(Pt 9):2478-2492.
- Sofroniew MV & Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica* 119(1):7-35.
- Song J & Kim OY (2018) Perspectives in Lipocalin-2: Emerging Biomarker for Medical Diagnosis and Prognosis for Alzheimer's Disease. *Clinical nutrition research* 7(1):1-10.
- Song S, Lee H, Kam TI, Tai ML, Lee JY, Noh JY, Shim SM, Seo SJ, Kong YY, Nakagawa T, Chung CW, Choi DY, Oubrahim H, Jung YK (2008) E2-25K/Hip-2 regulates caspase-12 in ER stress-mediated Abeta neurotoxicity. *J Cell Biol* 182(4):675-684.
- Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hyman B, Burton MA, Goldstein LE, Duong S, Tanzi RE, Moir RD (2010) The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One* 5(3):e9505.
- Sotiropoulos I, Galas MC, Silva JM, Skoulakis E, Wegmann S, Maina MB, Blum D, Sayas CL, Mandelkow EM, Mandelkow E, Spillantini MG, Sousa N, Avila J, Medina M, Mudher A, Buée L (2017) Atypical, non-standard functions of the microtubule-associated Tau protein. *Acta Neuropathol Commun* 5(1):91.
- Spencer RJ, Wendell CR, Giggey PP, Katzel LI, Lefkowitz DM, Siegel EL, Waldstein SR (2013) Psychometric limitations of the mini-mental state examination among nondemented older adults: an evaluation of neurocognitive and magnetic resonance imaging correlates. *Exp Aging Res* 39(4):382-397.
- 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.
- Sperling RA, Karlawish J, Johnson KA (2013) Preclinical Alzheimer disease—the challenges ahead. *Nat Rev Neurol* 9(1):54-58.
- Srikanth V, Maczurek A, Phan T, Steele M, Westcott B, Juskiw D, Münch G (2011) Advanced glycation endproducts and their receptor RAGE in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 32(5):763-777.
- Srikanth V, Westcott B, Forbes J, Phan TG, Beare R, Venn A, Pearson S, Greenaway T, Parameswaran V, Münch G (2013) Methylglyoxal, cognitive function and cerebral atrophy in older people. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 68(1):68-73.
- Steen E, Terry BM, Rivera EJ, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, Xu XJ, Wands JR, de la Monte SM (2005) Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease—is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis* 7(1):63-80.
- Stoorvogel W, Strous GJ, Geuze HJ, Oorschot V, Schwartz AL (1991) Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell* 65(3):417-427.
- Stuffers S, Sem Wegner C, Stenmark H, Brech A (2009) Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic* 10(7):925-937.
- Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV (2018) Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nature reviews. Neurology* 14(3):133-150.
- Sy M, Kitazawa M, Medeiros R, Whitman L, Cheng D, Lane TE, Laferla FM (2011) Inflammation induced by infection potentiates tau pathological features in transgenic mice. *Am J Pathol* 178(6):2811-2822.
- Szule JA, Jung JH, McMahan UJ (2015) The structure and function of 'active zone material' at synapses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370(1672).
- Szwergold BS, Kappler F, Brown TR (1990) Identification of fructose 3-phosphate in the lens of diabetic rats. *Science* 247(4941):451-454.
- Takahashi H, Klein ZA, Bhagat SM, Kaufman AC, Kostylev MA, Ikezu T, Strittmatter SM (2017) Opposing effects of progranulin deficiency on amyloid and tau pathologies via microglial TYROBP network. *Acta Neuropathol* 133(5):785-807.
- Takeda A, Yasuda T, Miyata T, Goto Y, Wakai M, Watanabe M, Yasuda Y, Horie K, Inagaki T, Doyu M, Maeda K, Sobue G (1998) Advanced glycation end products co-localized with astrocytes and microglial cells in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol* 95(6):555-558.
- Takedo A, Yasuda T, Miyata T, Mizuno K, Li M, Yoneyama S, Horie K, Maeda K, Sobue G (1996) Immunohistochemical study of advanced glycation end products in aging and Alzheimer's disease brain. *Neurosci Lett* 221(1):17-20.
- Tamura Y, Adachi H, Osuga J, Ohashi K, Yahagi N, Sekiya M, Okazaki H, Tomita S, Iizuka Y, Shimano H, Nagai R, Kimura S, Tsujimoto M, Ishibashi S (2003) FEEL-1 and FEEL-2 are endocytic receptors for advanced glycation end products. *J Biol Chem* 278(15):12613-12617.
- Tang BL (2009) Neuronal protein trafficking associated with Alzheimer disease: from APP and BACE1 to glutamate receptors. *Cell Adh Migr* 3(1):118-128.

- Tardivel M, Bégard S, Bousset L, Dujardin S, Coens A, Melki R, Buée L, Colin M (2016) Tunneling nanotube (TNT)-mediated neuron-to neuron transfer of pathological Tau protein assemblies. *Acta Neuropathologica Communications* 4(1):117.
- Teipel SJ, Flatz WH, Heinsen H, Bokde ALW, Schoenberg SO, Stöckel S, Dietrich O, Reiser MF, Möller H-J, Hampel H (2005) Measurement of basal forebrain atrophy in Alzheimer's disease using MRI. *Brain* 128(11):2626-2644.
- Teodorowicz M, Hendriks WH, Wichers HJ, Savelkoul HFJ (2018) Immunomodulation by Processed Animal Feed: The Role of Maillard Reaction Products and Advanced Glycation End-Products (AGEs). *Frontiers in Immunology* 9(2088).
- Thambisetty M & Lovestone S (2010) Blood-based biomarkers of Alzheimer's disease: challenging but feasible. *Biomark Med* 4(1):65-79.
- Thery C, Boussac M, Veron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, Amigorena S (2001) Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* 166(12):7309-7318.
- Thery C, Zitvogel L, Amigorena S (2002) Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2(8):569-579.
- Thilavech T, Ngamukote S, Belobrajdic D, Abeywardena M, Adisakwattana S (2016) Cyanidin-3-rutinoside attenuates methylglyoxal-induced protein glycation and DNA damage via carbonyl trapping ability and scavenging reactive oxygen species. *BMC complementary and alternative medicine* 16:138-138.
- Thinakaran G & Koo EH (2008) Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *The Journal of biological chemistry* 283(44):29615-29619.
- Thompson AG, Gray E, Heman-Ackah SM, Mäger I, Talbot K, El Andaloussi S, Wood MJ, Turner MR (2016) Extracellular vesicles in neurodegenerative disease—pathogenesis to biomarkers. *Nature Reviews Neurology* 12(6):346.
- Thornalley PJ (2003) Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys* 419(1):31-40.
- Thornalley PJ (2008) Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems—role in ageing and disease. *Drug Metabol Drug Interact* 23(1-2):125-150.
- Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS (1999) Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *The Biochemical journal* 344 Pt 1(Pt 1):109-116.
- Thorpe SR & Baynes JW (2003) Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives. *Amino Acids* 25(3-4):275-281.
- Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, Parroche P, Drabic S, Golenbock D, Sirois C, Hua J, An LL, Audoly L, La Rosa G, Bierhaus A, Naworth P, Marshak-Rothstein A, Crow MK, Fitzgerald KA, Latz E, Kiener PA, Coyle AJ (2007) Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol* 8(5):487-496.
- Tian T, Zhu YL, Hu FH, Wang YY, Huang NP, Xiao ZD (2013) Dynamics of exosome internalization and trafficking. *Journal of cellular physiology* 228(7):1487-1495.

- Tóth AE, Walter FR, Bocsik A, Sántha P, Veszelka S, Nagy L, Puskás LG, Couraud P-O, Takata F, Dohgu S, Kataoka Y, Deli MA (2014) Edaravone protects against methylglyoxal-induced barrier damage in human brain endothelial cells. *PLoS One* 9(7):e100152-e100152.
- Town T, Nikolic V, Tan J (2005) The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses. *Journal of neuroinflammation* 2:24-24.
- Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, Schwille P, Brugger B, Simons M (2008) Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319(5867):1244-1247.
- Trzepacz PT, Hochstetler H, Wang S, Walker B, Saykin AJ, Alzheimer's Disease Neuroimaging I (2015) Relationship between the Montreal Cognitive Assessment and Mini-mental State Examination for assessment of mild cognitive impairment in older adults. *BMC geriatrics* 15:107-107.
- Turk Z, Nemet I, Varga-Defteardarovic L, Car N (2006) Elevated level of methylglyoxal during diabetic ketoacidosis and its recovery phase. *Diabetes Metab* 32(2):176-180.
- Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC (2003) Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol* 70(1):1-32.
- Tzen KY, Yang SY, Chen TF, Cheng TW, Horng HE, Wen HP, Huang YY, Shiue CY, Chiu MJ (2014) Plasma Abeta but not tau is related to brain PiB retention in early Alzheimer's disease. *ACS Chem Neurosci* 5(9):830-836.
- Ullrich C, Pirchl M, Humpel C (2010) Hypercholesterolemia in rats impairs the cholinergic system and leads to memory deficits. *Mol Cell Neurosci* 45(4):408-417.
- Unzeta M, Sole M, Boada M, Hernandez M (2007) Semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) and its possible contribution to vascular damage in Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 114(6):857-862.
- Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, Yong A, Striker GE, Vlassara H (2010) Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc* 110(6):911-916 e912.
- Van Blitterswijk WJ, De Veer G, Krol JH, Emmelot P (1982) Comparative lipid analysis of purified plasma membranes and shed extracellular membrane vesicles from normal murine thymocytes and leukemic GRSL cells. *Biochim Biophys Acta* 688(2):495-504.
- van de Haar HJ, Jansen JFA, van Osch MJP, van Buchem MA, Muller M, Wong SM, Hofman PAM, Burgmans S, Verhey FRJ, Backes WH (2016) Neurovascular unit impairment in early Alzheimer's disease measured with magnetic resonance imaging. *Neurobiol Aging* 45:190-196.
- van der Pol E, Boing AN, Gool EL, Nieuwland R (2016) Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *J Thromb Haemost* 14(1):48-56.
- van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R (2012) Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. *Pharmacological Reviews* 64(3):676-705.
- Vander Jagt DL & Hunsaker LA (2003) Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: roles of aldose reductase, glyoxalase-I, betaine aldehyde dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase. *Chem Biol Interact* 143-144:341-351.

