

Université de Sherbrooke

Identification d'une signature immune associée à la maladie d'Alzheimer

Par
Aurélie Le Page
Programme d'immunologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph.D.)
en immunologie

Sherbrooke, Québec, Canada
10 Mars, 2017

Membres du jury d'évaluation

Pr Tamàs Fülöp, directeur des travaux, département de médecine, programme
d'immunologie

Pr Gilles Dupuis, co-directeur des travaux, département de biochimie, programme
d'immunologie

Pr Abdelaziz Amrani, directeur du programme d'immunologie, département de pédiatrie,
programme d'immunologie

Pr Xavier Roucou, arbitre externe au programme, département de biochimie

Pr Joaquin Madrenas, arbitre externe à l'université de Sherbrooke, département
d'immunologie et de microbiologie, Université McGill

© Aurélie Le Page,

Il ne suffit pas de «voir» un objet jusque-là invisible pour le transformer en objet d'analyse... Il faut encore qu'une théorie soit prête à l'accueillir.

*La logique du vivant (1976)
François Jacob*

« La vieillesse n'explique rien sauf notre manque d'imagination »

*Société de médecine gériatrique Rhône-Alpes, Annecy, 26 avril 1980
Jean-Pierre Junod*

Résumé

Identification d'une signature immune associée à la maladie d'Alzheimer

Par Aurélie Le Page, Programme d'immunologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de philosophiae doctor (Ph.D.) en immunologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

La maladie d'Alzheimer (MA) est un désordre neurologique progressif et irréversible caractérisé par l'accumulation de peptides β -amyloïdes, de plaques amyloïdes et de dégénérescence neurofibrillaires. L'inflammation et des altérations du système immunitaire ont été reliées à la MA, suggérant que le système immunitaire périphérique pourrait jouer un rôle pendant la phase asymptomatique de la maladie. Les lymphocytes *natural killer* et les neutrophiles (PMN) participent à la surveillance immune innée et leurs rôles demeurent controversés dans la MA. Nous avons étudié les changements phénotypiques et fonctionnels des cellules NK et des PMN du sang périphérique dans une cohorte de patients composée de personnes âgées en bonne santé, de patients *amnesic mild cognitive impairment* (aMCI) et de personnes atteintes de la MA à un stade léger (mMA). L'analyse phénotypique des lymphocytes NK a révélé des différences d'expression de CD16 (augmenté chez les patients mMA), de NKG2A (diminué chez les patients aMCI), et des TLR2 et TLR9 (tous deux diminués chez les patients mMA). Les tests fonctionnels ont révélé que l'activité cytotoxique des lymphocytes NK ainsi que leur capacité de dégranulation étaient inchangés dans les 3 groupes de patients. Au contraire, l'expression du récepteur CD95 était augmentée chez les aMCI et mMA et l'expression de granzyme B et la production de cytokines telles que TNF α et IFN γ étaient augmentées chez les aMCI mais pas chez les patients mMA. Le chimiotactisme induit par la chimiokine CCL19 et non par CC21 était diminué chez les aMCI et mMA, malgré l'augmentation de l'expression du CCR7 chez les patients aMCI. L'analyse des PMN révèle une augmentation spécifique de l'expression de CD177 chez les patients mMA. La stimulation à l'IL-8 entraîne l'augmentation attendue de l'intégrine CD11b à la surface des PMN des patients âgés contrôles, mais les patients aMCI et mMA ne répondent pas. La baisse de l'expression des récepteurs CD14 et CD16 a été observée sur les PMN des patients mMA uniquement. Au contraire, seul les PMN des patients aMCI présentent une baisse de l'expression du marqueur CD88 et du TLR2. La phagocytose est différenciellement diminuée dans les PMN des patients aMCI et mMA tandis que l'ingestion de particules de Dextran est absente uniquement chez les patients mMA. Le *killing* contre *Candida albicans* est sévèrement diminué dans les groupes aMCI et mMA, alors que la production de radicaux libres est seulement diminuée au stade mMA. La production de cytokines inflammatoires (TNF α , IL-6, IL-1 β , IL-12p70) et de chimiokines (MIP-1 α , MIP-1 β , IL-8) en réponse à une stimulation au LPS est très basse chez les patients aMCI et absente chez les mMA. Ces résultats suggèrent un état d'activation des cellules NK chez les patients aMCI qui pourrait refléter une réponse immunitaire active dirigée contre une agression encore non identifiée. L'altération différentielle des capacités de réponse à des agressions pathologiques des PMN des patients aMCI et mMA pourrait se traduire par une baisse progressive de la réponse immune associée au développement de la MA.

Mots clés : maladie d'Alzheimer, système immunitaire, lymphocytes *natural killer*, PMN.

Table des matières

Résumé.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux.....	ix
Liste des abréviations.....	x
1 Introduction.....	1
1.1 Maladie d'Alzheimer.....	1
1.1.1 Généralités.....	1
1.1.1.1 Évolution du concept et définition.....	1
1.1.1.2 Épidémiologie.....	3
1.1.1.3 Plaques amyloïdes.....	5
1.1.1.4 Dégénérescences neurofibrillaires.....	9
1.1.1.5 Caractéristiques cliniques.....	11
1.1.1.6 Stade amnestic mild cognitive impairment (aMCI).....	12
1.1.2 Facteurs de risque et mécanismes associés.....	13
1.1.2.1 Age et sexe.....	13
1.1.2.2 Génétique.....	14
1.1.2.3 Composante traumatique et vasculaire.....	16
1.1.2.4 Autres facteurs de risque.....	21
1.1.2.4.1 Réserve cognitive.....	21
1.1.2.4.2 Dépression, stress et manque de sommeil.....	22
1.1.2.4.3 Déficit en acétylcholine.....	22
1.1.2.4.4 Agrégation.....	23
1.1.2.4.5 Hypométabolisme.....	23
1.1.2.5 Hypothèse amyloïde.....	23
1.1.3 Diagnostic et traitements.....	25
1.1.4 Biomarqueurs.....	26
1.2 Système immunitaire.....	27
1.2.1 Système immunitaire dans le cerveau et dans le sang périphérique.....	27
1.2.2 Système immunitaire de la personne âgée.....	32
1.2.3 Système immunitaire et MA.....	35
1.3 Lymphocytes <i>natural killer</i> (NK) et MA.....	38

1.4 Neutrophiles et MA	39
1.5 Lymphocytes T régulateurs et MA.....	39
1.6 Rationnel et hypothèse du travail.....	40
1.6.1 Objectifs de recherche.....	41
1.6.1.1 Objectif 1	41
1.6.1.2 Objectif 2	41
1.6.1.3 Objectif 3	41
2 Article 1	43
2.1 Avant-propos	43
2.2 Résumé.....	43
2.3 Article 1.....	44
3 Article 2	82
3.1 Avant-propos	82
3.2 Résumé.....	82
3.3 Article 2.....	83
4 Etude phénotypique des lymphocytes T régulateurs dans la cohorte de patients aMCI et de patients atteints de la MA.....	119
4.1 Matériels et Méthodes.....	119
4.2 Résultats et conclusions	122
4.3 Discussion	126
5 Discussion.....	127
Perspectives.....	136
Conclusions générales.....	137
6 Remerciements.....	140
7 Liste des références	141
8 Annexes	180

Liste des figures

Figures des chapitres 1 et 5, Introduction et Discussion

Figure 1 Métabolisme de l'APP par les sécrétases	7
Figure 2 Structure de la protéine APOE et de ses différentes isoformes.....	16
Figure 3 Sites d'entrée possibles des cellules immunitaires dans le SNC	31

Figures du chapitre 2, article 1

Figure 1 Distribution of CD56 phenotypes in NK cell subpopulation of healthy subjects, aMCI and mAD patients.	70
Figure 2 IL-12 and IL-18 receptor expression on NK cell populations of healthy subjects, aMCI and mAD patients	71
Figure 3 TLR expression by NK cells of healthy subjects, aMCI and mAD patients.....	72
Figure 4 Expression of activatory and inhibitory receptors by NK cell populations of healthy subjects, aMCI and mAD patients	73
Figure 5 Functional responses of activated NK cells of healthy subjects, aMCI and mAD patients.	74
Figure 6 Cytokine production by activated NK cells of healthy subjects, aMCI and mAD patients.	75
Figure 7 Chemokine receptor expression and chemotaxis in NK cells of healthy subjects, aMCI and mAD patients	76
Figure 8 CD16 expression in NK cell subpopulations of healthy subjects, aMCI and mAD patients.	77
Figure S1 NK cell subpopulations gating strategy	78
Figure S2 Senescence markers in NK cells of healthy subjects, aMCI and mAD patients	79
Figure S3 NK cells response to CpG stimulation of healthy subjects, aMCI and mAD patients.	79

Figures du chapitre 3, article 2

Figure 1 PMN viability in healthy subjects ad, aMCI and mAD patients	107
----------------------------------------------------------------------------	-----

Figure 2 Distribution of PMN in healthy subjects and, aMCI and mAD patients.....	108
Figure 3 Expression of the CD11b integrin on PMN and PMN chemotaxis of healthy subjects and, aMCI and mAD patients	109
Figure 4 Phenotypic characterization of PMN in healthy subjects and, aMCI and mAD patients	110
Figure 5 Phagocytosis activity of PMN of healthy subjects and, aMCI and mAD patients	111
Figure 6 PMN killing activity in healthy elderly and, aMCI and mAD patients.....	112
Figure 7 Reactive oxygen species production of PMN of healthy elderly and, aMCI and mAD patients	113
Figure 8 Cytokine production by PMN of healthy elderly and, aMCI and mAD patients .	114
Figure 9 Chemokine production by PMN of healthy elderly and, aMCI and mAD patients	115
Figure 10 Toll-like receptor expression on PMN of healthy elderly and, aMCI and mAD patients	116

Figures du chapitre 4, objectif 3

Figure 1 Stratégie de gating des LTreg.....	121
Figure 2 Distribution des lymphocytes Treg CD4 ⁺ foxp3 ⁺ et CD8 ⁺ foxp3 ⁺ parmi les lymphocytes totaux dans la cohorte de patients.....	122
Figure 3 Distribution des sous populations T CD4 foxp3 ⁺ CD25 ⁺ et CD25 ^{high} dans la population T CD4	123
Figure 4 Expression des marqueurs CD25 et CD28 à la surface des lymphocytes Treg. ...	124
Figure 5 Expression du marqueur CCR4 à la surface des lymphocytes Treg	125

Figures en annexe, cohorte

Figure 1 Formulaire de consentement	186
Figure 2 Composition de la cohorte de patient : nombre de patient, répartition homme-femme et âge	209
Figure 3 Test MMSE (ou test de Folstein)	211
Figure 4 Test MoCA	213

Figure 5 Résultats des tests MMSE et MoCA des patients de la cohorte.....	215
Figure 6 Mesure des fonction rénales des patients de la cohorte.....	216
Figure 7 Mesure des fonctions hépatiques des patients de la cohorte	217
Figure 8 Dosages hormonaux des patients de la cohorte.....	218
Figure 9 Mesure de la coagulation sanguine des patients de la cohorte	219
Figure 10 Mesure du métabolisme glucidique, lipidique et protéique des patients de la cohorte	222
Figure 11 Dosage sanguin des vitamines B12, B9 et D des patients de la cohorte	223
Figure 12 Numération Formule Sanguine des patients de la cohorte	225
Figure 13 Répartition du génotype APOE dans les 5 groupes de patient de la cohorte	226
Figure 14 Résultats cliniques analysés en fonction du groupe de patient et du génotype APOE.....	232
Figure 15 Répartition des patients en fonction de leur sérologie au Cytomegalovirus et du groupe de patient.....	233
Figure 16 Résultats cliniques analysés en fonction du groupe de patient et de la sérologie au Cytomegalovirus.....	239

Liste des tableaux

Tableaux des chapitres 1 et 5, Introduction et Discussion

Tableau 1 Distribution des populations cellulaires sanguines chez l'homme28

Tableau 2 Tableau récapitulatif des altérations identifiées..... 130

Tableaux du chapitre 2, article 1

Tableau 1 Patients' clinical data77

Tableau S1 Primary antibodies used for cytofluorimetric analysis of NK cells.....80

Tableaux du chapitre 3, article 2

Tableau 1 Patients' clinical data..... 117

Tableau S1 Fluorochrome-conjugated primary antibodies used for cytofluorimetric analysis
of PMN 118

Tableaux de l'annexe, cohorte

Tableau 1 Évolution des patients de la cohorte240

Liste des abréviations

¹⁸ F-FDG	¹⁸ F-Fluorodésoxyglucose
aa	Acides aminés
ADN	Acide désoxyribonucléique
AICD	Domaine intracellulaire de l'APP
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
AL	Alzheimer léger
AM	Alzheimer modéré
aMCI	<i>Amnesic mild cognitive impairment</i>
APH-1	<i>Anterior pharynx defective 1</i>
APOE	Apolipoprotéine E
APP	Protéine précurseur des peptides amyloïdes
APPsβ	Fragment soluble β de la protéine précurseur des peptides amyloïdes
ARN	Acide ribonucléique
AS	Alzheimer sévère
BACE1	Enzyme-1 clivant le site β de l'APP
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BUN	<i>Blood urea nitrogen</i>
CAM	Complexe d'attaque membranaire
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDK5	Kinase cycline dépendante 5
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
COX 2	Cyclo-oxygénase 2
CRP	Protéine C réactive
DNF	Dégénérescence neuro-fibrillaire
DSM	Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux
DSTA	Démence sénile de type Alzheimer
DT2	Diabète de Type 2

DTA	Démence de type Alzheimer
EOAD	<i>Early onset Alzheimer's disease</i>
GSK3	Glycogène synthase kinase 3
HDL	Lipoprotéine de haute densité
IDE	Enzyme dégradant l'insuline
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IMC	Indice de masse corporel
IRM	Imagerie à résonance magnétique
LDL	Lipoprotéine de basse densité
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LOAD	<i>Late onset Alzheimer disease</i>
MA	Maladie d'Alzheimer
MBD	Domaine de liaison aux microtubules
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>
MMSE	<i>Mini-mental state evaluation</i>
MoCA	<i>Montreal cognitive assesment</i>
NGF	Facteur de croissance des nerfs
NINCDS-ADRDA	Institut national de neurologie et des désordres de communication et des attaques cérébro-vasculaires - association pour la maladie d'Alzheimer et autres troubles associés
NK	<i>Natural killer</i>
NLR	Récepteurs de type NOD
NMDA	<i>N-méthyl-D-aspartate</i>
OMS	Organisation mondiale de la santé
Pen-2	<i>Presenilin enhancer 2</i>
Peptides A β	Peptides β -amyloïdes
PiB	Composé B de Pittsburgh
PMA	Phorbol-myristate-13 acétate
PPAR γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>
PrPc	Protéine prion cellulaire

PSEN1	Préséniline 1
RAGE	Récepteurs des produits finaux de glycation avancée
RONS	Espèces réactives azotées
ROS	Espèces réactives oxygénées
SEP	Sclérose en plaque
SNC	Système nerveux central
T4	Thyroxine
TEP	Tomographie à émission de positron
TLR	Récepteur de type Toll
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TSH	Thyréostimuline
Treg	T régulateur
VLDL	Lipoprotéine de très faible densité

1 Introduction

La compréhension et le traitement de la maladie d'Alzheimer (MA) demeurent aujourd'hui l'un des plus grands défis de la recherche biomédicale.

1.1 MALADIE D'ALZHEIMER

1.1.1 GÉNÉRALITÉS

1.1.1.1 ÉVOLUTION DU CONCEPT ET DÉFINITION

L'histoire des démences séniles commence dès le 7^{ème} siècle avant Jésus Christ, avec la description du cycle de la vie en 4 étapes par le médecin grec Pythagore. Les 2 derniers stades débutant respectivement à 63 et 81 ans, constituent le ``senium`` ou ``l'âge d'or``, définis comme une période de déclin et de détérioration du corps humain et des capacités mentales. Selon les écrits des philosophes grecques Hippocrate, Platon et Aristote, le déclin cognitif est associé au vieillissement. Bien qu'ayant une étiologie organique, la démence sénile représente une inévitable conséquence du vieillissement (Berchtold et Cotman, 1998). Par la suite Galien inclus les démences ``morosis`` dans sa liste des maladies mentales et l'âge comme une condition associée aux démences (Torack, 1983). La civilisation gréco-romaine pose ainsi les fondations de l'usage du mot sénile, de son sens originel ``d'âge avancé`` il évolue vers le sens actuel de ``dément``.

Au 2^{ème} siècle avant Jésus Christ, Cicéron, le philosophe romain, avait observé avec perspicacité que la ``débilité sénile`` ``senilis stultitia`` ne concernait pas tous les hommes âgés. Il suggérait qu'une activité mentale pouvait prévenir ou ralentir la diminution des capacités mentales. La démence n'est plus alors une conséquence du vieillissement. Mais cette théorie ne prend pas racine. L'obscurantisme scientifique du Moyen Age n'apporte que très peu d'avancées dans le domaine médical, exception faite de la fonction du cerveau

qui devient le siège de la pensée et de la mémoire (Berchtold et Cotman, 1998). Il faut attendre le 16^{ème} siècle et le 19^{ème} siècle, pour qu'il y ait une distinction entre perte de la raison et perte de la mémoire et que la folie ne soit plus considérée comme un crime mais comme une maladie (Hunter et Macalpine, 1982). On passe progressivement de la chasse aux sorcières à la création d'institutions sous la période des humanistes (Berchtold et Cotman, 1998). Au 18^{ème} siècle, Cullen procède à classer l'ensemble des maladies avec une section pour les maladies de type ``neuroses`` (*nervous diseases*). Sous cette classification, la démence sénile ``ementia senilis`` apparaît pour la première fois. Elle y est définie comme un ralentissement de la perception et de la mémoire avec l'âge (Hunter et Macalpine, 1982).

Le 17^{ème} siècle et le 18^{ème} siècle, se traduisent par la recherche des changements physiologiques et en particuliers anatomiques dans le cerveau à l'origine des troubles mentaux. Matthew Baillie, un médecin anglais, a été le premier à dénoter une atrophie cérébrale chez un patient âgé dément (Torack, 1983). Mais il faut attendre 1864, avec Wills, pour que cette atrophie cérébrale soit associée à la baisse du poids du cerveau (Wilks, 1864). Rapidement, l'atrophie cérébrale est associée à la mort cellulaire. L'étude anatomique et cellulaire du cerveau est alors lancée. Aloïs Alzheimer, Otto Binswanger et Oskar Fisher en sont les précurseurs. Ils décrivent l'atrophie artériosclérotique du cerveau. Fisher décrit pour la première fois la présence de plaques amyloïdes qu'il nomme ``miliary sclerosis`` (Berchtold et Cotman, 1998). En 1906, Aloïs Alzheimer, un neuropathologiste allemand, à la 37^{ème} conférence des psychiatres allemands et par la suite dans une publication scientifique, décrit le cas d'une patiente, Augusta D. âgée de 51 ans et décédée à 54 ans ne correspondant alors à aucune classification des maladies mentales. Il relève des troubles de la mémoire, du langage, et d'autres fonctions cognitives. Il mentionne notamment une désorientation dans l'espace et dans le temps, des difficultés à comprendre des situations, des modifications de la personnalité (paranoïa), des hallucinations et des idées délirantes (Alzheimer et al., 1995; Alzheimer, 1907). Grâce à l'utilisation des nouvelles techniques histologiques de coloration à l'argent développées par Bielschowsky (Bielschowsky, 1903), il décrit pour la première fois des lésions cérébrales de type plaques séniles et des dégénérescences neurofibrillaires (DNF) sur une coupe de cerveau en post mortem (Alzheimer et al., 1995; Alzheimer, 1907). Il met ainsi en évidence des

caractéristiques anatomiques associées à une neurodégénération suggérant l'identification d'une nouvelle classe de malades. Émile Kraepelin, un des pères de la psychiatrie moderne, dans la 8^{ème} édition de son manuel de psychiatrie en 1910 énonce le terme de maladie d'Alzheimer en référence à la description des cas de démence préséniles. Il élabore en détail les observations comportementales associées avec les démences séniles et la MA, de même que les pertes de mémoire associées (Berchtold et Cotman, 1998).

Certains médecins revendiquaient que les changements associés à la MA étaient plus sévères que ceux des démences séniles et que l'atrophie neuronale était plus grande, mais les preuves contraires s'accumulèrent pour ne laisser place qu'au seul paramètre de l'âge comme facteur différenciateur (Mutrux, 1953; Berchtold et Cotman, 1998). Devant la similitude des symptômes cliniques et des observations anatomiques et cellulaires les deux concepts furent unifiés à la fin des années 70 sous le terme de démence sénile de type Alzheimer DSTA (Hunter et Macalpine, 1982). Dans les années 70, avec le développement des techniques d'imagerie médicales, la conceptualisation de la maladie reprend son essor. On adopte le terme de démence de type Alzheimer (DTA), puis de maladie d'Alzheimer (MA). La MA se définit alors comme une maladie neurodégénérative qui est caractérisée par des pertes de mémoire et un déclin cognitif, souvent associés à des troubles du comportement (Vellas et Robert, 2013). Dans le nouveau manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM-5) publié par l'Association Américaine de Psychiatrie en 2013, le terme de démence est remplacé par trouble neurocognitif.

1.1.1.2 ÉPIDÉMIOLOGIE

Neuf cent millions de personnes sont âgées de plus de 60 ans dans le monde. Cinq à huit pourcent de ces personnes âgées sont atteintes de démence à un moment donné de leur vie (Prince et al., 2015). Sachant que 60% à 80% de ces démences dans le monde sont de type Alzheimer (Prince et Jackson, 2009), on dénombre aujourd'hui 47.5 millions de personnes affectées par la MA dans le monde, soit un peu plus que la population du Canada (Prince et al., 2015).

Cinquante-huit pourcent de ces malades vivent dans un pays à revenu faible ou intermédiaire dont 49% en Asie, 25% en Europe, 18% en Amérique et 8% en Afrique.

Avec le vieillissement de la population, en particulier avec le vieillissement de la génération des ``baby boomers`` et la baisse de la fertilité, le nombre de malades est en constante augmentation. Le nombre de personnes atteintes de démences augmenterait de 116% dans les pays à revenus élevés, de 225% dans les pays à moyen revenu, et de 264% dans les pays à faibles revenus (Prince et al., 2015). En 2009, le rapport mondial sur la maladie d'Alzheimer publié par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) dénombrait 7.7 millions de nouveaux cas chaque année et estimait à 115.38 millions le nombre de personnes atteintes de démences d'ici 2050 (Prince et Jackson, 2009). Selon les dernières études de l'OMS publiées en 2015, ces chiffres sont passés à 9.9 millions de nouveaux cas par an et les prédictions ont été revues à 135.5 millions de malades d'ici 2050 (Prince et al., 2015). La Société Alzheimer du Canada estime à 747 000 le nombre de malades au Canada en 2012 et à une augmentation jusqu'à 1.4 million de cas d'ici 2031 (Alzheimer Society of Canada, 2012).

A 65 ans, le risque de développer la MA est de 9% pour les hommes et de 17% pour les femmes. A 75 et 85 ans, ces chiffres augmentent respectivement à 10% et 12% pour les hommes et, à 19% et 20% pour les femmes (Seshadri et al., 2006; Alzheimer's Association, 2015). Cette maladie affecte d'avantage les femmes que les hommes. L'âge et le sexe sont donc les principaux facteurs de risque de la MA. Lorsque la MA affecte une personne de plus de 65 ans, on parle dans ce cas de LOAD pour *Late Onset Alzheimer Disease*. Il s'agit alors d'une maladie d'origine sporadique. Cependant, cette maladie ne se présente pas uniquement après l'âge de 65 ans, puisque 1% à 5% des cas de la MA concernent des personnes âgées de moins de 65 ans (Bekris et al., 2010). On parle de EOAD pour *Early Onset Alzheimer Disease*, une maladie à composante génétique. La LOAD est donc une maladie associée au vieillissement au contraire de la EOAD qui est différente du vieillissement puisque des personnes jeunes peuvent la développer. De plus, la vitesse d'évolution de la maladie varie selon les individus. En moyenne, les personnes âgées de plus de 65 ans diagnostiquées pour la MA ont une survie de 4 à 8 ans suivant le diagnostic, mais certaines personnes peuvent vivre jusqu'à 20 ans avec la MA, suggérant l'intervention d'autres facteurs (Ganguli et al., 2005; Helzner et al., 2008; Xie et al., 2008; Alzheimer's Association, 2015).

Le cout global des démences ne cesse d'augmenter, il a été revu à la hausse par l'OMS, soit de 604 milliards en 2010 à 818 milliards en 2015. La prise en charge de la MA se distribue entre des coûts médicaux (20%), des coûts pour les soins sociaux (40%) et des coûts de soins informels (40%) (Wimo et Prince, 2010; Prince et al., 2015). Avec un coût de prise en charge important, la MA est de fait un important enjeu sanitaire, économique et scientifique.

1.1.1.3 PLAQUES AMYLOÏDES

En 1907, Aloïs Alzheimer avait noté la présence d'une substance spéciale dans le cortex entourant les DNF (Alzheimer, 1907; Alzheimer et al., 1995). Ce n'est qu'en 1984 que cette substance sera isolée, purifiée et identifiée comme un peptide de 4.2 kDa de 40 et 42 résidus d'acides aminés (aa) (Glenner et Wong, 1984). Ces peptides sont nommés peptides A β ou bêta-amyloïdes. En 1987, Kang et collaborateurs clonent la protéine précurseur des peptides amyloïdes (APP) (Kang et al., 1987). Ainsi les plaques amyloïdes anciennement appelées plaques séniles sont le résultat de l'agrégation et de l'accumulation anormales de peptides (peptides A β ou bêta-amyloïdes) dans le milieu extracellulaire.

L'APP est une protéine à un domaine transmembranaire unique de type I possédant un large domaine extracellulaire. La fonction physiologique de l'APP demeure mal définie et est le plus souvent étudiée dans des modèles murins. Un rôle trophique de l'APP est la fonction la mieux définie (Thinakaran et Koo, 2008). Notamment, la baisse des niveaux d'APP par l'introduction d'une construction APP anti-sens dans des fibroblastes induit une croissance ralentie de ces cellules (Saitoh et al., 1989). D'autre part, une participation de l'APP dans des processus d'adhésion cellulaire a été suggérée à travers les motifs d'adhésion RHDS (Thinakaran et Koo, 2008). L'épissage alternatif de l'APP génère 8 isoformes, dont les 3 plus communes sont celles de 695 aa majoritairement exprimée dans le cerveau, et les formes de 751 et 770 aa qui sont ubiquitaires (Bayer et al., 1999). L'APP subit des modifications post-traductionnelles de type *N*- et *O*-glycosylation sur des résidus asparagine et sérine et thréonine de son domaine extracellulaire et des phosphorylations et des sulfonations de résidus tyrosine cytoplasmiques (Thinakaran et Koo, 2008). Les processus menant à la production des peptides β -amyloïdes sont maintenant bien décrits

(Fig. 1, page suivante). L'APP est normalement clivée extracellulairement par une enzyme membranaire de type α -sécrétase, résultant en la coupure entre un résidu lysine et un résidu leucine de presque la totalité du domaine extracellulaire, générant ainsi un fragment d'APP soluble β (APPs β) (Perez et al., 1999; Miller et al., 2006). Par la suite, le fragment C-terminal intramembranaire de l'APP est clivé par une enzyme de type γ -sécrétase qui libère dans le milieu extracellulaire un peptide de 3kDa p3 et un polypeptide cytoplasmique AICD (domaine intracellulaire de l'APP). Dans le processus amyloïdogénique, l'APP n'est plus clivée par l' α -sécrétase mais par une β -sécrétase, une aspartyl protéase neuronale nommée BACE1, pour Enzyme-1 Clivant le site β de l'APP (Vassar, 2004), générant alors un fragment extracellulaire APPs β . Ce fragment est clivé par la γ -sécrétase ce qui génère les peptides A β extracellulaires et le polypeptide cytoplasmique AICD. (Querfurth et LaFerla, 2010; Thinakaran et Koo, 2008). La γ -sécrétase a de multiples sites de clivage générant des peptides A β de 38 à 43 résidus (Selkoe et Wolfe, 2007) . Quatre-vingt-dix pourcent des peptides A β se terminent par le résidu 40, le reste se compose de peptides de 42 aa et de très minoritaires peptides A β 37 et A β 38. Les formes A β 42 sont plus hydrophobes et sont celles retrouvées dans les plaques amyloïdes (Jarrett et al., 1993; Younkin, 1998).

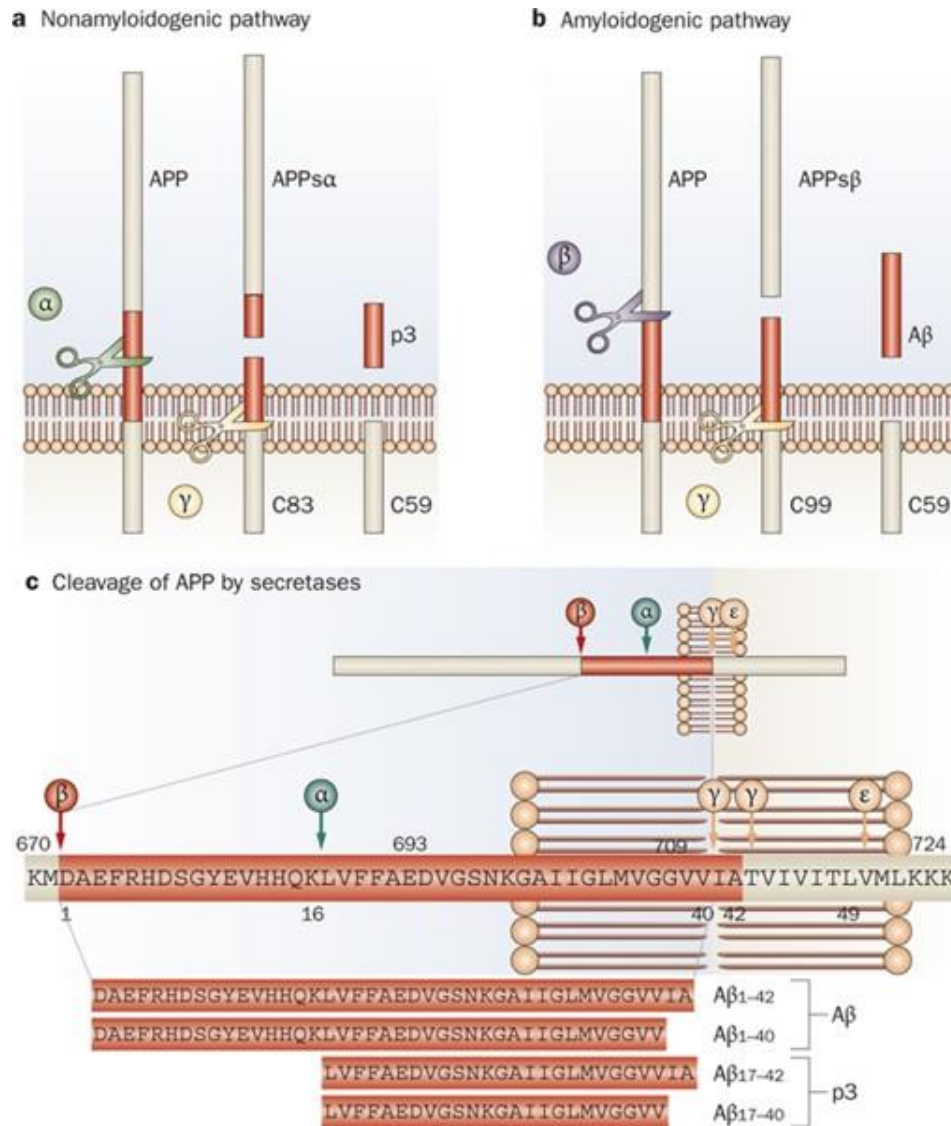


Figure 1. Métabolisme de l'APP par les sécrétases suivant la voie non-amyloïdogénique (a), la voie amyloïdogénique (b), et les sites de coupure de l'APP par les sécrétases (c). APPs α : protéine amyloïde précurseur soluble fragment α , APPs β : protéine amyloïde précurseur soluble fragment β , p3 : peptide p3, A β : peptide amyloïde- β , α : α -sécrétase, β : β -sécrétase, γ : γ -sécrétase, C59, C83, C99 : fragments C59, C83 et C99 (d'après De Strooper et al. 2010).

La γ -sécrétase se compose de 4 sous-unités, soient une enzyme, la préséniline 1 ou 2 (PSEN1 ou PSEN2), une glycoprotéine, la nicastrine (Yu et al., 2000), la protéine APH-1 (*Anterior PHarynx defective 1*) et une protéase la *Presenilin ENhancer 2* (Pen-2) (Iwatsubo, 2004; Zhang et al., 2014). Seulement 10% environ de l'APP est associée à la

membrane plasmique, la majorité étant localisée dans l'appareil de Golgi ou le système trans-Golgi (Thinakaran et Koo, 2008). Un motif d'internalisation YENPTY comprenant les résidus 682 à 687 en C-terminal, participe à une endocytose rapide et à l'entrée rapide dans les endosomes avec un recyclage vers la membrane plasmique ou une dégradation vers les lysosomes (Thinakaran et Koo, 2008). Le clivage par l' α -sécrétase permettrait le passage de l'APP à travers la membrane plasmique (Sisodia, 1992), tandis que le clivage par BACE1 se ferait dans les compartiments de type Golgi tardif, dans le réseau trans-Golgi et dans les endosomes (Koo et Squazzo, 1994). Ces observations sont en accord avec les résultats obtenus avec des lignées cellulaires de type neuroblastome où les peptides A β sont localisés surtout dans le réseau trans-Golgi et les endosomes. Enfin, un ensemble d'études démontre que le processus amyloïdogénique se déroulerait dans les microdomaines d'organelles intracellulaires de type radeaux lipidiques, structure enrichie en cholestérol et en sphingolipides (Riddell et al., 2001; Eehalt et al., 2003; Vetrivel et al., 2004; Vetrivel et al., 2005). Les mécanismes et implications d'une telle observation sont encore sous études.

Le rôle physiologique des peptides A β demeure obscur. Ces peptides sont reconnus par une variété de récepteurs dont ceux de la famille des TLR (« *toll like receptor* »), des récepteurs poubelles CD36, des récepteurs intracellulaires de type NLR (« *NOD-like receptor* »), des récepteurs des produits finaux de glycation avancée (RAGE), des canaux ioniques, des récepteurs tyrosine kinase, la protéine prion cellulaire (PrPc) et, récemment des récepteurs non canoniques du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (CMH-I) (El Khoury et al., 2003; Glass et al., 2010; Kim et al., 2013; Benilova et De Strooper, 2013). La particularité de ces peptides réside dans leur structure et dans leur capacité à s'agréger. Ils forment des oligomères, des protofibrilles et des fibrilles organisées en feuillet β insolubles (Fändrich, 2007; Fändrich et al., 2011). Les formes fibrillaires peuvent être détectées en histologie par le colorant organique rouge de Congo et la thioflavine T, un sel benzothiazolé (ces produits sont hydrophobes, ils ne traversent donc pas la barrière hémato-encéphalique (BHE)) (Maezawa et al., 2008). Un analogue radioactif de la thioflavine T, le composé B de Pittsburgh PiB est utilisé en imagerie par tomographie à émission de positron (TEP) pour localiser les peptides A β dans le cerveau (Johnson et al., 2012). Les fibrilles constituent le corps dense des plaques amyloïdes et s'accumulent le long de la paroi des vaisseaux sanguins cérébraux et sont donc à l'origine des angiopathies

cérébrales amyloïdes (Jakob-Roetne et Jacobsen, 2009). L'étude de leur structure anatomique demeure un défi (Fändrich et al., 2011). Le nombre de plaque et les niveaux d'A β insoluble corrèlent avec l'extension de la mort neuronale et la diminution cognitive (McLean et al., 1999), tandis que les niveaux d'oligomères solubles corrèlent avec la progression de la MA (Cavallucci et al., 2012; Jack et al., 2013). De plus, il existe une accumulation intracellulaire de peptides A β dans les neurones (LaFerla et al., 2007), ce qui pourrait être un évènement précoce à l'apparition des DNF et des plaques amyloïdes (Gouras et al., 2000; Capetillo-Zarate et al., 2012). La toxicité de la forme soluble s'exercerait à partir de faible concentration, en induisant la réduction de la densité des dendrites des neurones ainsi que le nombre de synapses électrophysiologiquement actives (Lacor et al., 2007; Shankar et al., 2007; 2008; Palop et Mucke, 2010). Les peptides A β endogènes participeraient aux mécanismes de la mémoire. En effet, ils seraient essentiels à l'induction d'une potentialisation à long terme dans l'hippocampe et de la mémoire. De plus, lors du fonctionnement de la mémoire, la production d'A β 42 serait augmentée (Puzzo et al., 2011).

La répartition des peptides A β est plus diffuse que celle des DNF dans la MA. Le néocortex est envahi en premier lieu, suivi de la région de l'hippocampe puis des noyaux sous-corticaux et du cervelet. La présence de peptides amyloïdes est nécessaire mais non suffisante. Vingt-cinq à trente pourcent des personnes âgées en bonne santé présentent des dépôts de peptides amyloïdes sans toutefois présenter des troubles de mémoire ou sans même développer la MA. Au contraire, d'autres personnes présentent la MA ne possèdent pas de dépôts amyloïdes (Selkoe, 2011; Serrano-Pozo et al., 2011; Jack et al., 2013).

1.1.1.4 DÉGÉNÉRESCENCES NEUROFIBRILLAIRES

La protéine Tau a été découverte dans les années 70 comme un facteur d'assemblage des microtubules (Weingarten et al., 1975; Witman et al., 1976). Elle est exprimée dans le système nerveux central et périphérique et, en moindre quantité, dans les reins, les poumons et les testicules (Andreadis, 2005). Cette protéine est majoritairement présente dans les neurones au niveau des axones et, occasionnellement, dans le compartiment somato-dendritique et les oligodendrocytes (Trojanowski et al., 1989; Tashiro et al., 1997;

Lee et al., 2001; Klein et al., 2002). Il existe 12 isoformes dans le cerveau, leur nomenclature est fonction du nombre de domaines liant les microtubules (*Microtubule Binding Domain*, MBD) (Morris et al., 2011). Tau subit un ensemble complexe de modifications post-traductionnelles parmi lesquelles la phosphorylation de résidus sérines, thréonines et tyrosines, l'acétylation, la réticulation par le biais de transglutaminase (*cross-linking*), la glycation, l'isomérisation, la nitration, la sumoylation, la *O*-GlcNacétylation et l'ubiquitination. Ces modifications suggèrent qu'il doit exister un haut niveau de régulation au niveau moléculaire (Morris et al., 2011). Grâce à ses projections en N- et C-terminal et son domaine MBD, Tau lie les microtubules (Morris et al., 2011). Le rôle physiologique de Tau reste incertain, mais pourrait être multiple. Tau peut lier des molécules de signalisation, des éléments du cytosquelette, et des lipides. Elle peut agir en tant que chaperonne ou encore activer ou inhiber des enzymes (en activant des kinases de la famille src ou en inhibant l'histone déacétylase 6 par exemple). Un gradient de Tau le long de l'axone (la concentration la plus élevée étant au niveau de la synapse) permettrait la dynamique et la stabilisation des microtubules sans en être un élément critique. Tau pourrait aussi connecter les microtubules et les filaments d'actine. Tau modulerait les voies de signalisation contrôlant l'extension des neurites et augmenterait les fonctions du facteur de croissance des nerfs (NGF). Enfin, Tau serait engagée dans la neurogénèse chez l'adulte et participerait à la réparation de l'ADN à la suite d'un choc thermique (Morris et al., 2011).

La protéine tau est impliquée dans de multiples maladies neurodégénératives que l'on nomme tauopathies. Celles-ci comprennent la sclérose latérale amyotrophique et certaines formes de la maladie de Parkinson (Morris et al., 2011). La protéine Tau est le principal composant des DNF (Grundke-Iqbal et al., 1986; Lee et al., 1991; Nukina et Ihara, 1986; Wood et al., 1986). La corrélation entre la présence de DNF et l'évolution des symptômes et la progression de la MA est élevée (Ihara, 2001; Giannakopoulos et al., 2003). Les mutations dans la protéine Tau n'induisent pas la MA mais induisent plutôt des démences lobaires fronto-temporales associées avec des inclusions de protéines Tau de différents types et de localisation spécifiques (Morris et al., 2011). Dans le cas de la MA, Tau est anormalement hyperphosphorylée à proximité ou à l'intérieur du domaine MBD. Ces modifications induisent des changements conformationnels anormaux du domaine MBD,

lequel perd sa capacité de lier les microtubules. Tau s'accumule et s'agrège dans les corps cellulaires et dans les neurites des neurones en formant des filaments hélicoïdaux à feuillets β qui sont insolubles (Lee et al., 2001; von Bergen et al., 2005; Fischer et al., 2009). Les DNF apparaissent d'abord dans la partie interne du lobe temporal (hippocampe et structure adjacentes comme l'amygdale) sans être forcément associées à des symptômes. Par la suite, les DNF se propagent dans la partie externe et les autres régions néocorticales associatives et, finalement, l'ensemble du cortex (Selkoe, 2011; Serrano-Pozo et al., 2011; Jack et al., 2013).

1.1.1.5 CARACTÉRISTIQUES CLINIQUES

L'atrophie cérébrale associée à une mort neuronale est la principale caractéristique anatomique des patients atteints de la MA. Les lésions neurologiques suivent un chemin particulier et quasi constant. L'atrophie cérébrale concerne en premier lieu l'hippocampe qui est touché dès les stades précoces. L'hippocampe avec le cortex enthorinal sont des zones primitives du cerveau impliquées dans la mémoire. Puis l'atrophie s'étend à d'autres structures comme le néocortex temporal, pariétal, le cortex cingulaire postérieur et le pronucléus par exemple (Serrano-Pozo et al., 2011; Braak et Braak, 1991; Selkoe, 2011).

En parallèle, plusieurs symptômes peuvent être observés. L'atteinte de l'hippocampe entraîne des troubles de la mémoire. Certaines composantes de la mémoire sont touchées précocement tandis que d'autres sont longtemps préservées. Les types de mémoires qui fonctionnent automatiquement sont les mieux préservées dans la maladie. Ainsi les malades conservent plus longtemps la mémoire perceptive qui consiste à mémoriser des informations perceptives comme des objets, des visages ou des paysages et la mémoire procédurale, c'est-à-dire la mémoire des habitudes et des habiletés acquises au fil du temps. Au contraire, la mémoire de travail qui permet le maintien des informations et leur manipulation en vue de la réalisation d'une tâche est altérée très tôt. Cependant, dans les cas les plus fréquents (2/3 des cas) et ce qui est le plus caractéristique est la perte de la mémoire épisodique, la mémoire des souvenirs. La conservation des souvenirs récents et la formation de nouveaux souvenirs est difficile. Les symptômes sont progressivement associés à des troubles de la mémoire sémantique (mémoire des connaissances générales) et

des troubles du langage plus ou moins marqués. On parle du syndrome des 3A pour Aphasie-Apraxo-Agnosie qui regroupe des troubles de l'expression, de l'organisation gestuelle et dans la reconnaissance des objets et visages connus, avec souvent des difficultés d'orientation spatiale comme une apraxie constructive et la difficulté à intégrer une perspective. Par la suite, apparaissent des troubles des fonctions exécutives c'est à dire des fonctions permettant le contrôle du comportement. Une altération du comportement social est aussi observable (Eustache et al., 2014). Les premiers symptômes sont donc principalement des troubles mnésiques, puis progressivement apparaissent des troubles fonctionnels. Ainsi l'évolution des symptômes ne corrént pas directement avec l'évolution des processus pathologiques identifiés à ce jour. La rapidité d'évolution ainsi que les symptômes sont variables en fonction de la zone du cerveau qui est atteinte et des patients.

L'hospitalisation de ces malades permet certaines observations cliniques importantes et peu expliquées. Les démences peuvent se caractériser par des marqueurs anormaux référant à plusieurs causes de démence, on parle alors de démences mixtes. Le plus souvent la MA est associée à une démence vasculaire, ou encore à une démence à corps de Lewy, ou dans certains cas aux 2 autres types de démence (Jellinger, 2007; Jellinger et Attems, 2007; Schneider et al., 2007). La fréquence d'hospitalisation est de 26% pour des causes de syncopes, de chutes ou autres traumatismes, 17% dans le cas de maladies ischémiques cardiaques, 9% pour cause de maladies gastro-intestinales, 6% pour des pneumonies et, 5% pour des déliriums ou des changements de statut mental (Alzheimer's Association, 2015). La cause de décès la plus commune est la pneumonie (Burns et al., 1990; Brunnström et Englund, 2009).

1.1.1.6 STADE AMNESTIC MILD COGNITIVE IMPAIRMENT (AMCI)

Il est communément admis que les premiers changements pathologiques associés à la MA se développent très tôt, au moins 20 ans, avant le début des symptômes (Jack et al., 2009; Reiman et al., 2012; Villemagne et al., 2013). Les chercheurs ont donc concentré beaucoup d'efforts à identifier des stades précoces de la maladie et des personnes plus à risque de développer la MA. Les individus aMCI présentent des changements dans leur

capacité de penser ce qui permet une identification par des tests neuropsychologiques. Par contre, les malades ne présentent aucun autre trouble fonctionnel et peuvent réaliser les tâches quotidiennes (Petersen et al., 1999; Kelley et Petersen, 2007; Winblad et al., 2004; Schmidtke et Hermeneit, 2008; Albert et al., 2011; McKhann et al., 2011; Jack et al., 2011; Sperling et al., 2011). Ces malades représentent 10 à 20% des personnes de plus de 65 ans (Hänninen et al., 2002; Lopez et al., 2003; Roberts et al., 2008). Dans ce groupe, les patients amnestic MCI présentent surtout des troubles de la mémoire et sont ceux qui évoluent le plus souvent vers la MA (Ganguli et al., 2005). Environ 50% des MCI développeront une démence dans les 3 à 4 ans qui suivent leur diagnostic, particulièrement les aMCI (Petersen et al., 1999; 2001; Morris et al., 2001; Fischer et al., 2007; Schmidtke et Hermeneit, 2008). Cependant tous les MCI ne deviennent pas déments, certains demeurent stables, tandis que d'autres retrouvent un état cognitif normal (Ganguli et al., 2005). Les patients aMCI représentent donc un stade précoce de la MA pour lequel des traitements thérapeutiques pourraient être engagés (Dubois et Albert, 2004).

1.1.2 FACTEURS DE RISQUE ET MÉCANISMES ASSOCIÉS

Même si l'étiologie et la pathogenèse de la MA et la neurodégénération qui y est associée ne sont pas encore complètement élucidées, un ensemble de facteurs de risque et des mécanismes associés ont été mis en évidence.

1.1.2.1 AGE ET SEXE

Les résultats des études épidémiologiques ont permis de conclure que l'âge et le sexe sont les principaux facteurs de risque associés à la MA. Le risque est plus élevé chez les femmes et peut être attribué à des variations biologiques ou génétiques ou, à des différences de style de vie (Carter et al., 2012). Le système hormonal représente la variation biologique majeure entre homme et femme. Le déficit en œstrogènes post-ménopause semble associé à une sensibilité accrue à la MA (Viña et Lloret, 2010). Des études menées chez la souris ont

révéle que les œstrogènes exercent un effet protecteur sur les astrocytes (Spence et al., 2011). D'autre part, l'allèle $\epsilon 4$ de l'apolipoprotéine E (APOE) aurait une association plus forte avec la MA chez les femmes que chez les hommes (Altmann et al., 2014; Ungar et al., 2014). L'APOE $\epsilon 4$ interagirait avec les œstrogènes par des mécanismes mal définis (Yaffe et al., 2000; Kang et Grodstein, 2012). En ce qui concerne les différences associées au mode de vie, il faut noter que les femmes vivent en moyenne plus longtemps que les hommes et que dans la première moitié du 20^{ème} siècle, leur niveau d'éducation était plus faible que celui des hommes. Une étude récente suggère que le risque cardiovasculaire qui est plus élevé chez les hommes a pour conséquence qu'après 65 ans, les hommes survivants sont ceux qui sont moins à risque de développer la MA, ce qui contribue à une fréquence plus élevée de la MA chez les femmes de plus de 65 ans (Chêne et al., 2015).

1.1.2.2 GÉNÉTIQUE

Les études impliquant des jumeaux ont révélé qu'il y a une forte composante génétique associée à la MA (Gatz et al., 1997). Les individus ayant un parent au premier degré malade ont un risque augmenté d'être atteints de la MA (Green et al., 2002; Loy et al., 2014). Par contre, les individus ayant plus d'un parent au premier degré atteint ont un risque 7 fois supérieur d'être atteint de la MA (Lautenschlager et al., 1996). Ces familles partageant un patrimoine génétique et un mode de vie commun, ce qui suggère que des facteurs de risque génétiques et environnementaux pourraient être en cause.

Dans les cas de l'EOAD (avant 65 ans), la MA est causée par des mutations génétiques. Dans 1% des cas, la forme est familiale autosomique (la mutation n'affecte pas les chromosomes sexuels) dominante (car un seul gène muté suffit). Les mutations de l'APP et de la PSEN1 confèrent une pénétrance totale (100% de transmission si l'individu est porteur de la mutation) tandis qu'une mutation de la PSEN2 donne 95% de chance de développer la maladie (Goldman et al., 2011). Une liste des mutations génétiques est disponible sur le site www.molgen.ua.ac.be. A ce jour, cette base de données regroupe 511 mutations différentes observées chez 1638 patients et familles. Les mutations de l'APP sont dans moins de 0.1% des cas des mutations dominantes faux sens localisées dans ou à proximité d'un exon codant (exon 16 ou 17) (Goate et al., 1991; Goate, 2006). Dans

quelques rares cas, d'autres types de mutations sont observées. Deux mutations récessives sont à l'origine d'une forme homozygote de la MA, des duplications montrent l'importance du maintien d'une certaine quantité d'APP dans l'organisme pour ne pas développer la MA (Reitz et al., 2011). De plus, le gène de l'APP étant localisé sur le chromosome 21, le risque est donc multiplié par un facteur trois dans le cas de la trisomie 21. Cette particularité explique l'apparition précoce de plaques séniles et l'incidence élevée de la MA chez ces patients (Ness et al., 2012). Les mutations de PSEN1 et PSEN2 perturbent le clivage de l'APP par la γ -sécrétase et ont pour conséquence d'augmenter le ratio des peptides $A\beta$ 1-42/ $A\beta$ 1-40, par augmentation de $A\beta$ 1-42 ou diminution de $A\beta$ 1-40. Ces résultats suggèrent une perte de fonction plutôt qu'un gain de fonction des γ -sécrétases (Scheuner et al., 1996; De Strooper et al., 1998; Reitz et al., 2011). Dans certains cas, une perte de l'activité carboxypeptidase de la γ -sécrétase et donc une dysfonction serait engagée. L'allèle PSEN sain donnerait une production de peptides normaux et l'allèle muté favoriserait l'agrégation de ces peptides (Szaruga et al., 2015). La perturbation de la voie des peptides amyloïdes et des sécrétases caractérise cette forme de la MA et serait à l'origine des processus neurodégénératifs.

Dans les formes de la MA survenant après l'âge de 65 ans (LOAD), le gène de l'APOE a été identifié comme le facteur de risque génétique majeur. L'APOE est une protéine associée aux lipoprotéines qui transportent le cholestérol dans la circulation sanguine (Huang et al., 2004). Trois allèles existent, soient ϵ 2, ϵ 3 et ϵ 4 avec des fréquences et des risques différents (Fig. 2, page suivante). Les formes E2, E3 et E4 représentent respectivement 10-20%, 20-30% et 60% de la population (Raber et al., 2004). Posséder une copie de l'allèle ϵ 4 augmente le risque par un facteur de 3, tandis que posséder les deux copies ϵ 4 augmente le risque 8 à 12 fois (Holtzman et al., 2012; Loy et al., 2014). De plus, les individus porteurs des formes ϵ 4 sont plus susceptibles de développer précocement la MA que les formes ϵ 3 et ϵ 2 (Kurz et al., 1996; Murman et al., 1996; Spinney, 2014). Les individus possédants l'allèle ϵ 4 sont estimés à 40% à 65% des patients atteints de la MA (Alzheimer's Disease Education et Referral Center, 2011). Récemment, une fonction de signalisation de l'apolipoprotéine a été mise en évidence. La reconnaissance de l'APOE par les neurones induit l'activation d'une voie non-canonique des MAPK menant à la production accrue de peptides $A\beta$ (Huang et al., 2017). La quantité de peptides $A\beta$ produite

est corrélée aux isoformes APOE, avec une production accrue de peptides A β pour l'isoforme E4 (Huang et al., 2017). A ce jour, le gène de l'apolipoprotéine n'explique pas entièrement cette héritabilité estimée à 58-79% des cas (Reitz et al., 2011).

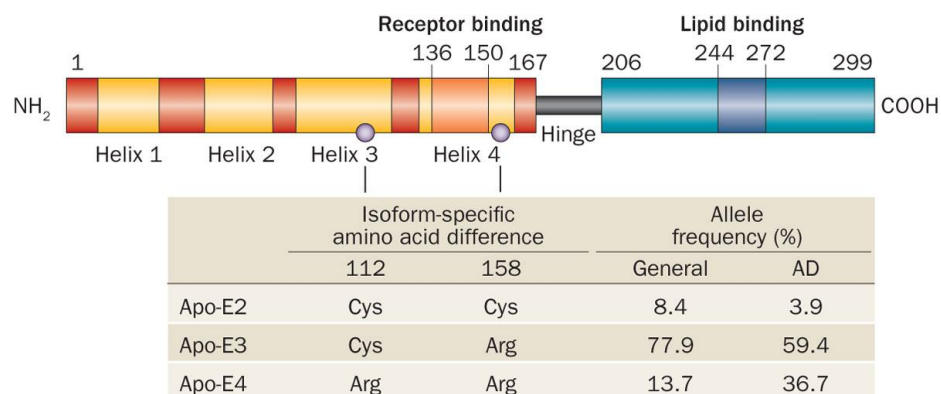


Figure 2 Représentation schématique de la protéine APOE et de ses différents isoformes. Schéma regroupant les hélices, les domaines de liaison de la protéine APOE comprenant le domaine de liaison au récepteur et le domaine de liaison aux lipides et les isoformes possibles. Tableau des différences en acide aminés spécifiques de chaque isoforme et fréquence allélique en % (Liu, C.-C. et al, Nature Neurol. Rev., 2013).

De larges études d'association sur l'ensemble du génome a été rendu possible grâce aux progrès de la biologie moléculaire à haut débit et à la bio-informatique. En 2013, le consortium international de génomique pour la MA (IGAP) 2010 a mis en évidence une dizaine de nouveaux gènes. Il renforce l'engagement des voies APP (SORL1 et CASS4), et Tau (CASS4 et FERMT2) dans la pathophysiologie, en plus de confirmer l'association avec ABCA7, APOE, BIN1, CLU, CR1, CD2AP, EPHA1, MS4A6A-MS4A4E et PICALM. Les facteurs associés au fonctionnement du système immunitaire et à la réponse inflammatoire sont identifiés avec les molécules HLA-DRB5-DRB1, INPP5D, MEF2C, CD33, CR1 et TREM2 (Lambert et al., 2013; Bradshaw et al., 2013; Griciu et al., 2013).

1.1.2.3 COMPOSANTE TRAUMATIQUE ET VASCULAIRE

Dès le début du siècle, une composante vasculaire dans la MA a été suspectée (Berchtold et Cotman, 1998). Le cerveau étant un grand consommateur d'oxygène et de nutriments, il est un des organes les plus irrigués. Pour avoir un cerveau sain, un système cardiovasculaire efficace est central afin d'une part, de pomper le sang vers le cerveau et, pour d'autre part, d'assurer un apport sanguin efficace et abondant (Alzheimer's Association, 2015). Les lésions cérébrales modérées et sévères consécutives à un traumatisme représentent un facteur de risque pour la MA. Il peut s'agir de chocs, de secousses, ou de chocs à la suite d'accidents (dans la majorité des cas des accidents de la route) (Lye et Shores, 2000). Une lésion cérébrale modérée se définit par une perte de conscience ou une amnésie post-traumatique d'au moins 30 minutes qui double le risque de développer la maladie d'Alzheimer. Les troubles sévères augmentent le risque d'un facteur 4.5. Ainsi les boxeurs, joueurs de football, de hockey ou les anciens militaires représentent une population à risque (Plassman et al., 2000).

Les changements vasculaires induits par les petits infarctus hémorragiques, les larges infarctus ischémiques corticaux, les vasculopathies et les lésions de la matière blanche sont des facteurs de risque de la MA (Reitz et al., 2011). Les maladies ischémiques affectent 60 à 90% des malades (O'Brien et al., 2003; Hachinski et al., 2006). Les accidents vasculaires cérébraux doublent le risque de démence (Savva et Stephan, 2010; Ballard et al., 2011). Une méta-analyse a montré que 7.4% des patients ayant subi un accident vasculaire cérébral développent une démence (Pendlebury et Rothwell, 2009). D'autres anomalies vasculaires peuvent être observées telles que des anomalies des capillaires, une interruption de l'intégrité de la BHE, des angiopathies amyloïdes cérébrales (présentes chez plus de 90% des malades atteints de la MA) et la présence d'athéromes (Roher et al., 2004; Querfurth et LaFerla, 2010). Les dommages cérébraux pourraient agir selon différents mécanismes, en affectant directement l'hypothalamus et ses projections, les régions du cerveau impliqués dans la mémoire, d'une part, et en augmentant les dépôts de peptides amyloïdes ou l'inflammation, d'autre part (Reitz et al., 2011). L'hypoperfusion induite pourrait modifier la quantité de kinase cycline dépendante 5 (CDK5) critique aux processus de mémorisation et d'apprentissage (Cheung et al., 2008). Enfin, une aberrante expression de la CDK5 induirait l'apoptose et la mort neuronale (Weishaupt et al., 2003) et, la phosphorylation anormale de la protéine Tau (Wen et al., 2007).

Les facteurs de risque associés aux maladies cardiovasculaires comme la cigarette, l'obésité et le diabète sont aussi associés aux démences. Fumer au milieu de sa vie augmente le risque de toutes les formes de démence (Ohara et al., 2015). La consommation de cigarettes affecterait l'initiation et la progression de la MA, d'une part en augmentant le risque par un facteur de 1.79 (Anstey et al., 2007). L'usage de la cigarette accélérerait le déclin des capacités cognitives (Anstey et al., 2007). Ce risque serait réversible puisqu'il diminuerait si la personne cesse sa consommation de cigarette vers la fin de sa vie. Une étude sur l'arrêt de la cigarette chez les personnes âgées indique que 24 mois après l'arrêt de la consommation de cigarette, la progression du déclin cognitif ralentit (Almeida et al., 2011). Plusieurs mécanismes ont été proposés tels que le rôle du stress oxydatif sur le système vasculaire et la neurodégénération, le rôle de l'agression hypoxique réalisée par la présence permanente de carboxyhémoglobinémie et un rôle promoteur d'un risque vasculaire, puisque la cigarette augmente le risque d'accident vasculaire, de diabète et d'hypertension (Ohara et al., 2015).

Une pression sanguine élevée au cours du milieu de la vie serait associée à un déclin cognitif plus tardif (Launer et al., 2000; Kivipelto et al., 2001; Whitmer et al., 2005). Cette association serait perdue à un âge plus avancé et serait même protectrice (Skoog et al., 1996; Glynn et al., 1999; Knopman et al., 2001; Posner et al., 2002; McGuinness et al., 2008). L'hypertension diminue l'intégrité vasculaire de la BHE, permettant ainsi l'extravasation de protéines indésirables vers le tissu cérébral (Debette et al., 2011; Kalaria, 2010). Ces protéines pourraient induire des dommages cellulaires, une réduction de la fonction des synapses et neurones, l'apoptose et l'accumulation de peptides amyloïdes (Shah et al., 2012; Deane et al., 2004). Trois études dont Syst-eur, (Forette et al., 2002), PROGRESS (Tzourio et al., 2003) et HOPE (Starr et al., 1996) ont montré un effet bénéfique des traitements de l'hypertension. Dans l'essai Syst-eur, le risque de démence était diminué de 55% dans le groupe traité, par rapport au groupe placebo. Le traitement consistait en du nitrendipine, un antagoniste du calcium, combiné à l'enalapril maleate, un inhibiteur de l'enzyme de conversion, et au hydrochlorothiazide, un diurétique. Dans PROGRESS, ce risque était diminué de 12 à 54.5% en fonction de l'incidence des accidents vasculaires cérébraux associés. Par contre, d'autres études ont présenté des résultats inconsistants (Rönnemaa et al., 2011; Ninomiya et al., 2011).

Le diabète de type 2 (DT2) doublerait le risque de la MA, en augmentant le risque de 54% (Profenno et al., 2010; Ott et al., 1999; Leibson et al., 1997; Luchsinger et al., 2001). Plusieurs mécanismes ont été proposés. L'étude histopathologique de coupe d'hippocampe a montré une diminution de l'expression de l'enzyme dégradant l'insuline (IDE) et de son ARN messager chez les patients atteints de la MA par rapport aux sujets témoins (Cook et al., 2003). Dans le cas d'hyperinsulinémie, l'insuline pourrait entrer en compétition avec les peptides A β pour l'accès à l'IDE (Craft, 2007), interférant ainsi avec l'élimination des A β du cerveau. De plus, la baisse de la tolérance au glucose augmente la formation de AGE. Les plaques amyloïdes et ainsi que les DNF possèdent des récepteurs pour ces produits, les RAGE (Deane et al., 2009; 2003; Chaney et al., 2005). La glycation des peptides A β augmente leur propension à l'agrégation (Yamagishi et al., 2005). Les RAGE faciliteraient les dommages neuronaux des peptides A β car ce sont des ligands de haute affinité pour ces peptides (Yan et al., 1996). Le tissu adipeux produit des régulateurs du métabolisme des adipokines comme l'adiponectine, des leptines et des cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale (TNF) et l'IL6. Leur concentration augmente en cas de résistance à l'insuline et d'hyperinsulinémie (Hassan et al., 2012). Les leptines auraient un effet protecteur puisque qu'elles sont importantes pour la mémoire et la plasticité de l'hippocampe (Harvey et al., 2006). Des améliorations de la cognition (par amélioration des scores aux tests neuropsychologiques) avec l'utilisation de médicaments utilisés pour le diabète comme les agonistes PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor γ*) tels la rosiglitazone et la pioglitazone ont été rapportés (Sato et al., 2011; Risner et al., 2006; Watson et al., 2005). Ces agonistes PPAR γ contribuent à un ensemble de processus physiologiques tel que la réaction inflammatoire, le contrôle du métabolisme lipoglucidique, la différenciation et le cycle cellulaire. Leurs activités anti-inflammatoires, antifibrosantes et antiprolifératives a permis le développement de nouvelles thérapies dans le traitement des hépatopathies chroniques (Dharancy et al., 2008). Notamment, les agonistes PPAR γ altèreraient l'homéostasie des peptides A β (Jiang et al., 2008).

Un indice de masse corporel (IMC) trop bas (inférieur à 18.5) ou trop élevé (supérieur à 30) serait un facteur de risque pour la MA (Loef et Walach, 2013; Anstey et al., 2011; Beydoun et al., 2008; Grundman et al., 1996; White et al., 1998; Gustafson et al., 2003; Razay et al., 2005; Stewart et al., 2005). Cette association serait dépendante de l'âge

puisque une perte de poids est notamment associée à la phase prodromale de la phase de démence (Gustafson et al., 2009). L'obésité centrale (ou encore obésité abdominale) souvent considérée comme la plus délétère est aussi associée à un risque accru de démence (Whitmer et al., 2008).

Des changements dans les niveaux de lipides sont associés à la MA, notamment des niveaux élevés de lipoprotéines à faible densité (LDL) postprandial, ou des niveaux bas de lipoprotéines à haute densité (HDL) (Merlo et al., 2010). Chez les patients atteints de la MA, des niveaux élevés de LDL oxydés ont été observés dans le plasma et dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) (Smith et al., 2007). Des niveaux élevés de lipoprotéines à très faible densité (VLDL) et des acides gras libres ont été associés à une concentration élevée en peptides A β (Craft, 2009; Patil et Chan, 2005). La lipoprotéine lipase est retrouvée dans les plaques amyloïdes sans que l'on comprenne son rôle dans le système nerveux central (SNC) (Paradis et al., 2004). Les mutations dans son gène sont associées à un risque plus élevé de développer la MA (Blain et al., 2006). L'hypercholestérolémie est aussi un facteur de risque connu (Martins et al., 2009), même si la BHE n'est pas perméable au cholestérol. Dans le cerveau, 25% du cholestérol non estérifié fait partie des gaines de myélines des oligodendrocytes et des membranes plasmiques (Dietschy et Turley, 2001). Ce sont dans les zones de forte concentration en cholestérol, les radeaux lipidiques, que les enzymes participant à la production des peptides amyloïdes sont retrouvées (Merlo et al., 2010). La déplétion membranaire du cholestérol inhibe le clivage de l'APP par les sécrétases diminuant ainsi les quantités d'A β 1-40 et 1-42 (Grimm et al., 2007). Le traitement par les statines réduit la synthèse du cholestérol en inhibant l'activité de l'enzyme hydroxyméthyl glutaryl CoA réductase, ce qui a comme conséquence de diminuer les niveaux de peptides A β chez l'homme (Friedhoff et al., 2001). Ces résultats sont encore sous investigation.

À l'inverse, les facteurs protecteurs des maladies cardiovasculaires tels que l'activité physique et de bonnes habitudes alimentaires protègent du développement de démences. Un régime faible en gras saturés (Huang et al., 2005; Kalmijn et al., 1997; Schaefer et al., 2006; Roberts et al., 2010; Solfrizzi et al., 2006) et riche en légumes et fruits en évitant des carences en vitamines (Morris et al., 2002; Engelhart et al., 2002; Masaki et al., 2000; Laurin et al., 2004; Luchsinger et al., 2003) est recommandé (Reitz et al., 2011; Barberger-Gateau et al., 2007; Gu et al., 2010; Lourida et al., 2013). Une activité physique régulière

participe au maintien d'un cerveau en bonne santé. L'aérobic augmente le flux sanguin, permettant une meilleure oxygénation et utilisation du glucose, le cerveau étant le premier consommateur de glucose (Abbott et al., 2004). L'activation de facteurs de croissance consécutive à un exercice physique faciliterait les changements structuraux et la plasticité du cerveau (Colcombe et Kramer, 2003). Mais si le lien entre un cerveau sain et l'activité physique est bien documenté, l'association entre l'exercice et la cognition (ou démence) demeure controversée (Abbott et al., 2004; Fratiglioni et al., 2004; Scarmeas et al., 2001; Verghese et al., 2003; Rovio et al., 2005). Chez la souris, l'exercice diminue la formation de peptides A β (Dishman et al., 2006). Par contre, l'effet de l'exercice sur l'amélioration de la fonction cognitive montre des résultats conflictuels (Emery et al., 1998; Fabre et al., 2002; Kramer et al., 2006; Lautenschlager et al., 2008).

1.1.2.4 AUTRES FACTEURS DE RISQUE ET MÉCANISMES ASSOCIÉS

1.1.2.4.1 RÉSERVE COGNITIVE

Parmi les facteurs environnementaux associés à la MA, on retrouve le concept de réserve cognitive. Ce concept repose sur l'observation que plus le niveau d'éducation est élevé, plus le risque de développer la MA diminue. Une étude menée chez des jumeaux a révélé que ceux effectuant un travail intellectuel plus complexe étaient moins à risque que leurs jumeaux respectifs (Andel et al., 2005). Selon ce concept, la réserve cognitive acquise par l'éducation permet au cerveau de mieux compenser les changements en permettant l'utilisant de routes de communication neuronales alternatives. Il faut souligner que les personnes avec un moindre niveau d'éducation sont aussi celles au statut socioéconomique bas pouvant subir des difficultés de nutrition et d'accès aux soins médicaux et aux traitements (Stern, 2012; 2006; Roe et al., 2007; Evans et al., 2003; Kukull et al., 2002; McDowell et al., 2007; Xu et al., 2014; Sando et al., 2008; Fitzpatrick et al., 2004). Dans ce même ordre d'idée, une activité sociale et mentale régulière serait protectrice. (Wang et al., 2002; Wilson et al., 2002a; b; Ball et al., 2002; Fratiglioni et al., 2004; Karp et al., 2006;

Krueger et al., 2009; Saczynski et al., 2006; Fratiglioni et Wang, 2007; Hall et al., 2009; Sharp et al., 2010; Wang et al., 2012; Wilson et al., 2013; Marcoa et al., 2014).

1.1.2.4.2 DÉPRESSION, STRESS ET MANQUE DE SOMMEIL

La dépression affecte 40 à 50% des malades atteints de la MA (Jorm, 2001; Barnes et al., 2006). Les études d'association entre un épisode de dépression clinique et la MA subséquente demeurent contestées (Tsuno et Homma, 2009; Becker et al., 2009). Dans le cas où une dépression serait un facteur de risque (Panza et al., 2008), plusieurs hypothèses ont été avancées. Les niveaux faibles de vitamines B₁₂ chez les personnes déprimées sont associés à des niveaux élevés d'homocystéine (Saczynski et al., 2010). Un niveau élevé d'homocystéine, comme dans le cas de certaines maladies cardiovasculaires, serait associé à la MA. De plus, les effets vasculaires de la dépression auraient des effets sur la formation de l'hippocampe et sur l'axe hypothalamo-pituitaire-surrénalien. Dans le cas du stress, les molécules produites, telles le cortisol, pourraient causer des atrophies néfastes dans des zones associées à la mémoire et à la cognition renforçant la sensibilité aux maladies neurodégénératives (Yaffe et al., 2010). Un stress chronique chez les rongeurs altère la morphologie du cerveau et notamment l'hippocampe (Aleisa et al., 2006). Enfin, un manque chronique de sommeil augmenterait l'accumulation des peptides A β et la formation de plaques amyloïdes (Kang et al., 2009).

1.1.2.4.3 DÉFICIT EN ACÉTYLCHOLINE

Au cours des années 60, une conceptualisation de la recherche biomédicale a exploré le rôle des systèmes de neurotransmission dans les grandes maladies neurologiques et psychiatriques. Dans ce contexte, une baisse de la production de l'acétylcholine impliquée dans les processus de mémorisation et d'apprentissage a été identifiée (Querfurth et LaFerla, 2010). Les récepteurs nicotiques alpha-7 acétylcholine sont aussi essentiels aux processus de cognition, leurs niveaux augmentent puis diminuent avec l'évolution de la MA (Ikonovic et al., 2009; Maelicke et al., 2001). Les données expérimentales montrent

que les peptides A β lient ces récepteurs, ce qui diminue la libération d'acétylcholine et le maintien d'une potentialisation à long terme (Wang et al., 2000).

1.1.2.4.4 AGRÉGATION

Le processus d'agrégation progressive des peptides β -amyloïdes dans la MA rappelle les mécanismes de repliement à la manière des prions (Frost and Diamond, 2010). L'acronyme prion provient de PROteinaceous INfectious particules défini par Stanley Prusiner en 1982. Les prions réfèrent à des agents pathogènes de nature protéiques et à caractère infectieux. Des études *in vivo* ont montré que l'utilisation d'extraits d'homogénat de cerveau de patients décédés de la MA injectés dans le cerveau de souris modèles de la MA (APP23) au niveau de l'hippocampe ou dans le cerveau droit accélère la formation d'agrégats de peptides β -amyloïdes (Stöhr et al., 2012; Meyer-Luehmann et al., 2006; Eisele et al., 2010). Ces dépôts se propagent séquentiellement depuis les sites d'injection le long des axones à différentes régions du cerveau selon des mécanismes qui pourraient modifier le transport axonal intracellulaire et d'autres mécanismes extracellulaires. La protéine Tau présenterait aussi des propriétés semblables aux prions. Le mélange de filaments et d'oligomères peut pénétrer dans une cellule et induire le repliement et l'agrégation de protéines Tau intracellulaires (Frost et al., 2009; Nonaka et al., 2010).

1.1.2.4.5 HYPOMÉTABOLISME

Les nouvelles techniques d'imagerie ont permis la mise en évidence d'un hypométabolisme, affectant le cortex cingulaire postérieur, le prénucléus et le cortex temporopariétal (Costantini et al., 2008; Cunnane et al., 2011). Le traceur radioactif ^{18}F -fluorodésoxyglucose (^{18}F -FDG) utilisé dans les TEP scan est métabolisé dans les cellules proportionnellement à leur consommation en glucose (Herholz et al., 2011; Herholz, 2012).

1.1.2.4.6 HYPOTHÈSE AMYLOÏDE

Selon cette hypothèse, les peptides A β sous leurs formes variées déclenchent une cascade d'évènements fatals d'abord pour les synapses puis les neurones en produisant les marqueurs pathologiques de la MA soient, les plaques amyloïdes, les DNF, la perte de synapse et la neurodégénération menant à la démence. L'hypothèse de la cascade β amyloïde a peu évoluée depuis sa formulation originale (Hardy and Higgins, 1992). Les effets toxiques ont été attribués aux oligomères de peptides A β (Musiek et Holtzman, 2015; Barage et Sonawane, 2015). L'hypothèse amyloïde est en grande partie soutenue par les formes génétiques précoces de la MA pour lesquelles les mutations dans les gènes de l'APP, de PSEN1 et 2 augmentent la quantité de peptides produits ou favorisent les formes qui s'agrègent. Ces mécanismes sont relativement bien décrits et ont été transposés aux formes sporadiques de la MA puisqu'elles partagent les mêmes caractéristiques cliniques et neuropathologiques, à l'exception de l'âge de manifestation.

Cependant, l'hypothèse de la cascade amyloïde demeure controversée (Herrup, 2015). Tout d'abord, il faut souligner que la seule accumulation de peptides β -amyloïdes ne suffit pas à la génération de la MA, puisqu'on peut retrouver des plaques séniles dans le cerveau de patients en santé (Podlisny et al., 1991). De plus, la corrélation entre la charge en plaques séniles ne corrèle pas avec la sévérité de la pathologie, au contraire des DNF (Nelson et al., 2009; Goedert, 2005). Le traitement de la toxicité des peptides β -amyloïdes doit tenir compte de leur rôle dans le maintien de leurs fonctions physiologiques. Des concentrations en deça du nanomolaire sont rencontrées dans la cellule et seraient neurotrophiques tandis que des concentrations élevées de l'ordre du micromolaire présenteraient des effets toxiques (Pearson and Peers, 2006). Ces observations suggèrent que l'intégration d'une fenêtre thérapeutique des niveaux de peptides β -amyloïdes plutôt qu'une diminution drastique des niveaux peptidiques *per se*. Le principal facteur de risque de la MA, l'âge, n'est pas pris en compte dans ce modèle. De même, l'influence de la protéine Tau n'est pas prise en compte, puisque deux mécanismes pathogéniques se développeraient en parallèle: le développement de la tauopathie dans l'hippocampe avec le vieillissement d'une part et, d'autre part, l'accumulation de peptides β -amyloïdes dans le neurocortex (Jack et al., 2014; Crary et al., 2014). Certains travaux suggèrent que l'apparition des DNF serait précoce à l'accumulation et l'agrégation des peptides β -amyloïdes (Ittner and Götz, 2011). L'ensemble de ces observations soulève la question de

la place de Tau dans la cascade amyloïde. Est-ce que Tau est la cible primaire, un médiateur ou un témoin «bystander» de la toxicité des peptides β -amyloïdes ? La protéine Tau et les peptides $A\beta$ ont des mécanismes de toxicité qui leur sont propres. D'avantage d'études doivent être entreprises pour comprendre l'interaction entre Tau et les peptides β -amyloïdes, afin de déterminer s'il y a une synergie de leurs effets ou si l'un favorise l'autre. Notamment, les peptides β -amyloïdes déclencheraient l'hyperphosphorylation de Tau (Ittner and Götz, 2011).

Devant l'échec des stratégies thérapeutiques ciblant les peptides amyloïdes, lesquelles seront développées dans le paragraphe suivant, l'hypothèse amyloïde est de plus en plus affaiblie (Herrup, 2015; Morris et al., 2014; Armstrong, 2014). La MA pourrait être multifactorielle, avec des lésions et des dysfonctions neuro-vasculaires qui s'accumulent, une composante génétique et une composante modifiable comme la composante vasculaire et le mode de vie (alimentation, activité physique et intellectuel). Cette possibilité a servi de base au débat sur la classification de la MA, à savoir si elle ne devrait pas être considérée comme une maladie à part entière, en soulignant son lien avec le vieillissement.

1.1.3 DIAGNOSTIC ET TRAITEMENTS

Dans les années 60, l'identification d'un diagnostic probable de la MA n'était pas toujours faite puisque seulement 45% des personnes atteintes de la MA indiquent avoir été informées du diagnostic (Prince et al., 2015). Avec la classification des maladies mentales publiée dans le DSM-5, les troubles neurocognitifs sévères doivent présenter un déclin cognitif significatif qui interfère avec l'indépendance et la réalisation des tâches quotidiennes. En revanche, dans les cas de troubles cognitifs moyens, le déclin doit être évident, mais il ne doit pas interférer avec la réalisation des activités quotidiennes (American Psychiatric Association, 2013). Tous les symptômes propres à la MA ne sont pas systématiquement des signes de démence puisqu'il convient d'exclure un ensemble de conditions pouvant causer des symptômes similaires à des démences. On parle alors de diagnostic différentiel. On estime que cela concerne 9% des démences. Il peut s'agir de dépression, de délirium, d'effets secondaires de certains médicaments, de problèmes de thyroïdes, de certaines carences en vitamines ou encore de la consommation excessive

d'alcool. Dans la majorité des cas, cette condition est réversible (Clarfield, 2003). Il s'agit d'un diagnostic de probabilité puisque le diagnostic définitif de MA ne peut se faire que par analyse du cerveau post mortem. Enfin, le dépistage de la MA est de plus en plus précoce mais n'est pas systématique.

A ce jour aucun traitement thérapeutique ne guérit la MA et aucun traitement ne permet d'en ralentir la progression (Massoud et Léger, 2011). En clinique, les médicaments administrés aux patients sont essentiellement des inhibiteurs de l'acétylcholine estérase et des antagonistes non compétitifs des récepteurs NMDA (*N*-méthyl-*D*-aspartate) (Winblad et Poritis, 1999; Grossberg et Desai, 2003; Bullock, 2002). Parmi les inhibiteurs de l'acétylcholine estérase on retrouve le donépézil, la rivastigmine et le bromhydrate de galantamine. Les récepteurs NMDA sont des récepteurs ionotropes activés par le glutamate et la glycine, essentiels à la mémoire et à la plasticité neuronale. Il s'agit de stimuler d'avantage ces récepteurs afin de maintenir les niveaux de la mémoire (Stern et Alberini, 2013). Le traitement proposé consiste en du chlorydrate de mémantine.

Les essais thérapeutiques en cours ciblent principalement la protéine Tau et les peptides A β . On dénombre des inhibiteurs de l'agrégation de la protéine Tau, des inhibiteurs de la glycogène synthase kinase 3 (GSK3), mais aussi des modulateurs de l'agrégation des peptides A β , des inhibiteurs des γ -sécrétases ou de BACE et des immunothérapies anti-peptides A β (Raffi et Aisen, 2009; Wolfe, 2002; Huang et Mucke, 2012). Par contre, les dommages cérébraux étant irréversibles, il est forcé d'admettre qu'à cause de ces dommages une thérapeutique ne peut être pleinement efficace (Gilman et al., 2005; Foster et al., 2009; Gerald et Ockert, 2013).

1.1.4 BIOMARQUEURS

Le principal objectif de l'étude des stades précoces de la MA réside dans l'identification de biomarqueurs. Un biomarqueur est une variable physiologique biochimique ou anatomique qui peut être mesurée objectivement *in vivo* et qui renseigne sur un processus biologique normal, des modifications pathologiques ou la réponse à une intervention thérapeutique (Jack et Holtzman, 2013). Le seul biomarqueur diagnostic connu à ce jour pour la MA concerne la forme EOAD et l'identification des mutations associées.

Les recherches actuelles sur la LOAD se concentrent sur l'étude de 5 biomarqueurs en clinique. Deux sont dosés dans le LCR tandis que trois sont mesurés par imagerie du cerveau. Ces biomarqueurs peuvent être regroupés en 2 groupes selon qu'ils ciblent les peptides amyloïdes ou à la neurodégénération. D'une part, il s'agit de la diminution des niveaux de peptides A β dans le LCR, dont la diminution corrèle avec l'augmentation de la charge en plaque dans le cerveau (Bouwman et al., 2009) et l'imagerie des structures amyloïdes par TEP scan (Nordberg et al., 2013). D'autre part, l'augmentation des protéines Tau et/ou de phospho-Tau dans le LCR (Visser et al., 2009), l'atrophie (volume) hippocampique visible en imagerie à résonance magnétique (IRM) (Dickerson et Wolk, 2012) et l'hypo-métabolisme ou l'hypoperfusion des cortex cingulaire postérieur ou temporo pariétal mesuré par fixation du marqueur radioactif ^{18}F -FDG en TEP scan (Jagust et Landau, 2012). La validité de ces paramètres est supportée par les corrélations observées suite à l'autopsie (Clark et al., 2011). Leur principale limite réside dans leur manque de spécificité pour la MA, en particulier pour les marqueurs de neurodégénération. L'utilisation de ces biomarqueurs pourrait dépendre du stade de la maladie et de leur combinaison (Bloudek et al., 2011). D'autres biomarqueurs sont à l'étude, utilisant notamment des techniques utilisant l'imagerie fonctionnelle.

1.2 SYSTÈME IMMUNITAIRE

1.2.1 SYSTÈME IMMUNITAIRE DANS LE SANG PÉRIPHÉRIQUE ET DANS LE CERVEAU

Le sang se compose d'un liquide, le plasma contenant les éléments figurés qui regroupent les érythrocytes, les plaquettes (ou thrombocytes) et les leucocytes. Les leucocytes incluent les cellules du système immunitaire inné comme les neutrophiles, les monocytes, les cellules NK et des cellules du système immunitaire adaptatif telles que les lymphocytes B et T de type CD4 et CD8 (Murphy, 2011). Dans le sang, les composantes cellulaires peuvent être à l'état naïf ou avoir été activées dans le sang même ou dans un organe puis avoir recirculé. Ces cellules baignent dans un mélange d'eau (90%), de protéines (6 à 8%), de lipoprotéines, de glucides, de lipides, d'acides aminés, de sels

minéraux (sodium, potassium, calcium, magnésium, chlorures, carbonates, phosphates), d'hormones, d'enzymes et de pigments (biliaires et caroténoïdes). Ces protéines peuvent être des anticorps, des facteurs de coagulation ou des transporteurs (L'Italien et Lord Dubé, 1998) (Tableau 1).

Tableau 1 Distribution des populations cellulaires sanguines chez l'homme

Type cellulaire	1 (x 10 ⁶ cells/mL)	Pourcentages
Erythrocytes	3800 - 6200	93 - 96% des cellules sanguines
Plaquettes	140 - 450	4 - 7% des cellules sanguines
Leucocytes	4.1 - 10.9	0.1 - 0.2% des cellules sanguines
Lymphocytes	1.1 - 3.5	14 - 47% des leucocytes
Cellules T	0.54 - 1.79	7 - 24% des leucocytes
Cellules T CD4+	0.30 - 1.50	4 - 20% des leucocytes
Cellules T Naïve CD4+	0.08 - 0.76	1 - 10% des leucocytes
Cellules T Mémoire CD4+	0.25 - 0.81	3 - 11% des leucocytes
Cellules T régulatrice (CD4+CD25+)	0.007 - 0.052	0.1 - 0.7% des leucocytes
Cellules T CD8+	0.14 - 0.82	2 - 11% des leucocytes
Cellules T Naïve CD8+	0.03 - 0.21	0.4 - 2.6% des leucocytes
Cellules T Mémoire CD8+		1 - 7% des leucocytes
Cellules B	0.07 - 0.53	1 - 7% des leucocytes
Cellules B Naïve	0.05 - 0.37	0.7 - 4.9% des leucocytes
Cellules B Mémoires		0.2 - 1.7% des leucocytes
Plasmocytes		0.2 - 2.0% des leucocytes (moëlle osseuse)
Cellules NK	0.08 - 0.43	1 - 6% des leucocytes
Cellules myéloïdes	3.9 - 6.5	53 - 86% des leucocytes
Cellules Dendritiques	0.02 - 0.06	0.3 - 0.9% des leucocytes
Cellules Myéloïdes Dendritiques	0.01 - 0.03	0.3 - 0.5% des leucocytes
Cellules Dendritiques Plasmacytoïdes	0.01 - 0.04	0.2 - 0.6% des leucocytes
Monocytes	0.20 - 0.90	2 - 12% des leucocytes
Granulocytes	2.13 - 6.35	35 - 80% des leucocytes
Neutrophiles	2.09 - 5.97	30 - 80% des leucocytes
Eosinophiles	0.03 - 0.30	0 - 7% des leucocytes
Basophiles	0.01 - 0.08	0 - 2% des leucocytes
Cellules progénitrices et cellules souches hématopoïétiques (CD34+)	0.001 - 0.007	0.03 - 0.09% des leucocytes

(Adapté du poster *Frequencies of Cell Types in Human Peripheral Blood*, Stemcell)

<https://www.stemcell.com/technical-resources/educational-materials/wallcharts.html>

Le cerveau est constitué d'un ensemble de cellules spécialisées qui sont les neurones et les cellules gliales. Ces dernières sont 10 à 50 fois plus nombreuses que les neurones. Parmi les cellules gliales, les oligodendrocytes forment la gaine de myéline essentielle au maintien de l'influx nerveux et guident les axones dans leur développement. Les astrocytes, à fonction nourricière, apportent les nutriments, régulent le pH, participent à la transmission synaptique et à la récupération des neurotransmetteurs (Sedel and Lyon-Caen, 2010). La microglie est cruciale dans le maintien de l'homéostasie du SNC. Elle est impliquée dans la maintenance des synapses et exerce un rôle trophique pour les neurones, les astrocytes et

les oligodendrocytes via la sécrétion de neurotrophines telles que le NGF, le BDNF, la NT3 et le GDNF (Ousman and Kubes, 2012). La microglie aurait une fonction dans la myélinisation, l'oligodendrogenèse et dans l'angiogenèse (Langmann, 2007). Enfin sa fonction majeure demeure la défense contre les infections et l'élimination des débris extracellulaires (Sedel et Lyon-Caen, 2010). La microglie à l'état normal n'est pas activée. Elle présente un faible niveau d'expression de la molécule HLA-DR, ce qui traduit sa capacité à accomplir de la présentation antigénique (Hayes et al., 1987). Elle exprime les molécules nécessaires à cette fonction comme le MCH-II, CD80, CD86, CD40, CD11a, CD54 et CD58 (Akiyama and McGeer, 1990; Shrikant and Benveniste, 1996). Lors de son activation, elle prend une forme moins ramifiée et augmente l'expression des molécules CD45 et CD11b (Hoek et al., 2000). A l'image des macrophages, l'injection intraventriculaire de lipopolysaccharide (LPS) induit la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-1 et l'IFN, ainsi que des chimiokines (Ousman and Kubes, 2012). Comme dans le cas des macrophages, la microglie pourrait être composée de nombreuses sous populations possédant des fonctions spécifiques. La microglie a deux origines embryonnaires: une population dérive de cellules du sac vitellin, tandis que l'autre provient de la moelle osseuse, chacune possédant des fonctions différentes (Ginhoux et al., 2010; Alliot et al., 1991; Schulz et al., 2012; Chen et al., 2010). A l'état basal, le cerveau est maintenu dans un environnement immunosuppresseur. Les astrocytes produisent du TGF β (Aloisi et al., 1997; Vincent et al., 1997) et la microglie de l'IL-10 (Aloisi et al., 1997). Dans une culture microgliale de rat, il a été montré que le NGF diminue l'expression de CD86 et de CD40 (Wei and Jonakait, 1999) et que NT3, NGF et BDNF diminuent l'expression de CMH-I (Neumann et al., 1998). Ainsi les neurotrophines participent à la diminution physiologique des capacités de présentation antigénique du cerveau. De même, l'interaction entre la molécule CD200 à la surface de la microglie avec son récepteur CD200R sur les neurones participe aussi à cet état (Hoek et al., 2000).