- Vanhanen M, Koivisto K, Moilanen L, Helkala EL, Hanninen T, Soininen H, Kervinen K, Kesaniemi YA, Laakso M, Kuusisto J (2006) Association of metabolic syndrome with Alzheimer disease: a population-based study. *Neurology* 67(5):843-847.
- Venkateshappa C, Harish G, Mahadevan A, Srinivas Bharath MM, Shankar SK (2012) Elevated oxidative stress and decreased antioxidant function in the human hippocampus and frontal cortex with increasing age: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 37(8):1601-1614.
- Vertesi A, Lever JA, Molloy DW, Sanderson B, Tuttle I, Pokoradi L, Principi E (2001) Standardized Mini-Mental State Examination. Use and interpretation. *Can Fam Physician* 47:2018-2023.
- Vienberg SG, Kleinridders A, Suzuki R, Kahn CR (2014) Differential effects of angiotensin-like 4 in brain and muscle on regulation of lipoprotein lipase activity. *Molecular metabolism* 4(2):144-150.
- Vilalta-Franch J, Lopez-Pousa S, Llinas-Regla J, Calvo-Perxas L, Merino-Aguado J, Garre-Olmo J (2013) Depression subtypes and 5-year risk of dementia and Alzheimer disease in patients aged 70 years. *Int J Geriatr Psychiatry* 28(4):341-350.
- Vistoli G, De Maddis D, Cipak A, Zarkovic N, Carini M, Aldini G (2013) Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radic Res* 47 Suppl 1:3-27.
- Vlassara H, Cai W, Goodman S, Pyzik R, Yong A, Chen X, Zhu L, Neade T, Beeri M, Silverman JM, Ferrucci L, Tansman L, Striker GE, Uribarri J (2009) Protection against loss of innate defenses in adulthood by low advanced glycation end products (AGE) intake: role of the antiinflammatory AGE receptor-1. *J Clin Endocrinol Metab* 94(11):4483-4491.
- von Bernhardi R & Eugenin J (2012) Alzheimer's disease: redox dysregulation as a common denominator for diverse pathogenic mechanisms. *Antioxid Redox Signal* 16(9):974-1031.
- von Zastrow M & Sorkin A (2007) Signaling on the endocytic pathway. *Current opinion in cell biology* 19(4):436-445.
- Waldenström A, Genneböck N, Hellman U, Ronquist G (2012) Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells. *PLoS One* 7(4):e34653.
- Walker D, Lue LF, Paul G, Patel A, Sabbagh MN (2015) Receptor for advanced glycation endproduct modulators: a new therapeutic target in Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs* 24(3):393-399.
- Walker DG, Dalsing-Hernandez JE, Campbell NA, Lue LF (2009) Decreased expression of CD200 and CD200 receptor in Alzheimer's disease: a potential mechanism leading to chronic inflammation. *Exp Neurol* 215(1):5-19.
- Walters A, Phillips E, Zheng R, Biju M, Kuruvilla T (2016) Evidence for neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Progress in Neurology and Psychiatry* 20(5):25-31.
- Wan W, Cao L, Liu L, Zhang C, Kalionis B, Tai X, Li Y, Xia S (2015) Abeta(1-42) oligomer-induced leakage in an in vitro blood-brain barrier model is associated with up-regulation of RAGE and metalloproteinases, and down-regulation of tight junction scaffold proteins. *J Neurochem* 134(2):382-393.
- Wang H, Golob EJ, Su MY (2006) Vascular volume and blood-brain barrier permeability measured by dynamic contrast enhanced MRI in hippocampus and cerebellum of patients with MCI and normal controls. *J Magn Reson Imaging* 24(3):695-700.

- Wang R, Sweeney D, Gandy SE, Sisodia SS (1996) The profile of soluble amyloid beta protein in cultured cell media. Detection and quantification of amyloid beta protein and variants by immunoprecipitation-mass spectrometry. *J Biol Chem* 271(50):31894-31902.
- Wang S, Cesca F, Loers G, Schweizer M, Buck F, Benfenati F, Schachner M, Kleene R (2011) Synapsin I is an oligomannose-carrying glycoprotein, acts as an oligomannose-binding lectin, and promotes neurite outgrowth and neuronal survival when released via glia-derived exosomes. *J Neurosci* 31(20):7275-7290.
- Wang X, Blanchard J, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2015) Memantine Attenuates Alzheimer's Disease-Like Pathology and Cognitive Impairment. *PLoS One* 10(12):e0145441.
- Wang X, Wang W, Li L, Perry G, Lee H-g, Zhu X (2014) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta* 1842(8):1240-1247.
- Wang Y, Balaji V, Kaniyappan S, Krüger L, Irsen S, Tepper K, Chandupatla R, Maetzler W, Schneider A, Mandelkow E, Mandelkow E-M (2017) The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes. *Molecular Neurodegeneration* 12:5.
- Weiner MW, Veitch DP, Aisen PS, Beckett LA, Cairns NJ, Cedarbaum J, Green RC, Harvey D, Jack CR, Jagust W, Luthman J, Morris JC, Petersen RC, Saykin AJ, Shaw L, Shen L, Schwarz A, Toga AW, Trojanowski JQ (2015) 2014 Update of the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: A review of papers published since its inception. *Alzheimers Dement* 11(6):e1-120.
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(5):1858-1862.
- Weston PSJ, Poole T, Ryan NS, Nair A, Liang Y, Macpherson K, Druyeh R, Malone IB, Ahsan RL, Pemberton H, Klimova J, Mead S, Blennow K, Rossor MN, Schott JM, Zetterberg H, Fox NC (2017) Serum neurofilament light in familial Alzheimer disease: A marker of early neurodegeneration. *Neurology* 89(21):2167-2175.
- Williams TI, Lynn BC, Markesbery WR, Lovell MA (2006) Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein, neurotoxic markers of lipid peroxidation, in the brain in Mild Cognitive Impairment and early Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 27(8):1094-1099.
- Winston CN, Goetzl EJ, Akers JC, Carter BS, Rockenstein EM, Galasko D, Masliah E, Rissman RA (2016) Prediction of conversion from mild cognitive impairment to dementia with neuronally derived blood exosome protein profile. *Alzheimer's & Dementia : Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring* 3:63-72.
- Wojsiat J, Laskowska-Kaszub K, Mietelska-Porowska A, Wojda U (2017) Search for Alzheimer's disease biomarkers in blood cells: hypotheses-driven approach. *Biomark Med* 11(10):917-931.
- Wollert T & Hurley JH (2010) Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 464(7290):864-869.
- Wu G, Sankaranarayanan S, Wong J, Tugusheva K, Michener MS, Shi X, Cook JJ, Simon AJ, Savage MJ (2012) Characterization of plasma beta-secretase (BACE1) activity and soluble amyloid precursor proteins as potential biomarkers for Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 90(12):2247-2258.
- Wu JW, Herman M, Liu L, Simoes S, Acker CM, Figueroa H, Steinberg JI, Margittai M, Kaye R, Zurzolo C, Di Paolo G, Duff KE (2013) Small misfolded Tau species are internalized via bulk endocytosis and anterogradely and retrogradely transported in neurons. *J Biol Chem* 288(3):1856-1870.

- Xiang X, Werner G, Bohrmann B, Liesz A, Mazaheri F, Capell A, Feederle R, Knuesel I, Kleinberger G, Haass C (2016) TREM2 deficiency reduces the efficacy of immunotherapeutic amyloid clearance. *EMBO molecular medicine* 8(9):992-1004.
- Xiao D, Ohlendorf J, Chen Y, Taylor DD, Rai SN, Waigel S, Zacharias W, Hao H, McMasters KM (2012) Identifying mRNA, microRNA and protein profiles of melanoma exosomes. *PLoS One* 7(10):e46874.
- Xiao T, Zhang W, Jiao B, Pan C-Z, Liu X, Shen L (2017) The role of exosomes in the pathogenesis of Alzheimer' disease. *Translational Neurodegeneration* 6:3.
- Xie J, Reverdatto S, Frolov A, Hoffmann R, Burz DS, Shekhtman A (2008) Structural basis for pattern recognition by the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Biol Chem* 283(40):27255-27269.
- Xu X-Y, Deng C-Q, Wang J, Deng X-J, Xiao Q, Li Y, He Q, Fan W-H, Quan F-Y, Zhu Y-P, Cheng P, Chen G-J (2017) Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products in Alzheimer's disease. *International Journal of Neuroscience* 127(5):454-458.
- Xue-Shan Z, Juan P, Qi W, Zhong R, Li-Hong P, Zhi-Han T, Zhi-Sheng J, Gui-Xue W, Lu-Shan L (2016) Imbalanced cholesterol metabolism in Alzheimer's disease. *Clin Chim Acta* 456:107-114.
- Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern D, Schmidt AM (1996) RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 382(6593):685-691.
- Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM (2010) Soluble RAGE: therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic disease and aging. *Biochem Pharmacol* 79(10):1379-1386.
- Yang K, Qiang D, Delaney S, Mehta R, Bruce WR, O'Brien PJ (2011) Differences in glyoxal and methylglyoxal metabolism determine cellular susceptibility to protein carbonylation and cytotoxicity. *Chem Biol Interact* 191(1-3):322-329.
- Yang L, Li X, Wu Z, Feng C, Zhang T, Dai S, Dong Q (2018) Inhibition of Methylglyoxal-Induced Histone H1 N(epsilon)-Carboxymethyllysine Formation by (+)-Catechin. *J Agric Food Chem* 66(23):5812-5820.
- Yang LB, Li R, Meri S, Rogers J, Shen Y (2000) Deficiency of complement defense protein CD59 may contribute to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 20(20):7505-7509.
- Yang S, Zhou H, Wang G, Zhong X-H, Shen Q-L, Zhang X-J, Li R-Y, Chen L-H, Zhang Y-H, Wan Z (2020) Quercetin is protective against short-term dietary advanced glycation end products intake induced cognitive dysfunction in aged ICR mice. *Journal of Food Biochemistry* n/a(n/a):e13164.
- Yang Z, Makita Z, Horii Y, Brunelle S, Cerami A, Sehajpal P, Suthanthiran M, Vlassara H (1991) Two novel rat liver membrane proteins that bind advanced glycosylation endproducts: relationship to macrophage receptor for glucose-modified proteins. *J Exp Med* 174(3):515-524.
- Yatime L & Andersen GR (2013) Structural insights into the oligomerization mode of the human receptor for advanced glycation end-products. *FEBS J* 280(24):6556-6568.
- Yeh W-J, Hsia S-M, Lee W-H, Wu C-H (2017) Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: A review of recent findings. *Journal of Food and Drug Analysis* 25(1):84-92.