L'homéostasie du SNC est cruciale au bon fonctionnement neuronal. Les premières observations de Sir Peter Medawar ont montré que le cerveau ne rejetait pas les greffes de tissus étranger (Medawar, 1948). De plus, l'absence de cellules présentatrice d'antigène classiques (APC), l'absence d'expression constitutive de molécules de CMH de classe I et II par les cellules du parenchyme, ainsi que l'absence de vaisseaux lymphatiques dans le

cerveau suggéraient que le cerveau puisse être un organe immunologiquement privilégié sans mécanismes d'immuno-surveillance (Simpson, 2006). L'observation de certaines pathologies impliquant une rupture de la perméabilité de la BHE a fortement remis en cause cette hypothèse. Le trafic des leucocytes à travers la BHE a été observé dans le cas de maladies inflammatoires telles que la sclérose en plaque (SEP), certaines infections virales et bactériennes et dans l'ischémie (Johanson et al., 2011). De nos jours, le concept est que le SNC et la moelle épinière sont sous surveillance immunitaire comme c'est le cas pour l'ensemble de l'organisme. Ce système de surveillance s'active fortement dans le cas de certaines pathologies comme les méningites et une perte d'immunité corrèle avec des infections cérébrales. Ce système est constitué de la microglie résidente et de cellules immunes telles que macrophages, cellules dendritiques et cellules T issues du sang et pouvant diffuser librement à travers la BHE et à la jonction entre le sang et le LCR (Ousman and Kubes, 2012). Trois sites d'entrée ont été proposés (Fig. 3, ci-dessous). Les mécanismes d'entrée de ces cellules sont semblables à ceux contrôlant l'entrée dans d'autres organes, sauf que la transmigration est à un niveau plus faible. Les molécules impliquées dans le processus d'extravasation sont les P- et E-sélectines, ICAM-1, et VCAM-1 qui interagissent avec VLA4 des cellules T Th1, la molécule MadCAM-1 et la PECAM-1 (Ousman and Kubes, 2012). CCR6 serait engagé dans la migration des lymphocytes Th17 dans des modèles d'encéphalomyélites allergiques expérimentales (EAE) (Reboldi et al., 2009).

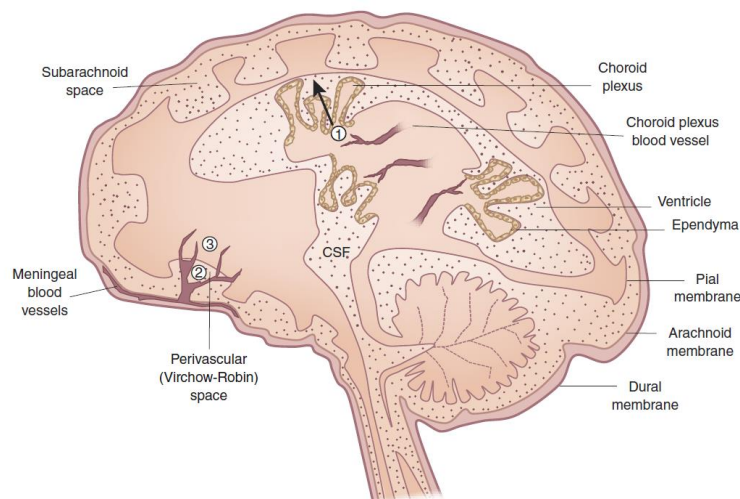


Figure 3 Sites d'entrée possibles des cellules immunitaires dans le SNC. 1. Plexus choroïdes, 2. Espaces péri-vasculaires, 3. Veinules post-capillaires (Adapté de Ousman *et al*, 2012).

Les cellules T qui interagissent transitoirement avec l'endothélium cérébral sont peu nombreuses et l'expression des molécules d'adhésion est un dixième de celle retrouvée sur d'autres endothéliums. Dans le cerveau, la cinétique du *rolling* des leucocytes est environ dix fois inférieure à celle observée dans d'autres compartiments. L'action du système immunitaire issu de la périphérie est donc globalement diminuée. Les cellules infiltrées sont localisées stratégiquement et ne colonisent pas le parenchyme à l'état physiologique (Ousman and Kubes, 2012). Les macrophages périvasculaires et les cellules dendritiques méningées sont localisés stratégiquement à l'interface entre le sang et le cerveau pour pouvoir collecter les antigènes de l'environnement et promouvoir une présentation antigénique adaptée (McMenamin, 1999). Dans le cas d'infection du SNC ou dans des pathologies telles que l'EAE, la sclérose en plaque et la sclérose latérale amyotrophique, le nombre de cellules dendritiques augmente et elles colonisent le parenchyme (Ousman and Kubes, 2012). Les cellules infiltrées dans le cerveau sont surtout des lymphocytes T (80%). Leur phénotype est $CD4^+CD45RA^-CD27^+CD69^+$ soit des cellules activées mémoires exprimant de haut niveau de CCR7, CXCR3 et L-sélectine (Kivisäkk et al., 2002; 2003). Une sous population de lymphocytes $CD4^+$ produisant de l'IL-17 et de l'IL-22 serait aussi retrouvée (Wojcik et al., 2011). On retrouve aussi des $CD3^+CD8^+granzyme\ B^-perforine^-$ et

des LB CD20⁺. Les cellules dendritiques sont de type myéloïde et plasmacytoïde (Ousman and Kubes, 2012).

1.2.2 SYSTÈME IMMUNITAIRE CHEZ LA PERSONNE ÂGÉE

En 2013, Lopez-Otin et ses collaborateurs ont définis 9 caractéristiques associées au vieillissement : instabilité génomique, attrition des télomères, altérations épigénétiques, perte de la protéostasie, dérégulation de la détection des nutriments, dysfonctions mitochondriales, épuisement des cellules souches, altération des communications entre les cellules, et sénescence cellulaire (López-Otín et al., 2013). Tout d'abord, la sénescence cellulaire peut être définie par un arrêt stable du cycle cellulaire associé à des changements phénotypiques (Kuilman et al., 2010). Avec l'âge, l'accumulation de cellules sénescents pourrait refléter une augmentation de leur production et/ou une diminution de leur élimination. Parmi les changements phénotypiques associés à la sénescence, on peut notamment citer des altérations du sécrétome qui devient particulièrement enrichi en cytokines pro-inflammatoires et en métalloprotéinases matricielles participant à l'installation d'un environnement inflammatoire (Kuilman et al., 2010). Avec l'âge, un état inflammatoire s'installe (de Magalhães et al., 2009; Lee et al., 2012). On parle d'*inflammaging* (Cevenini et al., 2013) qui est caractérisé par une accumulation de tissus endommagés pro-inflammatoires (López-Otín et al., 2013), une autophagie activée défectueuse (Salminen et al., 2012), une activation de l'inflammasome (NLRP3) (Bauernfeind et al., 2016), et une activation de la voie pro-inflammatoire NFκB (Salminen et al., 2008).

Le terme immunosénescence désigne l'ensemble des modifications du système immunitaire de la personne âgée. La première observation générale que l'on fait du système immunitaire âgé est une baisse généralisée de la réponse immune en réponse à des pathogènes, tel que mesuré par l'augmentation des infections (pneumonies, infections du système urinaire) (Kline and Bowdish, 2016), des cancers et des vaccins (Weiskopf et al., 2009; Targonski et al., 2007). L'ensemble des constituants humoraux et cellulaires autant qu'ils appartiennent à l'immunité innée ou adaptative sont affectés par la sénescence.

D'une façon générale, le système immunitaire inné semble mieux préservé et les changements plus délétères semblent toucher le système adaptatif (Franceschi et al., 2000).

Dans le système immunitaire inné, le nombre de neutrophiles sanguins et de précurseurs dans la moëlle osseuse sont préservés chez les personnes âgées en santé (Chatta et al., 1993). L'augmentation du nombre de PMN chez certaines personnes âgées est associée à une meilleure survie (Strindhall et al., 2007). Avec le vieillissement, les fonctions de chimiotactisme et d'adhésion sont inchangées. Cependant, les fonctions de phagocytose sont significativement diminuées dans le cas de bactéries opsonisées tandis que dans le cas de bactéries non opsonisées elles sont conservées (Wenisch et al., 2000; Emanuelli et al., 1986). Le récepteur du fragment constant (Fc) de type CD16 est significativement diminué chez les personnes âgées. De plus il a été montré que la production de superoxyde médiée par les Fc est diminuée avec l'âge (Fülöp et al., 1985). Parmi les granulocytes, on retrouve aussi les éosinophiles et les basophiles. Peu d'études ont été faites à ce jour sur ces populations cellulaires. Les éosinophiles possèdent une capacité diminuée de dégranulation (IL-5) et de production d'anions superoxydes, tandis que les propriétés d'adhésion, de chimiotactisme et de nombre sont inchangées avec l'âge (Mathur et al., 2008; Panda et al., 2009). Quant aux basophiles, des études contradictoires sur leur fonction de dégranulation ne permettent pas de statuer (Panda et al., 2009). Avec l'âge, le nombre de macrophages et leurs capacités bactéricides sont altérés (Stout and Suttles, 2005). Quant aux cellules NK, elles prolifèrent de moins en moins en fonction du vieillissement (Camous et al., 2012). Les sous-populations cellulaires CD56^{bright} diminuent (Chidrawar et al., 2006), tandis que les CD56^{dim} et les CD16⁺CD56⁻ augmentent (Solana et al., 2014). De plus, d'autres changements phénotypiques comme la baisse de l'expression du marqueur CD57 (Solana et al., 2014), la diminution de la production d'IFN- α et - γ , l'augmentation de production de chimiokine IL-8 et l'augmentation de production de cytokines telles l'IL-1, l'IL-4, l'IL-6 et le TNF- β sont observés (Camous et al., 2012).

Historiquement, l'immunosénescence du système immunitaire adaptatif et des cellules T a été davantage étudié (Pawelec and Larbi, 2008). L'organe-siège de la maturation des lymphocytes T, le thymus, s'atrophie avec l'âge, ce qui entraîne une baisse de la génération de lymphocytes T naïfs (Goronzy et al., 2007). On retrouve une accumulation de cellules T mémoires hautement différenciées au dépend des cellules T

naïves (Fülöp et al., 2012; Di Mitri et al., 2011; Fülöp et al., 2013). Plusieurs facteurs pourraient intervenir, certains auteurs ont proposé l'implication de modifications des caractéristiques des progéniteurs (Zhu et al., 2007), d'autres soulignent l'influence de l'environnement et en particulier de l'IL-7 (Aspinall et al., 2007) et du facteur de croissance des kératinocytes (Min et al., 2007). L'importance des facteurs environnementaux est illustrée par la transplantation d'un thymus de souris âgée chez une souris jeune menant à la restauration du thymus (Nobori et al., 2006). De même, de hauts niveaux d'IL-7 sont retrouvés chez de nombreux sujets centenaires (Nasi et al., 2006). Les lymphocytes B des personnes âgées sont davantage de type mémoires que naïfs, ce qui diminue sévèrement le répertoire de récepteur antigénique et participe à la baisse de l'immunité chez la personne âgée. Le mécanisme d'hypermutation est conservé tandis que la maturation d'affinité pourrait être altérée (Howard et al., 2006). Les centres germinatifs des muqueuses seraient les plus affectés par le vieillissement.

L'étude de l'immunosénescence doit aussi prendre en compte l'altération de la communication entre les différentes sous populations de cellulaires immunitaires (Fülöp et al., 2014). Des modifications dans la régulation de la signalisation sont retrouvées très précocement dans la cascade de signalisation progressive (*feed-forward*) ou plus tardivement dans le rétrocontrôle négatif (*feed-back*) en affectant aussi bien des populations cellulaires innées comme les neutrophiles (Fülöp et al., 2004) que des cellules de l'immunité adaptative comme les lymphocytes T.

Le système immunitaire du cerveau change avec l'âge et la microglie est la population cellulaire la plus affectée par le vieillissement (Streit and Xue, 2010). La microglie quiescente chez la personne âgée, possède moins de ramifications, ses mouvements sont plus lents et ses capacités de migration sont diminuées. Ces changements pourraient compromettre sa fonction de surveillance et de réponse immunitaire (Damani et al., 2011). La quantité de microglie totale augmente de 65% (Vaughan and Peters, 1974; Samorajski, 1976). Elle présente certaines caractéristiques telles que l'accumulation de dépôts de lipofuscine dans ses membranes (Vaughan and Peters, 1974) (ces dépôts sont des lysosomes qui, avec l'âge, perdent leur fonction et ne sont pas capables de se dégrader eux-mêmes), l'augmentation de l'expression du CMH (Perry et al., 1993) et l'augmentation de corps d'inclusion (Streit and Xue, 2010). Quant aux cellules immunitaires issues de la

périphérie, peu de données sont disponibles. Le nombre de CD résidente du cerveau est augmenté (Ousman and Kubes, 2012).

1.2.3 SYSTÈME IMMUNITAIRE ET MA

Chez l'homme, on retrouve peu de données sur le système immunitaires et la MA en tant que tel. L'étude post-mortem de cerveaux de patients Alzheimer a révélé la présence de concentrations élevées des cytokines IL-1 α et β (IL-1 α/β), IL-6, TNF α et interféron α (IFN α) (Rubio-Perez et Morillas-Ruiz, 2012; Akiyama et al., 2000; Wyss-Coray et Rogers, 2012). Des niveaux élevés des chimiokines CCL2, CCL3, CCL4, IL-8 et CXCL10 et des récepteurs de chimiokines CXCR2, CCR3, CCR5 ont ainsi été observés (Rubio-Perez et Morillas-Ruiz, 2012; Xia et Hyman, 1999; Mennicken et al., 1999; Cardona et al., 2008). Au niveau des plaques amyloïdes, la présence du C1q et du complexe d'attaque membranaire (CAM), complexe formant un pore membranaire pour faciliter l'action du complément, indique un état d'activation de la cascade du complément (Rubio-Perez et Morillas-Ruiz, 2012; Emmerling et al., 2000). La chimiokine «*Monocyte Chemotactic Protein 1*» (MCP-1 ou CCL2) y a également été retrouvée. CCL2 est connue pour participer au recrutement des monocytes, des lymphocytes T mémoires, des cellules dendritiques et des astrocytes. La microglie est recrutée dans l'environnement des plaques amyloïdes et adopte une forme active amiboïde qui exprime des marqueurs d'activation (comme le CMH-II et la cyclo-oxygénase 2 (COX 2)) et produit les médiateurs pro-inflammatoires MCP-1, TNF α , IL-1 β et IL-6 (Lue et al., 2010; Perry et al., 2010; Perry et Holmes, 2014). Il a été montré que les peptides A β sont capables d'activer la microglie pour induire une production de radicaux oxygénés (les espèces réactives oxygénées et azotées, respectivement ROS et RONS), de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β et IL-6), de chimiokines (IL-18) et des prostaglandines (PGE2) (Lue et al., 2010; Meda et al., 1995). Une astroglyose, c'est-à-dire une augmentation du nombre, de la taille et de la mobilité des astrocytes, est associée à la MA (Rubio-Perez et Morillas-Ruiz, 2012). Les astrocytes possèdent des récepteurs pour les peptides A β de type RAGE et scavenger. *In vitro*, en réponse aux peptides A β , les astrocytes génèrent les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF α , des ROS et des RONS. Récemment, le rôle de la sous unité p40 commune

aux cytokines IL-12 et IL-23 a été mise en évidence dans la progression de la MA dans un modèle murin (Papatriantafyllou, 2013; Vom Berg et al., 2012). Cet environnement pro-inflammatoire accompagné d'une quantité de protéines oxydées participe à la mort neuronale (Nunomura et al., 2006). Notamment, les oligodendrocytes, sont très sensibles au stress oxydatif et aux peptides β amyloïdes 1-40 et 1-42 (Heneka et al., 2010).

L'intégrité de la BHE est altérée dans la MA et sa perméabilité aux peptides $A\beta$ est augmentée (Biron et al., 2011). Le passage des peptides $A\beta$ à travers la BHE se fait via des récepteurs RAGE et la protéine de type 1 liée à des récepteurs de lipoprotéines de faible densité (LRP-1) (Deane et al., 2009; Bell et al., 2009). Dans un modèle murin de la MA, des monocytes périphériques ont été retrouvés dans le cerveau entourant les plaques amyloïdes, suggérant un dialogue entre la périphérie et le cerveau et la participation de la réponse immunitaire dirigée contre les peptides $A\beta$ (Simard et al., 2006). Les cellules du système adaptatif sont aussi impliquées. En effet, dès 1988, le marquage de coupes d'hippocampe et de cortex temporal de patients décédés de la MA, a révélé la présence de lymphocytes T exprimant fortement le marqueur CD45. Ces lymphocytes sont de type CD4 et CD8, avec une majorité de CD8 cytotoxiques. L'expression des molécules de CMH indique que le CMH-II de type HLA-DR et non le CMH-I est augmenté par rapport aux témoins. L'ensemble de ces observations suggère une capacité de présentation antigénique accrue dans le cerveau de patients atteints de la MA. Cependant, aucune prolifération clonale n'a pu être observée par marquage de la protéine nucléaire Ki-67 associée à la prolifération cellulaire (Hitchcock, 1991). Ces lymphocytes T ont un profil «cellules mémoire» car ils expriment les marqueurs CD45RA⁻, CD45R0⁺, CD27⁺. Par ailleurs, l'absence d'expression de CD25 (chaîne α du récepteur de l'IL-2), CD11b (intégrine α M) et CD27 suggère qu'il s'agit de cellules effectrices non activées (Itagaki et al., 1988; Rogers et al., 1988).

Dans le sang, le ratio des peptides $A\beta$ amyloïdes 1-42/1-40 est diminué avec la progression de la MA et des anticorps anti-peptides $A\beta$ sont présents (Fukumoto et al., 2003; Paul et al., 2010). Par contre, la phagocytose des peptides $A\beta$ par les macrophages est diminuée (Cashman et al., 2008; Zaghi et al., 2009; Masoumi et al., 2009; Fiala et al., 2005). Aucun changement dans le nombre des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ et des lymphocytes B et NK n'a pu être mis en évidence (Larbi et al., 2009; Speciale et al., 2007;

Richartz-Salzbunger et al., 2007; Pellicanò et al., 2012). En revanche, le nombre des sous populations T CD4⁺ et non les T CD8⁺ est modifié. Le nombre de T CD4⁺ naïfs est diminué, tandis que le nombre de lymphocytes T effecteurs mémoires CD45RA positifs et négatifs est augmenté (Larbi et al., 2009). Une augmentation de la densité des récepteurs des chimiokines CCR4 et CCR5 a été rapportée dans le cas des lymphocytes T CD4⁺ et, CCR6 sur les lymphocytes T, B et les monocytes (Goldeck et al., 2013). Plusieurs éléments appuient l'hypothèse d'un rôle des lymphocytes T CD8 dans la pathophysiologie de la MA (Itagaki et al., 1988). Leur présence augmentée dans le cerveau des patients atteints de la MA (Itagaki et al., 1988), ainsi que leur fonction antivirale (Cox et al., 2013), soulignent l'implication de cette population. A ce jour, peu ou aucune donnée dans la littérature n'a montré l'implication des populations de lymphocytes TH17, NKT et T $\gamma\delta$ dans la pathogenèse de la MA.

Un grand nombre d'articles implique la présence de pathogènes dans l'étiologie de la MA. Parmi les pathogènes cités, on retrouve des pathogènes à tropisme cérébral tels les virus *Herpes virus de type-1* et des bactéries de type spirochète comme *Treponema* et *Borrelia burgdorferi* ou d'autre type comme *Chlamidophyla pneumonia* (Miklossy, 2011; Carter, 2011; Soscia et al., 2010). On retrouve fréquemment la présence de l'un ou l'autre et, parfois plus d'un, de ces pathogènes en analyse post-mortem sur des coupes de cerveaux de patients décédés de la MA. Dans ce contexte, la production des peptides β amyloïdes pourrait être une réponse de défense face à ces pathogènes, donc d'agents possédant des propriétés antivirales (Bourgade et al., 2016b; a; Kumar et al., 2016; White et al., 2014).

Le rôle néfaste de l'inflammation dans la MA est souligné par certaines études. Des études épidémiologiques ont montré que l'utilisation prolongée d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) a un effet protecteur contre la MA. Des personnes atteintes de la lèpre ou de polyarthrite rhumatoïde et qui sont sous traitement sont relativement épargnées par la MA (Pasinetti, 2002; Hoozemans et al., 2003; Etminan et al., 2003). Cependant les essais cliniques n'ont pas démontré hors de tout doute un effet protecteur des NSAID (Zandi et Breitner, 2001). Ces anti-inflammatoires diminuent l'expression du CMH-II chez les microglies chez l'homme. Chez la souris, une baisse de l'accumulation des peptides A β a été observée et pourrait intervenir selon différents mécanismes dont l'inhibition des petites protéines G Rho et Roc (respectivement une GTPase et une sérine/ thréonine kinase) (Zhou

et al., 2003), ou encore l'activation des récepteurs par les proliférateurs de peroxyde de type γ (PPAR γ R) qui inhiberaient l'activité de BACE-1 (Sastre et al., 2006).

L'origine et la physiopathologie de la MA n'étant pas déterminées, plusieurs questions demeurent concernant le rôle de l'inflammation. Déterminer si l'inflammation joue un rôle directeur majeur, un rôle « *bystander* » ou un rôle bénéfique dans la MA demeure à établir (Wyss-Coray, 2006; Wyss-Coray et Rogers, 2012). Il pourrait s'agir d'une réponse inflammatoire incontrôlée ou, à l'inverse, incomplète. Les défauts dans les fonctions de phagocytose des macrophages des patients atteints de la MA peuvent laisser penser à un défaut dans la réponse à une agression ou dans un équilibre (Fiala et al., 2005). Plusieurs éléments indiquent l'engagement du système immunitaire dans la MA. L'hypothèse proposée par ces différentes observations serait un ou des défauts du système immunitaire impliqué(s) dans la pathogenèse de la MA.

1.3 LYMPHOCYTES NATURAL KILLER (NK) ET MA

L'association entre la MA et certains virus pose la question du rôle des NK dans la MA puisque les cellules NK participent activement à la réponse immunitaire contre les infections virales. Leur capacité à reconnaître les cellules transformées et infectées repose sur leur capacité à reconnaître la diminution de l'expression du CMH-I à la surface de ces cellules (Tian, 2013; Vivier et al., 2008). Dans des cerveaux de rat, une augmentation d'une population de cellules NK CD161⁺ NKp46⁺ a été observé avec le vieillissement et après traitement aux peptides β -amyloïdes (Solerte et al., 1997). Chez des patients atteints de la MA, une augmentation de la production d'IL-2, de TNF α et d'IFN γ après stimulation a l'IL-2 a été mise en évidence (Solerte et al., 1997), suggérant que les cellules NK pourraient contribuer à l'inflammation dans la MA. D'autre part, l'utilisation d'un inhibiteur de la HMG-COA reductase, l'atorvastatine, atténue l'augmentation du nombre de cellules NK dans le cerveau de rat âgés traités aux peptides A β en agissant sur la production d'IFN γ , MCP-1 et IP-10 (Lyons et al., 2011). Il est possible dans ce contexte, que le blocage de la production d'IFN γ par les NK pourrait empêcher l'activation de la microglie. Ce sont autant d'éléments justifiant une étude des NK dans la MA.

1.4 NEUTROPHILES ET MA

Les neutrophiles sont des cellules circulantes à durée de vie limitée qui sont la première ligne de défense contre les infections et/ou traumatismes à cause de leur propriété de migrer au site d'agression tissulaire. Ainsi les neutrophiles initient et orientent la réponse inflammatoire (Jaeger et al., 2012; Mantovani et al., 2011; Kumar et Sharma, 2010; Bian et al., 2012; Galli et al., 2011). Dans un modèle murin de la MA, le modèle 5xFAD qui comprends 3 mutations dans le gène de l'APP (*Swedish, Florida, London*) et 2 mutations dans le gène de la préséniline-1 (M146L et L286V), il a été démontré que les neutrophiles étaient capables de migration transendothéliale à travers les vaisseaux sanguins vers le cerveau et qu'ils pouvaient migrer, dans un second temps, dans le tissu vers les plaques amyloïdes (Baik et al., 2014). L'équipe de Zenaro *et al* (Zenaro et al., 2015), a confirmé ces résultats dans le même modèle murin, ainsi que dans le modèle 3xTg-AD. Cette étude démontre aussi l'engagement de l'intégrine LFA-1 et de son ligand dans les mécanismes d'adhésion et d'extravasation des neutrophiles dans le cerveau. L'inhibition de ce recrutement par blocage de LFA-1 améliore les facultés cognitives des souris. De plus, au niveau des plaques amyloïdes, cette étude a mis en évidence la production d'IL-17 par les neutrophiles ainsi que la formation de pièges extracellulaires, les NET (*Neutrophils Extracellular Trap*) (Zenaro et al., 2015). Ces études suggèrent que les neutrophiles pourraient contribuer à la pathogenèse de la MA et aux changements cognitifs, d'une part, et que l'inhibition du trafic des neutrophiles pourrait être bénéfique, d'autre part. Cependant l'implication des neutrophiles dans la MA chez l'homme demeure inconnue.

1.5 LYMPHOCYTES T REGULATEURS ET MA

Les lymphocytes T régulateurs (LTreg) sont indispensables au maintien de la tolérance immunitaire (Sakaguchi, et al, 2005; Shevach et al, 2009). Ces derniers possèdent la propriété d'inhiber la prolifération de lymphocytes effecteurs suivant différents mécanismes (Vignali et al., 2008). En 2015, Baruch et *al*, dans un modèle murin de la MA, ont montré que la déplétion transitoire des LTreg ou leur inhibition pharmacologique

permettait d'atténuer la neuro-inflammation, de diminuer la quantité de plaques amyloïdes et d'améliorer la cognition (Baruch et al, 2015). Chez l'homme, une étude a révélé une baisse de la quantité de lymphocytes T CD4 CD25^{high}, des lymphocytes Treg naïfs potentiels, dans un groupe de patients atteints de la MA par rapport à un groupe de patients en santé (Larbi et al., 2009). Les quelques éléments connus à ce jour semblent suggérer un rôle protecteur des LTreg contre la MA.

1.6 RATIONNEL ET HYPOTHÈSE DU TRAVAIL

La présence d'une inflammation cérébrale, le recrutement de cellules à fonction immunitaire comme la microglie, les macrophages et le complément au niveau des plaques amyloïdes sont plusieurs éléments décrits en détail dans les chapitres précédents qui indiquent qu'au cours de la MA, une réponse immune est initiée en périphérie et dans le cerveau. L'accumulation des plaques séniles suggère que cette réponse immune est inefficace pour éliminer les peptides β -amyloïdes, suggérant un dysfonctionnement du système immunitaire ou plus largement du système de protection du cerveau. Le système immunitaire est donc impliqué ou du moins associé à la physiopathologie de la MA. Son rôle causal ou non n'est pas déterminé à ce jour. Devant la difficulté à suivre l'évolution clinique de la MA, l'identification de biomarqueurs de la MA spécifiques, sensibles et facilement mesurables en clinique pourrait être réalisé par l'étude du système immunitaire en périphérie.

Ces observations suggèrent que des changements quantitatifs et/ou fonctionnels seraient observables dans le système immunitaire périphérique et pourraient être associés avec l'initiation et/ou l'évolution de la MA. L'étude de ces modifications par comparaison des différents stades de la MA, pourrait servir comme biomarqueur indicatif de la progression de la MA; tandis que l'étude des modifications chez des patients aMCI qui convertissent en MA, pourrait constituer un état exprimant des biomarqueurs fidèles sur l'initiation de la MA. Une analyse des changements des populations immunitaires apparaît alors essentielle afin de mieux comprendre la complexité de la MA. Dans cette thèse, les populations immunitaires innées, constituées principalement des neutrophiles et de

lymphocytes tueurs naturels (*“natural killer”* ou NK) seront étudiées en tant qu’outils de criblage de biomarqueurs associés à l’initiation et/ou à la progression de la MA.

Notre hypothèse est que l’étude du système immunitaire périphérique peut servir à l’identification de biomarqueurs fiables afin de caractériser et, possiblement, prédire le développement de la MA et d’intervenir dans sa progression.

1.6.1 OBJECTIFS DE RECHERCHE

L’objectif principal de mes travaux de recherche était celui d’identifier des signatures immunitaires de la MA en se basant sur une analyse des modifications quantitatives et/ou fonctionnelles des composantes cellulaires du système immunitaire. Les résultats sont présentés sous forme d’objectifs se rattachant dans chaque cas à une population cellulaire immunitaire concernée. La thèse décrit les résultats obtenus dans le cas des cellules du système immunitaire inné, soient les neutrophiles et les cellules NK. Dans l’objectif 3, mon étude se rattache à l’étude des populations immunitaires régulatrices.

1.6.1.1 OBJECTIF 1

Le premier objectif avait pour but d’identifier une signature immunitaire de la MA à partir de l’étude des modifications quantitatives et/ou fonctionnelles déterminées chez les cellules NK.

1.6.1.2 OBJECTIF 2

Le second objectif avait pour but d’identifier une signature immunitaire de la MA à partir de l’étude des modifications quantitatives et/ou fonctionnelles déterminées chez les neutrophiles.

1.6.1.3 OBJECTIF 3

Le troisième objectif avait pour but d'identifier une signature immune de la MA à partir de l'étude des modifications quantitatives et/ou fonctionnelles déterminées chez les lymphocytes T régulateurs.

2 Article 1

NK cells are activated in amnestic mild cognitive impairment but not in mild Alzheimer's diseases patients

Auteurs de l'article: Aurélie Le Page, Karine Bourgade, Julie Lamoureux, Eric Frost, Graham Pawelec, Anis Larbi, Gilles Dupuis and Tamàs Fülöp

Statut de l'article: publié dans le Journal of Alzheimer's Disease 2015;46(1):93-107.

2.1 AVANT-PROPOS

J'ai réalisé la purification des cellules mononuclées périphériques et l'ensemble des expériences décrites dans cette publication. J'ai effectué la mise au point des conditions de purification, de cultures et de stimulation des lymphocytes NK. J'ai mis au point les co-cultures des cellules NK avec les cellules K562, ainsi que l'analyse des données cliniques et le génotypage APOE des patients. De même pour les expériences basées sur la cytométrie en flux, j'ai mis au point les protocoles de marquage de surface, les marquages intracellulaires et, plus particulièrement, les marquages au CFSE et celui du CD107, suivi de la planification et utilisation des mélanges d'anticorps fluorescents en mode multi-couleurs. J'ai réalisé les tests statistiques et j'ai rédigé les versions initiales de l'article.

2.2 RÉSUMÉ

La MA est un désordre neurologique progressif et irréversible caractérisé par l'accumulation de peptides β -amyloïdes, de plaques amyloïdes et de dégénérescences neurofibrillaires. L'inflammation et des altérations du système immunitaire ont été reliées à la MA, suggérant que le système immunitaire périphérique pourrait jouer un rôle pendant la phase asymptomatique de la maladie. Les lymphocytes *natural killer* participent à la surveillance immune innée dirigée contre les pathogènes intracellulaires et les cellules

malignes, cependant leur rôle dans la MA demeure controversé. Nous avons étudié les changements des cellules NK du sang périphérique au niveau phénotypique et fonctionnel chez des patients aMCI (n = 10), des personnes atteintes de la MA à un stage léger (mAD) (n = 11) et des patients témoins âgés en santé (n = 10), respectivement. Les patients ont été sélectionnés selon les directives du NINCDS-ADRDA et classifiés à partir des résultats aux tests neuropsychologiques. L'analyse phénotypique a révélé des différences d'expression de CD16 (augmenté chez les patients mAD), de NKG2A (diminué chez les patients aMCI), et des TLR2 et TLR9 (tous deux diminués chez les patients mAD). Les tests fonctionnels ont révélé que l'activité cytotoxique des lymphocytes NK ainsi que leur capacité de dégranulation (analysé par la mesure de l'expression du CD107) étaient inchangés dans les 3 groupes de patients. Au contraire, l'expression du récepteur CD95 était augmentée chez les aMCI et mAD. L'expression de granzyme B et la production de cytokines telles que TNF α et IFN γ étaient augmentées chez les aMCI mais pas chez les patients mAD. Le chimiotactisme induit par la chimiokine CCL19 et non par CCL21 était diminué chez les aMCI et mAD, malgré l'augmentation de l'expression du CCR7 chez les patients aMCI. L'ensemble des altérations observées chez les lymphocytes NK suggère un état d'activation de ces cellules chez les patients aMCI par opposition au stade Alzheimer léger, lequel pourrait refléter une réponse immunitaire active dirigée contre une agression dont la nature n'a pas encore été identifiée.

2.3 ARTICLE 1

Abstract. Alzheimer's disease (AD) is a progressive irreversible neurological brain disorder characterized by accumulation of β -amyloidogenic peptides, amyloid plaques and neurofibrillar tangles. Inflammation and immune alterations have been linked to AD, suggesting that the peripheral immune system plays a role during the asymptomatic period of AD. NK cells participate in innate immune surveillance against intracellular pathogens and malignancy but their role in AD remains controversial. We have investigated changes in peripheral NK cell phenotypes and functions in amnesic mild cognitive impairment (aMCI, n = 10), patients with mild AD (mAD, n = 11) and healthy elderly controls (n = 10). Patients selected according to NINCDS-ADRDA criteria were classified using neuropsychological assessment tests. Phenotype analysis revealed differences in expression of CD16 (increased in mAD), NKG2A (decreased in aMCI), TLR2 and TLR9 (both decreased in mAD). Functional assays revealed that NK cell killing activity and degranulation (CD107 expression) were unchanged in the three groups. In contrast, expression of the CD95 receptor was increased in aMCI and mAD. Granzyme B expression and cytokine production (TNF α , IFN γ) were increased in aMCI but not in mAD. CCL19- but not CCL21-dependent chemotaxis was decreased in aMCI and mAD, despite the fact that CCR7 expression was increased in aMCI. Our data suggest that the limited number of alterations observed in peripheral NK cells in aMCI represent an activation state compared to mAD patients that may reflect an active immune response against a still to be defined aggression.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a degenerative disorder that causes irreversible neuronal degeneration in specific regions of the brain. It is clinically characterized by a progressive loss of memory, language skills and subsequent appearance of other cognitive functional alterations, such as judgement and decision making, individual self-autonomy and, in a large number of cases, uncontrolled behavioral disturbances. AD is at present the most common form of dementia in the world [1]. Projections with respect to the number of individuals who will suffer from AD are gloomy. For example, it is estimated that there are 35 million people currently affected with AD world-wide and this number is projected to increase to 115 million in the next 30 years or so, putting a severe burden on affected

individuals, carers and society, as well as levying a large monetary cost to medical management [2]. This paramount medical and social problem is further compounded by increased life expectancy world-wide and the absence of curative treatment.

Two forms of AD are known, although both are characterized by similar pathological changes, namely profound neuronal loss, presence of intraneuronal neurofibrillary tangles and extracellular deposits of beta amyloid peptides derived from γ -secretase-dependent proteolysis of amyloid precursor protein (APP) [3]. Several etiological factors have been proposed as the causes of AD although the most important risk factor remains age [4]. For instance, the rare early onset familial form of AD (EOAD) that develops before the age of 65 is due to genetic mutations associated with the metabolism of APP [5]. In contrast, susceptibility to the common late onset or sporadic form of AD (LOAD) that occurs after the age of 65 has been linked to polymorphisms in a number of unrelated genes [6]. In addition, environmental factors, family history, viral infections and vascular risk factors such as hypertension, hypercholesterolemia, and disturbed glucose metabolism are additional factors that contribute to AD [7,8]. Despite evidence to the effect that infectious agents may be a cause of AD [9], a recent comprehensive analysis of the link between infections and AD concluded that this connection remains elusive [10].

Although signs of LOAD become evident later in life, they may be the result of progressive subtle changes that occur from early adulthood on, and that are related to the risk factors outlined above. Increasing evidence suggests that initial signs that may lead to severe AD in the later stage of the disease initially manifest as mild cognitive impairment (MCI). MCI corresponds to a transition state between cognitive changes of normal aging that frequently but do not necessarily convert to AD [11]. Most investigations have focused on amnesic MCI (aMCI) which is the most common of the different MCI subtypes. aMCI patients typically present prominent memory impairment that, in most cases, becomes more severe and progresses to AD in many instances [12,13]. aMCI patients have an annual AD diagnosis rate of 10% to 15% as opposed to a rate of 1% to 2% in the general elderly population. In addition, most conversions occur within 3 years following early manifestations of AD [14]. It is at present unknown why some aMCI patients remain mildly impaired for many years and may not progress to the state of dementia characteristic of AD, whereas others progress to AD.

AD is phenotypically associated with cognitive deficits but exhibits pathologic traits suggestive of a systemic disorder [15-17]. These include alterations of the innate and adaptive immune systems [18,19]. For instance, brain-resident innate immune cells such as microglia and astrocytes react to challenge from local or systemic tissue injury, trauma, infections, or accumulated A β [20,21]. In response to these challenges, microglial cells are activated from a quiescent state to responding cells that produce pro-inflammatory cytokines (eg. IL-1, TNF α), express innate receptors such as RAGE and other scavenger receptors, and TLR receptors [22].

Natural killer (NK) cells participate in the three major functions of the immune system, namely homeostasis, immune surveillance and defence against pathogens. They can control early viral infections by direct killing of virus-infected cells [23] and are able to recognize and eliminate malignant cells [24] as well as senescent cells [25]. Circulating NK cells can be classified according to distinct phenotypes associated with specific functions. Human NK cells are generally defined by the CD3⁻ CD56⁺ phenotype but mature NK cell subsets can be further distinguished by their CD56^{dim} CD16^{bright} surface phenotype (>95% of all NK cells) [26]. This major subpopulation is the main effector of virus-infected and malignant cell lysis, whereas the minor CD56^{bright}CD16⁻ subpopulation is more efficient at producing cytokines such as IFN γ and TNF α . A fine balance between activation or inhibition of NK cell responses depends on the expression and communication between the type I Ig-superfamily activating receptors (NGK2D) and type II C-type lectin inhibitory receptors (NKG2A/CD94) [27]. The cytolytic activity of NK cells is mediated through pathways involving release of granules containing granzymes and pore-forming perforin that allow delivery of granzymes to the target cell cytoplasm where they initiate apoptotic death pathways [28]. The other pathway of NK-dependent cell killing involves members of the TNF superfamily of death receptors and their ligands [29].

NK cell subpopulations are affected by senescence. For example, the percentage of NK cells is increased in healthy aging and centenarians but there is a decrease in the CD56^{bright}CD16⁻ NK cell subset and an expansion of CD56^{bright}CD16⁺ NK cells. Considering that CD56^{bright}CD16⁻ cells have a high capacity to produce different cytokines and chemokines in response to cytokines, their decreased proportion may be responsible for the defective production of cytokines and chemokines by NK cells stimulated by IL-2 or

IL-12 observed in elderly individuals [30]. Furthermore, the effect of aging on the expression of NK cells receptors has been recently described. Although there was no alteration in CD16 expression or CD16 function of NK cells, expression of the activating natural cytotoxicity receptors NKp30 and NKp46 and, co-stimulatory molecule DNAX accessory molecule (DNAM)-1 were decreased [30]. Analysis of NK cell inhibitory receptors showed an age-related increase in KIR expression and a decrease in CD94/NKG2A expression, although discrepancies could be found in different studies. As a functional consequence, NK cytotoxicity against classic NK cell targets was impaired but antibody-dependent NK cell cytotoxicity was not affected by aging [30].

A limited number of studies has investigated the role and functional alterations of NK cells in AD, but disparate data have emerged [30]. For instance, it was reported that there are no significant differences between the relative percentage of CD56⁺ CD16⁺ NK cells in AD patients and age-matched donors [31]. However, earlier investigations of NK function revealed that NK cell activity was lower in AD patients than in age-matched subjects [32]. Later studies confirmed that NK functions were altered in AD. For example, abnormally high levels of NK cell responses to IL-2 [33-35] and IFN γ and IL-2 [37] have been reported. Both IL-2-stimulated and non-stimulated cultures of NK cells from AD patients produced larger amounts of IL-2, TNF α and IFN γ than those of age-matched controls after stimulation [38]. The bulk of these reports suggests that NK cells may contribute to inflammation in AD. Although limited in number, these reports also suggest that NK cells may play a role in the pathology of AD and raise the possibility that changes in NK cell properties may serve as a clue to early detection of immune alterations in progression of AD. In this connection, it is to be noted that studies of NK cell phenotype and functions in aMCI patients have not been reported, although these patients are at risk to progress to AD.

Here, we have investigated whether NK cell phenotypes and functions are different in patients diagnosed with an aMCI condition and in those with mild AD (mAD), relative to age-matched controls. Data showed selective alterations in aMCI and mAD patients with respect to expression of CD16, NKG2A, CCR7, TLR2, TLR9, and granzyme B. Expression of IL-12 receptors β 1- and β 2 and IL-18 receptor β on NK cells were the same for the three groups of participants. In addition, some functional assays (cell killing, degranulation) were identical whereas others (chemotaxis index) depended on the nature of the chemokine.

Expression of the CD95 (Fas) receptor was increased in aMCI and mAD. Cytokine production (TNF α , IFN γ) was increased in aMCI but not in mAD patients. Our data led us to conclude that a number of alterations in NK phenotypes and functions occur in progressive development of AD.