- Yin F, Banerjee R, Thomas B, Zhou P, Qian L, Jia T, Ma X, Ma Y, Iadecola C, Beal MF, Nathan C, Ding A (2010) Exaggerated inflammation, impaired host defense, and neuropathology in progranulin-deficient mice. *J Exp Med* 207(1):117-128.
- Yin H & Porter NA (2005) New insights regarding the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Antioxid Redox Signal* 7(1-2):170-184.
- Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG, Abedin MJ, Li H, Yasui K, Takeuchi M, Makita Z, Takasawa S, Okamoto H, Watanabe T, Yamamoto H (2003) Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J* 370(Pt 3):1097-1109.
- Yoshii T, Fukumori T, Honjo Y, Inohara H, Kim HR, Raz A (2002) Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. *J Biol Chem* 277(9):6852-6857.
- Yu PH, Wright S, Fan EH, Lun ZR, Gubisne-Harberle D (2003) Physiological and pathological implications of semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1647(1-2):193-199.
- Zarà M, Guidetti GF, Camera M, Canobbio I, Amadio P, Torti M, Tremoli E, Barbieri SS (2019) Biology and Role of Extracellular Vesicles (EVs) in the Pathogenesis of Thrombosis. *International journal of molecular sciences* 20(11):2840.
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ (2002) Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 33(3):337-349.
- Zeng J & Davies MJ (2005) Evidence for the formation of adducts and S-(carboxymethyl)cysteine on reaction of alpha-dicarbonyl compounds with thiol groups on amino acids, peptides, and proteins. *Chem Res Toxicol* 18(8):1232-1241.
- Zetterberg H (2017) Tau in biofluids—relation to pathology, imaging and clinical features. *Neuropathology and applied neurobiology* 43(3):194-199.
- Zetterberg H (2019) Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease—An update. *Journal of neuroscience methods* 319:2-6.
- Zetterberg H, Wilson D, Andreasson U, Minthon L, Blennow K, Randall J, Hansson O (2013) Plasma tau levels in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 5(2):9.
- Zhang L, Bukulin M, Kojro E, Roth A, Metz VV, Fahrenholz F, Nawroth PP, Bierhaus A, Postina R (2008) Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. *J Biol Chem* 283(51):35507-35516.
- Zhang Q, Ames JM, Smith RD, Baynes JW, Metz TO (2009) A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease. *Journal of proteome research* 8(2):754-769.
- Zheng H & Koo EH (2006) The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener* 1:5.
- 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. *Frontiers in aging neuroscience* 9:12-12.
- Zhou Z, Immel D, Xi CX, Bierhaus A, Feng X, Mei L, Nawroth P, Stern DM, Xiong WC (2006) Regulation of osteoclast function and bone mass by RAGE. *J Exp Med* 203(4):1067-1080.

- Zimmerman B, Kelly B, McMillan BJ, Seegar TCM, Dror RO, Kruse AC, Blacklow SC (2016) Crystal Structure of a Full-Length Human Tetraspanin Reveals a Cholesterol-Binding Pocket. *Cell* 167(4):1041-1051 e1011.
- Zipser BD, Johanson CE, Gonzalez L, Berzin TM, Tavares R, Hulette CM, Vitek MP, Hovanesian V, Stopa EG (2007) Microvascular injury and blood-brain barrier leakage in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 28(7):977-986.
- Zlokovic BV (2011) Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci* 12(12):723-738.
- Zlokovic BV, Deane R, Sagare AP, Bell RD, Winkler EA (2010) Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: a serial clearance homeostatic mechanism controlling Alzheimer's amyloid beta-peptide elimination from the brain. *J Neurochem* 115(5):1077-1089.
- Zou K, Gong JS, Yanagisawa K, Michikawa M (2002) A novel function of monomeric amyloid beta-protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. *J Neurosci* 22(12):4833-4841.
- Zvěřová M (2019) Clinical aspects of Alzheimer's disease. *Clinical Biochemistry* <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2019.04.015>.

9 ANNEXE I : BREVET

Titre du brevet: **Utilisation d'un profil de protéines dans les vésicules extracellulaires plasmatiques totales pour le diagnostic précoce des personnes à risque de développer la maladie d'Alzheimer**

Référence: G16398-00023-AD

Inventeurs: Morgane Perrotte, **Mohamed Haddad**, Charles Ramassamy

ABSTRACT

Methods, compositions and kits for the assessment and management of mild cognitive impairment (MCI) and early stage Alzheimer's disease (AD) are described. The assessment for MCI and early stage AD is based on the level of BDNF, NSE, S100B, PGRN and/or the PGRN/BDNF ratio, in plasma-derived extracellular vesicles (EVs) from a subject.

L'article relié au brevet

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

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

Auteurs de l'article : Morgane, Perrotte ^{1,2,3} ; **Mohamed, Haddad** ^{1,2} ; Aurélie, Le Page ⁴ ; Eric H. Frost ⁵ ; Tamas, Fulop ⁴ ; Charles, Ramassamy ^{1,2,3}

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

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

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

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

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

Abstract:

There is some evidence that alterations occurred in the brain of Alzheimer's disease (AD) patients or in subjects with mild cognitive impairment (MCI) could also appeared in peripheral. In an urgent context to find non-invasive biomarkers for early and accurate clinical diagnosis of AD, the protein cargo of circulating extracellular vesicles (EVs) may have potential as a readily accessible source of biomarkers related to AD disorders. To investigate this possibility, total plasma extracellular vesicles (pEVs) were isolated and characterized from plasma samples of MCI subjects, AD patients at different stages of the disease and controls for Luminex assay quantification of some proteins related to brain disorders in AD development. Lower levels of BDNF, Progranulin, NSE and S100B were found in pEVs during MCI phase and mild phase of AD compared to control group, with no significant difference later in the course. The ratio of Progranulin/BDNF in pEVs demonstrated high accuracy to define MCI stage with a sensitivity and specificity superior to 80%. Overall, our results strengthen the notion that this proteins pattern in total pEVs could be considered as non-invasive blood-based biomarkers for an early MCI and AD diagnosis but not for monitoring the disease evolution.

Abbreviations:

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

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

Introduction

Alzheimer's disease (AD), a multifactorial disorder, is the most common type of dementia and is characterized clinically by progressive cognitive decline and neuropathologically by synaptic and neuronal loss and the presence of amyloid plaques. During the progression of the disease, some alterations occur in the brain like a deficiency of cellular survival factors, an inflammation and a metabolic disorder (1-4). The development of AD pathogenesis is insidious and no clear event defines the onset of the disease (5). Hence, the detection of the disease at the early stages is a considerable challenge. The prodromal stage of dementia, mild cognitive impairment (MCI), provides an important opportunity for potential intervention to prevent the onset of dementia. However, the current standardized criteria for the diagnosis of MCI and AD including cognitive

changes, abnormal cerebrospinal fluid (CSF) levels of pathogenic proteins, and MRI and PET bioimaging data, have some limits (6). The clinicopathologic heterogeneity, the high costs of imaging and the invasive nature of CSF collection limit their usefulness for routine clinical testing. Thus, there is a strong necessity to identify non-invasive blood biomarkers easily measurable that could facilitate early and accurate diagnosis, as well as to evaluate the therapeutic efficacy of new treatment. Despite intense research in the field, there is no peripheral biomarker that has got beyond the discovery stage.

Recently, in the context of neurodegenerative diseases diagnosis, some studies brought to light the potential for the protein cargo of extracellular vesicles (EVs) in blood to serve as a readily accessible source of central nervous system (CNS) biomarkers. A growing number of researches indicate that EVs could contribute to the brain function and the pathogenesis of AD (7-10). EVs can be secreted by most cell types, including neurons, oligodendrocytes and astrocytes, and are detectable in different body fluids such plasma due to their transportation between the brain and bloodstream. The brain-derived EVs can be isolate from blood using L1-cell adhesion molecule (L1CAM) immunoreactivity and can be used to circumvent the problem of the biomarker identification that reflect the state of the CNS without requiring invasive collection techniques (11-13). Nevertheless, the CNS cell-specific EVs enrichment approach may introduce a bias to the results due to the not brain-specificity of L1CAM and the possible changes in the level of neural cell adhesion molecules during AD (14-17). The potential of brain derived protein in total circulating EVs for the detection of MCI or the evaluation of the disease progression remains to be determined. In this study, we have isolated and characterized total plasma-based EVs (pEVs), established a specific profile of some brain derived proteins for the identification of the MCI phase and early AD stage. We have also highlighted a relation between levels of some brain derived proteins in pEVs and the cognitive performance, assessed by two cognitive tests: the Mini-Mental State Examination (MMSE) and the Montreal Cognitive Assessment (MoCA) (18, 19). In pEVs from MCI and mild AD patients, we found an important reduction of the Progranulin/BDNF ratio and the levels of BDNF, NSE and S100B, compared to control participants. Levels of Progranulin in pEVs were reduced in MCI phase only, in comparison with control group. With our diagnostic accuracy analysis, we found that the ratio of Progranulin/BDNF could be used to classify samples from MCI patients and control subjects with a sensitivity of 90.9% and a specificity of 83.3%. Finally, the present study provides evidence that some proteins related to AD brain disorders are associated with cognitive performance.