Materials and methods

Subjects

This study was carried out with the approval of the ethics committee of the Faculty of Medicine and Health Sciences of the University of Sherbrooke (protocol # 2010-21/Fulop). Patients provided written informed consent where possible; when they were unable to give informed consent due to the extent of the cognitive impairment, legal caregivers provided it. Recruitment of healthy elderly subjects was conducted according to the criteria of the SENIEUR protocol [39]. AD and aMCI diagnosis was made according to NINCDS-ADRDA criteria [40] and the guidelines of Grundman *et al.* [41], respectively. Patients with a history or physical signs of atherosclerosis or inflammation were excluded. All subjects were evaluated and classified according to a standard protocol of our memory clinic including clinical, neuropsychological and imaging assessment [42]. Mini-Mental State Evaluation (MMSE) [43] and Montreal Cognitive Assessment (MoCA) [44] was performed. Ten healthy controls, 10 amnesic mild cognitive impairment (aMCI), and 11 patients with mild Alzheimer disease (mAD) were included in the study. Details of the patients' clinical data are summarized in Table 1.

Cell purification and cultures

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from heparinized blood (80 ml) by density gradient centrifugation over Ficoll-Paque plus medium (GE Healthcare Life Sciences, Baie d'Urfé, QC). PBMC were washed x3 in phosphate-buffered saline (PBS) (Wisent, St Bruno, QC) and resuspended in culture medium consisting of RPMI 1640, 10% fetal bovine serum and penicillin G (2.5 I.U./ml) and streptomycin (50 μ g/ml) (Wisent). NK cells were purified by positive magnetic isolation (Stemcell, Vancouver, BC, kit #18055), according to the supplier's recommendations. Purity of NK cells was >95% as assessed by FACS analysis of cells stained with anti-CD3 (T cells) and anti-CD56 (NK cells) mAbs. NK cell viability was assessed by FACS analysis using near-

IR LIVE/DEAD fixable kit (Life Technologies, Burlington, ON) showed levels of viability of $90\% \pm 7\%$ (healthy subjects), $87\% \pm 9\%$ (aMCI) and $84\% \pm 12\%$ (mAD), respectively.

ApoE4 genotyping

Genomic DNA (gDNA) was isolated from peripheral PBMC (1×10^6 cells) using a QiaAmp DNA mini kit (Qiagen, Toronto, ON) according to the manufacturer's instructions. APOE genotyping was performed with 20 ng of gDNA by real-time PCR, on a LightCycler 480 (Roche, Mississauga, ON). TaqMan genotyping assay rs7412 and rs429358 were used to recognize 2 single nucleotide polymorphism of mature apoE at amino acid residue 112 (T/C, Cys or Arg) and 158 (C/T, Arg or Cys).

Cell staining and flow cytometry analysis

PBMC or purified NK cells (1×10^6 cells) were washed twice with PBS (500 μ L), suspended in PBS (1 mL) and stained with a LIVE/DEAD fixable Aqua or IR Dead cells kit (1 μ L) (Life Technologies) for 25 min at room temperature, in the dark. After washing twice, PBMC or purified NK cells were fixed using a fixation buffer (BioLegend, San Diego, CA) containing 1% (w/v) paraformaldehyde (PFA) for 10 min at 4°C. Cells were treated for 10 min at 4°C with PBS containing 10% FBS to reduce non-specific binding. After washing twice with PBS, cells were incubated with a relevant antibody mix for 30 min at 4°C in the dark. Following 2 additional washings, cells were suspended in PBS, filtered through a nylon filter cloth (70 μ m mesh size, Morgans Screening & Filters Ltd., Pickering, ON) to remove cell clumps and processed for analysis. Data were acquired on a FACSAria III (BD Biosciences, San Jose, CA) instrument and analyzed using the FACSDiva v. 6.1 software. Analysis were performed using the FlowJo version 7.6.1 software (TreeStar, Ashland, OR). Mean fluorescence intensity (MFI) refers to geometric mean fluorescence intensity. Monoclonal antibodies used in this study are listed in Supplementary Table 1.

NK cell subpopulation gating strategy

Lymphocytes were gated using forward-scatter light-area (FSC-A) and size-scatter light-area (SSC-A). Doublets were excluded by selecting cells in a polygon gate in a forward-scatter light-high (FSC-H) and a forward-scatter light-area (FSC-A) plot. Dead cells were excluded based on the IR or Aqua fluorescence staining. NK cells were identified by CD56⁺CD3⁻ and NK cell subpopulations were determined by CD56 intensity

to identify CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells. Details of the FACS strategy are illustrated in Supplementary Figure 1.

CFSE-based cytotoxic assays of NK cells stimulated with IL-12 and K562 cells

K562 cells (kindly provided by Dr. Jana Stankova, University of Sherbrooke) were suspended (2.5×10^6 cells/mL) in PBS and labeled with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE, Life Technologies, Burlington, ON) (10 μ M) for 15 min at 37°C, in the dark. Purified NK cells were incubated with target CFSE-labeled K562 cells at an effector-to-target ratio of 5:1 in RPMI 1640 medium containing FBS (10%). Cells were then stimulated with IL-12p70 (1 ng/mL) and incubated for 5 h at 37°C. At the end of the incubation period, propidium iodide (PI) was added to assess cell death. Following an incubation of 15 min in the dark, cells were washed twice (PBS), suspended in PBS (200 μ L) and analyzed by cytofluorimetry (FACSCalibur instrument).

Cell degranulation and intracellular cytokine analysis in NK cells exposed to IL-12 and challenged with K562 cells

Degranulation and cytokine secretion of NK cells were analyzed by multi-parametric intracellular cytokine staining [45]. Purified NK cells were cultured in the presence of target K562 cells at effector-to-target ratio of 5:1 for 5 h in the presence of IL-12 (1 ng/mL). Monensin (0.7 μ l/mL), brefeldin (0.7 μ l/ml) and an anti-CD107a mAb (BD Biosciences) were added one hour later. Cells were then harvested and washed twice (PBS). Dead cell assessment was done by incubation with near-IR live dead fixable kit (Life Technologies, Burlington, ON) (1 μ L/mL) for 30 min at room temperature. Cells were then fixed using 1% (w/v) PFA for 10 min at 4°C and treated for 10 min at 4°C with 10% FBS in PBS to reduce non-specific binding. Cell surface staining was performed using anti-CD3, anti-CD16 and anti-CD56 antibodies for 25 min at 4°C. Intracellular staining was achieved by treatment with permeabilisation buffer (eBiosciences, San Diego, CA) for 15 min at 4°C and staining for 30 min with Brilliant Violet buffer containing anti-CD95, anti-TNF α , anti-IFN γ and granzyme b mAbs (Table S1). After two additional washings, cells were analyzed by cytofluorimetry (FACSAria III instrument, FACSDivaTM software v. 6.1).

Chemotaxis assays

The lower compartment of a Boyden chamber was filled with RPMI 1640 medium containing FBS (10%) or medium containing CCL19 or CCL21 (50 ng/ml each) (PeproTech, Rock Hill, NJ) in a total volume of 200 μ l. Medium did not contain FBS to avoid nonspecific migration of the cells. Polycarbonate membranes with 3.0 μ m pores were used (Neuro Probe, Gaithersburg, MD). NK cells (1×10^6 cells) were added to the upper compartment of the Boyden chamber in a volume of 200 μ l. Following incubation for 1 h at 37°C, cells in the lower chamber were recovered and analyzed using a FACSCalibur (BD Biosciences) cytofluorimeter calibrated with beads supplied by the manufacturer which were used to controls the machine fluidic performance and speed. Cell counts were acquired over 1 min under constant high speed. The chemotactic index was calculated as the ratio of the number of cells that migrated in response to chemokines over the number of cells that migrated in the absence of stimulus.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using one-way ANOVA and GraphPad Prism 6.02 software (GraphPad Software, La Jolla, CA).

Results

Patients' clinical data

Patients clinically diagnosed by extensive neuropsychological and imaging tests as suffering from aMCI or mAD had a mean MMSE score of 27.80 ± 1.99 and 23.70 ± 3.59 , respectively, and a mean MoCA score of 24.30 ± 2.06 and 15.70 ± 4.42 , respectively. In comparison, healthy controls had a mean MMSE score of 29.70 ± 0.67 and a MoCA score of 27.00 ± 3.30 (Table 1). No gender effect was noted as women were more represented in healthy controls (70%) and aMCI patients (90%) than in mAD patients (55%). APOE ϵ 4 allele frequency was increased in the aMCI group (0.64) compared to mAD patients (0.22) and healthy controls (0.25). All laboratory parameters were within the normal range (Table 1). Of significance, there were no signs of increased systemic inflammation in any of the participants during the course of the study as assessed by quantification of C-reactive protein. The 3 groups did not differ in the fraction of people infected by *Cytomegalovirus*.

NK cell populations in healthy controls, aMCI and mAD patients

Similar relative percentage of CD56⁺ CD16⁺ NK cells in AD patients and elderly controls have been reported previously [32,33]. We investigated whether this was also the case in aMCI. Cytofluorimetric analysis of peripheral CD56⁺ CD3⁻ NK cells (see gating strategy in supplementary Figure S1) revealed that these cells accounted for 10.6% (control), 9.8% (aMCI) and 11.6% (mAD) (Fig. 1A) of the lymphocyte population. Thus, there were no significant differences between the two groups of patients and the controls. NK^{bright} cells (CD56^{bright} CD16⁻) that correspond to a minor subpopulation of NK cells accounted for 0.8% (control), 0.7% (aMCI) and 0.9% (mAD) of the lymphocyte population (Fig. 1B), also not significant. In the case of the major NK^{bright} cell subpopulation (CD56^{dim} CD16⁺), it accounted for 8.7% (control), 8.0% (aMCI) and 10.6% (mAD) of the lymphocyte population (Fig. 1C), again not significant. The ratio of the two NK cell subpopulations in each group of subjects also showed no significant differences (Fig. 1D).

Cytokine receptor distribution in NK cell populations of healthy controls, aMCI and mAD patients

IL-18 receptor β -chain and IL-12 receptor β 1- and β 2-chains are expressed on T and NK cells and monocytes [46,47]. We sought to determine whether there was any modulation of expression of these cytokine receptors in NK cells of aMCI and mAD patients. We found that there were no differences in the levels of expression (MFI) of the IL-18 receptor β -chain (Fig. 2A) or the IL-12 receptor β 1- (Fig. 2B) and β 2-(Fig. 2C) chains.

TLR expression in NK cells of healthy controls, aMCI and mAD patients

Human NK cells have been reported to express the 10 known human TLRs at different levels [48-50]. TLR2 and TLR4 are surface receptors that recognize beta amyloid peptides [51]. Cytofluorimetric analysis of TLR2 expression revealed that its expression level (MFI) was significantly ($p < 0.05$) lower in mAD patients than in healthy controls whereas no significant differences were found in aMCI (Fig. 3A). However, TLR4 expression (MFI) was similar in all 3 groups of subjects (Fig. 3B). Endosomal TLR3 and TLR9 receptors recognize viral double-stranded RNA and unmethylated CpG DNA, respectively [52]. Intracellular quantification (MFI) of TLR3 expression showed no differences between controls, aMCI and mAD subjects (Fig. 3C). In contrast, significant differences were observed in the case of intracellular analysis (MFI) of TLR9 expression.

Thus, there were significantly decreased levels in mAD patients relative to controls ($p < 0.001$) and in aMCI patients compared to mAD ($p < 0.05$) (Fig. 3D). The difference between aMCI patients and healthy controls approached significance ($p < 0.06$).

Activation and inhibition markers in NK cell subpopulations of healthy controls, aMCI and mAD patients

Activating and inhibitory receptors present on NK cells can trigger signaling by themselves as in the case of activating receptor NKG2D, but they can also transduce signaling through recruitment of the transmembrane adapter glycoprotein CD94. CD94 forms heterodimeric disulfide bonds with the monomeric cell surface NKG2A, creating an activating complex [27]. Cytofluorimetric analysis revealed that the level of expression of CD94 was similar in each group of participants (Fig. 4A). There were also no significant differences in expression of NKG2D (Fig. 4B). However, levels of expression of NKG2A did reveal significant differences. aMCI patients expressed less NKG2A with respect to both mAD patients and healthy subjects ($p < 0.01$). However, there were no significant differences between healthy controls and mAD patients (Fig. 4C).

Cytotoxic activity of activated NK cells of healthy controls, aMCI and mAD patients

The killing capacity of purified IL-12-activated NK cells was monitored using the MHC class I-negative NK cell-sensitive human erythroleukemia cell line K562. It was found that NK cell killing capacity did not differ between the 3 groups of subjects (Fig. 5A). NK cell cytotoxic effector function engages multiple pathways, including a granule-dependent pathway [28]. Cytofluorimetric analysis of CD107a (LAMP1) was performed as an index of NK cell degranulation. In agreement with results of the direct NK cytotoxic activity assay, CD107 expression was maintained to similar levels throughout (Fig. 5B). However, exposure of NK cells to CpG oligodeoxynucleotides differentially influenced degranulation in that NK cells from aMCI and mAD patients were unable to degranulate following this treatment, in marked contrast to healthy individuals (Supplementary Figure 3). These data suggest that NK cells of affected individuals could have a reduced ability to respond to pathogen challenges via the TLR-9 pathway. The NK cell granule-independent effector pathways involve death receptors of the TNF family that include CD95 (Fas). Ligation of CD95 by CD95L can induce apoptosis of target cells [29]. Cytofluorimetric analysis of CD95 showed significantly higher levels of expression in aMCI and mAD

patients than controls in which it was almost undetectable ($p < 0.05$) (Fig. 5C). The granule-dependent pathway of NK cell cytolytic activity involves release of the serine protease granzyme B [28]. Intracellular staining of granzyme B revealed significantly higher expression (~200-fold) in aMCI patients compared to either mAD patients or healthy controls ($p < 0.01$) (Fig. 5D).

Cytokine production by activated NK cells of healthy controls, aMCI and mAD patients

Inflammation and alteration of the inflammatory status in aging (“inflamm-aging”) leads to a chronic situation that may cause neuronal impairment and loss associated with AD [17]. We investigated the intracellular production of TNF α and IFN γ in the three groups of subjects. Results showed that purified IL-12-activated NK cells from aMCI patients cultured in the presence of K562 target cells produced significantly more TNF α than mAD patients or controls ($p < 0.05$) where it was barely detectable (Fig. 6A). Intracellular production of IFN γ by IL-12-activated NK cells cultured in the presence of K562 target cells tended to follow a similar pattern although this did not achieve significance ($p < 0.07$) (Fig. 6B).

Chemokine receptor expression and chemotaxis in NK cells of healthy controls, aMCI and mAD patients

NK cell subpopulations are known to express distinct chemokine receptors which are related to their immune functions [53]. We investigated whether chemokine receptor expression could be related to AD in NK cells. CCR5 is the receptor for CCL5 (Rantes) and CCL4 (macrophage inflammatory protein 1 β , MIP1 β) and CCL3 (MIP1 α) chemokines. Analysis of CCR5 expression showed that the levels of CCR5 (MFI) in NK cells were not significantly different between the 3 groups of participants (Fig. 7A). In addition, we determined the levels of expression of the CX3CR1 receptor of the CX3CL1 (fractalkine) chemokine which has been reported to be involved in NK CD56^{dim} CD16⁺ recruitment in the brains of multiple sclerosis (MS) patients [54-56]. We found no differences in expression of this receptor in NK CD56^{dim} CD16⁺ cells in any of the 3 groups (Fig. 7B). We also determined the levels of expression of CCR7, a chemokine receptor likely to regulate NK CD56^{bright} CD16⁻ cell homing to lymph nodes in that it recognizes CCL19 and CCL21 chemokines [57]. Analysis of the levels of expression of CCR7 in NK CD56^{bright} CD16⁻ cells, the main producers of cytokines, was significantly greater in aMCI patients

than controls ($p < 0.05$), although mAD was not different from controls (Fig. 7C). We investigated whether the higher level of CCR7 expression on NK CD56^{bright} CD16⁻ cells in aMCI patients favored chemotaxis of NK cells in response to CCL19 or CCL21 chemoattractants. We found that NK cell migration in response to CCL19 was significantly impaired ($p < 0.05$) in both aMCI and mAD patients relative to controls (Fig. 7D). In marked contrast, there were no differences in NK cell migration in response to CCL21 (Fig. 7E).

CD16 expression in NK cell subpopulations of healthy controls, aMCI and mAD patients

CD16 is a low affinity Fc γ RIII cell surface protein differentially expressed on NK cells that is involved in antibody-dependent cellular cytotoxicity [58]. We determined the levels of expression of CD16 in CD56⁺CD3⁻ NK cells in healthy controls, aMCI and mAD patients. Results showed significant higher levels ($p < 0.05$) of expression in mAD patients than healthy controls (Fig. 8A). There were no significant differences between the three groups in the major CD16^{high} (Fig. 8B) or minor CD16^{low} (Fig. 8C) NK cell subpopulations. However, the ratio of the distribution of CD16^{high}/CD16^{low} subpopulations was significantly higher in mAD subjects ($p < 0.05$) but not in aMCI individuals compared to controls (Fig. 8B).

Discussion

Activation of innate immunity is emerging as a crucial component of neurodegenerative diseases. In the case of AD, microglial cells are commonly found in an activated or primed state [21]. The present study extends our understanding of innate immune involvement in AD pathogenesis by analyzing the properties of subpopulations of NK cells of the innate immune system. We report analysis of functional and phenotypic differences of circulating NK cells in aMCI and mAD patients relative to healthy age-matched controls. To the best of our knowledge, this is the first analysis of NK cells from aMCI patients. We found that the distribution of NK cell subpopulations was similar in healthy individuals, aMCI and mAD patients, suggesting that progression of cognitive impairment was not associated with alterations in peripheral NK cell distribution. Our data are in agreement with those of Richartz-Salzbunger *et al.* [31] who did not observe any differences in CD56⁺CD16⁺ cell distribution in AD patients compared to healthy elderly

subjects. In addition, our findings suggest that the balance between CD56^{bright} cytokine-producing NK cells and CD56^{dim} cytotoxic NK cells was also unaffected. The data further indicate an absence of selective expansion of a particular subset of NK cells associated with aMCI or mAD. Because the main risk factor for AD remains age [4], the putative involvement of NK cell senescence was assessed by measuring expression of senescence marker. CD57 expression, and the frequency of CD56^{dim} CD94^{low} and CD56^{dim} CD94^{high}. NK cells were similar between groups (Supplementary Figure 2), excluding cell senescence as a mechanism driving alterations in NK cells in mAD. Furthermore, CD94 and NKG2A expressions were not decreased with disease progression as it is observed with senescence [30]. These results seem to suggest that aMCI and mAD are not on the continuum of healthy aging regarding NK cell phenotype changes supporting the occurrence of a different pathological pathway. Moreover, these observations are at odds with the hypothesis stating that microglial cell senescence is the major contributor to AD pathogenesis. [59].

Inflamm-aging is one of the hallmarks of aging and impacts on chronic inflammatory diseases associated with aging that may include AD. Increased concentrations of IL-12 and IL-18 as well as TNF α have been reported in the mild and moderate AD patients and shown to correlate with disease progression, while IL-2 serum levels were not altered in AD [60]. Because IL-2, IL-12 and IL-18 are activators of NK cell functions [61], we asked whether the expression of receptors for IL-12 (IL-12R β 1 and IL-12R β 2) and IL-18 (IL-18R β) in activated NK cells was different in aMCI and mAD patients. Results showed that the expression of these receptors did not differ between the three groups, suggesting that NK cells of aMCI and mAD patients possessed the same specific receptor levels. This observation suggested that NK cells did not respond to the higher IL-12 and IL-18 levels by receptor downregulation. Not only were these receptor levels unchanged, but NK cells were able to respond to stimulation by increased TNF α production.

TLR can modulate NK cell activity under inflammatory conditions. TLR2 and TLR4 recognize bacterial peptidoglycans and lipopolysaccharides, respectively [23], and have also been shown to recognize A β peptides [51,62]. We investigated whether expression of these TLRs was different in aMCI and mAD patients. We found significantly lower TLR2 expression in NK cells of mAD patients, suggesting that its role in A β peptide recognition

and clearing was compromised in mAD. In contrast, TLR4 expression was not affected and was similar in the three groups of participants. This condition may compensate for lower TLR2 levels. TLR3 and TLR9 are intracellular receptors that recognize viral double-stranded RNA and CpG islands in DNA [52,63]. Expression of TLR3 in NK cells was similar in the three groups of subjects. In marked contrast, TLR9 expression was significantly lower in aMCI and mAD patients, suggesting a correlation with progression of AD. The lower TLR9 expression may be a general feature of alterations in immune cells such as lymphocytes in AD patients (Le Page *et al.*, unpublished), suggesting a general decreased ability to defend against microbial infections. Data reported here provided a link with studies in Tg2576 mice treated by intracerebroventricular injections of CpG ODN [64,65] where amyloid plaque clearance and improved cognition were observed, suggesting that the decrease observed here may contribute to AD development. Taken together, these observations suggested that low TLR9 expression may be a component of the pathogenesis of AD in relation to the viral hypothesis [9] and that modulation of TLR9 signaling may represent a novel approach in the management of AD.

The general state of inflammation associated with AD [16-18] may affect the ability of NK cells to defend against pathogens. This possibility was assessed by measuring expression of NK cell surface markers and *in vitro* assays of NK cell functions in aMCI and mAD patients. Analysis of expression of activating (NKG2D) and inhibitory (NKG2A) NK cell receptors revealed that NKG2D expression was similar in the three groups of subjects. Unexpectedly, the expression of NKG2A was markedly lower in NK cells of aMCI patients, but not in healthy individuals or mAD patients. These observations suggested that the functional response of NK cells is activated during prodromal AD, but lost in full-blown AD. This suggestion raised the question whether the killing activity of NK cells was also greater in aMCI than mAD patients and controls, suggestive of innate immune-mediated pathology during AD development. However, assays of activated (IL-12) NK cell cytotoxicity using K562 cells as a target revealed similar levels of activity and degranulation as measured by CD107a (LAMP-1) expression [45] among the three groups of participants. Similarly, expression of the death receptor CD95 was low in healthy individuals and mAD patients, but significantly higher in aMCI individuals. Interestingly, granzyme B levels which were low in healthy subjects were significantly higher in aMCI

patients but low in mAD patients. These observations suggested that increased granzyme B release and expression of Fas (CD95) are of importance in the early stages of AD, as observed in aMCI patients. This higher activation state of NK cells was not retained as increased cell killing capacity, degranulation and granzyme B expression in mAD. It has been reported in several cases that CD95 is a strong indicator of NK activation [66,67] as well as granzyme B release, suggesting that NK cells have recently engaged a target [68]. In contrast, at later stages of disease, the NK markers return to baseline. An additional function of NK cells is cytokine production mainly mediated by the minor NK CD56^{bright} CD16⁻ NK cell population, although CD56^{dim} CD16⁺ NK cells are also able to produce cytokine and in particular IFN γ . Here, results showed that activated (IL-12 and K562 cells) NK cells may be involved in contributing to the inflammatory status in aMCI patients by producing significantly increased quantities of TNF α and similar patterns of IFN γ ($p < 0.07$). These cytokines has been implicated in delayed disease progression by decreasing TH17 cells differentiation [69]. Our results suggested that in NK cells could play a protective role against AD development/progression as reported in the case of rheumatoid arthritis and HIV infection [69,70]. NK cell destruction of invading microbial pathogens involves their capacity to search-and-destroy the invaders by a process of chemotaxis in response to a gradient of chemokines [53]. We investigated whether this function was altered in aMCI and mAD patients. Results showed that expression of the CCR5 receptor of the inflammatory chemokine CCL5 (RANTES) was similar in NK cells of the three groups of subjects. CX3CR1, reported to mediate entry of NK cells across the blood-brain barrier in multiple sclerosis and shown to correlate with progression of the disease [56], showed similar levels of expression, suggesting that CX3CR1-positive cells may not directly participate in the aetiology of AD. CCR7 is expressed by NK CD56^{bright} CD16⁻ cells, and elicits their recruitment to lymph nodes where they interact with dendritic cells and monocytes. We found that CCR7 expression was significantly higher in NK cells of aMCI patients than in healthy individuals, suggesting an increased capacity of this NK cell subpopulation to be recruited to secondary lymphoid organs. However, there was an absence of significant differences in the case of mAD individuals, consistent with the notion that NK cell activation and migration may either be beneficial or detrimental. Under conditions when NK cells may act as protectors, there will be slow or absence of

progression to AD. In contrast, when activation and migration of NK cells may be impaired, this situation could generate immune-mediated damages that become associated with progression to AD. Obviously, further studies are needed to clearly resolve which of these opposite effects is prevalent. CCL19 and CCL21 trigger cell recruitment in draining lymph nodes following recognition by cellular CCR7 receptors. Here, chemotaxis assays revealed that NK cells of aMCI and mAD had lost their ability to migrate in response of CCL19 whereas the response to CCL21 was similar in all three groups of subjects [71]. These results suggested that recruitment of NK CD56^{bright} CD16⁻ cells by CCL19 was lower in both aMCI and mAD patients. However, it can be hypothesized that the observed higher expression of CCR7 in aMCI subjects may represent a compensatory mechanism for impaired chemotaxis although this compensatory effect appears to be lost in mAD. ADCC is a mechanism that mediates IgG-dependent opsonisation of infected cells by activating the CD16 Fc receptor. We found that CD16 expression was significantly greater in mAD patients than either in healthy individuals or aMCI subjects. CD16 expression was either high or approximately 9 times lower in CD16^{low} NK cells. These data translated into a significantly increased ratio of CD16 expression in mAD subjects. The trigger of this NK cell response within the context of AD remains to be determined.

In summary, data presented here clearly show that the expression of several different NK cell receptors and their functions were different in aMCI, and mAD patients when compared to healthy age-matched controls. There were major differences between aMCI individuals and mAD patients, although several of the parameters analyzed here revealed similarities between mAD patients and controls. Thus, differences observed in this study did not highlight patterns of progression from healthy to aMCI-to-AD, but appeared to be a characteristic of aMCI individuals. Our data showed that aMCI was associated with a state of activation of NK cells which was lost in mAD. These observations raised the possibility that NK cells are involved in an active immune attempt to respond to an as-yet unidentified pathology in aMCI. However, it cannot be excluded that NK activation in aMCI is pathogenic as an immune-mediated process that is dampened during development of overt AD, in which case it is too late to prevent progression of the immune-mediated damages. The complexity of AD as a possible systemic disorder [15-17], the chronic inflammatory status of the disease [21] and the involvement of the innate and adaptive immune systems

[18,19] are focal points that require systematic investigations of the whole immune response involvement in AD.

Acknowledgments

The authors wish to thank Ms Odette Baril for patients' management and all the participants who made this study possible. The authors also express their appreciation to Dr. M. Richter who kindly provided access to the FACS ARIA III cytofluorimeter and to Ms Isabelle Marois for her help in cytofluorimetric analysis. This work was supported by grants from Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (No. 106634), the Université de Sherbrooke and the Research Center on Aging.

References

1. Tam JH, Pasternak SH. (2012) Amyloid and Alzheimer's disease: Inside and out. *Can J Neurol Sci* 39: 286-298.
2. Prince M, Jackson J. (2009) World Alzheimer report 2009: The global prevalence of dementia.
3. Claeysen S, Cochet M, Donneger R, Dumuis A, Bockaert J, et al. (2012) Alzheimer culprits: Cellular crossroads and interplay. *Cell Signal* 24: 1831-1840.
4. Kern A, Behl C. (2009) The unsolved relationship of brain aging and late-onset Alzheimer disease. *Biochim Biophys Acta* 1790: 1124-1132.
5. Rao AT, Degnan AJ, Levy LM. (2014) Genetics of Alzheimer disease. *AJNR Am J Neuroradiol* 35: 457-458.
6. Piaceri I, Nacmias B, Sorbi S. (2013) Genetics of familial and sporadic Alzheimer's disease. *Front Biosci (Elite Ed)* 5: 167-177.
7. Reitz C, Mayeux R. (2014) Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol* 88: 640-651.
8. Fulop T, Lacombe G, Cunnane S, Le Page A, Dupuis G, et al. (2013) Elusive Alzheimer's disease: Can immune signatures help our understanding of this challenging disease? part 1: Clinical and historical background. *Discov Med* 15: 23-32.
9. Miklossy J. (2011) Emerging roles of pathogens in Alzheimer disease. *Expert Rev Mol Med* 13: e30.
10. Mawanda F, Wallace R. (2013) Can infections cause Alzheimer's disease? *Epidemiol Rev* .
11. Geda YE. (2012) Mild cognitive impairment in older adults. *Curr Psychiatry Rep* 14: 320-327.

12. Kelley BJ, Petersen RC. (2007) Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurol Clin* 25: 577-609, v.
13. Winblad B, Palmer K, Kivipelto M, Jelic V, Fratiglioni L, et al. (2004) Mild cognitive impairment--beyond controversies, towards a consensus: Report of the international working group on mild cognitive impairment. *J Intern Med* 256: 240-246.
14. Fischer P, Jungwirth S, Zehetmayer S, Weissgram S, Hoenigschnabl S, et al. (2007) Conversion from subtypes of mild cognitive impairment to Alzheimer dementia. *Neurology* 68: 288-291.
15. Morris JK, Honea RA, Vidoni ED, Swerdlow RH, Burns JM. (2014) Is Alzheimer's disease a systemic disease? *Biochim Biophys Acta* 1842: 1340-1349.
16. Holmes C. (2013) Review: Systemic inflammation and Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39: 51-68.
17. Sardi F, Fassina L, Venturini L, Inguscio M, Guerriero F, et al. (2011) Alzheimer's disease, autoimmunity and inflammation. the good, the bad and the ugly. *Autoimmun Rev* 11: 149-153.
18. Kapadia M, Sakic B. (2011) Autoimmune and inflammatory mechanisms of CNS damage. *Prog Neurobiol* 95: 301-333.
19. Boutajangout A, Wisniewski T. (2013) The innate immune system in Alzheimer's disease. *Int J Cell Biol* 2013: 576383.
20. Butchart J, Holmes C. (2012) Systemic and central immunity in Alzheimer's disease: Therapeutic implications. *CNS Neurosci Ther* 18: 64-76.
21. Heneka MT, Kummer MP, Latz E. (2014) Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol* 14: 463-477.

22. Rivest S. (2009) Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol* 9: 429-439.
23. Della Chiesa M, Marcenaro E, Sivori S, Carlomagno S, Pesce S, et al. (2014) Human NK cell response to pathogens. *Semin Immunol* 26: 152-160.
24. Raulet DH, Guerra N. (2009) Oncogenic stress sensed by the immune system: Role of natural killer cell receptors. *Nat Rev Immunol* 9: 568-580.
25. Rodier F, Campisi J. (2011) Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* 192: 547-556.
26. Caligiuri MA. (2008) Human natural killer cells. *Blood* 112: 461-469.
27. Long EO, Kim HS, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S. (2013) Controlling natural killer cell responses: Integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol* 31: 227-258.
28. Krzewski K, Coligan JE. (2012) Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Front Immunol* 3: 335.
29. Chavez-Galan L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chavez R, Lascurain R. (2009) Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* 6: 15-25.
30. Jadidi-Niaragh F, Shegarfi H, Naddafi F, Mirshafiey A. (2012) The role of natural killer cells in Alzheimer's disease. *Scand J Immunol* 76: 451-456.
31. Richartz-Salzbunger E, Batra A, Stransky E, Laske C, Kohler N, et al. (2007) Altered lymphocyte distribution in Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res* 41: 174-178.
32. Araga S, Kagimoto H, Funamoto K, Takahashi K. (1991) Reduced natural killer cell activity in patients with dementia of the Alzheimer type. *Acta Neurol Scand* 84: 259-263.
33. Solerte SB, Fioravanti M, Severgnini S, Locatelli M, Renzullo M, et al. (1996) Enhanced cytotoxic response of natural killer cells to interleukin-2 in Alzheimer's disease. *Dementia* 7: 343-348.

34. Solerte SB, Fioravanti M, Pascale A, Ferrari E, Govoni S, et al. (1998) Increased natural killer cell cytotoxicity in Alzheimer's disease may involve protein kinase C dysregulation. *Neurobiol Aging* 19: 191-199.
35. Solerte SB, Cerutti N, Severgnini S, Rondanelli M, Ferrari E, et al. (1998) Decreased immunosuppressive effect of cortisol on natural killer cytotoxic activity in senile dementia of the Alzheimer type. *Dement Geriatr Cogn Disord* 9: 149-156.
36. Solerte SB, Fioravanti M, Severgnini S, Locatelli M, Renzullo M, et al. (1996) Enhanced cytotoxic response of natural killer cells to interleukin-2 in Alzheimer's disease. *Dementia* 7: 343-348.
37. Masera RG, Prolo P, Sartori ML, Staurengi A, Griot G, et al. (2002) Mental deterioration correlates with response of natural killer (NK) cell activity to physiological modifiers in patients with short history of Alzheimer's disease. *Psychoneuroendocrinology* 27: 447-461.
38. Lyons A, Murphy KJ, Clarke R, Lynch MA. (2011) Atorvastatin prevents age-related and amyloid-beta-induced microglial activation by blocking interferon-gamma release from natural killer cells in the brain. *J Neuroinflammation* 8: 27-2094-8-27.
39. Pawelec G, Ferguson FG, Wikby A. (2001) The SENIEUR protocol after 16 years. *Mech Ageing Dev* 122: 132-134.
40. Small GW, Rabins PV, Barry PP, Buckholtz NS, DeKosky ST, et al. (1997) Diagnosis and treatment of Alzheimer disease and related disorders. consensus statement of the american association for geriatric psychiatry, the alzheimer's association, and the american geriatrics society. *J Amer Med Assoc* 278: 1363-1371.

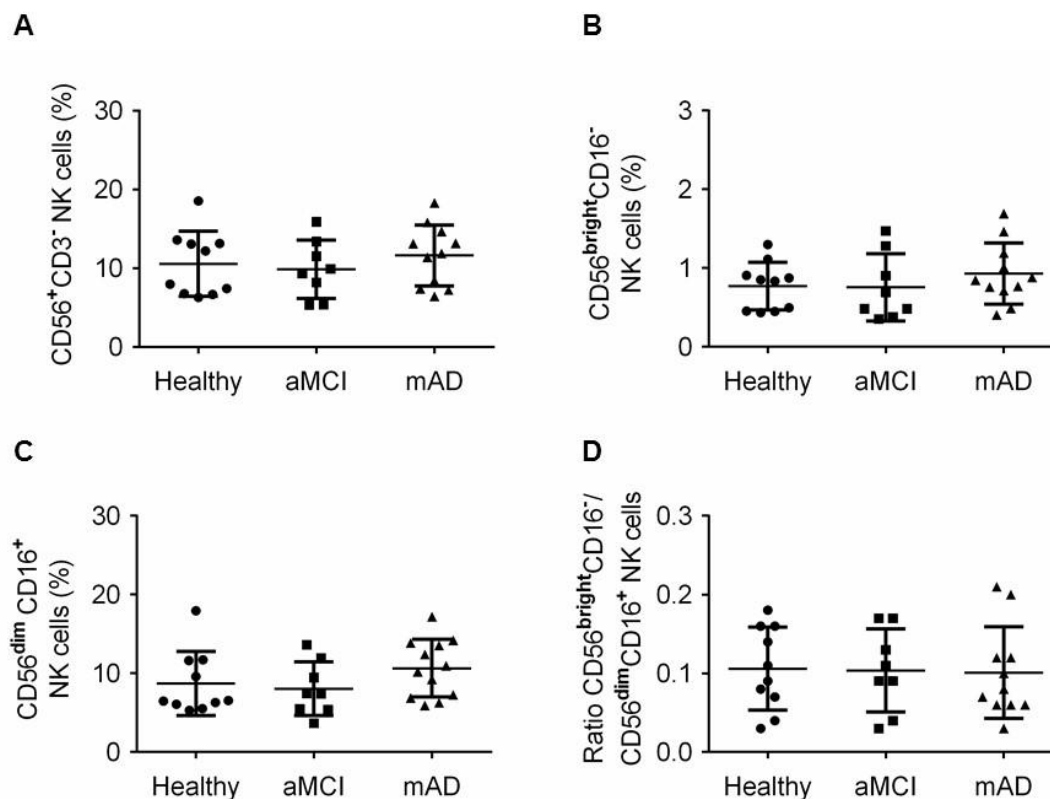
41. Grundman M, Petersen RC, Ferris SH, Thomas RG, Aisen PS, et al. (2004) Mild cognitive impairment can be distinguished from Alzheimer disease and normal aging for clinical trials. *Arch Neurol* 61: 59-66.
42. Monastero R, Mangialasche F, Camarda C, Ercolani S, Camarda R. (2009) A systematic review of neuropsychiatric symptoms in mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis* 18: 11-30.
43. 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.
44. Nasreddine ZS, Phillips NA, Bedirian V, Charbonneau S, Whitehead V, et al. (2005) The montreal cognitive assessment, MoCA: A brief screening tool for mild cognitive impairment. *J Am Geriatr Soc* 53: 695-699.
45. Aktas E, Kucuksezer UC, Bilgic S, Erten G, Deniz G. (2009) Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol* 254: 149-154.
46. Parihar R, Dierksheide J, Hu Y, Carson WE. (2002) IL-12 enhances the natural killer cell cytokine response to ab-coated tumor cells. *J Clin Invest* 110: 983-992.
47. Salani F, Ciaramella A, Bizzoni F, Assogna F, Caltagirone C, et al. (2013) Increased expression of interleukin-18 receptor in blood cells of subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Cytokine* 61: 360-363.
48. Chalifour A, Jeannin P, Gauchat JF, Blaecke A, Malissard M, et al. (2004) Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood* 104: 1778-1783.
49. Hart OM, Athie-Morales V, O'Connor GM, Gardiner CM. (2005) TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production. *J Immunol* 175: 1636-1642.

50. Lauzon NM, Mian F, MacKenzie R, Ashkar AA. (2006) The direct effects of toll-like receptor ligands on human NK cell cytokine production and cytotoxicity. *Cell Immunol* 241: 102-112.
51. Udan ML, Ajit D, Crouse NR, Nichols MR. (2008) Toll-like receptors 2 and 4 mediate abeta(1-42) activation of the innate immune response in a human monocytic cell line. *J Neurochem* 104: 524-533.
52. Amarante MK, Watanabe MA. (2010) Toll-like receptor 3: Involvement with exogenous and endogenous RNA. *Int Rev Immunol* 29: 557-573.
53. Maghazachi AA. (2010) Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 341: 37-58.
54. Hamann I, Unterwalder N, Cardona AE, Meisel C, Zipp F, et al. (2011) Analyses of phenotypic and functional characteristics of CX3CR1-expressing natural killer cells. *Immunology* 133: 62-73.
55. Infante-Duarte C, Weber A, Kratzschmar J, Prozorovski T, Pikol S, et al. (2005) Frequency of blood CX3CR1-positive natural killer cells correlates with disease activity in multiple sclerosis patients. *FASEB J* 19: 1902-1904.
56. Huang D, Shi FD, Jung S, Pien GC, Wang J, et al. (2006) The neuronal chemokine CX3CL1/fractalkine selectively recruits NK cells that modify experimental autoimmune encephalomyelitis within the central nervous system. *FASEB J* 20: 896-905.
57. Forster R, Davalos-Miszlitz AC, Rot A. (2008) CCR7 and its ligands: Balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol* 8: 362-371.
58. Mandelboim O, Malik P, Davis DM, Jo CH, Boyson JE, et al. (1999) Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5640-5644.

59. Streit WJ, Xue QS. (2014) Human CNS immune senescence and neurodegeneration. *Curr Opin Immunol* 29: 93-96.
60. Motta M, Imbesi R, Di Rosa M, Stivala F, Malaguarnera L. (2007) Altered plasma cytokine levels in Alzheimer's disease: Correlation with the disease progression. *Immunol Lett* 114: 46-51.
61. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. (2008) Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9: 503-510.
62. Liu S, Liu Y, Hao W, Wolf L, Kiliaan AJ, et al. (2012) TLR2 is a primary receptor for Alzheimer's amyloid beta peptide to trigger neuroinflammatory activation. *J Immunol* 188: 1098-1107.
63. Ishii KJ, Akira S. (2006) Innate immune recognition of, and regulation by, DNA. *Trends Immunol* 27: 525-532.
64. Doi Y, Mizuno T, Maki Y, Jin S, Mizoguchi H, et al. (2009) Microglia activated with the toll-like receptor 9 ligand CpG attenuate oligomeric amyloid {beta} neurotoxicity in in vitro and in vivo models of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 175: 2121-2132.
65. Scholtzova H, Kascsak RJ, Bates KA, Boutajangout A, Kerr DJ, et al. (2009) Induction of toll-like receptor 9 signaling as a method for ameliorating Alzheimer's disease-related pathology. *J Neurosci* 29: 1846-1854.
66. Frey C, Bonert A, Kratzsch T, Rexroth G, Rosch W, et al. (2006) Apolipoprotein E epsilon 4 is associated with an increased vulnerability to cell death in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 113: 1753-1761.
67. Milush JM, Lopez-Verges S, York VA, Deeks SG, Martin JN, et al. (2013) CD56negCD16(+) NK cells are activated mature NK cells with impaired effector function during HIV-1 infection. *Retrovirology* 10: 158-4690-10-158.

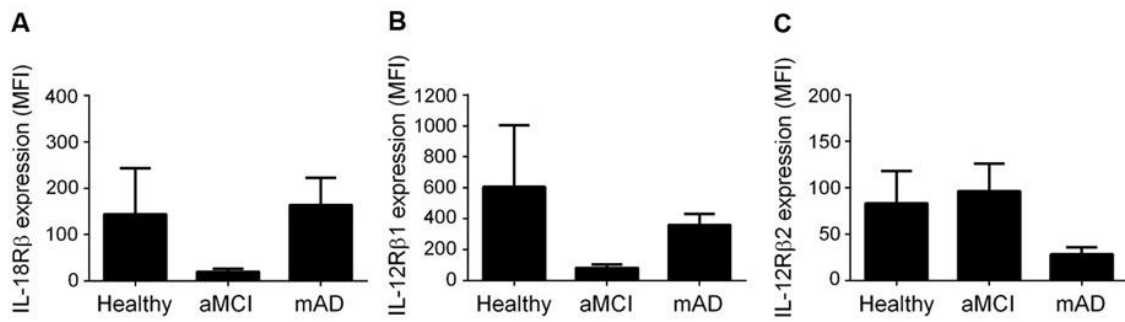
68. Bhat R, Watzl C. (2007) Serial killing of tumor cells by human natural killer cells--enhancement by therapeutic antibodies. *PLoS One* 2: e326.
69. Jiang Y, Zhou F, Tian Y, Zhang Z, Kuang R, et al. (2013) Higher NK cell IFN-gamma production is associated with delayed HIV disease progression in LTNPs. *J Clin Immunol* 33: 1376-1385.
70. Aggarwal A, Sharma A, Bhatnagar A. (2013) Biocommunications among peripheral blood fractions: A focus on NK and NKT cell biology in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* 46: 238-250.
71. Hong HS, Ahmad F, Eberhard JM, Bhatnagar N, Bollmann BA, et al. (2012) Loss of CCR7 expression on CD56(bright) NK cells is associated with a CD56(dim)CD16(+) NK cell-like phenotype and correlates with HIV viral load. *PLoS One* 7: e44820.

Figures



Le Page *et al.* Fig. 1

Fig. 1: Distribution of CD56 phenotypes in NK cell subpopulation of healthy subjects, aMCI and mAD patients. A) Percentage of CD56⁺CD3⁻ NK cells in the lymphocyte gate. B) Percentage of CD56^{bright} CD16⁻ NK cells in the lymphocyte gate. C) Percentage of CD56^{dim} CD16⁺ NK cells in the lymphocyte gate. D) Ratio of NK^{bright}/NK^{dim} cells in the lymphocyte gate. NK^{bright} and NK^{dim} refer respectively to CD56^{bright} CD16⁻ and CD56^{dim} CD16⁺ NK cells. Data are shown as the mean (horizontal bar) ± SD.



Le Page *et al.* Fig. 2

Fig. 2. IL-12 and IL-18 receptor expression on NK cell populations of healthy subjects, aMCI and mAD patients. A) IL-18R β expression. B) IL-12R β 1 expression. C) IL-12R β 2 expression.

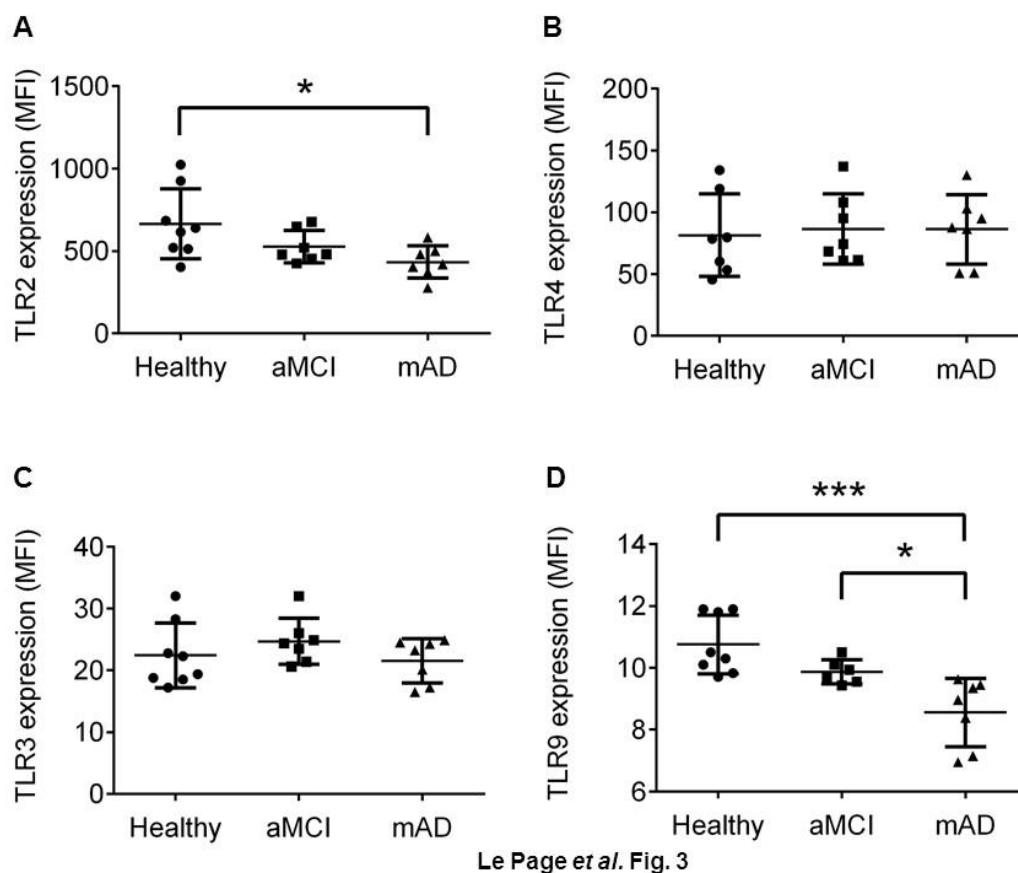
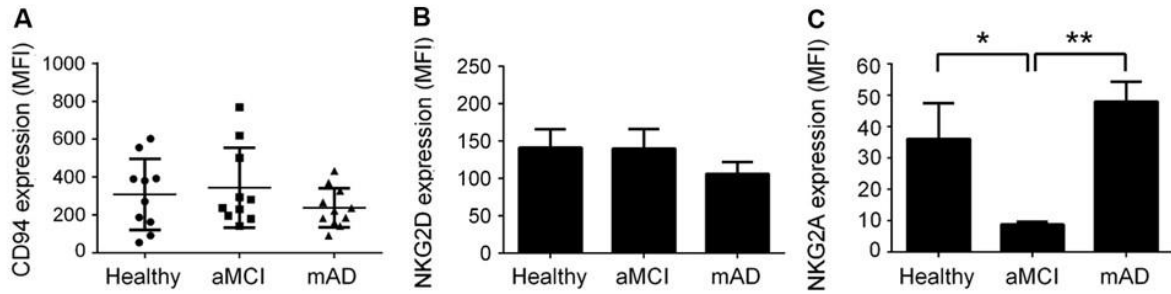
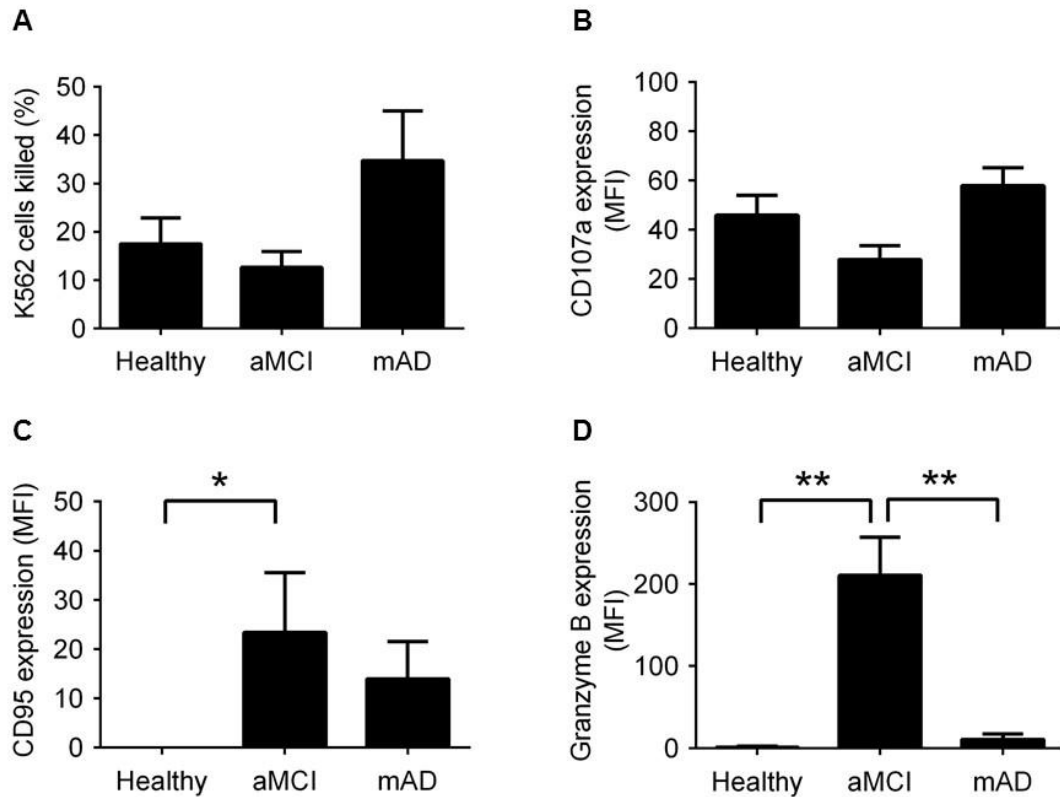


Fig. 3. TLR expression by NK cells of healthy subjects, aMCI and mAD patients. A) TLR2 expression. B) TLR4 expression. C) TLR3 expression. D) TLR9 expression. Results are displayed as mean fluorescence intensity (MFI) in arbitrary units. Data are shown as the mean (horizontal bar) \pm SD. The asterisks (*) correspond to $p < 0.05$, and (***) to $p < 0.001$.



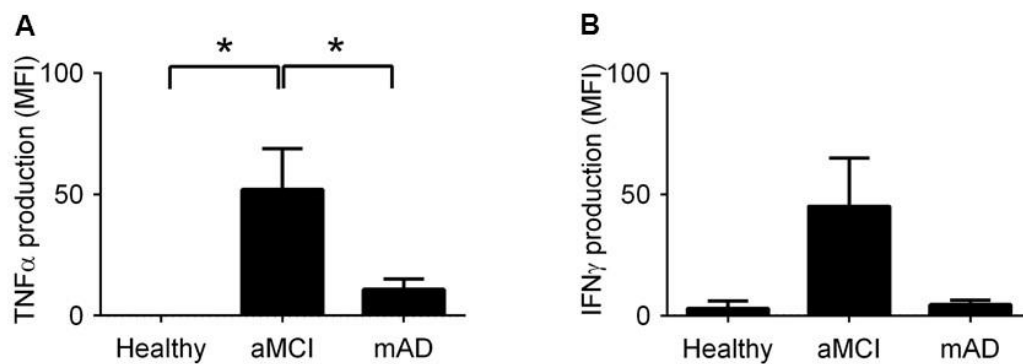
Le Page *et al.* Fig. 4

Fig. 4. Expression of activatory and inhibitory receptors by NK cell populations of healthy subjects, aMCI and mAD patients. A) CD94 expression. B) NKG2D expression. C) NKG2A expression. Results are displayed as mean fluorescence intensity (MFI) in arbitrary units. Data are shown as the mean (horizontal bar) \pm SD. The asterisks correspond to $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**).



Le Page *et al.* Fig. 5

Fig. 5. Functional responses of activated NK cells of healthy subjects, aMCI and mAD patients. A) Percentage of K562 killing by IL-12-activated NK cells. B) CD107a expression in IL-12-activated NK cells cultured in the presence of K562 cells. C) CD95 expression in IL-12-activated NK cells cultured in the presence of K562 cells. D) Granzyme B production in IL-12-activated NK cells cultured in the presence of K562 cells. Results are displayed as mean fluorescence intensity (MFI) in arbitrary units. Data are shown as the mean (horizontal bar) \pm SD. The asterisks (**) correspond to $p < 0.01$.



Le Page *et al.* Fig. 6

Fig. 6. Cytokine production by activated NK cells of healthy subjects, aMCI and mAD patients. A) TNF α production by IL-12-activated NK cells cultured in the presence of K562 cells. B) IFN γ production by IL-12-activated NK cells cultured in the presence of K562 cells. Results are displayed as mean fluorescence intensity (MFI) in arbitrary units. Data are shown as the mean (horizontal bar) \pm SD. The asterisks (*) correspond to $p < 0.05$.

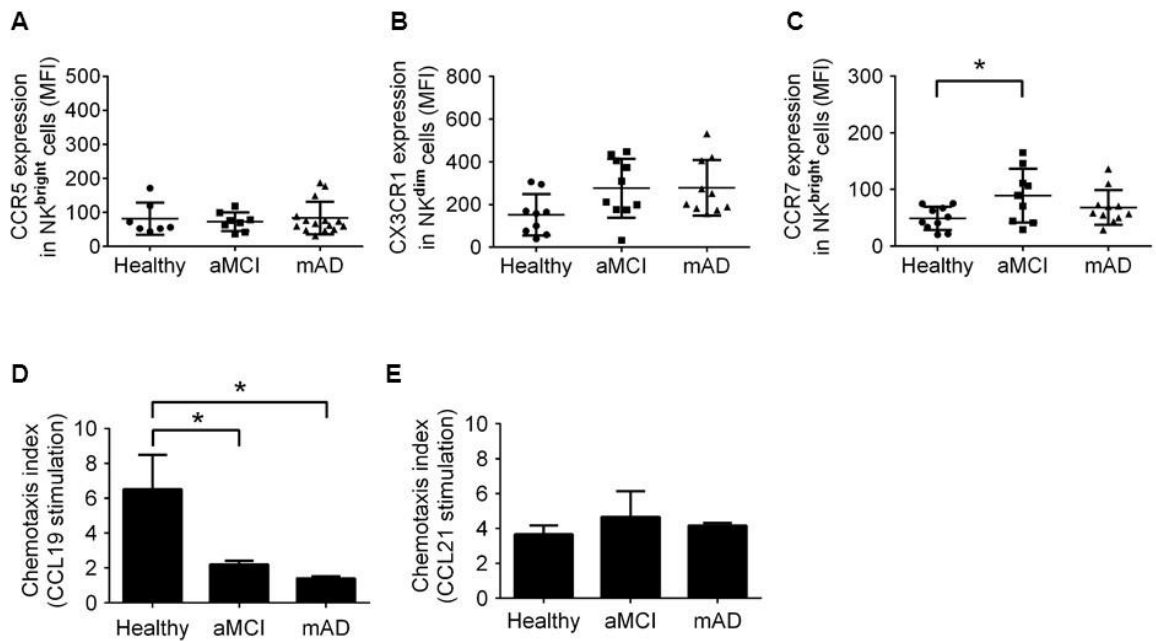
Le Page *et al.* Fig. 7

Fig. 7. Chemokine receptor expression and chemotaxis in NK cells of healthy subjects, aMCI and mAD patients. A) CCR5 expression in the NK CD56^{bright} CD16⁻ cell population. B) CX3CR1 expression in the NK CD56^{dim} CD16⁺ population. C) CCR7 expression in the NK CD56^{bright} CD16⁻ population. Where indicated, results are displayed as mean fluorescence intensity (MFI) in arbitrary units. Data are shown as the mean (horizontal bar) \pm SD. D) CCL19-induced chemotaxis of purified NK cells. E) CCL21-induced chemotaxis of purified NK cells. Data are shown as the mean (horizontal bar) \pm SD. The asterisks (*) correspond to $p < 0.05$.

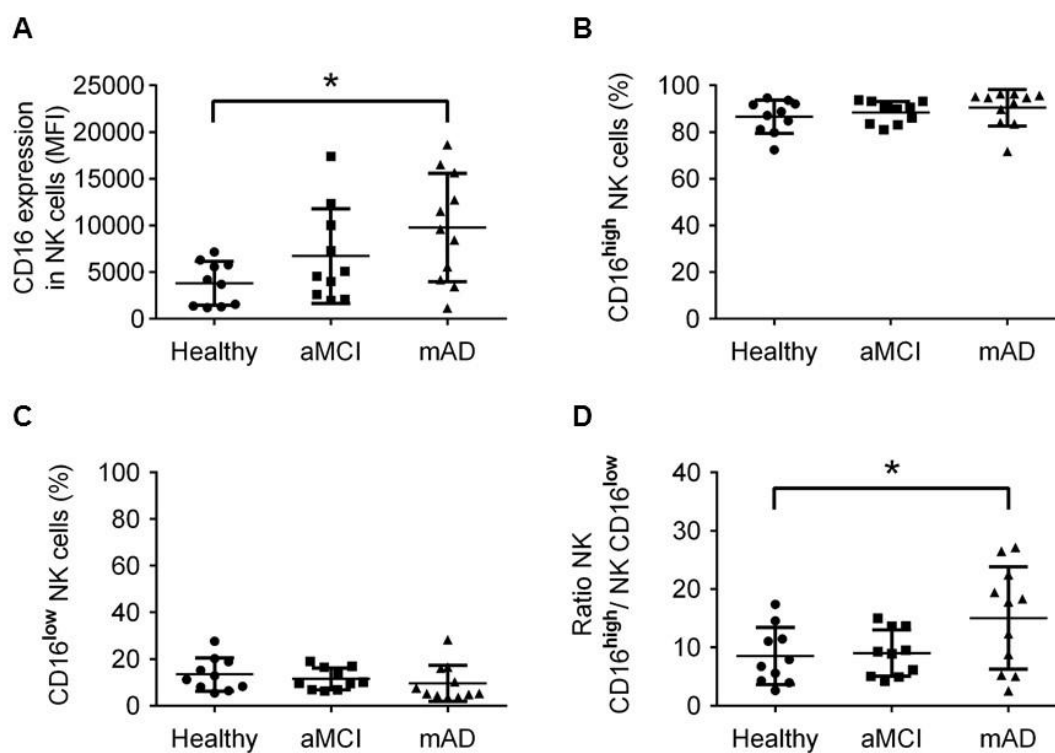
Le Page *et al.* Fig. 8

Fig. 8. CD16 expression in NK cell subpopulations of healthy subjects, aMCI and mAD patients. A) CD16 expression is displayed as mean fluorescence intensity (MFI) in arbitrary units. B) Distribution of CD16^{high} cells in the NK cell population expressed as percentage. C) Distribution of CD16^{low} cells in the NK cell population expressed as percentage. D) Ratio of the distribution of CD16^{high} to CD16^{low} in the NK cell population. The asterisks (*) correspond to $p < 0.05$.

Table 1 Patients' clinical data.

Parameters		Healthy controls		aMCI patients		mAD patients		<i>p</i> Values		
		(n = 10)		(n = 10)		(n = 11)		(Tukey's post-test)		
Type	Units	mean	SD	mean	SD	mean	SD	aMCI vs C	mAD vs C	aMCI vs mAD
Age	years	71.1	5.07	72.9	6.42	78.1	5.79	0.77	0.03	0.12
Sex	women (%)	70	—	90	—	55	—	—	—	—
	men (%)	30	—	10	—	46	—	—	—	—
MMSE	score/30	29.70	0.67	27.80	1.99	23.70	3.59	0.20	<0.0001	<0.002
MoCA	score/30	27.00	3.30	24.30	2.06	15.70	4.42	0.20	<0.0001	<0.0001
ApoE4	frequency	0.22	—	0.64	—	0.25	—	—	—	—
WBC	10 ⁹ /L	5.86	0.75	5.11	1.08	6.32	1.93	0.45	0.73	0.13
Lymphocytes (abs. number)	10 ⁹ /L	1.79	0.41	1.55	0.33	1.69	0.78	0.60	0.91	0.83
Monocytes (abs. number)	10 ⁹ /L	0.42	0.12	0.43	0.15	0.51	0.16	0.99	0.36	0.45
PMN (abs. number)	10 ⁹ /L	3.46	0.70	2.95	0.85	3.90	1.18	0.46	0.54	0.07
NLR	—	2.08	0.73	1.93	0.53	2.93	2.78	0.98	0.44	0.33
Hemoglobin	g/L	135.6	9.12	128.8	9.34	127.3	11.4	0.30	0.16	0.94
Total cholesterol	mmol/L	4.21	1.27	3.69	1.36	3.98	1.75	0.71	0.93	0.90
Triglycerides	mmol/L	2.19	1.32	2.59	1.84	2.82	1.60	0.85	0.65	0.95
HDL	mmol/L	1.31	0.36	1.70	0.57	1.35	0.49	0.19	0.98	0.26
LDL	mmol/L	2.24	0.73	1.86	0.82	2.47	1.04	0.61	0.83	0.30
Total cholesterol/HDL	ratio	3.20	0.76	2.31	0.76	3.13	1.49	0.19	0.99	0.24
Cytomegalovirus seropositivity	frequency	0.40	—	0.30	—	0.36	—	—	—	—
CRP	mg/L	3.49	1.04	3.00	0	3.44	0.08	0.33	0.99	0.40

Abbreviations are: abs, absolute; ApoE, apolipoprotein E; CRP, C-reactive protein; C, control healthy subjects; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; MMSE, mini-mental state evaluation; MoCA, Montreal cognitive assessment; NLR, neutrophil leukocyte ratio; PMN, polymorphonuclear; WBC, white blood cells. Serological parameters were obtained from the clinical laboratories of the Centre Hospitalier Universitaire de l'Université de Sherbrooke (CHUS) and analyzed by one-way ANOVA and Tukey's post-test. Absolute number is defined as the percentage of cells counted multiplied by the total number of white blood cells.

Supplementary material

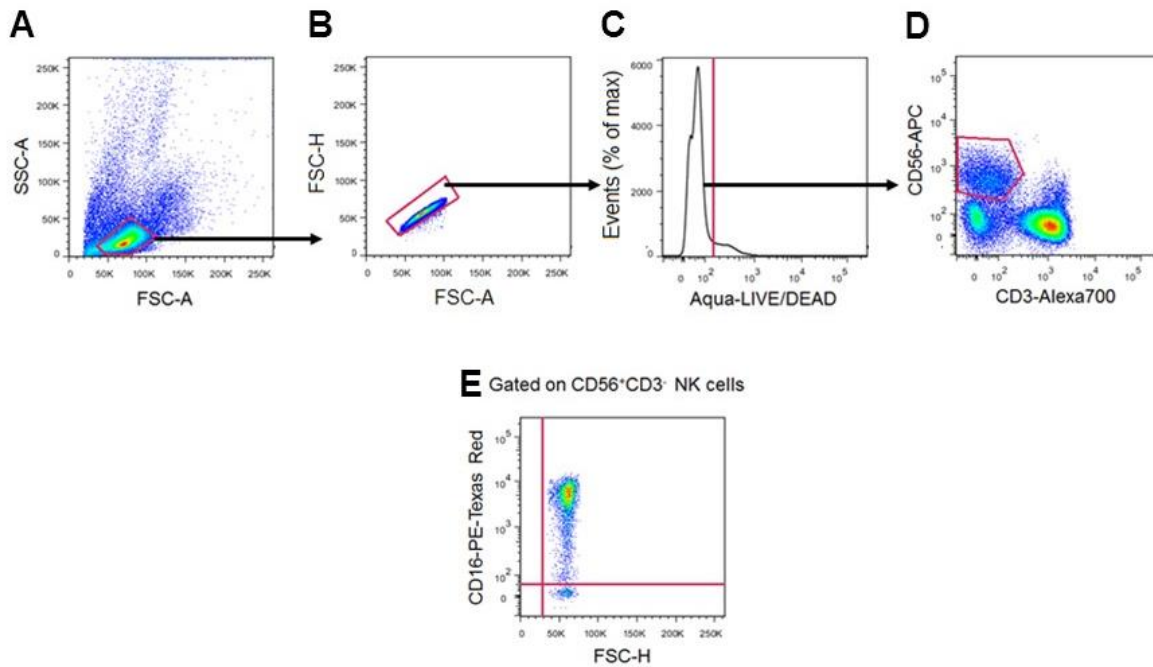
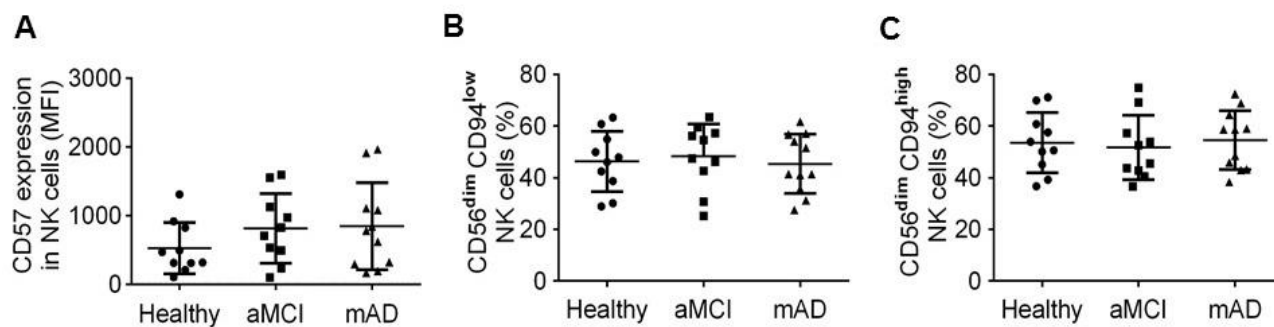
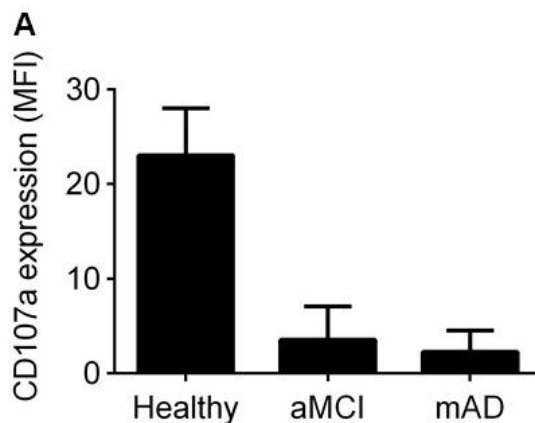
Le Page *et al.* Fig. S1

Fig. S1. NK cell subpopulations gating strategy. A) Lymphocyte gating in forward-scattered light-area (FSC-A) and size-scattered light-area (SSC-A) dot plot. B) Doublet exclusion by a polygon gate in forward-scattered light-high (FSC-H) and forward-scattered light-area (FSC-A) dot plot. C) Dead cells exclusion by selection of fluorescence-negative live cells with Aqua LIVE/DEAD or near-IR LIVE/DEAD kit. D) NK cells gating using CD56 and CD3 markers. E) CD16^{high} and CD16^{low} population of NK cells.



Le Page *et al.* Fig. S2

Fig. S2. Senescence markers in NK cells of healthy subjects, aMCI and mAD patients. A) CD57 expression in NK cell population. B) Percentage of CD56^{dim} CD94^{low}-positive cells in lymphocyte gate. C) Percentage of CD56^{dim} CD94^{high}-positive cells in lymphocyte gate. Data are shown as the mean (horizontal bar) ± SD.



Le Page *et al.* Fig. S3

Fig. S3. NK cells response to CpG stimulation of healthy subjects, aMCI and mAD patients. A) CD107 expression of IL-12-activated NK cells cultured in the presence of K562 cells and CpG (5 µg/mL).

Table S1. Primary antibodies used for cytofluorimetric analysis of NK cells.

Fluorochrome-conjugated Antibody (anti human)	Clone	Suppliers and catalog number	Laser filter bandpass (nm)
CD3 Alexa Fluor 700	UCHT1	BD, 557943	Red, 790/45
CD16 PE-CF594	3G8	BD, 562320	Y/G, 610/20
CD56 APC	MEM-188	eBioscience, 17-0569	Red, 660/20
CCR7 (CD197) PE-Cy7	3D12	BD, 557648	Y/G, 780/60
CCR5 (CD195) APC-Cy7	2D7	BD, 557755	Red, 780/60
CX3CR1 PerCP-Cy5.5	2A9-1	BioLegend, 341613	Blue, 695/40
CD94 FITC	HP-3D9	BD, 555888	Blue, 590/90
NKG2D PE-Cy7	1D11	BD, 562365	Y/G, 780/60
NKG2A (CD159a) Alexa Fluor 700	131411	R&D, FAB1059N	Red, 790/45
CD57 PE	CD28.2	BD, 562296	Y/G, 782/15
CD107a PE	H4A3	BD, 555801	Y/G, 782/15
CD95 BV711	DX2	BD, 563132	Violet, 710/50
TNF α Alexa Fluor 700	MAb11	BD, 557996	Red, 790/45
anti-h IFN γ V500	B27	BD, 561980	Violet, 510/50
granzyme B BV421	GB11	BD, 563389	Violet, 450/50
IL-12R β 1 PerCP	69310	R&D, FAB839C	Blue, 695/40
IL-12R β 2 Alexa Fluor 488	305719	R&D, FAB1959G	Blue, 590/90
IL-18R β PE	132029	R&D, FAB118P	Y/G, 582/15
TLR 2 (CD282) FITC	TL2.1	BioLegend, 309706	Blue, 590/90
TLR 3 (CD283) PE	TLR3.7	eBioscience, 12-9039	Y/G, 582/15
TLR 4 (CD284) PE-Cy7	HTA125	eBioscience, 25-9917	YG. 780/60
TLR 9 (CD289) PE	eB72-1665	BD, 560425	YG, 582/15

Abbreviations are: APC, allophycocyanin; APC-Cy7, allophycocyanin with cyanin 7; BD, BD Biosciences; BV, Brilliant Violet; CCR7, C-C chemokine receptor 7; FITC, fluorescein

isothiocyanate; h, human; IFN γ , γ interferon; NKG2D, natural killer groupe 2, member D; NKG2A, natural killer groupe 2, member A; PE, phycoerythrin; PE-Cy7, phycoerythrin with cyanin 7; PerCP, peridinin chlorophyll protein; PerCP-Cy5.5, peridinin chlorophyll protein with cyanine5.5; TLR, toll-like receptor; TNF α , tumor necrosis factor α ; Y/G, Yellow/Green.

Suppliers' addresses are, BD Biosciences, Mississauga, ON; BioLegend, San Diego, CA; eBioscience Inc., San Diego, CA; R&D Systems, Minneapolis, MN.

3 Article 2

Polymorphonuclear Neutrophil Functions are Differentially Altered in Amnestic Mild Cognitive Impairment and Mild Alzheimer's Disease Patients

Auteurs de l'article : Aurélie Le Page; Julie Lamoureux; Karine Bourgade; Eric H. Frost; Graham Pawelec; Jacek M. Witkowski, Anis Larbi; Gilles Dupuis; Tamàs Fülöp.

Statut de l'article: article soumis à Journal of Alzheimer Disease le 4 février 2017.

3.1 AVANT-PROPOS

Pour cet article, j'ai réalisé l'isolement sur gradient des PMN ainsi que l'ensemble des analyses phénotypiques et fonctionnelles réalisées pour cette publication. J'ai principalement développé des protocoles d'isolement, de stimulation, de manipulation de *Candida albicans* et de marquage pour analyses cytofluorimétriques, tout en maintenant les PMN dans un état inactivé. J'ai aussi rédigé les versions initiales du manuscrit en anglais.

3.2 RÉSUMÉ

Les mécanismes de neurodégénération associés à la maladie d'Alzheimer (MA) demeurent un sujet d'intenses investigations. Chez les patients atteints de la MA, les altérations de la barrière hémato-encéphalique (BHE) facilitent l'échange de médiateurs inflammatoires et des cellules immunes entre le cerveau et la périphérie. Cet article présente une analyse phénotypique et fonctionnelle des cellules polymorphonucléées de type neutrophiles (PMN) du sang périphérique dans une cohorte de patient composée de patients témoins âgés et en santé (n = 13), de patients *amnestic mild cognitive impairment* (aMCI, n = 13) et de patients diagnostiqués à un stade léger de la MA (mAD, n = 15). Les résultats montrent une augmentation de l'expression de CD177 spécifiquement chez les patients mAD. La stimulation à l'IL-8 entraîne l'augmentation attendue de l'intégrine CD11b à la surface des PMN des patients âgés témoins;

en revanche, les patients aMCI et mAD ne répondent pas. Des diminutions de l'expression des récepteurs CD14 et CD16 ont été observées chez les PMN des patients mAD mais pas chez les patients aMCI. Par contre, seuls les PMN des patients aMCI présentent une baisse de l'expression du marqueur CD88. La phagocytose de bactéries *E. coli* opsonisées est différentiellement diminuée chez les PMN des patients aMCI et mAD, tandis que l'ingestion de particules de Dextran est absente uniquement chez les patients mAD. L'activité de *killing* de *Candida albicans* est sévèrement diminuée dans les groupes de patients aMCI et mAD, alors que la production de radicaux libres est seulement diminuée au stade mAD. La production de cytokines inflammatoires (TNF α , IL-6, IL-1 β , IL-12p70) et de chimiokines (MIP-1 α , MIP-1 β , IL-8) en réponse à une stimulation au LPS est très faible chez les patients aMCI et absente chez les mAD. L'expression du TLR2 diminue uniquement au stade aMCI tandis que l'expression du TLR4 n'est pas modifiée chez les autres groupes. L'ensemble de ces résultats suggère qu'il existe une altération différentielle des capacités de réponse à des agressions pathologiques des PMN chez les patients aMCI et mAD. Ces observations pourraient se traduire par une baisse progressive de la réponse immune associée au développement de la MA.

3.3 ARTICLE 2

Abstract. The mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease (AD) remain under investigations. Alterations in the blood-brain-barrier facilitate exchanges of inflammatory mediators and immune cells between the brain and the periphery in AD. Here we report analysis of phenotype and functions of polymorphonuclear neutrophils (PMN) in peripheral blood in amnesic mild cognitive impairment (aMCI, n = 13), patients with mild AD (mAD, n = 15) and healthy elderly controls (n = 13). Results showed an increased expression of CD177 in mAD but not in healthy or aMCI patients. IL-8 stimulated increased expression of the CD11b integrin in PMN of healthy subjects in vitro but PMN of aMCI and mAD patients failed to respond. CD14 and CD16 expression was lower in PMN of mAD but not in aMCI individuals relative to controls. Only PMN of aMCI subjects expressed lower levels of CD88. Phagocytosis towards opsonized E. coli was differentially impaired in PMN of aMCI and mAD subjects whereas the capacity to ingest Dextran particles was absent only in mAD subjects. Killing activity was severely impaired in aMCI and mAD subjects whereas free radical production was only impaired in mAD. Inflammatory cytokine (TNF α , IL-6, IL-1 β , IL-12p70) and chemokine (MIP-1 α , MIP-1 β , IL-8) production in response to LPS stimulation was very low in aMCI and nearly absent in mAD. TLR2 expression was lower only in aMCI. Our data showed a differentially altered capacity of PMN of aMCI and mAD subjects to respond to pathological aggression that may translate into progressive impaired responses associated with AD development.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder that is characterized by irreversible neuronal degeneration in specific regions of the brain, especially the neocortex and the hippocampus which is the major seat of memory [1,2]. Post-mortem examination of AD brains reveals the hallmarks of the disease which are intracellular accumulation of tangles of hyperphosphorylated tau protein in neurons and, extracellular deposits (senile plaques) of short amyloid- β peptides ($A\beta$) composed mainly of 40 ($A\beta_{40}$) and 42 ($A\beta_{42}$) amino acid residues [3]. However, the mechanism of $A\beta$ accumulation in AD is not well understood [4]. $A\beta$ accumulation may be caused by overproduction or by a defect in clearance and degradation by microglial cells, or both [5–10]. In addition, age-related immune alterations due to immunosenescence and inflamm-aging [11] may contribute to the decrease of $A\beta$ clearance and progression to AD [7,8,12]. Increased expression of mediators of inflammation such as chemokines (CXCR2, CCR3, CCR5), pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and TNF α) and their cognate receptors has been reported in post mortem AD brains [13,14]. Whether neuroinflammation is a driving force in progression of AD or whether it is a consequence of microglial cell recognition and increased inflammatory response to $A\beta$ through multiple intrinsic receptors remains unclear [15,16]. It is conceivable that brain insults triggered together or separately by neurotoxic $A\beta$, hyperphosphorylated tau protein, dead neurons, viral infection, pathogens or other causes would induce a local response associated with microglial cell activation and production of mediators of inflammation. These mediators would reach the periphery due to an altered blood brain barrier (BBB) [17] and would exacerbate or even trigger an immune response [18–20]. In addition, peripheral mediators of inflammation would feed back to reach the AD brain, creating a pernicious loop that would sustain increased inflammatory status. In this context, polymorphonuclear neutrophils (PMN), monocytes and T and B lymphocytes have been reported to enter the brain parenchyma of AD patients [17,18,21–27].

PMN are part of the innate immune system and are the first line of defense against invasion by microbial pathogens. They are attracted to the site of injury by various chemoattractants including IL-8, C5a, leukotriene B₄, platelet-activating factor and fMLP [28]. PMN migrate into inflamed tissues through a cascade of events that involves cognate interactions of PMN receptors with their ligands at the surface of the inflamed endothelium (rolling) and chemokine-induced transient arrest, followed by extravasation where they perform microbial killing, and assist in

tissue repair [29,30]. PMN express multiple cell surface receptors that allow recognition of various bacterial and fungal structural components. These receptors include CR1 (CD35), CR3/Mac 1 (CD11b, α_M integrin subunit) and C5a (CD88) complement receptors, Fc γ receptors II (CD32) and III (CD16), TLR 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9 and 10 [31,32], cytosolic NOD1 and NOD2 receptors [33], opsonins and chemokine receptors [34]. The killing activity of PMN involves phagocytosis [35], release of glucosidase and proteolytic enzymes [36,37], oxidative burst [38], formation of extracellular traps (NET) [39,40], antigenic presentation through MHC-II [41,42] and recruitment of other immune cells such as monocytes [43]. PMN also produce anti- and pro-inflammatory and lipid mediators and, anti-microbial peptides [44]. PMN functions such as phagocytosis, chemotaxis, free radical production and apoptosis have been reported to be altered with aging [11,45–51] and this situation may alter immune protection in AD patients.

Post-mortem analyses of AD brains have shown the presence of PMN in the parenchyma, along with NETs [24]. In addition, PMN ligands C1q, C4 and C3 have been reported to co-localize with senile plaques [52,53]. An increase in activity of PMN has been reported in AD patients. For instance, increased levels of expression of gelatinase-associated lipocalin, a proinflammatory component of the azurophilic granules [54], anti-inflammatory α_1 -antitrypsin [55,56], anti-microbial and cytotoxic α_1 - and α_2 -defensins [57], inflammatory proteins (S100B, S100A9 and S100A12), increased expression of p47phox and gp91phox subunits of NADPH oxidase [58] and oxidative stress have been reported in the serum of AD patients [59]. Furthermore, increased expression of α_M CD11b integrin [60], HLA-DR and COX2 [61] suggests that PMN of AD patients are in a state of activation. The bulk of these observations suggests that an inflammatory status is present in AD patients, in agreement with the concept that AD is a systemic disease [17] and that the capacity of AD patients to defend against infections may be compromised. Thus, it has been reported that PMN phagocytic functions are altered at the early stages of AD and although they retained the ability to engulf microbes, their phagocytic capacity, proteolysis of engulfed microbes and myeloperoxidase activity were all decreased [62].

We have previously reported that a number of functional alterations are predominantly observed in peripheral NK cells of mAD patients relative to aMCI subjects [63]. These observations led to the suggestion that such impaired functions may affect mAD individuals more severely than aMCI in their capacity to respond to pathological challenge during the progressive development of AD. In the present report, we extend these observations to the

properties of PMN of aMCI and mAD patients. We investigated the distribution, phenotype and functions of PMN at an early stage of the disease in a cohort of amnesic mild cognitive impairment (aMCI) patients and in patients who had a diagnosis of mild AD (mAD). Despite absence of any differences in the overall number of PMN between aMCI and mAD, we observed a significantly more PMN expressing the marker CD177 in the mAD group. Analysis of PMN viability suggested that cells of aMCI subjects may be primed, as shown by delayed spontaneous apoptosis. IL-8 stimulation failed to increase expression of CD11b in PMN of aMCI and mAD patients. A decrease in CD14 and CD16 receptor expression was observed in PMN of mAD subjects. In contrast, only PMN of aMCI subjects showed decreased expression of CD88 and TLR2. With respect to PMN functions, we observed differential alterations between aMCI and mAD subjects. There was reduction in phagocytosis and killing of *Candida albicans*, and decreased free radical production following opsonized *E. coli*, fMLP or PMA stimulation. Cytokine and chemokine production following LPS stimulation was low in mAD and aMCI patients. There were low levels production of inflammatory cytokine (TNF α , IL-6, IL-1 β , IL-12p70) and chemokine (MIP-1 α , MIP-1 β , IL-8) in response to LPS in PMN of aMCI and mAD subjects.

Materials and methods

Subjects

aMCI and mAD diagnosis was made according to NINCDS-ADRDA criteria [64,65] and the guidelines of Grundman *et al.* [66]. Healthy elderly individuals satisfied the SENIEUR standard protocol for immuno-gerontological studies [67]. Subjects who had a history or physical signs of atherosclerosis or inflammation were excluded. Evaluation and classification of subjects followed the standard protocol of our memory clinic including clinical, neuropsychological and imaging assessment. Mini-Mental State Evaluation (MMSE) and Montreal Cognitive Assessment (MoCA) were performed, as we have previously described in detail [63]. The study included 13 healthy controls, 13 patients with amnesic mild cognitive impairment (aMCI) and 15 with mild Alzheimer's disease (mAD). Details of the patients' clinical data are summarized in Table 1. The study was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine and Health Sciences of the University of Sherbrooke (protocol # 2010-21/Fülöp).

ApoE4 genotyping

ApoE4 genotyping was performed as described [63]. Briefly, genomic DNA (gDNA) was isolated from peripheral PBMC (1×10^6 cells) using a QiaAmp DNA mini kit (Qiagen, Toronto, ON) according to the manufacturer's instructions. APOE genotyping was performed with 20 ng of gDNA by real-time PCR, on a LightCycler 480 instrument (Roche, Mississauga, ON). TaqMan genotyping assay rs7412 and rs429358 were used to recognize 2 single nucleotide polymorphism of mature apoE at amino acid residue 112 (T/C, Cys or Arg) and 158 (C/T, Arg or Cys).

PMN purification and culture

Human PMN were isolated from ethylenediaminetetraacetate-treated venous blood samples (24 ml in each case) and purified by density gradient centrifugation over Polymorphep[®] (Axis-Shield Diagnostics Ltd, Dundee, Scotland or Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway), according to the manufacturer's instructions. Whole blood was carefully layered onto the Polymorphprep[®] gradient and centrifuged for 30 min at $500 \times g$ at medium acceleration and slow deceleration without applying brakes to the rotor. Plasma and mononuclear cells were removed and the lower band of PMN was collected. Cells were washed twice with HEPES-buffered saline (HBS) (10 mM HEPES, pH 7.4, 0.85% NaCl) and then with NaCl-free HBS. Erythrocytes were lysed by brief (7 min, 37°C) treatment with NH₄Cl- (0.83% (w/v) containing HEPES lysis buffer (10 mM, pH 7.4). Cell concentration was adjusted to 5×10^6 cells/ml in RPMI 1640 culture medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS) and penicillin G (2.5 IU/ml)/streptomycin (50 µg/ml) (Wisent, St Bruno, QC). The purity of PMN was greater than 98%, as assessed using the CD66b marker and FACS analysis (FACS Canto instrument, BD Biosciences, Mississauga, ON).

Cell surface staining

Purified PMN (1×10^6 cells) were washed twice with PBS (500 µl) and fixed using a fixation buffer (BioLegend, San Diego, CA) containing 1% (w/v) paraformaldehyde (PFA) for 10 min at 4°C. Cells were treated for 10 min at 4°C with PBS containing 10% FBS to reduce non-specific binding. After washing twice with PBS, cells were incubated with the relevant antibody mix for 30 min at 4°C, in the dark. Following 2 additional washings, cells were suspended in PBS, filtered through a nylon filter cloth (70 µm mesh size, Morgans Screening & Filters Ltd., Pickering, ON) to remove cell clumps and processed for analysis. Data were acquired on a Canto II (BD Biosciences) instrument using the FACSDiva v. 6.1 software.

Analysis were performed using the FlowJo version 7.6.1 software (TreeStar, Ashland, OR). Mean fluorescence intensity (MFI) refers to the geometric mean of fluorescence intensity. Antibodies used in this study are listed in supplementary Table S1.

Viability assays

PMN viability was determined using an Annexin V apoptosis detection kit (Calbiochem EMD Biosciences, Etobicoke, ON). Cells (1×10^6) were washed once (PBS), suspended in binding buffer, FITC-labeled Annexin V (1.25 μ l) was added and cells were incubated for 15 min in the dark, at room temperature. Propidium iodide (10 μ l) in binding buffer was then added and samples were analyzed promptly on a FACS Calibur instrument (BD Biosciences).