Materials and Methods

Selection of participants

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

Cognitive assessments and plasma collection

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

Isolation of total extracellular vesicles from plasma

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

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

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

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

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

Finally, the absence of a negative control (Calnexin) and the presence of some EVs markers (TSG101, GAPDH and CD63) and cerebral markers (L1CAM, GFAP) were confirmed by a Western blot analysis. The total proteins of pEVs were extracted using Radio Immuno Precipitation Assay (RIPA) buffer (50mM Tris buffer, pH 8, 150 mM sodium chloride, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1% Igepal, 1% sodium deoxycholate, 5 mM EDTA, 1% protease and phosphatase inhibitor cocktail) and their concentrations were quantified using bicinchoninic acid (BCA) assay (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific, Inc). The same pEVs protein amount (15 μ g) was separated using 10% SDS-PAGE gel and transferred to PVDF membranes. The membranes were blocked in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) and 5% nonfat dry milk before incubation (overnight at 4°C) with the following primary antibodies: TSG101 (MBS7605273, MyBiosource, Inc, San Diego, CA, USA); CD63 (Sc-5275, Santa Cruz, Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA); Calnexin (Sc-, Santa Cruz, Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA); L1CAM (Sc-53386, Santa Cruz, Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA); GFAP (G9269, EMD Millipore Corp., Burlington, MA, USA). Then, membranes were washed with TBS-T and HRP-conjugated secondary antibodies were incubated for 1h at room temperature (7076S, Anti-mouse IgG HRP-linked Antibody or 7074S, Anti-rabbit HRP-linked Antibody from Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA). The membrane blots were detected by chemiluminescence using ECL substrate (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) and

the FluorChem HD2 system. The membranes were stained with Coomassie blue to detect the profile of EVs total proteins.

Quantification of brain derived proteins: multianalyte immunoassay

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

Statistical analysis

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

Results

Patient characteristics

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

Characterization of total extracellular vesicles isolated from plasma

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

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

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

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

Brain derived proteins levels in total circulating extracellular vesicles

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

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

There was only a significantly difference in the Progranulin/BDNF ratio and S100B levels between the control group and the AD group when all stages of the disease were combinated. By contrast, BDNF, NSE and Progranulin levels were not significantly different in pEVs from all AD patients

compared to control subjects. These results emphasize the importance of disease stages in the identification of biomarkers.

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

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

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

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

The table 3 reports the diagnostic sensitivity and specificity of each marker for the discrimination of control participants and mild AD patients. The ratio of Progranulin/BDNF in pEVs corresponded to the best marker with diagnostic sensitivity and specificity of 81.8% and 75%, respectively. The Levels of NSE and S100B had lowest diagnostic efficiency with AUC inferior to 75%. In contrast, BDNF and Progranulin levels in pEVs presented a poor diagnostic accuracy to distinguish control group to mild AD patients.

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

Relationship of brain derived proteins levels to cognitive performance

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

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

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

Discussion:

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

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

More specifically the content of pEVs like some proteins including BDNF, Progranulin, NSE and S100B, can reflect central and peripheral disorders in AD. These proteins are predominantly brain origins but are also expressed in other non-neural cell types. Our results indicate a deficiency of these proteins in pEVs during the MCI phase and the early AD stage. In neuron cells, BDNF and Progranulin are co-transported in vesicles for regulating neuronal growth and survival, as well as synapse formation and function (25, 31-33). The reduction of these neuroprotective proteins observed in pEVs from MCI and mild AD patients and their association with cognitive performance may explain the neuronal impairment and the decreased neuronal resistance to the toxicity of AD pathogenic proteins. In combination, the ratio of Progranulin/BDNF in pEVs is very sensitive and specific for MCI determination. During AD development, there is a central and peripheral inflammation and the S100B overexpression by reactive astrocytes can be considered as a marker for brain damage (34-36). In pEVs, S100B levels are lower in MCI phase and at the beginning of AD and associated with cognitive performance, according to another study that measure serum S100B levels (37). Finally, NSE, a major glycolytic pathway enzyme found in all neurons, is another index of neuronal damage and brain glucose hypometabolism. In the present study, pEVs NSE levels were reduced in MCI and mild AD patients as previously observed in serum and CSF (37, 38).

Taken together, our study highlights for the first time some modifications of proteins related to AD brain disorders in total pEVs during the development of AD and their association with cognitive performance. This approach could distinguish controls from MCI or AD patients at early stage but could not monitor the disease progression.

Further investigations will be required to validate our initial findings. First, future works is underway to validate the acquired preliminary results in larger independent cohorts. On the other

hand, standardized isolation, characterization and normalization methods are required to use pEVs in the field of diagnosis.

Acknowledgements:

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

References:

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

9. Dinkins MB, Dasgupta S, Wang G, Zhu G, Bieberich E. Exosome reduction in vivo is associated with lower amyloid plaque load in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 2014;35(8):1792-800.
10. Polanco JC, Scicluna BJ, Hill AF, Gotz J. Extracellular Vesicles Isolated from the Brains of rTg4510 Mice Seed Tau Protein Aggregation in a Threshold-dependent Manner. *The Journal of biological chemistry*. 2016;291(24):12445-66.
11. Mustapic M, Eitan E, Werner JK, Jr., Berkowitz ST, Lazaropoulos MP, Tran J, et al. Plasma Extracellular Vesicles Enriched for Neuronal Origin: A Potential Window into Brain Pathologic Processes. *Frontiers in neuroscience*. 2017;11:278.
12. Shi M, Liu C, Cook TJ, Bullock KM, Zhao Y, Gingham C, et al. Plasma exosomal alpha-synuclein is likely CNS-derived and increased in Parkinson's disease. *Acta neuropathologica*. 2014;128(5):639-50.
13. Fiandaca MS, Kapogiannis D, Mapstone M, Boxer A, Eitan E, Schwartz JB, et al. Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*. 2015;11(6):600-7 e1.
14. Yew DT, Li WP, Webb SE, Lai HW, Zhang L. Neurotransmitters, peptides, and neural cell adhesion molecules in the cortices of normal elderly humans and Alzheimer patients: a comparison. *Experimental gerontology*. 1999;34(1):117-33.
15. Gillian AM, Brion JP, Breen KC. Expression of the neural cell adhesion molecule (NCAM) in Alzheimer's disease. *Neurodegeneration : a journal for neurodegenerative disorders, neuroprotection, and neuroregeneration*. 1994;3(4):283-91.
16. Smogeli E, Davidson B, Cvancarova M, Holth A, Katz B, Risberg B, et al. L1CAM as a prognostic marker in stage I endometrial cancer: a validation study. *BMC cancer*. 2016;16:596.
17. Markovic-Lipkovski J, Zivotic M, Muller CA, Tampe B, Cirovic S, Vjestica J, et al. Variable Expression of Neural Cell Adhesion Molecule Isoforms in Renal Tissue: Possible Role in Incipient Renal Fibrosis. *PloS one*. 2015;10(9):e0137028.
18. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of psychiatric research*. 1975;12(3):189-98.

19. Nasreddine ZS, Phillips NA, Bedirian V, Charbonneau S, Whitehead V, Collin I, et al. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2005;53(4):695-9.
20. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Archives of neurology*. 1999;56(3):303-8.
21. Ligthart GJ, Corberand JX, Fournier C, Galanaud P, Hijmans W, Kennes B, et al. Admission criteria for immunogerontological studies in man: the SENIEUR protocol. *Mechanisms of ageing and development*. 1984;28(1):47-55.
22. Soreide K. Receiver-operating characteristic curve analysis in diagnostic, prognostic and predictive biomarker research. *Journal of clinical pathology*. 2009;62(1):1-5.
23. Trzepacz PT, Hochstetler H, Wang S, Walker B, Saykin AJ. Relationship between the Montreal Cognitive Assessment and Mini-mental State Examination for assessment of mild cognitive impairment in older adults. *BMC geriatrics*. 2015;15:107.
24. Poon WW, Blurton-Jones M, Tu CH, Feinberg LM, Chabrier MA, Harris JW, et al. beta-Amyloid impairs axonal BDNF retrograde trafficking. *Neurobiology of aging*. 2011;32(5):821-33.
25. Petoukhov E, Fernando S, Mills F, Shivji F, Hunter D, Krieger C, et al. Activity-dependent secretion of progranulin from synapses. *Journal of cell science*. 2013;126(Pt 23):5412-21.
26. Consensus report of the Working Group on: "Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease". The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group. *Neurobiology of aging*. 1998;19(2):109-16.
27. Mueller SG, Weiner MW, Thal LJ, Petersen RC, Jack CR, Jagust W, et al. Ways toward an early diagnosis in Alzheimer's disease: the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI). *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*. 2005;1(1):55-66.
28. Ray S, Britschgi M, Herbert C, Takeda-Uchimura Y, Boxer A, Blennow K, et al. Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nature medicine*. 2007;13(11):1359-62.
29. O'Bryant SE, Xiao G, Barber R, Reisch J, Doody R, Fairchild T, et al. A serum protein-based algorithm for the detection of Alzheimer disease. *Archives of neurology*. 2010;67(9):1077-81.