Chemotaxis assays

Chemotaxis of freshly purified PMN was assessed using 12-well Transwell[®] plates equipped with 3.0 μ m polycarbonate membrane inserts (Corning, New York, NY). IL-8 chemoattractant (100 ng/ml) in serum-free RPMI 1640 medium was added to the lower chamber. PMN (1×10^6 cells) were then added to the upper chamber. Migration was allowed to proceed for 1 h at 37°C. Cells collected from the lower chamber were counted on a FACS Calibur instrument (BD Biosciences).

Phagocytosis assays

Phagocytosis was assessed in whole blood using the pHrodo[®] E.coli BioParticles[®] Phagocytosis kit (Life Technologies, Burlington, ON). Blood samples (100 μ l) were incubated (15 min at 37°C) with the bioparticles whereas control samples were kept on ice. Phagocytosis was stopped by placing the tubes in an ice bath. Erythrocytes were removed by brief lysis with NH₄Cl, as above. Cells were washed and DNA stained with appropriate solutions of the commercial kit and processed on a FACS Calibur cytometer. Percentages of phagocytized cells and mean fluorescence intensity (MFI) were recorded. Phagocytic index was defined as the percentage of PMN that had ingested *E. coli*, multiplied by the MFI and divided by 100. Uptake of Dextran was used as an alternative approach. Whole blood samples (100 μ l) were incubated with FITC-labeled Dextran (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON) (1 mg/ml) for 1 h at 37°C or in an ice bath in the case of control samples. Cells were then fixed for 10 min by treatment with 1% PFA, washed three times with PBS and analyzed by cytofluorometry (FACS Canto II cytometer).

Cell killing assays

Candida albicans cells (1.5×10^6 bacteria) were stained with CFSE (10 μ M) (Molecular Probes, Eugene, OR) for 15 min at 37°C, in the dark. PMN in whole blood (100 μ l) were stained with an anti-CD66b phycoerythrin-labeled mAb for 25 min at room temperature, in the dark. Whole blood (100 μ l) and *Candida albicans* (5×10^5 cells) were then mixed and left for 1 h at 37°C, in the dark. The reaction was stopped by placing samples on ice. An aqueous solution (400 μ l) of lysis buffer (1.2 μ l of Triton X-100 and 1.2 μ l of Tween 20) was added and samples were incubated for 25 min at 37°C in a thermomixer set at 600 rpm. After centrifugation (10 min at 1000 x g) at 4°C, the pellet was suspended in ethidium homodimer-1 (EthD1, 2 μ M, 800 μ l) for 10 min at room temperature, in the dark. Results were analyzed by flow cytometry (FACS Canto II instrument) and are shown as killing index, as described [68–70]. The killing corresponds to the ratio of the percentage of dead *Candida albicans* (CFSE⁺EthD1⁺) relative to the percentage of neutrophils (CD66b-PE⁺).

Reactive oxygen species (ROS) production

Two protocols were used to quantify ROS production. A first series of experiments made use of the PhagoburstTM protocol (Glycotope Biotechnology GmbH, Heidelberg, Germany) which is based on the conversion of dihydrorhodamine (DHR) to rhodamine 123. Whole blood (100 μ l) was incubated (10 min) in a water bath (37°C) with opsonized *E. coli* in the absence (control) or presence of fMLP (5 μ M) or PMA (8.1 μ M). DHR was then added and incubation continued for 10 min at 37°C. An additional incubation (20 min) with lysis solution supplied with the kit allowed removal of erythrocytes and cell fixing. After two washes (PBS), samples were analyzed by cytofluorometry (FACS Calibur cytometer).

A second series of experiments was based on the detection of reactive oxygen species (ROS) by measuring the deacetylation of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) by cellular esterase, followed by oxidation by ROS into 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). PMN were stained with a FITC-labeled CD66b mAb for 30 min at room temperature, in the dark. After one wash (PBS), PMN were incubated with DCFDA (20 μ M) for 30 min at room temperature, in the dark. Positive controls consisted of PMN incubation (4 h, 37°C) with *t*-butyl hydrogen peroxide (55 μ M) or with LPS (1 μ g/ml). Samples were analyzed by cytofluorometry (FACS Canto II instrument).

Cytokine, and chemokine quantification in supernatants of LPS-activated PMN

Levels of TNF- α , IL-6, IL-12p70, IL-1 β , MIP-1 α , MIP-1 β , and IL-8 in the supernatants of LPS-activated PMN (50 μ l) were quantified using a human cytokine and chemokine magnetic bead assay (Milliplex® MAP Multiplex Assays; EMD Millipore, Billerica, MA). Purified PMN (5×10^5 cells) were challenged with LPS (1 μ g/ml) from *Salmonella typhimurium* SL1181 (product #L9516, Sigma-Aldrich) for 6 or 24 h. Quantification was performed according to the manufacturer's instructions with a sample incubation step overnight, at 4°C. Data were acquired on a Luminex® 200TM System using the Luminex xPonent® software and analyzed using the Milliplex® Analyst 5.1 software (EMD Millipore).

Statistical analysis

One-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test was performed to assess differences between patient groups. Data were processed using GraphPad Prism 6.02 software (GraphPad Software, La Jolla, CA).

Results

PMN functional integrity

PMN are notoriously sensitive to spontaneous activation during isolation. To confirm that our protocol of PMN isolation yielded cells with functional integrity, we used FACS analysis to assess cell viability and response to LPS challenge. Results showed that PMN viability was $95.4 \pm 3.0\%$, $96.5 \pm 0.6\%$ and $94.6 \pm 3.5\%$, in the case of healthy, aMCI and mAD subjects, respectively shortly after isolation (Fig. 1A). We next determined whether there was any spontaneous activation and subsequent apoptosis in 48 h cultures. Results showed that cell viability under standard conditions was $61.0 \pm 7.1\%$, $83.5 \pm 4.0\%$ and $49.6 \pm 2.8\%$ in the healthy, aMCI and mAD groups, respectively (Fig. 1B). Exposure to LPS did not influence cell viability in each of the respective cohort of subjects. However, data showed a significantly maintained viability in aMCI relative to healthy controls ($p < 0.05$) and mAD ($p < 0.01$) subjects after 48 hours without any stimulation. These observations suggest that PMN of aMCI patients are primed (by an unknown stimulus), as opposed to PMN of healthy and mAD patients.

PMN number and phenotype

PMN number did not differ between the three groups of subjects. Values were $3.62 \pm 1.0 \times 10^9$, $3.28 \pm 1.0 \times 10^9$ and $3.49 \pm 1.5 \times 10^9$ PMN/l in healthy controls, aMCI and mAD patients, respectively (Fig. 2A). Previous reports have suggested that the PMN:lymphocyte ratio (NLR)

could reflect progression of AD [71,72]. Our data are at odds with these observations. Thus, we saw no significant differences in the NLR in the three groups: values were 1.9 ± 0.3 , 1.7 ± 0.3 and 2.1 ± 0.5 , respectively, for healthy controls, aMCI and mAD patients (Fig. 2B). Furthermore, PMN gating based on forward side scatter and size side scatter parameters revealed similar percentages of CD66b-positive PMN in all 3 groups. Values were $95.1 \pm 1.2\%$, $95.9 \pm 0.7\%$ and $96.7 \pm 0.8\%$, respectively (Fig. 2C). Mean fluorescence intensity (MFI) also did not significantly differ between the three cohorts of subjects (2483 ± 415 , 1473 ± 193 and 1991 ± 175 in healthy individuals, aMCI and mAD patients, respectively), suggesting that PMN-associated innate immunity in aMCI and mAD patients may not be related to PMN number and phenotype (Fig. 2D). CD177 is a counter-receptor for PECAM-1 (CD31) and is involved in PMN transmigration [73,74]. We found that expression of this receptor was significantly higher in the mAD group as compared to healthy ($p < 0.05$) or aMCI subjects ($p < 0.05$) (Fig. 2E). Thus, the percentage of CD177-positive PMN was $50.9 \pm 8.3\%$ in healthy subjects, 65.1 ± 2.5 in aMCI patients and $70.9 \pm 6.1\%$ in mAD patients. Of interest, MFI was substantially higher in mAD individuals (2746 ± 869) than controls (647 ± 282) or aMCI (392 ± 273) subjects ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively, Fig. 2F).

Chemotaxis

IL-8 is a chemokine produced by endothelial cells that induces expression of the CD11b (α_M) integrin, thus favoring PMN adhesion to the endothelium [62]. We investigated the influence of IL-8 with respect to CD11b expression in the three groups of subjects. We found no significant differences under basal conditions (Fig. 3A), but exposing PMN to IL-8 resulted in a significant ($p < 0.05$) increase only in healthy subjects (Fig. 3A). However, this increased response did not translate into upregulated PMN migration in *in vitro* assays (Fig 3B).

Expression of PMN markers involved in phagocytosis

CD14 cooperates with TLR4 in response to LPS challenge [75]. Here, we found that the percentage of CD14-positive PMN in the mAD group was significantly reduced ($p < 0.01$) relative to healthy subjects or aMCI patients (Fig. 4A), as was CD14 staining intensity (Fig. 4B). However, CD14 expression and distribution were similar in healthy and aMCI individuals.

CD33 has been suggested to be a risk factor in AD [75] and its phagocytic activity has been reported to be defective in AD [76]. However, we observed no differences in the number of CD33-positive PMN and in MFI values in the three groups (Figs. 4C and 4D).

Expression of the low affinity FcγRIII receptor (CD16) has been reported to be increased in NK cells of mAD patients but not in aMCI individuals [63]. Here, results again showed an absence of differences in expression in PMN from aMCI and mAD patients, relative to healthy subjects (Fig. 4E). However, MFI analysis did reveal a significantly ($p < 0.01$ and $p < 0.05$) lower value in the mAD group (2151 ± 476) compared to the healthy (5120 ± 614) and aMCI group (3799 ± 983) (Fig. 4F).

CD88 (C5aR), is a G protein-coupled receptor of the complement factor C5a involved in the recognition of opsonized particles, an important process in the initiation of the inflammatory response [77]. We found that the percentage of CD88-positive PMN was similar in all three experimental groups (Fig. 4G), but, once again, MFI analysis revealed significantly lower values in aMCI (77.0 ± 63.9) compared to mAD (400.5 ± 67.9 ; $p < 0.05$) and healthy subjects (616.9 ± 101.8 ; $p < 0.05$) (Fig. 4H).

Phagocytosis

Results of experiments quantifying the capacity of PMN to respond to bacterial challenge showed that PMN of aMCI patients were as efficient as those from healthy subjects at phagocytosing opsonized *E. coli*. In contrast, the phagocytic activity of PMN from mAD patients was compromised ($p < 0.001$). We found that $96.8 \pm 1.3\%$ of PMN from healthy controls had ingested bacteria in contrast to only $40.2 \pm 10.6\%$ in the mAD group (Fig. 5A). This difference was even more marked when comparing MFIs: whereas the MFI in PMN from healthy individuals was 150.4 ± 41.6 , from aMCI and mAD subjects it was only slightly above background (aMCI, 18.7 ± 0.9 ; mAD, 3.7 ± 0.8). Nonetheless, phagocytic activity was significantly ($p < 0.001$) less in mAD than in aMCI subjects (Fig. 5B). Our data are in agreement with a previous report of a decrease in phagocytic activity of PMN from AD patients as a function of progression of the disease [62].

The relative efficiency of phagocytosis was also assessed by measuring the phagocytic index, which was significantly lower ($p < 0.001$) in aMCI patients (29.7 ± 17.1) and mAD patients (11.5 ± 6.4) than in healthy controls (150.4 ± 39) (Fig. 5C). The intrinsic phagocytic capacity of PMN was further assessed using FITC-labelled Dextran. In this case, results showed that PMN of aMCI subjects had the same capacity to ingest the fluorescent polysaccharide particles as those of healthy subjects (Fig. 5D). In marked contrast, PMN of the mAD group displayed barely detectable phagocytic capacity compared to healthy ($p < 0.001$) and aMCI (p

<0.001) subjects (Fig. 5D). The bulk of these data suggest that PMN of patients diagnosed with some form of cognitive impairment had a reduced phagocytotic response to bacterial challenge and further suggest that the phagocytic alteration in mAD could be associated with progression of the disease.

Cell killing activity

The ability of PMN to kill pathogens was assayed using the yeast *Candida albicans*. Results showed that PMN of aMCI and mAD patients were severely impaired in their ability to kill the pathogen (Fig. 6). The killing index defined as the relative intensity of the fluorescent signal of PMN to that of labelled *C. albicans* showed low values (0.89 ± 0.18) in the case of aMCI and mAD (1.21 ± 0.21) patients, in contrast to healthy subjects (3.33 ± 0.97). These differences were statistically significant at $p < 0.01$ (aMCI) and $p < 0.05$ (mAD).

Reactive oxygen species (ROS) production

Production of reactive oxygen species also referred to as the “oxidative burst” is part of the mechanism of pathogen destruction by activated PMN [78]. We used a phagoburst assay to assess PMN responses in aMCI and mAD patients to challenge with opsonized *E. coli*. PMN were left unstimulated or were exposed to the weak ROS stimulator fMLP or to the strong ROS inducer PMA. Whereas there were no differences between healthy subjects and aMCI groups, results showed that ingestion of opsonized *E. coli* by PMN from mAD patients was significantly impaired ($p < 0.01$) relative to the other two groups (Fig. 7A). Values were 135 ± 26 (control) and 50 ± 40 (mAD). Similar results were obtained when PMN had been activated by exposure to fMLP. In this case, the PMN response of mAD patients (24.9 ± 11.0) was significantly lower ($p < 0.05$) with respect to healthy controls (46.7 ± 8.3) but there were no differences between controls and aMCI patients (Fig. 7B). PMA triggered a robust phagoburst response in PMN from healthy subjects and aMCI individuals (Fig. 7C). However, PMN response of mAD patients (346 ± 133) was significantly decreased ($p < 0.05$) with respect to healthy controls (887 ± 146 ; $p < 0.01$) and aMCI patients (911 ± 343 ; $p < 0.05$). Together, these data strongly suggest that progression to AD is associated with an impaired response to microbial challenge and destruction.

Inflammatory cytokine production

We next analyzed pro-inflammatory cytokine production by PMN stimulated by LPS (1 $\mu\text{g/ml}$). As expected, PMN of healthy subjects responded robustly and produced high levels of

TNF α after 6 h (1443 ± 690 ng/ml) and 24 h (1389 ± 44 ng/ml) (Fig. 8A). In marked contrast, PMN of aMCI patients produced low amounts of TNF α under LPS stimulation (Fig. 8A). Values were 64 ± 31 ng/ml at 6 h and 58 ± 29 ng/ml at 24 h. Notably, PMN of mAD patients barely produced detectable amounts of TNF α under both basal conditions as well as after LPS stimulation (Fig. 8A). Similar observations were made in the case of IL-6 production: thus, PMN from healthy subjects responded well to LPS stimulation after 6 h (4034 ± 3257 ng/ml) and 24 h (8737 ± 863 ng/ml), but PMN from aMCI subjects produced very low amounts and PMN from mAD patients failed to generate any IL-6 response at all (Fig 8B). The same was true for IL-1 β production. Whereas there was a robust response of PMN from healthy controls after 6 h (2160 ± 490 ng/ml) and 24 h (5811 ± 3427 ng/ml), LPS-stimulated PMN from aMCI and mAD patients failed to generate a response (Fig. 8C). This lack of response of aMCI and mAD patients was also seen for IL-12p70 production. In this case, PMN of healthy subjects responded well after 24 h of LPS stimulation (5.98 ± 3.3 ng/ml) whereas there was a weak response of PMN of aMCI subjects and complete lack of response in mAD patients (Fig. 8D).

Chemokine production

PMN are attracted to the site of tissue injury in response to locally-produced chemoattractants and produce further chemoattractants themselves. The data shown above suggested a severe impairment of response of PMN from aMCI and mAD patients to LPS stimulation. We investigated whether these alterations in PMN response would also be reflected in their production of chemoattractants. PMN of healthy subjects responded robustly to LPS in terms of MIP-1 α production after 6 h (4550 ± 2752 ng/ml) and 24 h (5446 ± 1485 ng/ml) (Fig. 9A). In marked contrast, PMN of aMCI and mAD patients failed to respond under similar conditions. Whereas MIP-1 α production was low and variable in PMN from aMCI patients, it was undetectable in mAD subjects (Fig. 9A). Similar results were seen for MIP-1 β production. In this case, PMN of healthy controls generated a very variable response after 6 h (2375 ± 2046 ng/ml) and 24 h (3234 ± 2630 ng/ml) (Fig. 9B), but PMN of aMCI and mAD patients failed to respond at all (Fig. 9B). We also tested IL-8 production and found that PMN of healthy subjects generated large amounts 6 h (6942 ± 15 ng/ml) and 24 h (11897 ± 173 ng/ml) after LPS challenge (Fig. 9C). Again, PMN of aMCI patients produced low amounts after 6 h (1076 ± 207 ng/ml) and 24 h (1774 ± 319 ng/ml) of LPS stimulation, whereas PMN of mAD failed to respond

at all (Fig. 9C). Taken together, these findings document severely impaired responses to LPS by PMN from aMCI individuals and a complete failure to respond in mAD patients.

TLR expression

TLRs are the means by which PMN recognize a wide range of microbial structural components and respond by production of cytokines and chemokines and destruction of the pathogen [79]. Here, we assessed TLR expression on control and patients' PMN. We found that percentages of TLR2-expressing PMN were similar in healthy controls and aMCI and mAD patients (Fig. 10A), but the density of its expression was significantly lower in aMCI than in either healthy ($p < 0.05$) or mAD ($p < 0.05$) subjects (Fig.10B). In contrast, there were no differences in TLR4 expression either as percentages or as MFI values in aMCI, mAD or healthy subjects (Figs. 10C and 10D).

Discussion

AD is the most frequent neurodegenerative disease that affects millions of people; despite the urgency of the problem, the nature of the underlying pathophysiological causes remains controversial. However, recent evidence suggests that the immune system plays a role in AD as it is activated in response to thus far unidentified challenges that may include infectious agents. We have recently reported [63] that NK cells are activated in aMCI patients, suggesting that these cells are responding to some challenge in the AD brain. The fact that PMN act as the first line of defense against microbial invaders and recent data that suggested that they also play a role in AD [24] led us to investigate PMN phenotype and functional properties in a cohort of aMCI and mAD subjects.

PMN are notoriously sensitive to activation during the steps of isolation. Our data showed that this was not the case in either patients or controls for the protocol employed here (Fig 1A). PMN are short lived but are activated by pro-inflammatory mediators, which increases their survival. Our assessment of PMN viability in the present study revealed a delay in spontaneous apoptosis in 48 h cultures only in the aMCI group under basal conditions (Fig. 1B). Cell viability was not increased in LPS-challenged PMN, suggesting that PMN of aMCI subjects were already in a primed state in response to unidentified stimuli. PMN are sensitive to changes in inflammatory status which could influence the number and expression of the PMN markers CD66b and CD177 in aMCI and mAD subjects. Here, our data showed no differences in the

distribution of the total number of CD66b-positive PMN (Fig. 2), but quantification of CD177, expressed physiologically on approximately 40-80% of PMN [80,81], revealed significantly more CD177-positive cells in the mAD population. Furthermore, MFI quantification confirmed a robust increase of this marker in the mAD group (Fig.2). Increases in the percentage of CD177-positive PMN have been reported in pathological conditions such as sepsis [82] and myeloma [83]. In addition, it has been reported that CD177 is expressed by the more mature PMN and that it can be an effector of the IKK β factor to prolong survival in the bone marrow [84] and to increase PMN mobility following activation [85]. Our observations suggest that the increase in CD177 expression could be related to disease progression towards mAD. Furthermore, this interpretation is in agreement with the reported state of activation of NK cells and lymphocytes in peripheral blood of AD patients [63,86]. The main function of CD177 is to actively participate in endothelial transmigration by heterophilic binding to CD31 (PECAM-1) [74,83,87]. It is tempting to suggest that the interaction between CD177 and CD31 could serve to recruit PMN into brain parenchyma in AD, in a manner analogous to the reported interaction between ICAM-1 and LFA-1 [24].

Recruitment of activated circulating PMN and extravasation into inflamed tissues involves chemotaxis along a chemokine gradient. During this series of events, PMN upregulate expression of adhesion molecules, particularly the CD11b integrin. Here, we found that whereas IL-8-stimulated PMN from healthy elderly individuals responded with a 2.5-fold increase in CD11b expression, PMN from aMCI or mAD did not respond to the stimulus (Fig. 3). Consistent with this, IL-8 did not stimulate migration of PMN of aMCI and mAD subjects; on the other hand, spontaneous PMN migration of healthy individuals was not upregulated by IL-8. These observations suggested that CD11b does not play a role in PMN migration to the parenchyma in the AD brain in the absence of its CD31 coreceptor.

The efficiency of PMN as cells responsible for innate immune protection depends on expression of a number of cell surface molecules. Analysis of some of these revealed differences in their expression by PMN from aMCI and mAD patients. For instance, while CD14 expression in PMN from aMCI subjects was similar to that of healthy individuals (suggesting that they maintained their capacity to mount an immune response against bacterial challenge), it was markedly less well-expressed by PMN from mAD patients. This suggests that progression to AD

could be associated with an alteration in protection against opportunistic bacterial infections (Fig. 4), without a change in TLR4 expression (Fig. 10).

CD33 has been suggested to be involved in phagocytosis and to be defective in AD [76]. In addition, it has been linked to a decrease in monocyte phagocytic activity in AD [76,88]. In contrast, we found that expression of CD33 was not altered in PMN of aMCI and mAD subjects, suggesting that it may not be involved in the decreased phagocyte activity of these PMN (Fig. 4). Lower CD88 expression was observed in PMN from the aMCI group, suggesting that the complement pathway could be involved at the aMCI stage. CD88 expression in PMN of the mAD group was significantly ($p < 0.05$) higher than in aMCI subjects (Fig. 4). It is to be noted that components of the complement pathway have been suggested to be involved in AD. For instance, it has been reported that C1q is present in the vicinity of amyloids plaques [89], that complement intermediates have been found by Genome-Wide Association Studies analysis [90] and that a link has been proposed between complement and microglial synapse loss [91]. Overall, the bulk of our data showed that some PMN surface markers were differentially expressed in aMCI and mAD subjects and that PMN of mAD patients were more susceptible to these alterations.

Engulfment (phagocytosis) of invading microorganisms is one of the major effector functions of PMN. We found that this protective function was severely affected in PMN of aMCI and mAD subjects (Fig. 5). Phagocytosis of opsonized *E. coli* occurs through specific receptors [92] such as CD16, an Fc γ RIII receptor. Phenotypic analysis of CD16 revealed that its expression was greatly reduced in PMN of mAD subjects (Fig. 4), explaining in part the impaired phagocytic activity against *E. coli* (Fig. 5). Phagocytosis mediated by carbohydrate recognition was impaired only in PMN of mAD subjects in model assays using FITC-Dextran (Fig. 5). These observations were interpreted to suggest that PMN of aMCI and mAD patients responded to specific antigenic patterns displayed on *E. coli* outer membrane, whereas there was severe general impairment of phagocytosis in PMN of the mAD group (Fig. 5). Alterations in PMN phagocytic activity have been previously reported in AD [61]. However, our data are the first to report that this is also the case in aMCI subjects (Fig. 5). This observation adds support to the interpretation that progression to AD may be associated with a decreased response to bacterial challenge.

Release of antimicrobial products stored in intracellular granules, production of reactive oxygen species (ROS) resulting from NADPH oxidase activity and generation of NETs are the main components involved in the microorganism killing process [93]. Assays of *Candida albicans* killing showed a clear defect in the capacity of PMN of aMCI and mAD patients to destroy pathogens (Fig. 6), suggesting that the intracellular killing machinery of PMN was altered in these cells. This possibility received experimental support when ROS production was quantified. Whereas PMN of aMCI individuals responded in a manner similar to healthy subjects, the response of PMN from mAD patients was markedly decreased (Fig. 7). Exposing PMN to the chemoattractant fMLP or to PMA did not induce an improved response, unlike its effects in healthy subjects or aMCI patients (Fig. 7). These results suggest that the observed lesser killing ability of PMN from aMCI patients (Fig. 6) was not due to a defect in phagoburst activity but likely involved antimicrobial components of PMN granules. Overall, the impaired killing ability of PMN from mAD patients (Fig. 6) may be the result of a combination of events involving altered phagoburst activity and intracellular antimicrobial components, and may reflect complex alterations in PMN functions with progression of the disease. Unexpectedly, the capacity to produce cytokines and chemokines following LPS stimulation was severely compromised in PMN of both aMCI and mAD patients (Figs.8 and 9). These defects clearly indicate that PMN of these patients have a very limited capacity to respond to a hostile antigenic environment and to communicate with other immune cells to mount an efficient primary response. However, the explanation for these observations remains undetermined at this time. Overall, our data are consistent with the interpretation that PMN from aMCI and mAD patients are severely compromised with respect to their ability to defend against microbial infections in the periphery and in the AD brain. PMN from aMCI and mAD patients retained the capacity to recognize antigenic microbial patterns as shown by retained expression of TLR4 (Fig. 10). However, TLR2 expression was lower in PMN from aMCI subjects (Fig. 10). This observation is in keeping with the report of a decrease in the capacity to respond to amyloid peptides in the AD brain [94].

In summary, data presented here strongly suggest that the innate immune system plays a role in the development and progression of AD. We have previously reported that NK cell receptor expression and function were different in aMCI and mAD patients as compared to healthy elderly individuals [63]. Results described here showed that this pattern of differentially

affected phenotype and functions also applies to PMN from aMCI and mAD subjects. However, alterations in PMN functions were in most but not all cases similarly affected in aMCI and mAD patients, in contrast to the situation with NK cells where mAD patients and not aMCI patients were primarily susceptible. Overall, the altered capacity of PMN from aMCI and mAD patients to phagocytose and kill pathogens and the impaired ability to produce cytokines and chemokines in response to stimulation indicate that the early innate response is likely to be severely compromised in these patients. This has implications for development of and progression to AD. The fact that AD is now recognized as a systemic disorder [95–97], that there is evidence that inflammatory status is associated with the disease [98] and that there is involvement of the innate and adaptive immune systems [99,100] converge to highlight these targets in the management of the disease. Alterations of NK and PMN functions need further systematic investigation to facilitate the development of new strategies to treat early symptoms of AD and to monitor progression to the full-blown clinical condition.

Acknowledgments

The authors wish to thank Ms Odette Baril for the recruitment of patients, their neuropsychological evaluation and blood collection. We also thank all the participants who made this study possible. The authors express their appreciation to Dr. M. Richter who kindly provided access to the FACS ARIA III cytofluorimeter and to Ms Isabelle Marois for her help in cytofluorimetric analysis. This work was supported by grants from Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (No. 106634), the *Société des médecins* de l'Université de Sherbrooke and the Research Center on Aging of the CIUSSS-CHUS, Sherbrooke and by the Polish Ministry of Science and Higher Education statutory grant 02-0058/07/262 to J. M. W.

REFERENCES

- [1] Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA (2010) Alzheimer disease. *Dis Mon* **56**, 484–546.
- [2] Selkoe DJ (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* **298**, 789–791.
- [3] Querfurth HW, LaFerla FM (2010) Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **362**, 329–344.
- [4] Iqbal K, Liu F, Gong C-XX (2016) Tau and neurodegenerative disease: the story so far. *Nat Rev Neurol* **12**, 15–27.
- [5] Cai Z, Hussain MD, Yan L-JJ (2014) Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Int. J. Neurosci.* **124**, 307–321.
- [6] Bekris LM, Galloway NM, Millard S, Lockhart D, Li G, Galasko DR, Farlow MR, Clark CM, Quinn JF, Kaye JA, Schellenberg GD, Leverenz JB, Seubert P, Tsuang DW, Peskind ER, Yu CE (2011) Amyloid precursor protein (APP) processing genes and cerebrospinal fluid APP cleavage product levels in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **32**, 556e13–23.
- [7] Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, Yarasheski KE, Bateman RJ (2010) Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science* **330**, 1774–1775.
- [8] Sun X, Chen W-DD, Wang Y-DD (2015) β -Amyloid: the key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Front Pharmacol* **6**, 221–230.
- [9] ElAli A, Rivest S (2016) Microglia in Alzheimer's disease: A multifaceted relationship. *Brain Behav. Immun.* **55**, 138–50.
- [10] Zolezzi JM, Inestrosa NC (2014) Brain metabolite clearance: impact on Alzheimer's disease. *Metab Brain Dis* **29**, 553–561.
- [11] Solana R, Tarazona R, Gayoso I, Lesur O, Dupuis G, Fulop T (2012) Innate immunosenescence: effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans. *Semin. Immunol.* **24**, 331–341.
- [12] Tarasoff-Conway JM, Carare RO, Osorio RS, Glodzik L, Butler T, Fieremans E, Axel L, Rusinek H, Nicholson C, Zlokovic BV, Frangione B, Blennow K, Ménard J, Zetterberg H, Wisniewski T, de Leon MJ (2015) Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* **11**, 457–470.
- [13] Latta CH, Brothers HM, Wilcock DM (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's disease; A source of heterogeneity and target for personalized therapy. *Neuroscience* **302**, 103–111.
- [14] Le Thuc O, Blondeau N, Nahon J-LL, Rovère C (2015) The complex contribution of chemokines to neuroinflammation: switching from beneficial to detrimental effects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1351**, 127–140.
- [15] Doens D, Fernández PL (2014) Microglia receptors and their implications in the response to amyloid β for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neuroinflammation* **11**, 48–62.
- [16] Yu Y, Ye RD (2015) Microglial A β receptors in Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Neurobiol.* **35**, 71–83.
- [17] Goldeck D, Witkowski JM, Fülöp T, Pawelec G (2016) Peripheral Immune Signatures in Alzheimer Disease. *Curr Alzheimer Res* **13**, 739–749.
- [18] Wyss-Coray T (2006) Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat. Med.* **12**, 1005–1015.
- [19] McCaulley ME, Grush KA (2015) Alzheimer's Disease: Exploring the Role of Inflammation and Implications for Treatment. *Int J Alzheimers Dis* **2015**, 515248:1–10.
- [20] Krstic D, Knuesel I (2013) Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* **9**, 25–34.

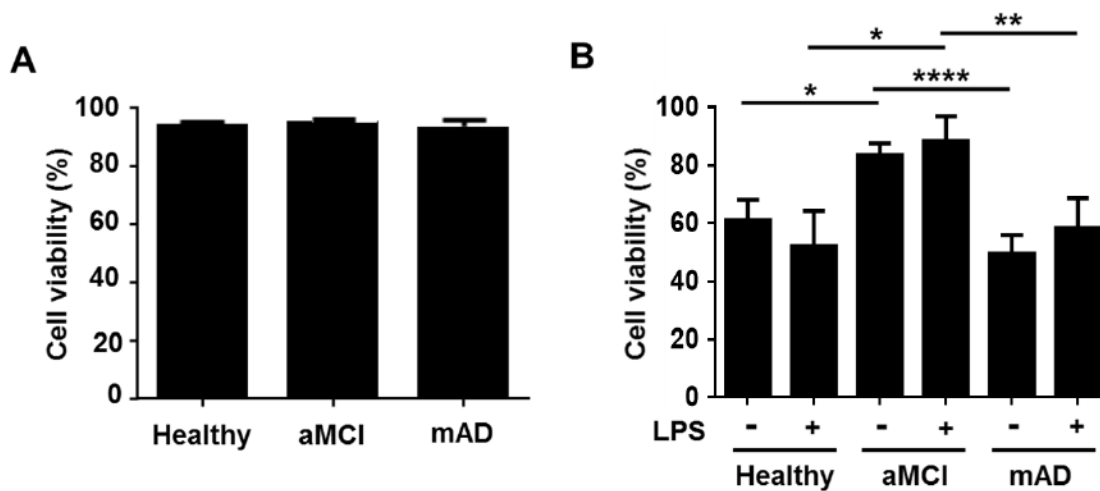
- [21] Savage MJ, Iqbal, Loh, Trusko SP, Scott, Siman (1994) Cathepsin G: Localization in human cerebral cortex and generation of amyloidogenic fragments from the β -amyloid precursor protein. *Neuroscience* **60**, 607–619.
- [22] Baik SH, Cha M-YY, Hyun Y-MM, Cho H, Hamza B, Kim DK, Han S-HH, Choi H, Kim KH, Moon M, Lee J, Kim M, Irimia D, Mook-Jung I (2014) Migration of neutrophils targeting amyloid plaques in Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiol. Aging* **35**, 1286–1292.
- [23] Subramanian S, Ayala P, Wadsworth T, Harris C, Vandenbark A, Quinn J, Offner H (2010) CCR6: a biomarker for Alzheimer's-like disease in a triple transgenic mouse model. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **22**, 619–629.
- [24] Zenaro E, Pietronigro E, Della Bianca V, Piacentino G, Marongiu L, Budui S, Turano E, Rossi B, Angiari S, Dusi S, Montresor A, Carlucci T, Nani S, Tosadori G, Calciano L, Catalucci D, Berton G, Bonetti B, Constantin G (2015) Neutrophils promote Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin. *Nat. Med.* **21**, 880–896.
- [25] Whalley K (2015) Neurodegenerative disease: A neutrophil invasion. *Nat. Rev. Neurosci.* **16**, 510.
- [26] Schwartz M, Kipnis J, Rivest S, Prat A (2013) How Do Immune Cells Support and Shape the Brain in Health, Disease, and Aging? *The Journal of Neuroscience* **33**, 17587–17596.
- [27] Michaud J-P, Bellavance M-A, Préfontaine P, Rivest S (2013) Real-Time In Vivo Imaging Reveals the Ability of Monocytes to Clear Vascular Amyloid Beta. *Cell Reports* **5**, 646–653.
- [28] Kolaczowska E, Kubes P (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 159–175.
- [29] Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA (2014) The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol* **9**, 181–218.
- [30] Nourshargh S, Alon R (2014) Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity* **41**, 694–707.
- [31] Prince LR, Whyte MK, Sabroe I, Parker LC (2011) The role of TLRs in neutrophil activation. *Curr Opin Pharmacol* **11**, 397–403.
- [32] Thomas CJ, Schroder K (2013) Pattern recognition receptor function in neutrophils. *Trends Immunol.* **34**, 317–328.
- [33] Fukata M, Vamadevan AS, Abreu MT (2009) Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. *Semin. Immunol.* **21**, 242–253.
- [34] Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ (2014) Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**, 2563–2582.
- [35] Lee WL, Harrison RE, Grinstein S (2003) Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect.* **5**, 1299–1306.
- [36] Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L (2000) Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab. Invest.* **80**, 617–653.
- [37] Faurschou M, Borregaard N (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* **5**, 1317–1327.
- [38] Nauseef WM, Borregaard N (2014) Neutrophils at work. *Nat. Immunol.* **15**, 602–611.
- [39] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532–1535.
- [40] Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A (2006) Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell. Microbiol.* **8**, 668–676.

- [41] Fanger NA, Liu C, Guyre PM, Wardwell K, O'Neil J, Guo TL, Christian TP, Mudzinski SP, Gosselin EJ (1997) Activation of human T cells by major histocompatibility complex class II expressing neutrophils: proliferation in the presence of superantigen, but not tetanus toxoid. *Blood* **89**, 4128–4135.
- [42] Radsak M, Iking-Konert C, Stegmaier S, Andrassy K, Hänsch GM (2000) Polymorphonuclear neutrophils as accessory cells for T-cell activation: major histocompatibility complex class II restricted antigen-dependent induction of T-cell proliferation. *Immunology* **101**, 521–530.
- [43] Soehnlein O, Zernecke A, Weber C (2009) Neutrophils launch monocyte extravasation by release of granule proteins. *Thrombosis and Haemostasis*. 105/5: 892–900.
- [44] Tecchio C, Micheletti A, Cassatella MA (2014) Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Front Immunol* **5**, 508–515.
- [45] Fortin CF, McDonald PP, Lesur O, Fülöp T (2008) Aging and neutrophils: there is still much to do. *Rejuvenation Res* **11**, 873–882.
- [46] Panda A, Arjona A, Sapey E, Bai F, Fikrig E, Montgomery RR, Lord JM, Shaw AC (2009) Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends Immunol.* **30**, 325–333.
- [47] Khanfer R, Carroll D, Lord JM, Phillips AC (2012) Reduced neutrophil superoxide production among healthy older adults in response to acute psychological stress. *Int J Psychophysiol* **86**, 238–244.
- [48] Fülöp T, Larbi A, Pawelec G (2013) Human T cell aging and the impact of persistent viral infections. *Front Immunol* **4**, 271–280.
- [49] Shaw AC, Goldstein DR, Montgomery RR (2013) Age-dependent dysregulation of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 875–887.
- [50] López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G (2013) The hallmarks of aging. *Cell* **153**, 1194–1217.
- [51] Fulop T, Le Page A, Fortin C, Witkowski JM, Dupuis G, Larbi A (2014) Cellular signaling in the aging immune system. *Curr. Opin. Immunol.* **29**, 105–111.
- [52] Pensalfini A, Albay R, Rasool S, Wu JW, Hatami A, Arai H, Margol L, Milton S, Poon WW, Corrada MM, Kawas CH, Glabe CG (2014) Intracellular amyloid and the neuronal origin of Alzheimer neuritic plaques. *Neurobiol. Dis.* **71**, 53–61.
- [53] Verga L, Frangione B, Tagliavini F, Giaccone G, Migheli A, Bugiani O (1989) Alzheimer patients and Down patients: cerebral preamyloid deposits differ ultrastructurally and histochemically from the amyloid of senile plaques. *Neurosci. Lett.* **105**, 294–299.
- [54] Naudé PJ, Dekker AD, Coppus AM, Vermeiren Y, Eisel UL, van Duijn CM, Van Dam D, De Deyn PP (2015) Serum NGAL is Associated with Distinct Plasma Amyloid- β Peptides According to the Clinical Diagnosis of Dementia in Down Syndrome. *J. Alzheimers Dis.* **45**, 733–743.
- [55] Licastro F, Morini MC, Polazzi E, Davis LJ (1995) Increased serum alpha 1-antichymotrypsin in patients with probable Alzheimer's disease: an acute phase reactant without the peripheral acute phase response. *J. Neuroimmunol.* **57**, 71–75.
- [56] Wetterling T, Tegtmeyer KF (1994) Serum alpha 1-antitrypsin and alpha 2-macroglobulin in Alzheimer's and Binswanger's disease. *Clin Investig* **72**, 196–199.
- [57] Watt AD, Perez KA, Ang C-SS, O'Donnell P, Rembach A, Pertile KK, Rumble RL, Trounson BO, Fowler CJ, Faux NG, Masters CL, Villemagne VL, Barnham KJ (2015)

- Peripheral α -defensins 1 and 2 are elevated in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **44**, 1131–1143.
- [58] Bruce-Keller AJ, Gupta S, Parrino TE, Knight AG, Ebenezer PJ, Weidner AM, LeVine H, Keller JN, Markesbery WR (2010) NOX activity is increased in mild cognitive impairment. *Antioxid. Redox Signal.* **12**, 1371–1382.
- [59] Shepherd CE, Goyette J, Utter V, Rahimi F, Yang Z, Geczy CL, Halliday GM (2006) Inflammatory S100A9 and S100A12 proteins in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **27**, 1554–1563.
- [60] Scali C, Proserpi C, Bracco L, Piccini C, Baronti R, Ginestroni A, Sorbi S, Pepeu G, Casamenti F (2002) Neutrophils CD11b and fibroblasts PGE(2) are elevated in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **23**, 523–530.
- [61] Fiala M, Lin J, Ringman J, Kermani-Arab V, Tsao G, Patel A, Lossinsky AS, Graves MC, Gustavson A, Sayre J, Sofroni E, Suarez T, Chiappelli F, Bernard G (2005) Ineffective phagocytosis of amyloid-beta by macrophages of Alzheimer's disease patients. *J. Alzheimers Dis.* **7**, 221–32; discussion 255–262.
- [62] Davydova TV, Fomina VG, Voskresenskaya NI, Doronina OA (2003) Phagocytic activity and state of bactericidal systems in polymorphonuclear leukocytes from patients with Alzheimer's disease. *Bull. Exp. Biol. Med.* **136**, 355–357.
- [63] Le Page A, Bourgade K, Lamoureux J, Frost E, Pawelec G, Larbi A, Witkowski JM, Dupuis G, Fülöp T (2015) NK Cells are Activated in Amnesic Mild Cognitive Impairment but not in Mild Alzheimer's Disease Patients. *J. Alzheimers Dis.* **46**, 93–107.
- [64] McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carrillo MC, Thies B, Weintraub S, Phelps CH (2011) The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **7**, 263–269.
- [65] Small GW, Rabins PV, Barry PP, Buckholtz NS, DeKosky ST, Ferris SH, Finkel SI, Gwyther LP, Khachaturian ZS, Lebowitz BD, McRae TD, Morris JC, Oakley F, Schneider LS, Streim JE, Sunderland T, Teri LA, Tune LE (1997) Diagnosis and treatment of Alzheimer disease and related disorders. Consensus statement of the American Association for Geriatric Psychiatry, the Alzheimer's Association, and the American Geriatrics Society. *JAMA* **278**, 1363–1371.
- [66] Grundman M, Petersen RC, Ferris SH, Thomas RG, Aisen PS, Bennett DA, Foster NL, Jack CR, Galasko DR, Doody R, Kaye J, Sano M, Mohs R, Gauthier S, Kim HT, Jin S, Schultz AN, Schafer K, Mulnard R, van Dyck CH, Mintzer J, Zamrini EY, Cahn-Weiner D, Thal LJ (2004) Mild cognitive impairment can be distinguished from Alzheimer disease and normal aging for clinical trials. *Arch. Neurol.* **61**, 59–66.
- [67] Pawelec G, Ferguson FG, Wikby A (2001) The SENIEUR protocol after 16 years. *Mech. Ageing Dev.* **122**, 132–144.
- [68] Hampton MB, Winterbourn CC (1999) Methods for quantifying phagocytosis and bacterial killing by human neutrophils. *J. Immunol. Methods* **232**, 15–22.
- [69] Salih HR, Husfeld L, Adam D (2000) Simultaneous cytofluorometric measurement of phagocytosis, burst production and killing of human phagocytes using *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* as target organisms. *Clin. Microbiol. Infect.* **6**, 251–258.

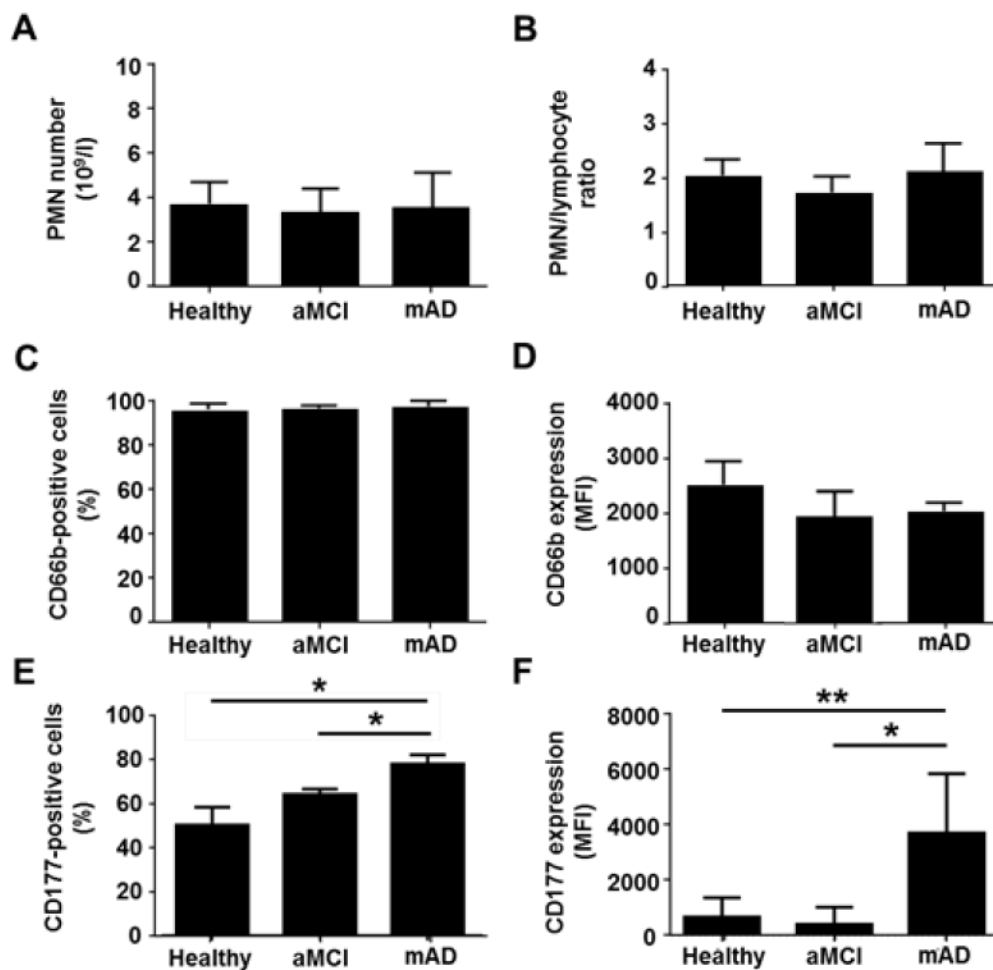
- [70] Anding K, Rost JM, Jacobs E, Daschner FD (2003) Flow cytometric measurements of neutrophil functions: the dependence on the stimulus to cell ratio. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **35**, 147–152.
- [71] Kuyumcu ME, Yesil Y, Oztürk ZA, Kizilarslanoğlu C, Etgül S, Halil M, Ulger Z, Cankurtaran M, Arioğul S (2012) The evaluation of neutrophil-lymphocyte ratio in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* **34**, 69–74.
- [72] Rembach A, Watt AD, Wilson WJ, Rainey-Smith S, Ellis KA, Rowe CC, Villemagne VL, Macaulay SL, Bush AI, Martins RN, Ames D, Masters CL, Doecke JD (2014) An increased neutrophil-lymphocyte ratio in Alzheimer's disease is a function of age and is weakly correlated with neocortical amyloid accumulation. *J. Neuroimmunol.* **273**, 65–71.
- [73] Baggiolini M (2015) CXCL8 - The First Chemokine. *Front Immunol* **6**, 285.
- [74] Dimasi D, Sun WY, Bonder CS (2013) Neutrophil interactions with the vascular endothelium. *Int. Immunopharmacol.* **17**, 1167–1175.
- [75] Zanoni I, Granucci F (2013) Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation. *Front Cell Infect Microbiol* **3**, 32.
- [76] Griciuc A, Serrano-Pozo A, Parrado AR, Lesinski AN, Asselin CN, Mullin K, Hooli B, Choi SH, Hyman BT, Tanzi RE (2013) Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of amyloid beta. *Neuron* **78**, 631–643.
- [77] Ward PA (2009) Functions of C5a receptors. *J. Mol. Med.* **87**, 375–378.
- [78] Manda-Handzlik A, Demkow U (2015) Neutrophils: The Role of Oxidative and Nitrosative Stress in Health and Disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **857**, 51–60.
- [79] Futosi K, Fodor S, Mócsai A (2013) Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int. Immunopharmacol.* **17**, 638–650.
- [80] Matsuo K, Lin A, Procter JL, Clement L, Stroncek D (2000) Variations in the expression of granulocyte antigen NB1. *Transfusion* **40**, 654–62.
- [81] Caruccio L, Bettinotti M, Matsuo K, Sharon V, Stroncek D (2003) Expression of human neutrophil antigen-2a (NB1) is increased in pregnancy. *Transfusion* **43**, 357–363.
- [82] Göhring K, Wolff J, Doppl W, Schmidt KL, Fenchel K, Pralle H, Sibelius U, Bux J (2004) Neutrophil CD177 (NB1 gp, HNA-2a) expression is increased in severe bacterial infections and polycythaemia vera. *Br. J. Haematol.* **126**, 252–254.
- [83] Stroncek DF (2007) Neutrophil-specific antigen HNA-2a, NB1 glycoprotein, and CD177. *Curr. Opin. Hematol.* **14**, 688–693.
- [84] Xie Q, Klesney-Tait J, Keck K, Parlet C, Borchering N, Kolb R, Li W, Tygrett L, Waldschmidt T, Olivier A, Chen S, Liu G-HH, Li X, Zhang W (2015) Characterization of a novel mouse model with genetic deletion of CD177. *Protein Cell* **6**, 117–126.
- [85] Demaret J, Venet F, Plassais J, Cazalis M-AA, Vallin H, Friggeri A, Lepape A, Rimmelé T, Textoris J, Monneret G (2016) Identification of CD177 as the most dysregulated parameter in a microarray study of purified neutrophils from septic shock patients. *Immunol. Lett.* **178**, 122–130.
- [86] Larbi A, Pawelec G, Witkowski JM, Schipper HM, Derhovanessian E, Goldeck D, Fulop T (2009) Dramatic shifts in circulating CD4 but not CD8 T cell subsets in mild Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **17**, 91–103.
- [87] Sachs UJ, Andrei-Selmer CL, Maniar A, Weiss T, Paddock C, Orlova VV, Choi EY, Newman PJ, Preissner KT, Chavakis T, Santoso S (2007) The neutrophil-specific antigen CD177 is a counter-receptor for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *J. Biol. Chem.* **282**, 23603–23612.

- [88] Bradshaw EM, Chibnik LB, Keenan BT, Ottoboni L, Raj T, Tang A, Rosenkrantz LL, Imboywa S, Lee M, Von Korff A, Morris MC, Evans DA, Johnson K, Sperling RA, Schneider JA, Bennett DA, De Jager PL (2013) CD33 Alzheimer's disease locus: altered monocyte function and amyloid biology. *Nat. Neurosci.* **16**, 848–850.
- [89] Wyss-Coray T, Rogers J (2012) Inflammation in Alzheimer disease—a brief review of the basic science and clinical literature. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006346:1-24.
- [90] Hong S, Dissing-Olesen L, Stevens B (2016) New insights on the role of microglia in synaptic pruning in health and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* **36**, 128–134.
- [91] Hong S, Beja-Glasser VF, Nfonoyim BM, Frouin A, Li S, Ramakrishnan S, Merry KM, Shi Q, Rosenthal A, Barres BA, Lemere CA, Selkoe DJ, Stevens B (2016) Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* **352**, 712–716.
- [92] Freeley S, Kemper C, Le Friec G (2016) The “ins and outs” of complement-driven immune responses. *Immunol. Rev.* **274**, 16–32.
- [93] Kruger P, Saffarzadeh M, Weber AN, Rieber N, Radsak M, von Bernuth H, Benarafa C, Roos D, Skokowa J, Hartl D (2015) Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog.* **11**, e1004651:1–23.
- [94] Tahara K, Kim H-DD, Jin J-JJ, Maxwell JA, Li L, Fukuchi K (2006) Role of toll-like receptor signalling in A β uptake and clearance. *Brain* **129**, 3006–3019.
- [95] Sardi F, Fassina L, Venturini L, Inguscio M, Guerriero F, Rolfo E, Ricevuti G (2011) Alzheimer's disease, autoimmunity and inflammation. The good, the bad and the ugly. *Autoimmun Rev* **11**, 149–153.
- [96] Holmes C (2013) Review: systemic inflammation and Alzheimer's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **39**, 51–68.
- [97] Morris JK, Honea RA, Vidoni ED, Swerdlow RH, Burns JM (2014) Is Alzheimer's disease a systemic disease? *Biochim. Biophys. Acta* **1842**, 1340–1349.
- [98] Heneka MT, Kummer MP, Latz E (2014) Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 463–477.
- [99] Boutajangout A, Wisniewski T (2013) The innate immune system in Alzheimer's disease. *Int J Cell Biol* **2013**, 576383:1-7.
- [100] Kapadia M, Sakic B (2011) Autoimmune and inflammatory mechanisms of CNS damage. *Prog. Neurobiol.* **95**, 301–333.



Le Page *et al.* Fig. 1

Figure 1. Viability of PMN from healthy subjects, aMCI and mAD patients. A) Percentage of viable PMN in the PMN gate following PMN purification. B) Percentage of viable PMN in the PMN gate 48 h after purification and cultured in the absence (-) or presence (+) of LPS (1 $\mu\text{g/ml}$). Data are a combination of 20 independent experiments and are shown as the mean \pm SD. The asterisks (*) correspond to $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.0001$ (****).



Le Page et al. Fig. 2

Figure 2. Distribution of PMN in healthy subjects, aMCI and mAD patients. A) Number of PMN in the blood. B) Ratio of absolute number of PMN to lymphocytes in the blood. C) Percentage of CD66b-positive cells after purification. D) CD66b expression represented as mean fluorescence intensity (MFI) in the PMN gate of purified cells. E) Percentage of CD177-positive cells after purification. F) CD177 expression (MFI) in the PMN gate of purified cells. Data are a combination of 20 independent experiments and are shown as the mean \pm SD. The asterisks (*) correspond respectively to $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**).

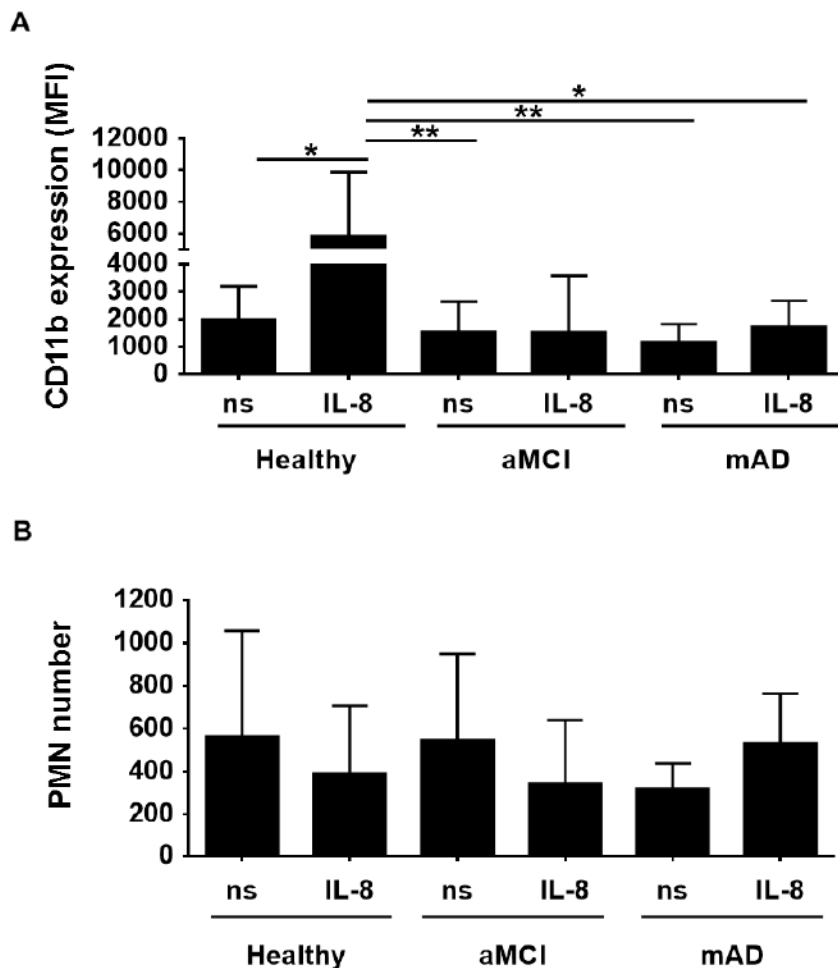
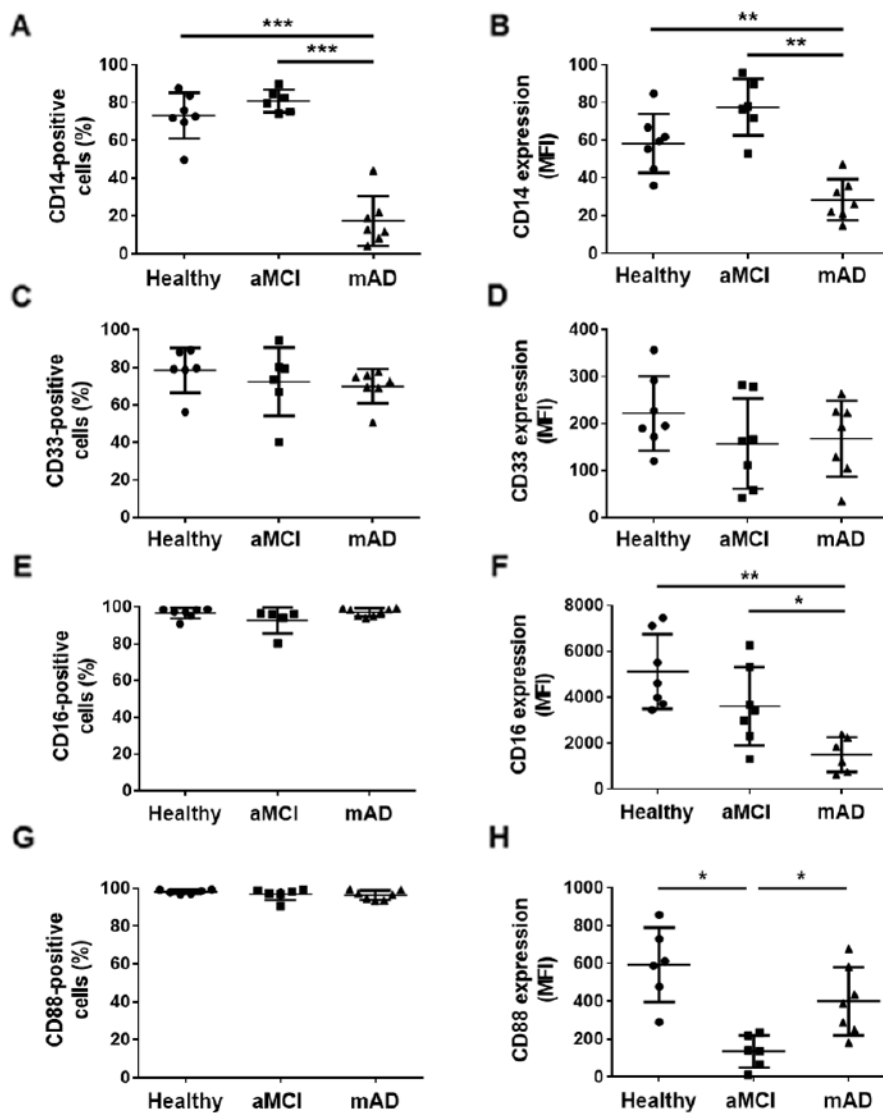
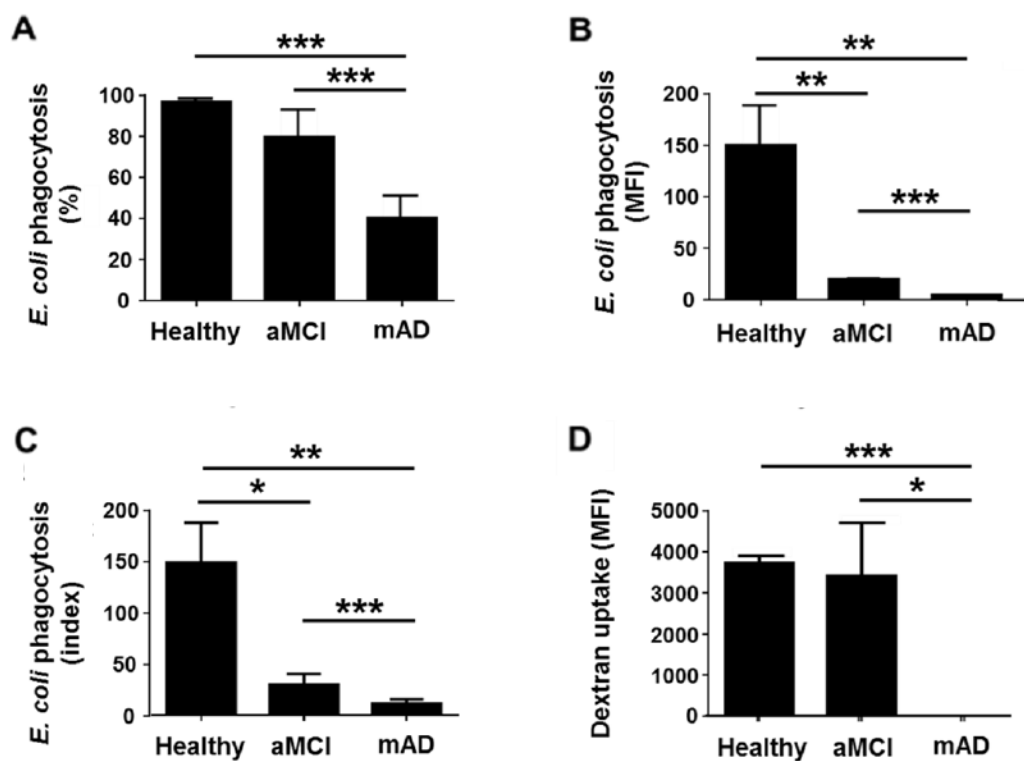
Le Page *et al.* Fig.3

Figure 3. Expression of the CD11b integrin on PMN and PMN chemotaxis of healthy subjects, aMCI and mAD patients. A) CD11b expression on PMN in the basal unstimulated state (ns) or stimulated by IL-8 for 1 h (50 ng/ml). B) A) Number of PMN that migrated at the basal state or following 1 h of IL-8 (50 ng/mL). Cells that had migrated to the lower compartment of the transwell cell were counted by flow cytometry. Data are a combination of 23 independent experiments and are shown as the mean \pm SD. The asterisks (*) correspond to $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**).



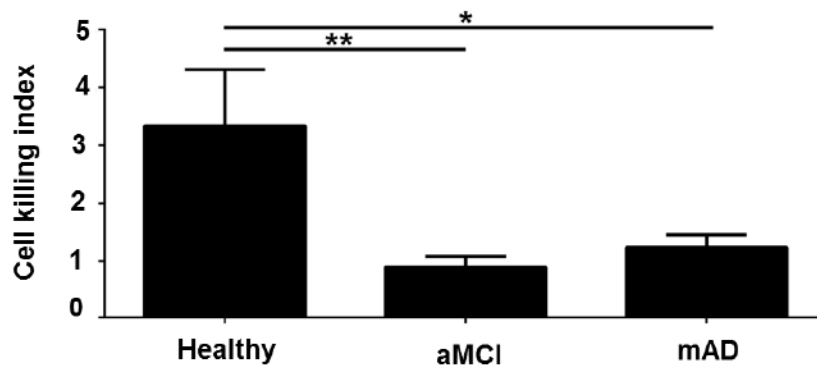
Le Page *et al.* Fig. 4

Figure 4. Phenotypic characterization of PMN in healthy subjects, aMCI and mAD patients. A) Percentage of CD14-positive cells. B) MFI analysis of CD14 expression in PMN. C) Percentage of CD33-positive cells. D) MFI analysis of CD33 expression in PMN. E) Percentage of CD16-positive cells. F) MFI analysis of CD16 expression in PMN. G) Percentage of PMN CD88-positives. H) MFI analysis of CD88 expression in PMN. Data are a combination of 22 independent experiments and are shown as the mean (horizontal bars) \pm SD. The asterisks (*) correspond to $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***).



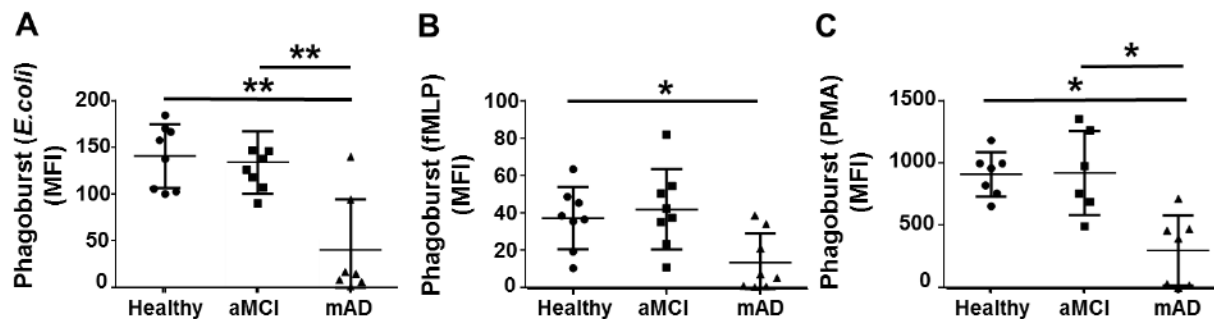
Le Page *et al.* Fig. 5

Figure 5. Phagocytic activity of PMN of healthy subjects, aMCI and mAD patients. A) Percentage of fluorescent PMN after ingestion of FITC-labeled *E.coli*. B) MFI of fluorescent PMN after ingestion of FITC-labeled *E.coli*. C) Phagocytosis index is defined as the percentage of PMN that had ingested *E. coli*, multiplied by the MFI and divided by 100. D) MFI of PMN after ingestion of FITC-labeled Dextran. Data are a combination of 22 independent experiments and are shown as the mean \pm SD. The asterisks (*) correspond to $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***).



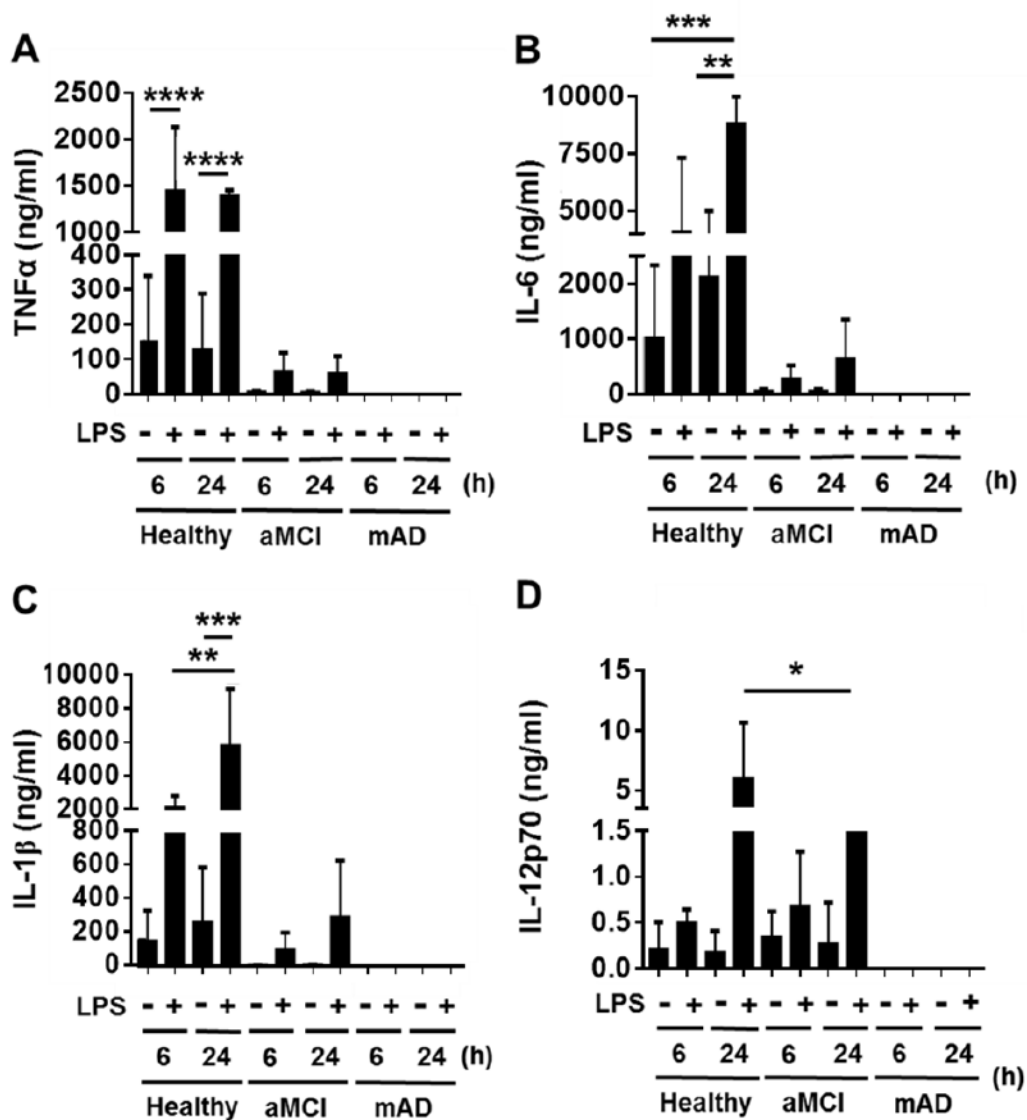
Le Page et al. Fig. 6

Figure 6. PMN killing activity in healthy elderly, aMCI and mAD patients. FITC-labeled *Candida albicans* was used as a target. Data are a combination of 9 independent experiments and are shown as the mean \pm SD. The asterisks (*) correspond to $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**).



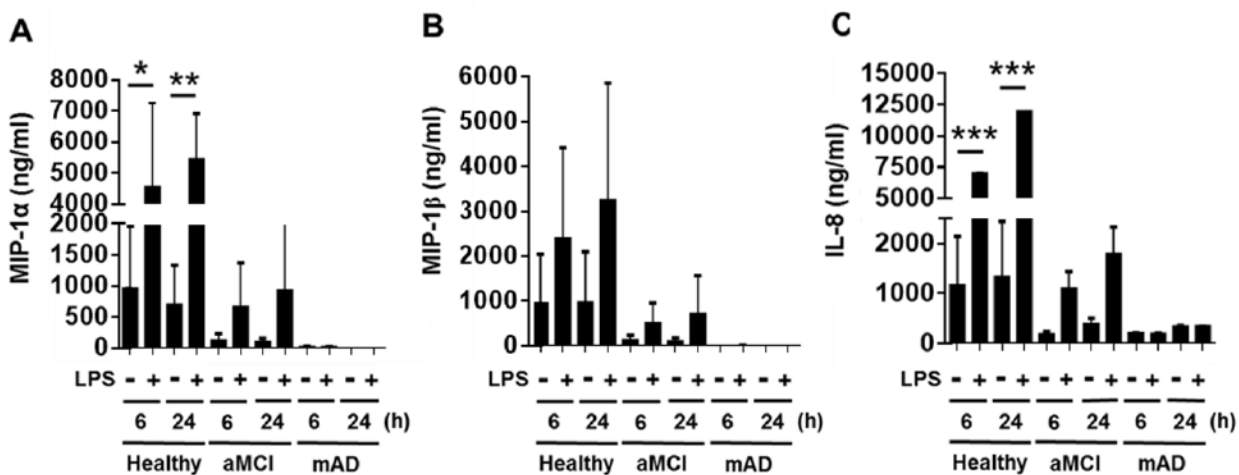
Le Page et al. Fig. 7

Figure 7. Reactive oxygen species production by PMN from healthy elderly, aMCI and mAD patients. A) Superoxide production defined by phagoburst by PMN following exposure to opsonized *E. coli*. B) Superoxide production defined by phagoburst by PMN following fMLP (5.0 μ M) stimulation. C) Superoxide production defined by phagoburst by PMN following PMA (8.1 μ M) stimulation. Data are a combination of 22 independent experiments and are shown as the mean (horizontal bars) \pm SD. The asterisks (*) correspond to $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**).



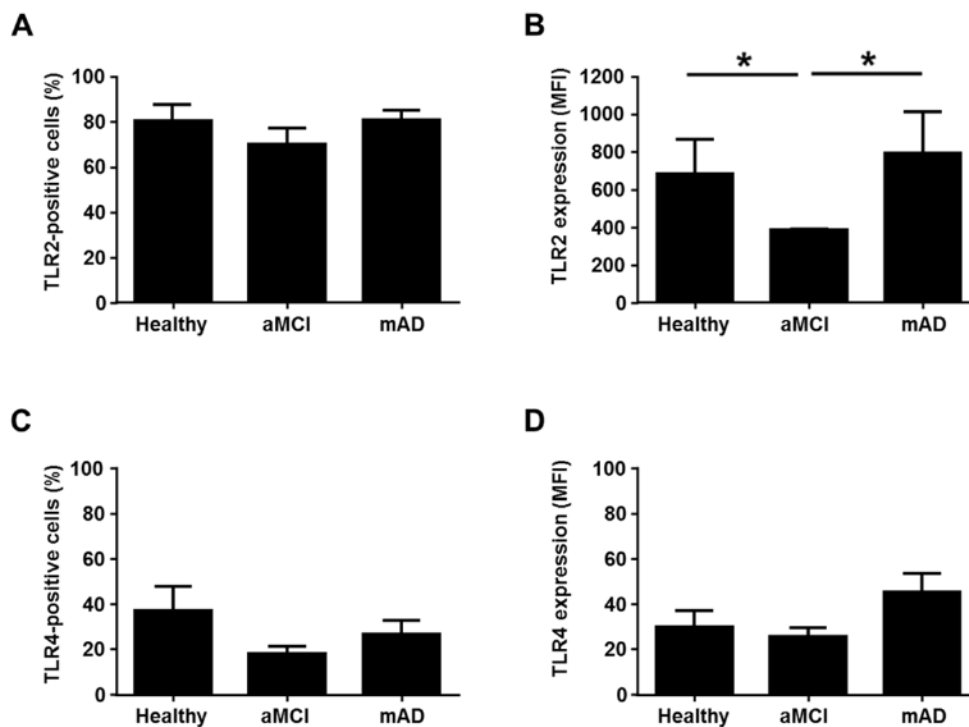
Le Page et al. Fig. 8

Figure 8. Cytokine production by PMN of healthy elderly, aMCI and mAD patients. A) Production of TNF α , B) IL-6, C) IL-1 β and, D). IL12p70. Cytokine production was measured at 6 and 24 h under basal conditions (-) or in PMN exposed (+) to LPS (1 μ g/ml). Data are a combination of 9 independent experiments and are shown as the mean \pm SD. The asterisks (*) correspond to $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.05$ (***) and $p < 0.01$ (****).



Le Page et al. Fig.9

Figure 9. Chemokine production by PMN of healthy elderly, aMCI and mAD patients. Data measured following LPS stimulation or unstimulated for 6 or 24 hours. A) Production of MIP-1 α , B) MIP-1 β and, C) IL-8. Cytokine production was measured at 6 and 24 h under basal conditions (-) or in PMN exposed (+) to LPS (1 μ g/ml). Data are a combination of 9 independent experiments and are shown as the mean \pm SD. The asterisks (*) correspond to $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***)



Le Page et al. Fig. 10

Figure 10. Toll-like receptor expression on PMN of healthy elderly, aMCI and mAD patients. A) Percentage of TLR2-positive PMN. B) MFI of TLR2 expression. C) Percentage of TLR4-positive PMN. D) MFI of TLR4 expression. Data are a combination of 18 independent experiments. The asterisks (*) correspond to $p < 0.05$ (*).

Table 1. Patients' clinical data.

Parameters		Healthy subjects (C) (n = 13)		aMCI patients (n = 13)		mAD patients (n = 15)		<i>p</i> values (Tukey's post-test)		
		mean	SD	mean	SD	mean	SD	aMCI versus C	mAD versus C	aMCI versus mAD
Age	years	71.1	5.22	72.8	3.64	78.1	4.37	0.50	<0.001	<0.01
Sex	women (%)	77	—	70	—	80	—	—	—	—
	men (%)	23	—	30	—	20	—	—	—	—
MMSE	score/30	29.31	0.75	26.75	1.50	25.00	2.00	<0.05	<0.0001	<0.05
MoCA	score/30	27.54	2.19	24.00	2.95	17.69	2.59	0.08	<0.0001	<0.0001
ApoE4	frequency	0.35	—	0.67	—	0.39	—	—	—	—
WBC	10 ⁹ /L	5.63	0.81	5.72	1.22	6.75	1.80	0.99	0.20	0.27
Lymphocytes (ab)	10 ⁹ /L	1.72	0.36	1.62	0.38	1.90	0.66	0.92	0.72	0.48
Monocytes (ab)	10 ⁹ /L	0.38	0.08	0.47	0.13	0.60	0.16	0.36	<0.01	0.11
PMN (ab)	10 ⁹ /L	3.37	0.72	3.33	0.85	3.96	1.08	0.99	0.36	0.32
NLR	—	2.12	0.77	2.29	0.68	2.22	0.53	0.87	0.94	0.98
Hemoglobin	g/L	133.8	7.53	135.4	8.49	133.5	9.43	0.93	0.99	0.89
Total cholesterol	mmol/L	4.53	0.96	5.21	0.95	4.44	0.74	0.35	0.98	0.26
Triglycerides	mmol/L	1.72	0.79	1.72	0.79	1.71	0.50	0.99	0.99	0.99
HDL	mmol/L	1.49	0.39	1.69	0.40	1.48	0.49	0.68	0.99	0.64
LDL	mmol/L	2.41	0.56	3.01	0.66	2.27	0.60	0.20	0.90	0.10
TC/HDL	ratio	3.13	0.58	3.22	0.70	3.50	1.18	0.98	0.68	0.83
CMV	frequency	0.38	—	0.54	—	0.53	—	—	—	—
CRP	mg/L	1.20	1.85	0.79	1.45	0.99	1.55	0.90	0.97	0.98

Serological parameters are from the clinical laboratories of the Centre Hospitalier Universitaire de l'Université de Sherbrooke (CHUS) and are analyzed by one-way ANOVA and Tukey's post-test. Absolute number is defined as the percentage of cells counted multiplied by the total number of white blood cells.

Abbreviations: ab, absolute number; ApoE, apolipoprotein E; C, healthy (control) subjects; CMV *Cytomegalovirus* seropositivity; CRP, C-reactive protein; TC, total cholesterol; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; MMSE, mini-mental state evaluation; MoCA, Montreal cognitive assessment; NLR, neutrophil leukocyte ratio; PMN, polymorphonuclear neutrophils; WBC, white blood cells.

Table S1. Fluorochrome-conjugated primary antibodies used for cytofluorimetric analysis of PMN.

Fluorochrome-conjugated antibody	Clone	Supplier and catalog number	Laser filter bandpass (nm)
anti-human (h) CD11b PerCP Cy5.5	ICRF44	BioLegend , 301328	Blue, 695/40
anti-h CD14 PE	M5E2	BioLegend , 301806	Y/G, 582/15
anti-h CD16 APC-Cy7	3G8	BD Biosciences, 302018	Red, 780/60
anti-h CD33 FITC	HIM3-4	BD Biosciences, 555626	Blue, 590/90
anti-h CD66b FITC	CLB-B13.9	Abcam , ab51534	Blue, 590/90
anti-h CD88 (C5aR) PE-Cy7	S5/1	BioLegend , 344308	Y/G, 780/60
anti-h CD177 PE	MEM 166	LifeSpan Biosciences , LS-C46489	Y/G, 582/15
anti-h TLR2 (CD282) FITC	TL2.1	BioLegend , 309706	Blue, 590/90
anti-h TLR4 (CD284) PE	HTA125	BioLegend , 312806	Y/G, 582/15

Abbreviations: APC-Cy7, allophycocyanin with cyanin 7; CD, cluster of differentiation; FITC, fluorescein isothiocyanate; h, human; PE, phycoerythrin; PE-Cy7, phycoerythrin with cyanin 7; PerCP, peridinin chlorophyll protein; PerCP-Cy5.5, peridinin chlorophyll protein with cyanine5.5; R. receptor; TLR, toll-like receptor; Y/G, Yellow/Green.

Suppliers' locations: Abcam, Cambridge, MA; BD Biosciences, Mississauga, ON; BioLegend, San Diego, CA; eBioscience Inc., San Diego, CA; LifeSpan Biosciences, Seattle, WA.

4 Etude phénotypique des lymphocytes T régulateurs dans la cohorte de patients aMCI et de patients atteints de la MA.

Auteurs : Aurélie Le Page, Eric H. Frost, Jacek M. Witkowski, Anis Larbi, Gilles Dupuis, Tamàs Fülöp.

Afin de pouvoir approfondir l'implication du système immunitaire dans la MA, cette partie de la thèse s'attache à étudier une population cellulaire régulatrice du système immunitaire adaptatif, soit les lymphocytes T régulateurs (Treg). Plusieurs éléments dans la littérature soulignent des modifications du système immunitaire adaptatif associés à la MA (Itagaki et al., 1988; Togo et al., 2002; Rogers et al., 1988; Larbi et al., 2009). Des modifications dans la distribution des sous-populations lymphocytaires T (Larbi et al., 2009), des modifications des capacités migratoires lymphocytaires par changement de l'expression des récepteurs de chimiokines (Goldeck et al., 2013) ainsi que leur infiltration dans le cerveau (Simard et al., 2006; Ousman and Kubes, 2012; Zenaro et al., 2015) ont été particulièrement analysés. Les lymphocytes Treg agissent en régulant la fonction d'autres cellules immunitaires en particulier en inhibant leur prolifération en fonction des signaux reçus de l'environnement extérieur (Shevach, 2009). Plusieurs mécanismes permettant leur activité suppressive ont été identifiés à ce jour (Vignali et al., 2008). Ainsi ces cellules participent au maintien de la tolérance du corps envers certains antigènes et notamment dans la tolérance au soi (Sakaguchi, 2005).

4.1 MATÉRIELS ET MÉTHODES

La cytométrie en flux est une technique de choix pour l'étude des cellules immunitaires en suspension dans le sang et tout particulièrement pour une analyse phénotypique. Chez l'homme, les lymphocytes Treg, qu'ils soient de type naturel, induit ou adaptatif (Shevach and Thornton, 2014) sont tous caractérisés par l'expression intracellulaire du facteur de transcription foxp3 (forkhead box P3) qui est engagé dans le

développement et les fonctions des Treg (Ramsdell and Ziegler, 2014). En tant que lymphocyte, les Treg expriment le marqueur CD3, dont les différentes chaînes s'associent au TCR. Les Treg produisent surtout des cytokines et n'ont pas d'activité cytotoxique, ils sont donc de type « helper » et expriment le marqueur CD4. Une autre caractéristique des Treg est leur forte expression en CD25, la chaîne α du récepteur à l'IL-2. De façon similaire aux autres lymphocytes, les Treg expriment le marqueur CD28, la molécule de co-stimulation liant les molécules CD80 et CD86, et le récepteur de chimiokine CCR4. Le CCR4 lie les chimiokines RANTES, MCP-1, MIP-1, CCL17 et CCL22. On retrouve aussi dans le sang humain, des lymphocytes de phénotype $CD8^+ foxp3^+$ aux propriétés régulatrices (Kiniwa et al., 2007). Les marqueurs analysés pour étudier les propriétés régulatrices des lymphocytes seront le CD3, CD4, CD8, foxp3, CD25, CD28, et CCR4. En tenant compte des configurations disponibles des lasers et des filtres des cytomètres en flux, de l'expression moyenne connue des marqueurs et les caractéristiques de fluorescence des fluorochromes utilisés, le mélange d'anticorps utilisé a été: CD3 - brilliant violet 510 (BV510), CD4 - brilliant violet 421 (BV421), CD8 perridine chlorophyle protéine (PerCP), foxp3 phycoérythrine (PE), CD25 allophycocyanine 7 (APC-Cy7), CD28 alexa 700 (A700), et CCR4 phycoérythrine-cyanine 7 (Pe-Cy7). Un protocole de marquage classique a été utilisé. Le marqueur foxp3 étant un facteur de transcription et donc un marqueur intracellulaire, le protocole de marquage a nécessité des étapes de fixation au paraformaldéhyde 1% et une perméabilisation. Le tampon de perméabilisation pour foxp3 et facteur de transcription du fournisseur Ebioscience a été utilisé. Il s'agit du tampon commercial possédant le meilleur rendement pour les LTreg. Puisqu'il faut fixer les lymphocytes et donc les tuer, il ne sera pas possible de faire des expériences fonctionnelles en FACS pour les LTreg. L'acquisition des données a été effectuée sur un cytomètre de type Aria III de BD Biosciences. L'analyse des fichiers FACS a été réalisée au moyen du logiciel FlowJo (version 7.6.1) et les graphiques tracés au moyen du logiciel GraphPad Prism (version 6.02). La stratégie de gating pour identifier les LTreg est décrite dans la figure ci-dessous. Les analyses statistiques ont été réalisées au moyen des tests d'ANOVA. Un astérisque (*) correspond à une valeur de $p < 0.05$.

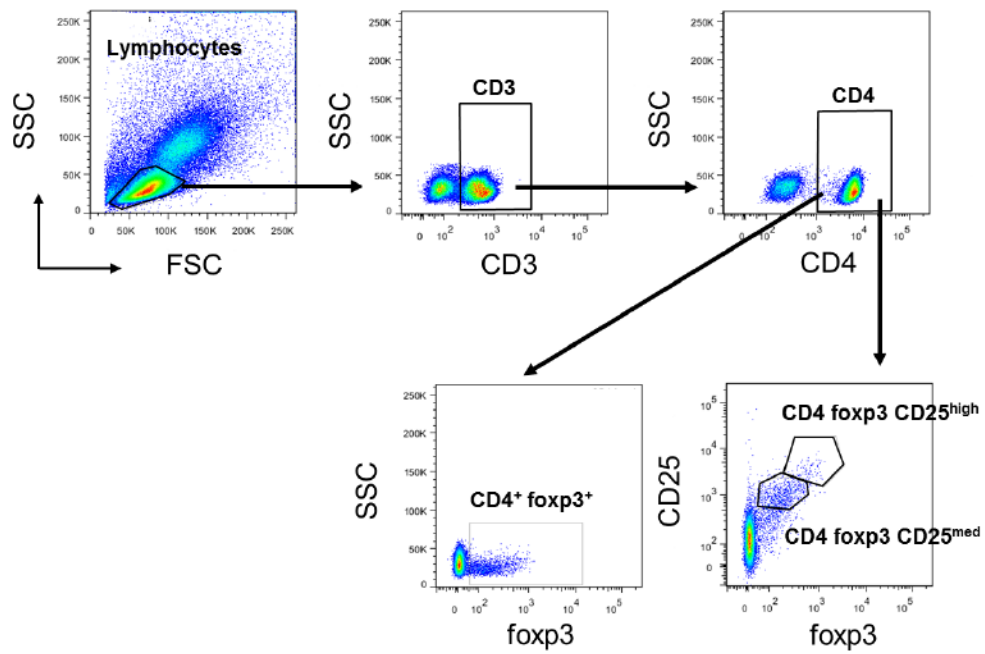


Figure 1. Stratégie de gating des lymphocytes Treg. Les abréviations sont SSC pour *side scatter* et, FSC pour *forward scatter*.