30. Zhang R, Barker L, Pinchev D, Marshall J, Rasamoeliso M, Smith C, et al. Mining biomarkers in human sera using proteomic tools. *Proteomics*. 2004;4(1):244-56.
31. Van Damme P, Van Hoecke A, Lambrechts D, Vanacker P, Bogaert E, van Swieten J, et al. Progranulin functions as a neurotrophic factor to regulate neurite outgrowth and enhance neuronal survival. *The Journal of cell biology*. 2008;181(1):37-41.
32. Matsuda N, Lu H, Fukata Y, Noritake J, Gao H, Mukherjee S, et al. Differential activity-dependent secretion of brain-derived neurotrophic factor from axon and dendrite. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(45):14185-98.
33. Tapia L, Milnerwood A, Guo A, Mills F, Yoshida E, Vasuta C, et al. Progranulin deficiency decreases gross neural connectivity but enhances transmission at individual synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(31):11126-32.
34. Sheng JG, Mrak RE, Rovnaghi CR, Kozlowska E, Van Eldik LJ, Griffin WS. Human brain S100 beta and S100 beta mRNA expression increases with age: pathogenic implications for Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 1996;17(3):359-63.
35. Marshak DR, Pesce SA, Stanley LC, Griffin WS. Increased S100 beta neurotrophic activity in Alzheimer's disease temporal lobe. *Neurobiology of aging*. 1992;13(1):1-7.
36. Mrak RE, Sheng JG, Griffin WS. Correlation of astrocytic S100 beta expression with dystrophic neurites in amyloid plaques of Alzheimer's disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 1996;55(3):273-9.
37. Chaves ML, Camozzato AL, Ferreira ED, Piazenski I, Kochhann R, Dall'Igna O, et al. Serum levels of S100B and NSE proteins in Alzheimer's disease patients. *Journal of neuroinflammation*. 2010;7:6.
38. Cutler NR, Kay AD, Marangos PJ, Burg C. Cerebrospinal fluid neuron-specific enolase is reduced in Alzheimer's disease. *Archives of neurology*. 1986;43(2):153-4.

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

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

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

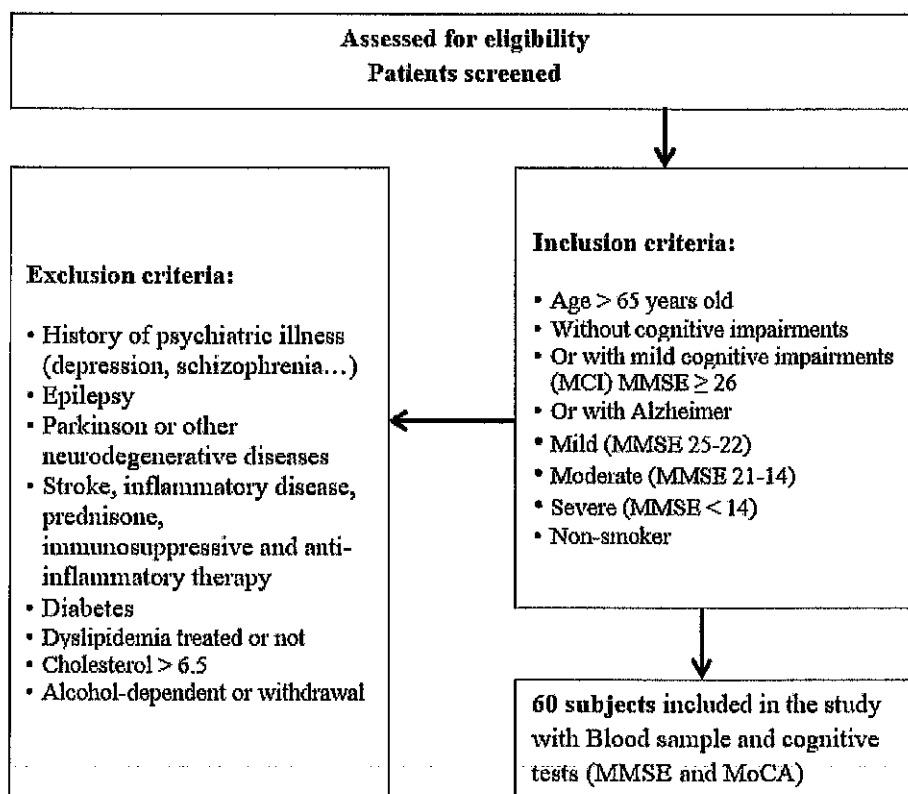
Table 2. Cutoff values to separate controls participants to MCI subjects

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

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

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

Figure 1: Inclusion and exclusion criteria of the study



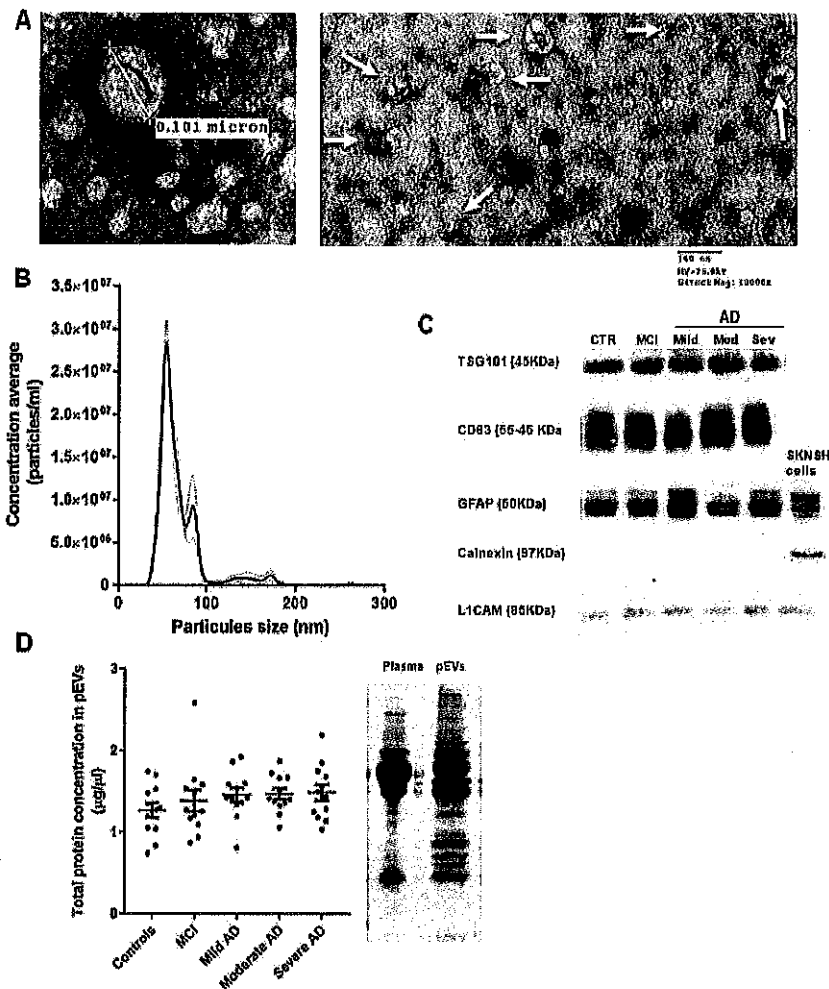


Figure 2. Characterization of total extracellular vesicles isolated from plasma (pEVs). Transmission electron microscopy images revealed the characteristic shape and size of pEVs from a control participant (A). Particles concentrations were analyzed by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) using Nanosight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

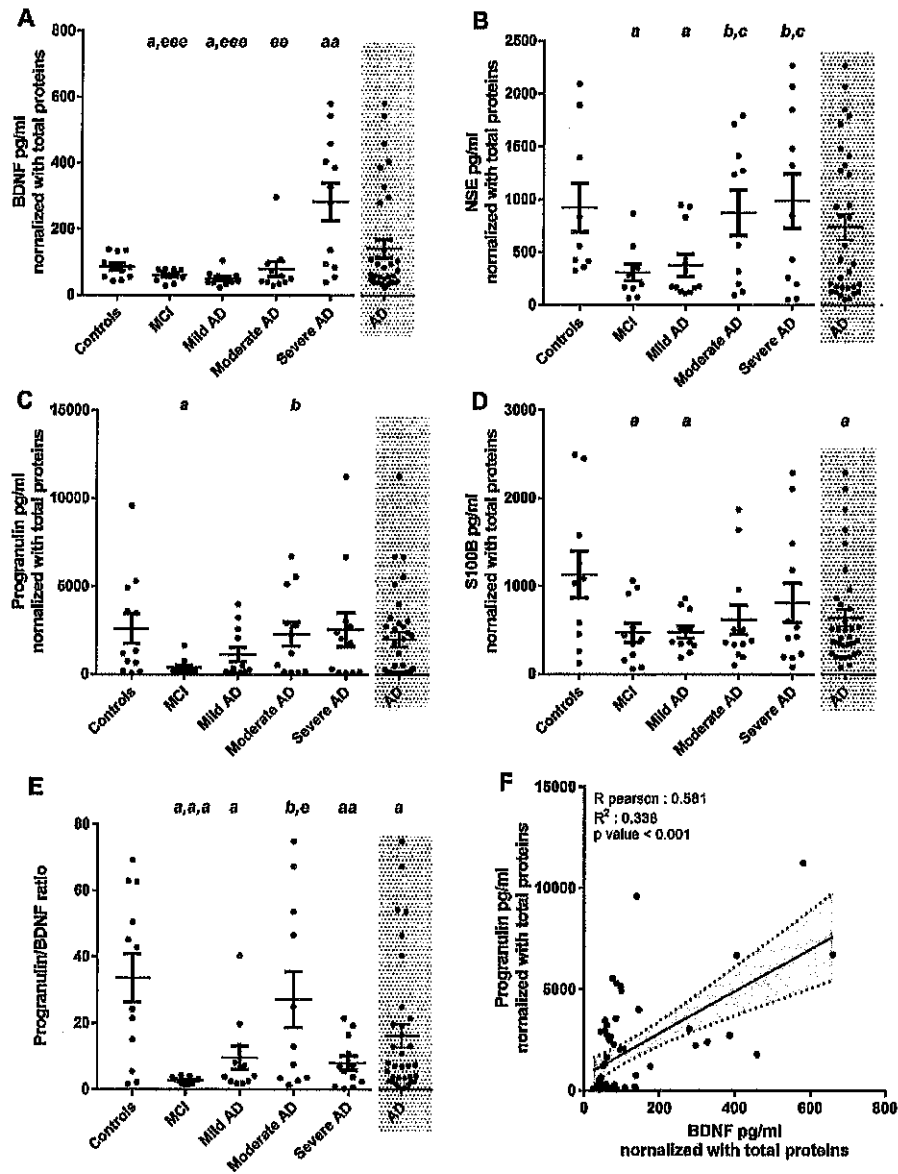


Figure 3. Levels of some brain derived proteins including BDNF, NSE, Progranulin and S100B (A-D) and the ratio of Progranulin/BDNF (E) in pEVs . Each point represents the value for one patient or control subject. The mean \pm SEM for each group is shown by a horizontal line and is expressed in pg/ml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

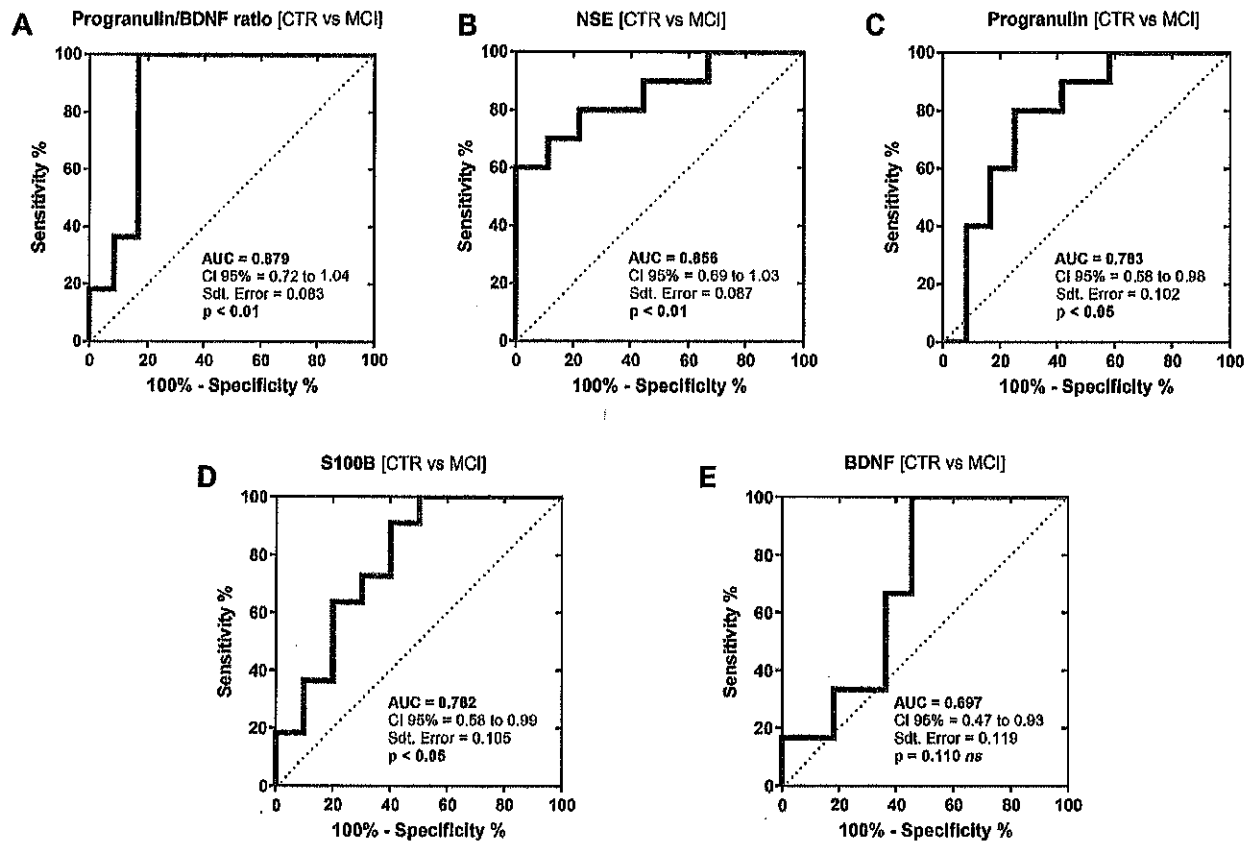


Figure 4. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. The plot represents the performance of the Progranulin/BDNF ratio (A) and the levels of NSE, Progranulin, S100B and BDNF in pEVs to differentiate control subjects to MCI subjects (B-E). Area under the curve (AUC) values, standard errors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

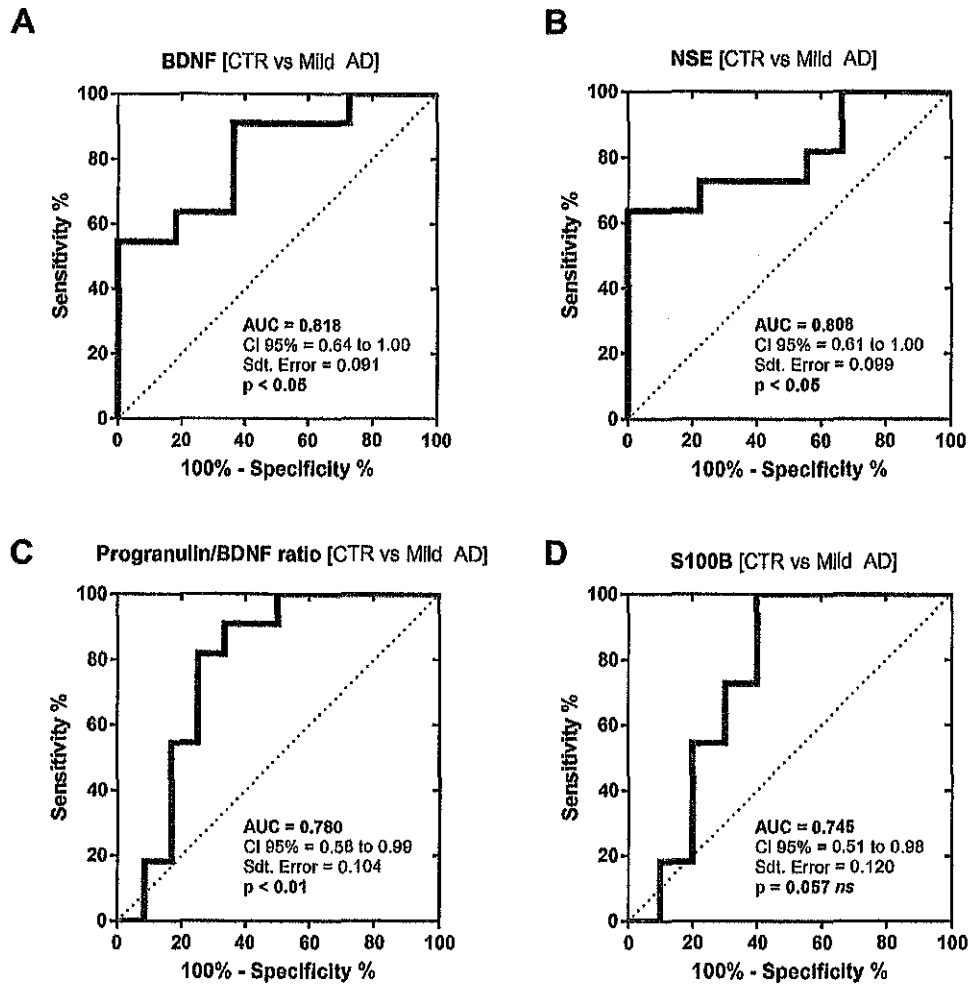


Figure 5. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. The plot represents the performance of levels of BDNF, NSE, the ratio of Progranulin/BDNF and levels of S100B in pEVs to differentiate control subjects to mild AD patients (A-D). Area under the curve (AUC) values, standard errors (Sdt.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

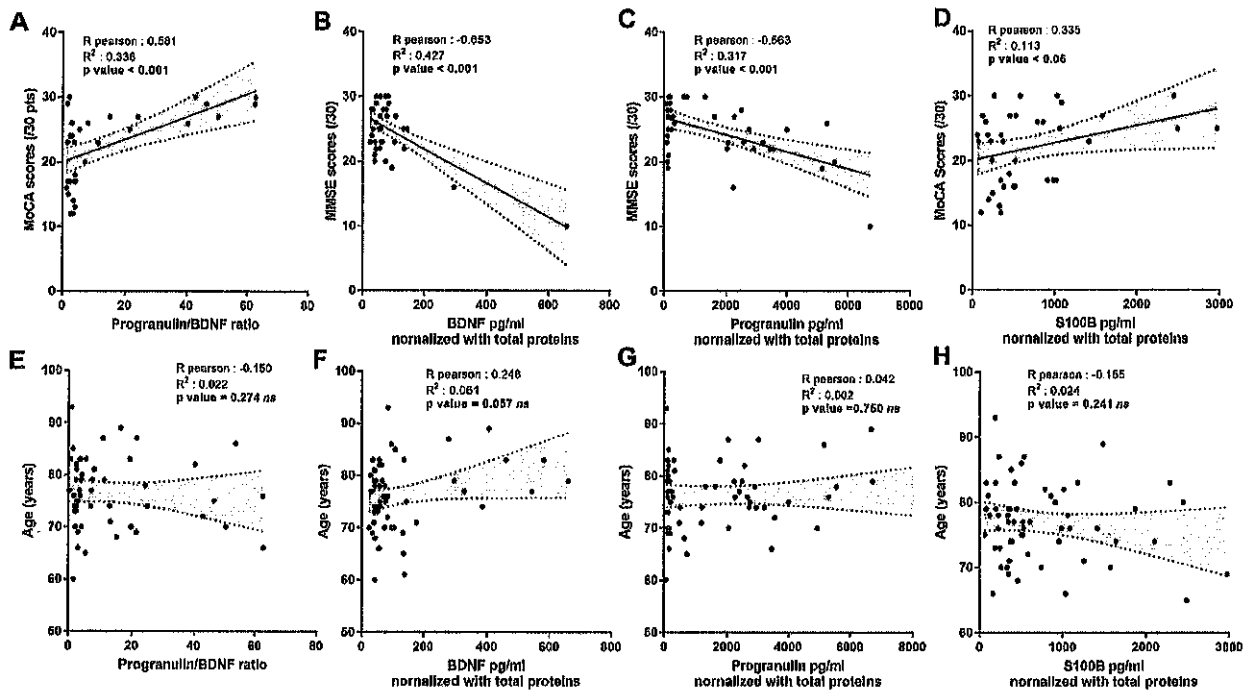
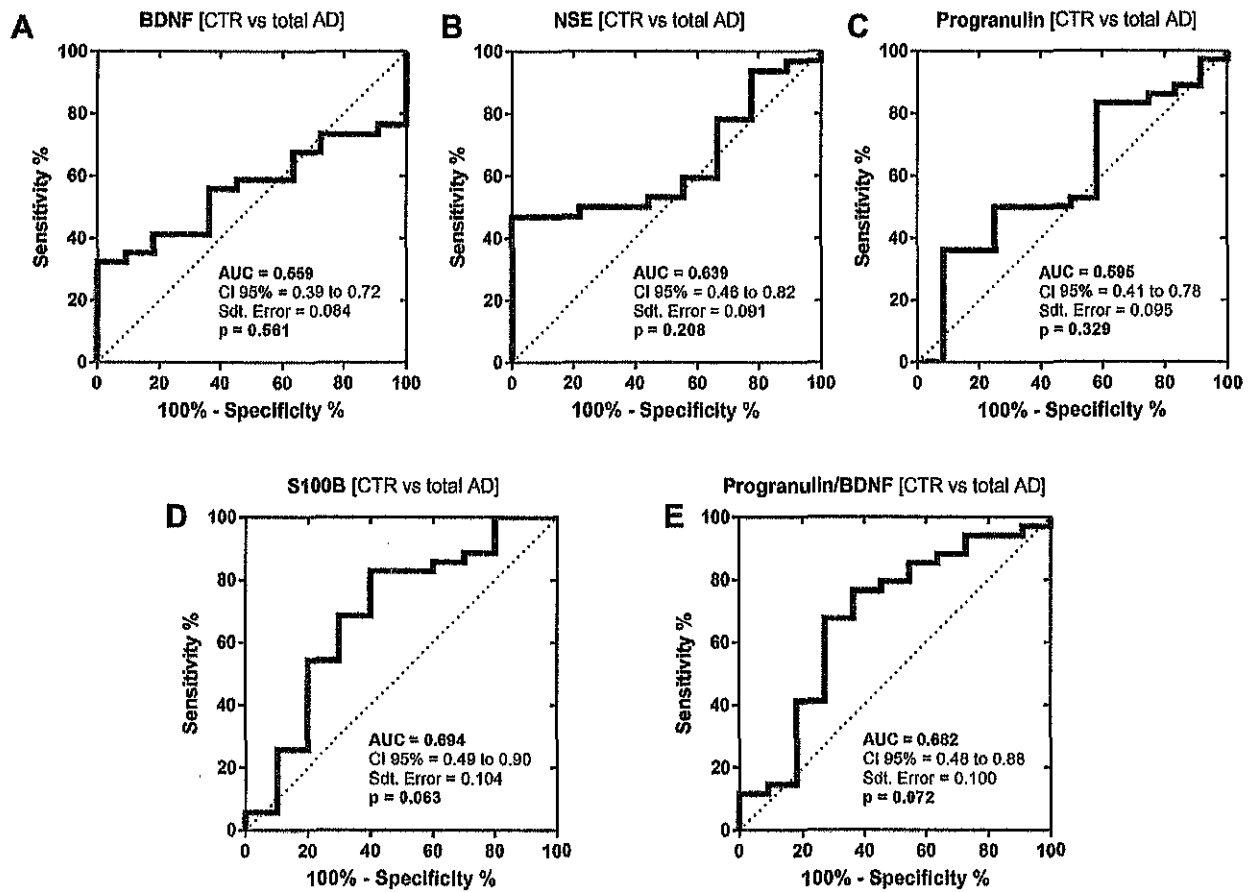
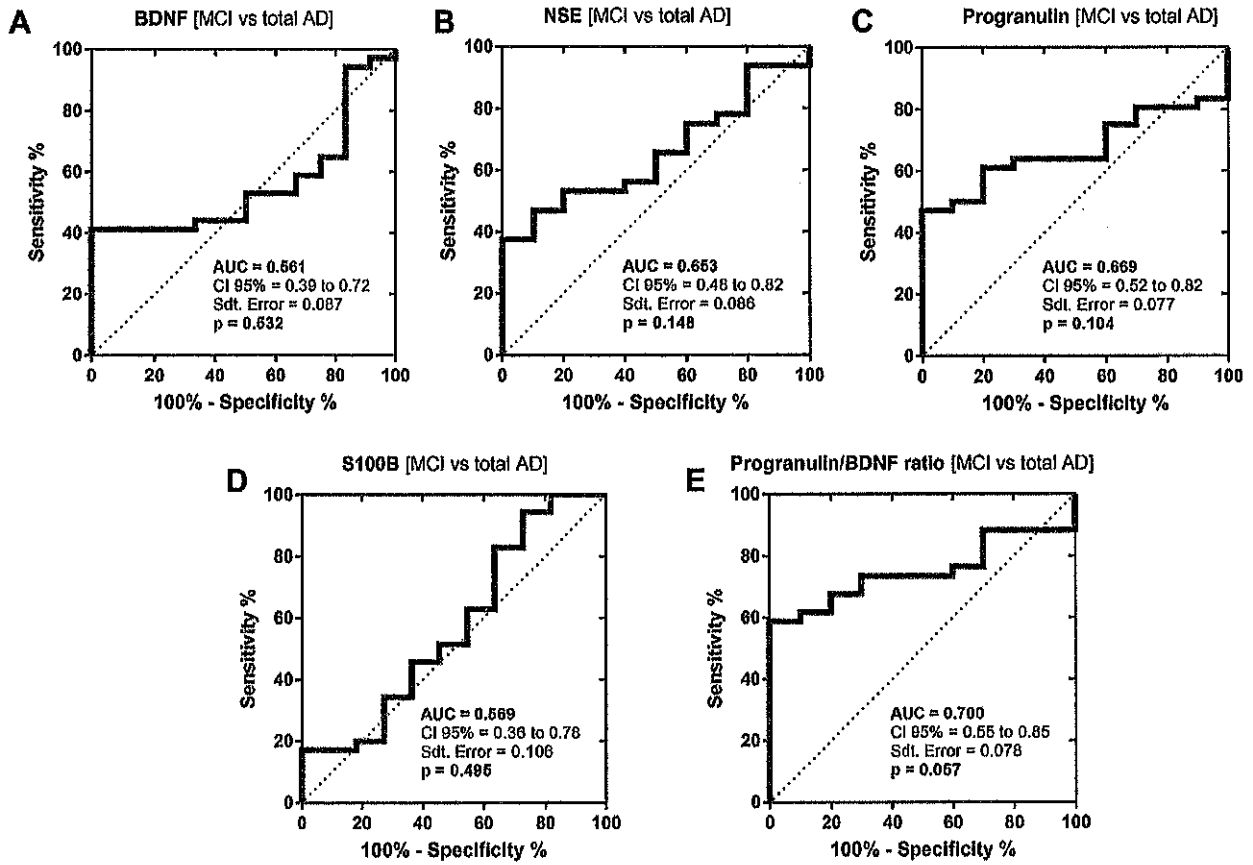


Figure 6. Correlation analysis with cognitive performances and age. Scatter plots of pEVs Progranulin/BDNF ratio in relation to MoCA scores (A) or age (E), pEVs BDNF levels in relation to MMSE scores (B) or age (F), pEVs Progranulin levels in relation to MMSE scores (C) or age (G) and pEVs S100B levels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



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



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

10 ANNEXE II : ARTICLE EN DEUXIÈME AUTEUR

Titre: Profile of pathogenic proteins in total circulating extracellular vesicles in mild cognitive impairment and during the progression of Alzheimer's disease

Auteurs de l'article : Morgane Perrotte ^{1,2,3} ; Mohamed Haddad ^{1,2} ; Aurélie Le Page ⁴ ; Eric H. Frost⁵, Tamàs Fulöp ⁴ ; Charles Ramassamy ^{1,2,3*}

1- INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada, Address : 531 Boulevard des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, CANADA

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

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

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

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

Statut de l'article : Publié dans le journal Neurobiology of Aging, Novembre 2019.

Abstract

Accumulating evidence suggests that the propagation of hyperphosphorylation of tau protein and the amyloid- β peptide can be mediated by extracellular vesicles (EVs) and be associated with the onset and the progression of Alzheimer's disease (AD). As EVs may transfer between the brain and the blood, we have thus hypothesized that the total plasma EVs (pEVs) may contain potential markers to predict the mild cognitive impairment (MCI) and AD progression. We have thus quantified AD-related proteins in isolated pEVs from controls, MCI and AD subjects. In pEVs, we observed early changes of total tau (tTau), amyloid precursor protein levels, and phospho-tau (pTau)-T181/tTau ratio from MCI subjects and late increases of Ab42 and pTau-T181 levels from patients with moderate AD. Interestingly, abnormal amyloid precursor protein levels and pTau-T181/tTau ratio in pEVs demonstrated a high accuracy to define MCI and AD staging. Although larger samples sizes will be needed to generate well-powered investigations, these preliminary results highlighted the potential of AD-related proteins enriched in pEVs as a sensitive tool for differentiating patients with MCI to patients with AD and monitoring AD progression

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

11 ANNEXE III : REVUES

Revue 1

Titre: Common Pathological Mechanisms and Risk Factors for Alzheimer's Disease and Type-2 Diabetes: Focus on Inflammation

Auteurs de l'article: Emmanuel Moyses¹, Mohamed Haddad², Camelia Benlabiod³, Charles Ramassamy² and Slavica Krantic⁴

1-INRA, UMR-85, University of Tours, Nouzilly, France

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

3-Institut Gustave Roussy, INSERM U1170, Villejuif, France

4-Inserm UMRS 938, St. Antoine Res Ctr, Paris, France

Statut de l'article : Publié dans le journal of Current Alzheimer Research, Octobre 2019.

Abstract

Background: Diabetes is considered as a risk factor for Alzheimer's disease, but it is yet unclear whether this pathological link is reciprocal. Although Alzheimer's disease and diabetes appear as entirely different pathological entities affecting the central nervous system and a peripheral organ (pancreas), respectively, they share a common pathological core. Recent evidence suggests that in the pancreas in the case of diabetes, as in the brain for Alzheimer's disease, the initial pathological event may be the accumulation of toxic proteins yielding amyloidosis. Moreover, in both pathologies, amyloidosis is likely responsible for local inflammation, which acts as a driving force for cell death and tissue degeneration. These pathological events are all inter-connected and establish a vicious cycle resulting in the progressive character of both pathologies.

Objective: To address the literature supporting the hypothesis of a common pathological core for both diseases.

Discussion: We will focus on the analogies and differences between the disease-related inflammatory changes in a peripheral organ, such as the pancreas, versus those observed in the brain. Recent evidence suggesting an impact of peripheral inflammation on neuroinflammation in Alzheimer's disease will be presented.

Conclusion: We propose that it is now necessary to consider whether neuroinflammation in Alzheimer's disease affects inflammation in the pancreas related to diabetes.

Keywords: Amyloidosis, Insulin resistance, Hyperglycemia, Vasculopathy, Innate immune response, Microglia, Cytokines, Advanced glycation end products.

Revue 2

Titre: Glutathione: an old and small molecule with great functions and new applications in the brain and in Alzheimer's disease

Auteurs de l'article: Mohamed Haddad^{1,2}, Vincent Hervé^{1,2}, Mohamed Raâfet Ben Khedher^{1,2}, Jean-Michel Rabanel¹, Charles Ramassamy^{1,2,*}

1 - INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie 531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7.

2- Institute on Nutrition and Functional Foods, Université Laval 2440, boulevard Hochelaga, Québec (Québec) Canada G1V 0A6.

Statut de l'article : Soumis dans le journal of Antioxidants & Redox Signaling.

Abstract

Glutathione (GSH) represents the most abundant and the main antioxidant in the body with important functions in the brain. In this review, we will summarize different factors involved in the synthesis of GSH and on the regulation of its homeostasis, its important role in different organelles and particularly in mitochondria. We will describe the impact of the ratio [GSH]/[GSSG] as rheostats of the activation of cell proliferation, apoptosis, necrosis or ferroptosis. We will highlight the important roles of GSH related–pathway thioredoxin, glutaredoxin and GSH systems in maintaining the redox balance in the brain. We will describe the important role of the antiporter glutamate/cysteine XC- on the crosstalk neuronal-astrocytes regulations to maintain GSH homeostasis in the brain.

Oxidative stress is one of the central mechanisms in Alzheimer's disease (AD). However, most of studies indicate that GSH levels in the brain were broadly not altered in AD but in peripheral the ratio GSH/GSSG decreased in mild cognitively impairment and AD patients. We and others have demonstrated the important role of GSH in AD, in particular in the detoxification of advanced glycation endproducts and of acrolein.

As the depletion of GSH appears to be associated to some age-related pathologies such as AD, we will discuss some current therapeutics approaches to increase the levels of GSH. Finally, we will explain how nanotechnology could be at the rescue of GSH deficit in brain cells and its application in innovative tools as ligands of nanocarriers to enhance brain delivery of active compounds.

12 ANNEXE IV: CHAPITRE DE LIVRE

Titre: Redox Based-Peripheral Biomarkers in Alzheimer's Disease: Challenges, Limits and Prospects

Auteurs: Morgane Perrotte, Joel Pincemail, **Mohammed Haddad**, and Charles Ramassamy

M. Perrotte • **M. Haddad** • C. Ramassamy (*)

-National Institute of Scientific Research- Armand Frappier Institute, Laval, QC, Canada

-Institute of Nutrition and Functional Foods, Laval University, Laval, QC, Canada

J. Pincemail

-Liège CHU Department of Cardiovascular Surgery and Antioxidant Nutrition and Health

-Platform, Sart Tilman, Liège 4000, Belgium

Statut du chapitre : Publié dans le livre : Inflammation, Aging and Oxidative Stress. Décembre 2016

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease with several preclinical and clinical stages. There is growing interest in investigating early biomarkers to adequately define the at-risk state which may ultimately allow preventive strategies and therapeutic agents for the disease- modifying status of AD. The validation of biomarkers for defining the preclinical state of mild cognitive impairment (MCI)/AD is the hope for defining a therapeutic window in which the brain remains responsive to treatment. Biomarkers characterized with neuroimaging and in CSF samples are highly accurate, but they remain difficult to generalize into clinical practice due to the high cost technology associated and the invasive nature. There is still an urgent need to extend these findings to peripheral tissue and fluids. Peripheral, blood or serum-based biomarkers present advantages because they are minimally invasive especially for large scale studies and for repeated measures. However, the search and validation of reliable peripheral biomarkers is a great challenge because blood profile represents an accumulation of the alterations in all tissues.

Cumulative studies have reported abnormal levels of antioxidants and oxidative stress in AD and in mild cognitive patients (MCI) in both the brain and the blood stream. There are still several controversial data that require more refine studies, with rigourous and frequent monitoring of these biomarkers during the course of cognitive decline.

13 ANNEXE V: ARTICLES EN PRÉPARATION

Titre: Regulation of Neurotrophic and Inflammatory Factors in Extracellular Vesicles as Potential Early Peripheral Markers for AD diagnosis: Impact of the Apolipoprotein E4 allele

Auteurs de l'article: Mohamed Raâfet Ben Khedher ^{1,2}, Mohamed Haddad ^{1,2}, Danielle Laurin^{3,4,5,6,7}, Charles Ramassamy ^{1,2,*}

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

2 -Institut sur la Nutrition et les Aliments Fonctionnels, Laval University, QC, Canada,

3 -Centre d'excellence sur le vieillissement de Québec, Québec, QC, Canada,

4 -CHU de Québec-Université Laval Research Center, Québec, QC, Canada,

5 -Department of social and preventive medicine, Faculty of medicine, Laval University, Québec, QC, Canada;

6 -Institute of nutrition and functional foods, Québec, QC, Canada,

7 -Faculty of pharmacy, Laval University, Québec, QC, Canada,

Statut de l'article : A soumettre dans le journal of Alzheimer's & Dementia.

Abstract

Introduction: Considerable body of evidence now links early disturbed endosomal pathway function to apolipoprotein E4 variant (ApoE- ϵ 4) and the risk of progression to Alzheimer's disease (AD). We tested the influence of ApoE- ϵ 4 presence on a candidate patterns of specialized neuronal proteins measured in peripheral extracellular vesicles (pEVs) and in plasma from cognitively impaired not demented (CIND) patients.

Methods: The levels of 15 neurodegenerative, neurotrophic and neuroinflammatory proteins were quantified in plasma and pEVs of healthy volunteers and CIND subjects stratified upon the presence of ApoE- ϵ 4 allele.

Results: The NPTX-2/ α -Syn ratio measured in pEVs was able to predict AD onset among ApoE- ϵ 4+ CIND individuals.

Discussion: Our findings support an active role of ApoE- ϵ 4 variant in altered endosomal protein processing and suggests that the pEVs NPTX-2/ α -Syn ratio can serve as a useful antemortem biomarker for AD susceptibility within CIND subjects.

Titre: Anti-oxidative and anti-glycation capacity of Cyanidin 3-O-galactoside and protective effect of neuronal cells against MG-induced toxicity

Auteurs de l'article: Haichao Wen^{*3}, Mohamed Haddad^{*1,2}, Charles Ramassamy^{1,2} and Jingming Li³

*: Co premier auteur

1 -INRS-Centre Armand-Frappier santé biotechnologie, Laval, QC, Canada,

2 -Institut sur la Nutrition et les Aliments Fonctionnels, Laval University, QC, Canada,

3 -China Agricultural University | CAU · College of Food Science and Nutritional Engineering, China

Statut de l'article : A soumettre dans le journal of Nutritional neuroscience.

Abstract

Methylglyoxal (MG) is a major precursor of advanced glycation end products (AGEs) formation. MG and AGEs are involved in the pathophysiology of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease. Anthocyanins are natural phenolic compounds that possess antiglycation activity. The main of this study is to determine whether a naturally occurring anthocyanin, cyanidin-3-O-galactoside (C3G) protect neuronal cells against MG-induced toxicity. We have evaluated the hydrogen peroxide (H₂O₂)-trapping capacity, the anti glycation and anti A β aggregation capacity of C3G. The effect of C3G on MG induced cellular oxidative stress and tau phosphorylation were evaluated used SK-N-SH neuronal cells. Our results showed that C3G reduced the formation of fluorescent AGEs in bovine serum albumin and in A β mediated by MG. Moreover, C3G reduced A β aggregation produced by A β and MG incubation. C3G directly trapped H₂O₂ in a concentration dependent manner. On neuronal cells challenged with MG and a glutathione inhibitor, low concentration of C3G improved neuronal survival. These neuroprotective effects were supported by a decrease in intracellular reactive oxygen species and hyperphosphorylated tau. These data suggest that C3G protects against MG-induced protein glycation and aggregation and oxidative damage by scavenging free radicals and MG. Here, using C3G could delay neuronal death in neurodegenerative diseases related to oxidative stress.