4.2 RÉSULTATS ET CONCLUSIONS

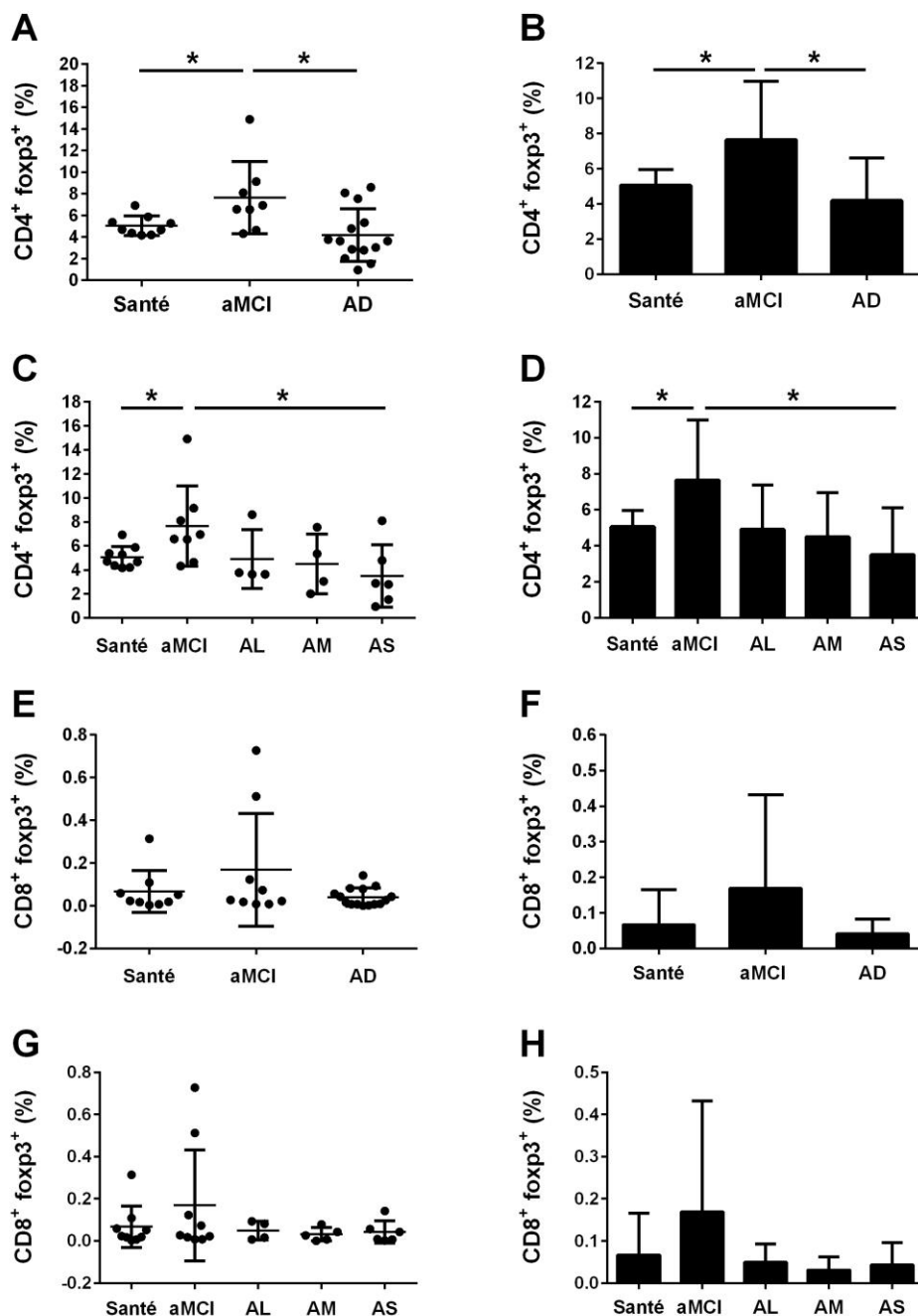


Figure 2. Distribution des lymphocytes Treg CD4⁺ foxp3⁺ et CD8⁺ foxp3⁺ dans la population de lymphocytes totaux pour chaque cohorte de patients. La cohorte se compose de patients en santé, au stade aMCI, au stade Alzheimer léger (AL), au stade Alzheimer modéré (AM), et au stade Alzheimer sévère (AS). Le groupe AD regroupe l'ensemble des patients atteints de la MA. Résultats représentés en pourcentage de cellules parmi les lymphocytes totaux. De 31 à 34 patients de la cohorte ont été analysés. L'astérisque (*) correspond à une valeur de $p < 0.05$.

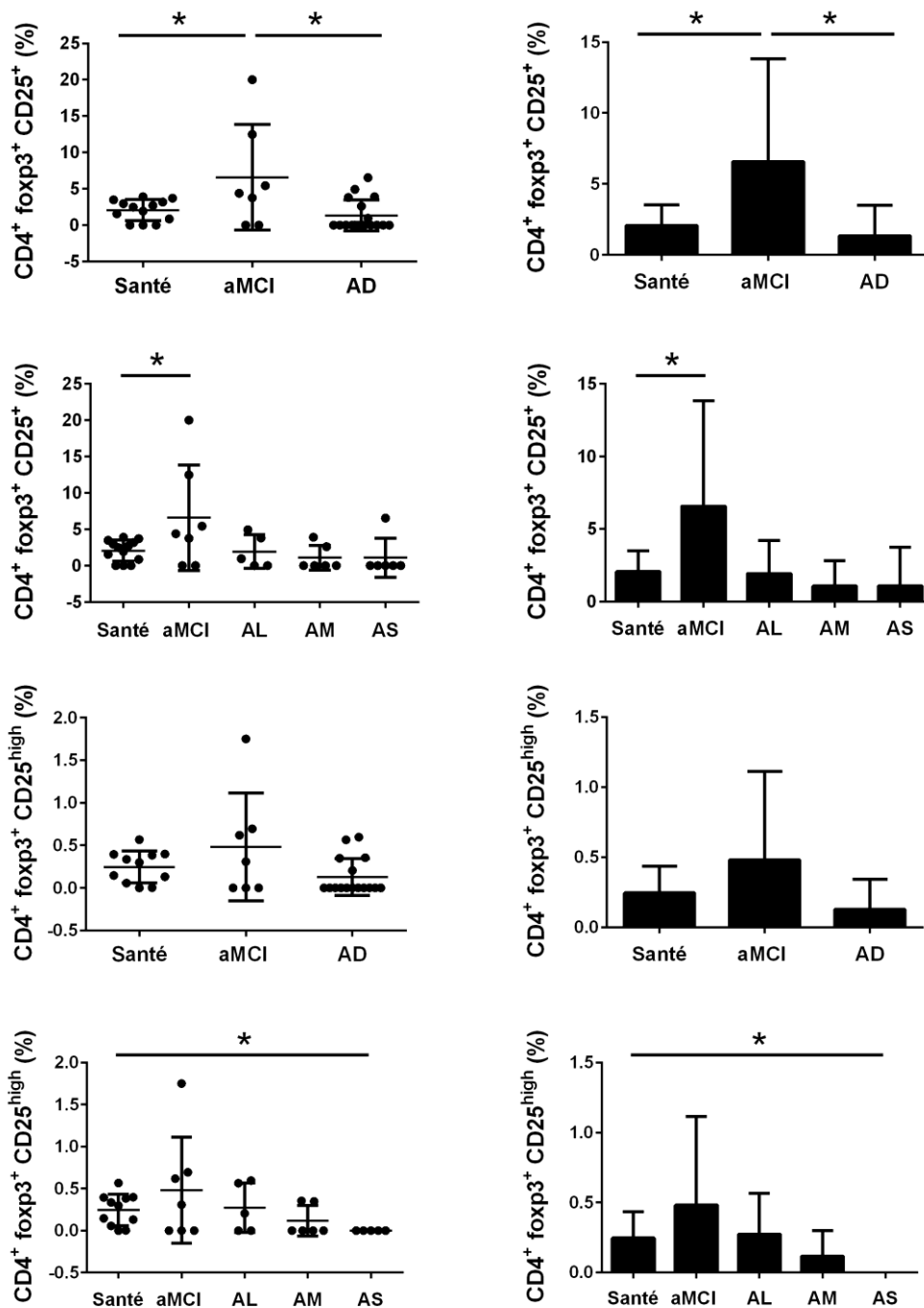


Figure 3. Distribution des sous populations de lymphocytes T CD4⁺ foxp3⁺ CD25⁺ et CD25^{high} dans la population de lymphocytes T CD4⁺. Résultats représentés en MFI (moyenne d'intensité de fluorescence en utilisant la moyenne géométrique). La cohorte se compose de patients en santé, au stade aMCI, au stade Alzheimer léger (AL), au stade Alzheimer modéré (AM), et au stade Alzheimer sévère (AS). Le groupe AD regroupe l'ensemble des patients atteints de la MA. Trente-quatre patients de la cohorte ont été analysés.

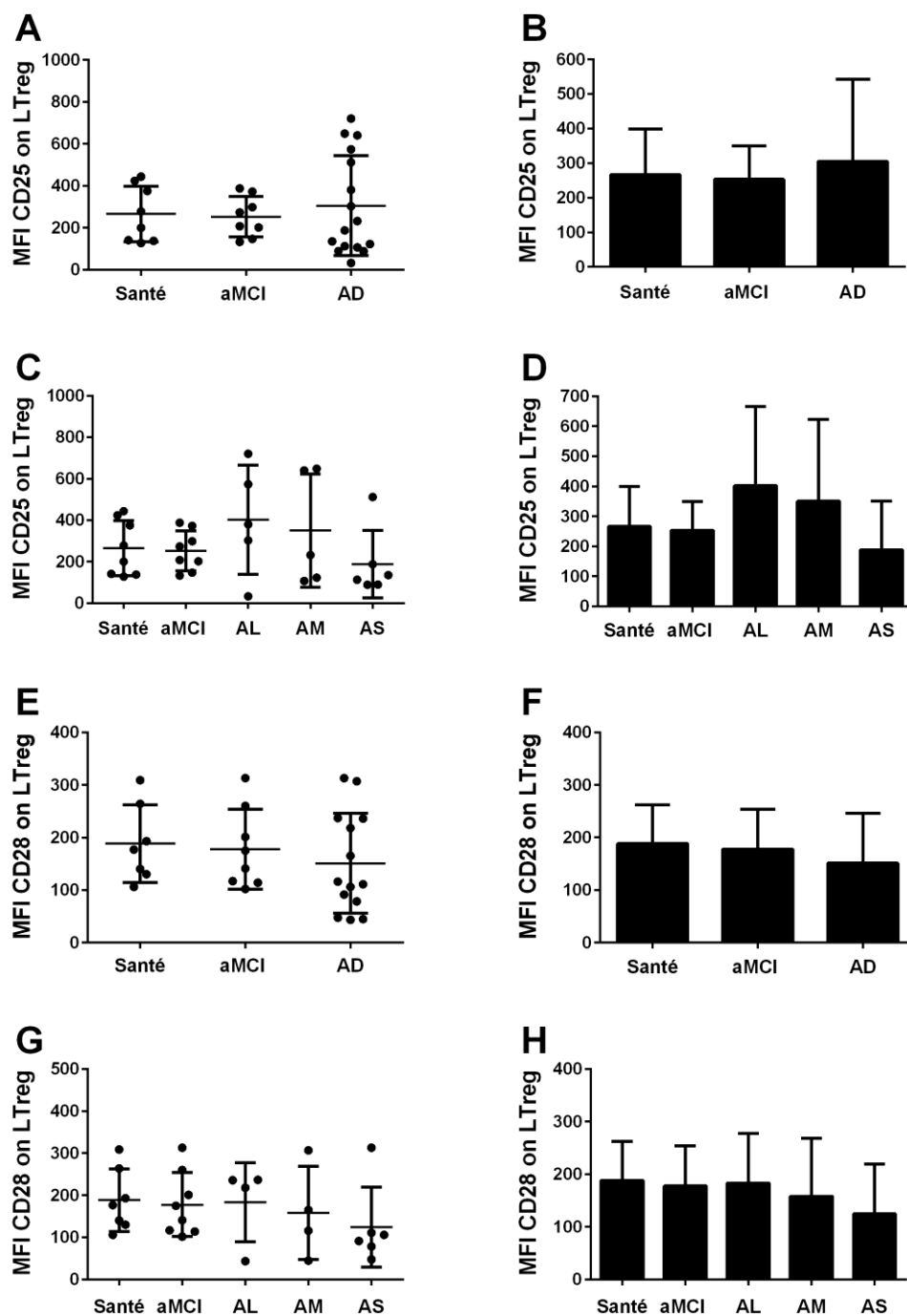


Figure 4. Expression des marqueurs CD25 et CD28 à la surface des lymphocytes Treg. Résultats représentés en MFI (moyenne d'intensité de fluorescence en utilisant la moyenne géométrique). La cohorte se compose de patients en santé, au stade aMCI, au stade Alzheimer léger (AL), au stade Alzheimer modéré (AM), et au stade Alzheimer sévère (AS). Le groupe AD regroupe l'ensemble des patients atteints de la MA. De 29 à 32 patients de la cohorte ont été analysés.

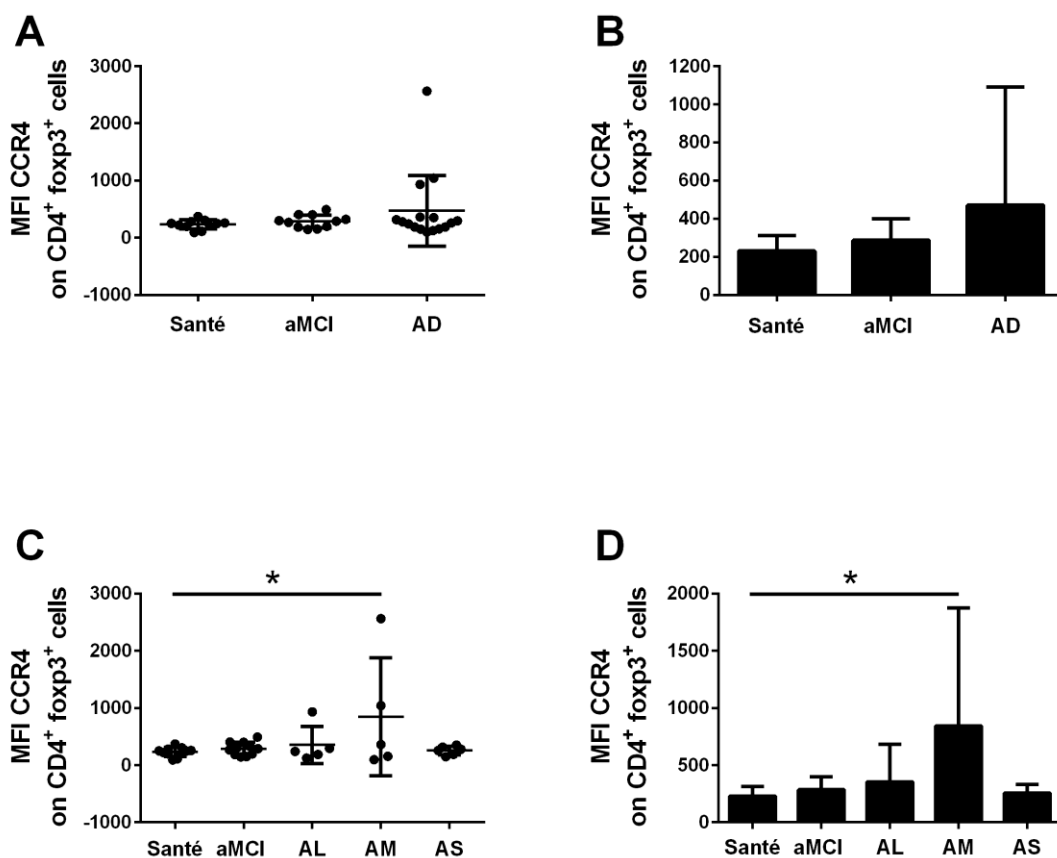


Figure 5. Expression du marqueur CCR4 à la surface des lymphocytes Treg. Résultats représentés en MFI (moyenne d'intensité de fluorescence en utilisant la moyenne géométrique). La cohorte se compose de patients en santé, au stade aMCI, au stade Alzheimer léger (AL), au stade Alzheimer modéré (AM), et au stade Alzheimer sévère (AS). Le groupe AD regroupe l'ensemble des patients atteints de la MA. Trente-huit patients de la cohorte ont été analysés.

Tout d'abord, on n'observe aucune modification dans la distribution sanguine des lymphocytes T $CD8^+$ $foxp3^+$ qui possèdent des propriétés suppressives (Figures 2E, F, G, et H). L'analyse phénotypique des Treg dans la cohorte de patient révèle que le pourcentage de LTreg de phénotype $CD4^+$ $foxp3^+$ parmi les lymphocytes totaux est augmenté de façon significative dans le groupe aMCI (7.6 ± 3.3) par rapport aux groupes de patients en santé (5.07 ± 0.9 ; $p < 0.05$) et Alzheimer (4.2 ± 2.4 ; $p < 0.05$) (Figures 2A, B, C et D). Une analyse des Treg basée selon le profil $CD4^+$ $foxp3^+$ $CD25^+$ montre à nouveau une

augmentation des LTreg au stade aMCI (6.58 ± 2.7) par rapport aux stades Alzheimer (1.34 ± 0.5 ; $p < 0.01$) et santé (2.06 ± 0.4 ; $p < 0.04$) (Figures 3A, B, C et D). En revanche, une analyse basée sur le profil $CD4^+ \text{foxp3}^+ CD25^{\text{high}}$ ne montre pas cette observation. La quantité de Treg $CD4^+ \text{foxp3}^+ CD25^{\text{high}}$ baisse de manière significative ($p < 0.01$) au stade AS (0 ± 0.0) par rapport aux patients en santé (0.25 ± 0.05) (Figures 3E, F, G et H). L'analyse de l'expression du marqueur CD25 à la surface des lymphocytes Treg exprimée en MFI ne permet pas d'observer de différences significatives entre les trois différents groupes de patients (Figures 4A, B, C et D). Les points du graphique du groupe de patients Alzheimer présentent une distribution intéressante puisque le nuage de points se sépare en deux groupes, suggérant 2 comportements différents. L'analyse plus détaillée comprenant 3 stades de développement de la MA suggère une augmentation de l'expression de CD25 au stade AL et AM, suivie d'une baisse de son expression au stade AS. Une étude sur un nombre plus élevé de patient permettrait de conclure si ces variations sont significatives. L'analyse de l'expression du marqueur CD28 ne montre pas de variations significatives entre les groupes de patients de la cohorte (Figures 4E, F, G, et H). L'expression de CCR4 ne varie pas parmi les patients de la cohorte, malgré 3 patients qui surexpriment fortement ce marqueur (Figure 5).

4.3 DISCUSSION

En 2009, Larbi et *al.*, ont observé une diminution de la proportion en lymphocytes T $CD4^+ CD25^{\text{high}}$, des lymphocytes Treg naïfs potentiels, dans un groupe de patient atteint de la MA par rapport à un groupe de patient en santé (Larbi et al., 2009). L'absence d'analyse du marqueur *foxp3* ne permettait pas d'affirmer que cette population était essentiellement composée de LTreg. Dans notre étude, nous retrouvons une baisse significative des Treg $CD4^+ \text{foxp3}^+ CD25^{\text{high}}$ uniquement pour le groupe de patient atteint de la MA au stade sévère par rapport au groupe de patients âgés en santé (Figure 3). Nos données suggèrent donc que la baisse des LTreg est un mécanisme tardif dans la progression de la MA. En revanche, la quantité de Treg augmente de manière significative au stade aMCI par rapport aux groupes de patients en santé et MA (Figures 2 et 3). Ces résultats représentent la première analyse des LTreg dans une cohorte de patients aMCI. Comme dans l'article 1

traitant des cellules NK inclus dans cette thèse, les Treg semblent engagés dès le stade aMCI dans une réponse immune dont l'origine demeure inconnue. Afin d'approfondir cette observation, et déterminer si d'autres changements phénotypiques pouvaient être retrouvés, l'analyse a été étendue à d'autres marqueurs. Le marqueur de co-activation CD28 a été analysé sans toutefois montrer de changement dans la cohorte (Figure 4). L'expression du récepteur de chimiokine CCR4 chez les LTreg a été étudiée étant donné qu'une augmentation de sa densité a été rapportée chez les lymphocytes CD4⁺ de patients Alzheimer (Goldeck et al., 2013) et que ce récepteur est aussi exprimé par les LTreg. Les résultats ont montré qu'au contraire des lymphocytes T CD4 helper, il n'y a pas d'accroissement d'expression de CCR4 chez les LTreg (Figure 5). Une étude de déplétion des Treg dans un modèle murin de la MA a permis de mettre en évidence l'atténuation de la neuro-inflammation, la diminution du nombre des plaques amyloïdes et l'amélioration de la cognition, ce qui suggère leur rôle protecteur contre la MA (Baruch et al., 2015). Enfin, le système immunitaire inné étant principalement affecté dans la MA, l'étude des cellules innées de type MDSC, (cellules suppressives dérivées de la lignée myéloïde) devra être entrepris. Ces études permettront de déterminer leur influence sur l'état d'activation du système immunitaire inné comme les monocytes et macrophages. Ces populations immunes pourraient permettre de moduler l'activité du système immunitaire afin d'améliorer la réponse immune dans la MA. Cependant dans ce contexte, il faudra déterminer si la réponse immune dans la MA doit être renforcée ou au contraire freinée, c'est-à-dire comprendre son rôle bénéfique ou néfaste dans la MA.

5 Discussion

À l'instar de l'avancée des connaissances de l'implication du système immunitaire dans les cancers, l'engagement du système immunitaire dans les maladies neurodégénératives est de plus en plus étudié, mais le nombre d'études sur ce sujet demeure encore relativement faible (Heppner et al., 2015). La réponse immune consiste en une réponse globale puisqu'il s'agit d'un système. Ce système engage plusieurs populations cellulaires, s'activant à la suite de blessure ou suite à une infection par des pathogènes de nature variée (virus, bactéries,

parasites) ou encore en cas de présence de cellules anormales comme dans les cellules cancéreuses (Chaplin, 2010). Dans la MA, la nature du stimulus déclencheur n'a pas encore été identifié. Parmi les causes physiopathologiques avancées pour expliquer la MA, on retrouve la présence de peptides amyloïdes agrégés ou non, les enchevêtrements de la protéine tau, la mort neuronale, l'inflammation cérébrale (Querfurth and LaFerla, 2010). L'origine de l'inflammation associées à la MA n'est pas clairement établie non plus. Devant tant d'inconnu, l'étude du système immunitaire dans la MA doit être envisagée selon une approche globale et systématique de ce système.

Trois domaines de recherche sur la MA font l'objet d'intensives investigations. D'une part, le caractère inflammatoire chronique de la MA vise l'importance de l'inflammation cérébrale (Wyss-Coray, 2006; Wyss-Coray and Rogers, 2012) en relation avec le processus d'inflamm-aging (Cevenini et al., 2013). Dans cette thèse, nous avons étudié l'état inflammatoire en périphérie, c'est-à-dire dans le sang des patients par mesure de marqueurs pro- et anti- inflammatoires et par l'étude de l'implication des cellules immunes dans l'inflammation (articles 1 et 2 de la thèse). D'autre part, l'implication de pathogènes tels que les virus dans la MA (Bourgade et al., 2015; Bourgade et al., 2016; Bourgade et al., 2016; Harris and Harris, 2015; McNamara and Murray, 2016) amène à étudier la réponse immunitaire antivirale et donc la population immune aux fonctions antivirales : les lymphocytes NK (article 1 de la thèse). Enfin, l'activation du système immunitaire inné devient un composant crucial des maladies neurodégénératives et en particulier en ce qui concerne la MA. La microglie est retrouvée activée ou « primée », démontrant la pertinence de l'étude des populations immune innées (Tejera and Heneka, 2016). Ici, nous avons étudié le phénotype et l'activité des neutrophiles dans la cohorte de patients (article 2 de la thèse).

Plusieurs points importants ont été mis en évidence suite à l'analyse de données cliniques des patients aMCI et mAD (Figures en annexe). Les patients de la cohorte étaient en bonne santé. Les fonctions rénale et hépatique étaient dans les normes. Le système hormonal mesuré par dosages de la T4, TSH et du cortisol ne présentait pas d'anomalies. Le métabolisme glucidique, lipidique et protéique était normal, à l'exception du niveau d'albumine qui était abaissé de manière significative ($p \leq 0,001$) au stade AS. Une baisse des niveaux d'albumine peut être un indicateur d'un état de dénutrition ou d'inflammation.

Cette observation est soutenue par la baisse des niveaux de vitamines D et B9 (ou encore folate) au stade AS. La vitamine D est naturellement retrouvée dans les poissons gras, les œufs et le foie. La vitamine B9 ou folate est présente dans la levure sèche, le foie et certains légumes verts (épinards, salades, endives, choux) et en moindre quantité dans les céréales, les fromages, les fruits, les viandes et les œufs. Dans les pays situés au-dessus du 42^{ème} parallèle, comme c'est le cas du Canada, la nourriture comme le lait est supplémentée de vitamine D. De plus, les patients au stade sévère de la MA voient leur régime alimentaire changer, car ils rentrent le plus souvent en institution spécialisée et, dans certains cas à ce stade de la maladie, peuvent développer des troubles de la déglutition. Chacun des paramètres étudiés de la NFS étaient dans les valeurs normales. Des augmentations des quantités de neutrophiles au stade sévère et des lymphocytes au stade AM par rapport aux autres sous-groupes de patients ont été observées et discutés plus en détails dans les articles de la thèse. Le niveau de monocytes était inchangé. Enfin, la mesure du niveau sanguin de la protéine C réactive (CRP) n'a révélé aucun signe inflammatoire chez les patients de la cohorte (graphique non montré).

En résumé, les fonctions physiologiques principales fonctionnent selon les valeurs standards, une légère dénutrition au stade le plus sévère de la MA apparaît. De plus, aucun signe d'inflammation périphérique n'a été observé chez les différents groupes de patients atteints de la MA. Ces observations nous permettent de conclure que le statut nutritif des patients n'influence pas le système immunitaire, à l'exception des données au stade sévère. L'absence de mise en évidence de facteurs pro-inflammatoires classiques sanguins suggère que l'inflammation est restreinte au cerveau dans la MA. Les modifications du système immunitaire des patients qui pourraient être identifiées ne seraient donc pas en lien avec un statut inflammatoire périphérique classique et d'autres facteurs doivent être envisagés. En effet, la littérature sur le sujet demeure contradictoire, la présence d'une inflammation à bas bruit ou atypique n'est pas totalement exclue (Doecke et al., 2012; Ray et al., 2007; O'Bryant et al., 2011; Hye et al., 2014). La difficulté de ces études réside principalement dans l'hétérogénéité des cohortes de patients et dans la faible sensibilité des tests (Thambisetty et al., 2010; Galasko et al., 2013; Delaby et al., 2015).

Tableau 2 Tableau récapitulatif des altérations identifiées.

Type cellulaire	Phénotype ou fonction analysé	Santé	aMCI	Alzheimer
NK	Distribution sanguine	Maintenue	Maintenue	Maintenue
	Expression du récepteur inhibiteur NKG2A	Maintenue	Diminuée	Maintenue
	Expression du récepteur activateur NKG2D	Maintenue	Maintenue	Maintenue
	Activité cytotoxique	Maintenue	Maintenue	Maintenue
	Capacité de dégranulation	Maintenue	Maintenue	Maintenue
	Expression du CD95 (Fas)	Nulle	Augmentée	Maintenue
	Expression de Granzyme B	Nulle	Augmentée	Nulle
	Production de TNF α	Nulle	Augmentée	Nulle
	Production d'IFN γ	Nulle	Augmentée (ns)	Nulle
	Expression du CCR7 sur les NK CD56bright	Maintenue	Augmentée	Maintenue
	Chimiotactisme vers CCL21	Maintenue	Maintenue	Maintenue
	Chimiotactisme vers CCL19	Maintenue	Diminuée	Diminuée
	Expression du CD16	Maintenue	Maintenue	Augmentée
	Expression du TLR2	Maintenue	Maintenue	Diminuée
	Expression du TLR9	Maintenue	Maintenue	Diminuée
PMN	Viabilité à 4h	Maintenue	Maintenue	Maintenue
	Viabilité à 72h	Maintenue	Augmentée	Maintenue
	Distribution sanguine	Maintenue	Maintenue	Maintenue
	Expression du CD11b	Maintenue	Diminuée	Diminuée
	Chimiotactisme	Maintenue	Maintenue	Maintenue
	Expression du CD88	Maintenue	Diminuée	Maintenue
	Expression du TLR2	Maintenue	Diminuée	Maintenue
	Expression du CD177	Maintenue	Maintenue	Augmentée
	Expression du CD14	Maintenue	Maintenue	Diminuée
	Expression du CD16	Maintenue	Maintenue	Diminuée
	Phagocytose de <i>E. coli</i> opsonisées	Maintenue	Diminuée	Diminuée
	Phagocytose de particules de dextran	Maintenue	Maintenue	Diminuée
	Killing	Maintenue	Diminuée	Diminuée
	Production de ROS	Maintenue	Maintenue	Diminuée
	Production de cytokines	Maintenue	Diminuée	Nulle
Production de chimiokines	Maintenue	Diminuée	Nulle	
LTreg	Distribution des Ltreg CD4+foxp3+CD25high	Maintenue	Maintenue	Diminuée (AS)
	Distribution des LT CD8+foxp3+	Maintenue	Maintenue	Maintenue
	Expression du CD25	Maintenue	Maintenue	Maintenue
	Expression du CD28	Maintenue	Maintenue	Maintenue
	Expression du CCR4	Maintenue	Maintenue	Maintenue

Ns : non significatif, AS : stade sévère de la MA

Le premier article décrit une étude des lymphocytes NK. Les résultats montrent que la distribution de cette population cellulaire et de ses sous populations respectives (Figure 1) est conservée en périphérie en accord avec Araga et *al.* (Araga et al., 1991). L'âge étant le principal facteur de risque de la MA (Hickman et al., 2016), des marqueurs associés à la sénescence des lymphocytes NK ont été étudiés. L'expression du marqueur CD57 et la fréquence des sous populations CD56^{dim}CD94^{low} et CD56^{dim}CD94^{high} de cellules NK étaient

similaires chez les patients de la cohorte (Figure S2). La progression de la MA et des altérations des lymphocytes NK n'est pas associées à une exacerbation de la sénescence. Les cytokines IL-2, IL-12 et IL-18 sont des facteurs activateurs connus des lymphocytes NK (Vivier et al., 2008). A ce jour aucune variation des niveaux d'IL-2 n'a été démontrée chez des patients Alzheimer (Motta et al., 2007). En revanche, une augmentation des niveaux d'IL-12, IL-18 et TNF α ont été corrélés à la progression de la MA chez des patients aux stades légers et modérés (Motta et al., 2007). L'augmentation de la concentration de ces cytokines pourrait modifier l'expression des récepteurs de cytokines à la surface des NK. L'analyse en cytométrie en flux des niveaux d'expression des récepteurs IL12R β 1, IL12R β 2 et IL18R β n'a pas révélé de variations (Figure 2). Un autre facteur capable de moduler l'activité des cellules NK est l'activation de la voie des TLR. Parmi eux, le TLR-2 reconnaît le peptidoglycane bactérien mais est aussi un récepteur pour les peptides amyloïdes (Della Chiesa et al., 2014; Udan et al., 2008; Liu et al., 2012). L'article met en évidence une diminution de l'expression du TLR-2 au stade Alzheimer (figure 3A) ce qui suggère une possible baisse dans son rôle de reconnaissance des peptides amyloïdes. Le TLR-4 reconnaît le LPS des bactéries gram négatives et ne présente pas d'altération de son expression à la surface des NK (figure 3B). Cette observation pourrait être une compensation à la baisse de l'expression du TLR-2. Quant à la reconnaissance intracellulaire de particules virales, la reconnaissance des ARN double brin est la propriété de TLR-3 et les îlots CpG sur l'ADN celle de TLR-9 (Amarante et al., 2010; Ishii et al., 2006). L'expression de TLR-3 est conservée tandis que celle de TLR-9 est altérée chez les patients aMCI et mAD (Figures 3C et 3D). Cette première altération identifiée chez les lymphocytes NK implique des changements très précoces dès le stade aMCI et suggère un engagement précoce des lymphocytes NK dans le développement de la MA.

L'étude détaillée de l'activation et des fonctions des cellules NK a permis de mettre en évidence un état d'activation des NK dès le stade aMCI avec une baisse du marqueur inhibiteur NKG2A, sans toutefois une modification de l'expression du marqueur activateur NKG2D (Figure 4). Cette activation n'est plus retrouvée au stade Alzheimer, soulignant ainsi le caractère transitoire de l'activation des NK avec le développement de la MA. Les NK sont toujours capables de répondre au TNF α puisque l'activité de killing mesurée par l'utilisation de cellules cible (cellules K562 qui sous expriment le CMH-I et, par

conséquent, miment une infection virale) est maintenue (Figure 5). Le CD95, appelé aussi récepteur Fas, et le granzyme B sont deux facteurs impliqués dans les voies de cytotoxicité des lymphocytes NK via la voie Fas et Fas ligand et la voie des perforines et granzymes (Smyth et al., 2005). Ces deux facteurs sont augmentés uniquement chez les patients aMCI de la cohorte (Figures 5 C et D). Cependant, l'activité de killing mesuré par le pourcentage de cellules cibles K562 tuées n'est pas augmenté chez les patients aMCI par rapport au groupes santé et Alzheimer (Figure 5A). L'absence de corrélation entre l'activité de killing et l'augmentation de marqueurs caractéristiques d'une activité cytotoxique dans le groupe aMCI suggère la possibilité d'un défaut dans l'activité de killing. Une étude approfondie des différents facteurs intervenants dans les deux voies de cytotoxicité des cellules NK devrait être entreprise. Une autre fonction des NK est la production de cytokines qui est surtout effectuée par la sous population NK CD56^{bright} CD16⁻. Dans cette population, on retrouve une augmentation significative de la production de TNF α spécifique du stade aMCI uniquement, la production d'IFN γ suit cette tendance sans atteindre la significativité (Figure 6). La production de ces cytokines pourrait exercer un effet protecteur dans la MA comme c'est le cas dans d'autres maladies comme la polyarthrite rhumatoïde et l'infection au VIH (Jiang et al., 2013; Aggarwal et al., 2013). Ces cytokines ralentissent le développement de l'infection au VIH en diminuant la différenciation des lymphocytes en Th17 (Jiang et al., 2013). Le chimiotactisme permet aux NK d'interagir avec d'autres cellules immunes telles que les monocytes et les CD. L'étude de l'expression des récepteurs de chimiokine CCR5, CX3CR1 et CCR7 a révélé que seule l'expression du récepteur CCR7 est augmentée sur les NK du groupe de patient aMCI par rapport aux patients en santé et ceux atteints de la MA (Figure 7). L'augmentation de son expression suggère qu'un plus grand nombre de cellules NK sont recrutées et qu'il y a une influence accrue avec le système immunitaire. Des expériences mesurant le chimiotactisme en utilisant CCL19 ou CCL21, les deux chimiokines liant le récepteur CCR7 a montré une perte précoce des capacités de réponse au CCL19 des NK chez les patients dès le stade aMCI. Cette altération est maintenue au stade Alzheimer. Ces observations suggèrent que l'expression du CCR7 augmente pour compenser la perte de chimiotactisme envers CCL19. Enfin, l'augmentation de l'expression de CD16 (Figure 8) est un indicateur indirect de

l'augmentation des mécanismes de cytotoxicité médié par les anticorps ADCC. La nature de la cellule ciblée par les anticorps demeure cependant inconnue.

L'ensemble de ces résultats souligne l'activation des lymphocytes NK chez les patients aMCI. Un ensemble d'éléments de la littérature suggère l'implication de la sénescence de la microglie dans le développement de la MA (Rawji et al., 2016). A travers l'étude des NK, la MA n'apparaît pas comme une maladie liée à l'exacerbation de la sénescence. Il est possible que l'association entre la sénescence et la MA ne soit restreinte qu'à certaines populations cellulaires. L'activation des cellules NK est perdue au stade Alzheimer, ce qui suggère un essoufflement de leurs capacités fonctionnelles. Enfin, il faut souligner que l'activation des cellules NK observée chez les patients aMCI est altérée puisque les lymphocytes NK sont incapables de chimiotactisme vers CCL19. Les causes infectieuses ou autres associées à cette perte de fonction nécessitent une analyse plus poussée. Il est possible que l'activation des NK soit bénéfique pour contrer les changements pathologiques liés à la MA. Ainsi, stimuler précocement le chimiotactisme des NK au CCL19 chez des patients aMCI et soutenir l'activité des NK tout au long de la MA pourrait ralentir la progression de la MA et améliorer les capacités cognitives des patients. Mes travaux renforcent l'intérêt des études des agents infectieux et notamment des virus associés à la MA.

Un autre constituant du système immunitaire inné sont les PMN. Les PMN initient et orientent les réponses immunes, ils peuvent donc jouer un rôle majeur dans une maladie. Ces cellules sont retrouvées en grande quantité dans le sang. Jusqu'à récemment, très peu d'éléments ont suggéré l'implication des PMN dans la MA. Cette position était en grande partie soutenue par l'absence de détection de PMN dans les coupes histologiques de cerveau de patients atteints de la MA. Or ces études histologiques, sont rendues difficiles par la faible infiltration de cellules immunes à travers la BHE (Hohsfield et al., 2015) et par les caractéristiques des PMN eux-mêmes, comme leur durée de vie courte. Jusqu'à l'étude de Zenaro et al qui a montré fonctionnellement dans un modèle murin qu'intervenir sur le recrutement de neutrophiles dans le cerveau pouvait améliorer la cognition des souris et diminuer la charge en plaques amyloïdes (Zenaro et al., 2015). L'article de la thèse avait pour objectif d'étudier ces cellules, de manière à identifier des changements fonctionnels

des PMN en périphérie, et décrire le type de réponse initiée avec la MA chez des patients aMCI et mAD.

L'article 2 montre que la distribution des PMN n'est pas modifiée dans la cohorte de patients (Figure 1). En revanche, une augmentation d'une sous population CD177 positive a été identifiée (Figure 2). CD177 est une glycoprotéine membranaire avec une ancre de type GPI (glycosyl-phosphatidylinositol) dont les fonctions sont très mal décrites dans la littérature (Matsuo et al., 2000; Caruccio et al., 2003; Stroncek et al., 2007). La fonction la mieux caractérisée est sa liaison au récepteur PECAM-1 (appelé aussi CD31) au cours de la transmigration endothéliale (Sachs et al., 2007; Stroncek et al., 2007; Dimasi et al., 2013). Il serait alors pertinent d'étudier si la reconnaissance CD177-CD31 permettrait l'entrée de PMN dans le cerveau au cours de la MA et de tester alors si le blocage de cette interaction pourrait retarder la progression de la maladie. Il a été montré qu'ICAM-1 et LFA-1 étaient engagés dans le recrutement des PMN dans le cerveau dans un modèle murin de la MA (Zenaro et al., 2015). En bloquant la migration transendothéliale des PMN, via le blocage de l'interaction ICAM-1 et LFA-1, les symptômes neurologiques de la MA ont été atténués et la mémoire a été améliorée dans le modèle murin de la MA. Une étude récente suggère que le CD177, augmenterait la mobilité des PMN après activation (Demaret et al., 2016). L'analyse des fonctions spécifiques de la sous population de PMN CD177 devrait être envisagée pour mieux définir leur rôle. Parmi les autres fonctions du CD177, celui-ci serait un effecteur de IKK β prolongeant la survie dans la moelle osseuse, ou encore un marqueur de PMN matures (Xie et al., 2015). La mesure de la viabilité suggère que les PMN seraient primés puisqu'un retard dans l'entrée en apoptose spontanée a été observé (Figure 1). Cette observation suggère que l'augmentation de la survie et du priming des PMN pourrait se traduire plus tardivement par l'augmentation de l'expression de CD177. Les analyses fonctionnelles ont révélé que le chimiotactisme est affecté dès le stade aMCI, avec une augmentation de l'expression de CD11b au stade aMCI et mAD, associée à une perte de la réponse à l'IL-8 (Figure 3). Au stade aMCI, la diminution de l'expression du CD88 ou C5aR suggère des capacités d'opsonisation altérées qui sont retrouvées au stade mAD (Figure 4). L'identification de variations dans l'expression du CR1 (appelé aussi CD35) s'inscrit dans le cadre d'une large littérature sur l'implication du complément dans la MA. Les éléments majeurs qui soutiennent cette possibilité sont la présence de la molécule C1q

au niveau des plaques amyloïdes (Wyss-Coray and Rogers, 2012) et l'association de certains facteurs du complément avec la MA au cours de d'études génétiques d'association sur le génome des malades (GWAS) (Hong et al., 2016). Une étude a relié le complément à la perte synaptique de la microglie (Soyon Hong et al., 2016). Une analyse détaillée des voies du complément et l'utilisation de molécules bloquant certains effecteurs de la voie permettrait de déterminer s'il y a implication du complément dans la MA. La mesure de la phagocytose de bactérie *E coli* est diminuée chez les individus aMCI et mAD (Figure 5). L'augmentation de l'expression du marqueur CD33 est un mécanisme permettant de moduler les capacités de phagocytose et est connu pour affecter la phagocytose des monocytes dans la MA (Bradshaw et al., 2013; Griciuc et al., 2013). Nos résultats ne montrent pas de modification de l'expression de CD33, ce qui suggère que CD33 ne participe pas à la modification des capacités de phagocytose observée dans notre étude. L'expression des marqueurs CD14 et CD16 impliqués dans la phagocytose diminuent avec la MA (Figure 4). CD14 ne semble pas agir conjointement avec TLR4 puisque son expression n'est pas modifiée (Figure 10). La voie du TLR2 pourrait être aussi impliquée puisque son expression diminue au stade aMCI par rapport au stade santé et mAD (Figure 10). Les capacités de phagocytose des molécules de dextran sont conservées plus longtemps puisqu'elles diminuent uniquement au stade Alzheimer par rapport au stade santé et aMCI (figure 5). Ainsi la phagocytose activée via la reconnaissance de récepteurs et de ligand est d'abord affectée, puis la phagocytose est activée via opsonisation. Afin de mesurer l'habilité des PMN à éliminer les pathogènes ou débris phagocytés, le killing a été étudié (Figure 6). L'activité de killing diminue chez les individus aMCI et mAD. La production de radicaux libres mesurés par le test de phagoburst est altérée chez les patients mAD (Figure 7). D'autre part, la production de facteur comme les cytokines (TNF α , IL-6 IL-1 β , IL-12p70) et les chimiokines (MIP1 α , MIP1 β et IL-8) suite à une stimulation au LPS baisse dès le stade aMCI par rapport aux patients en santé et se poursuit au stade mAD (Figures 8 et 9). La production de facteurs pro-inflammatoire apparait donc défectueuse et est à mettre en relation avec l'absence de détection de marqueurs inflammatoires dans la cohorte de patients. Les fonctions des PMN sont donc affectées dans la MA, selon des caractéristiques propres aux stades aMCI et mAD.

Quant au système immunitaire adaptatif des patients de la cohorte, une augmentation précoce des LTreg dès le stade aMCI et une baisse de leur nombre au stade sévère de la MA ont été identifiées (objectif 3). Ces observations suggèrent un engagement des LTreg au stade aMCI, qui seraient activés pour limiter la réponse des lymphocytes T CD4 et T CD8 par un ensemble de mécanismes de suppression propre aux Treg comme la production de facteurs immunosuppresseurs tel que le TGF β par exemple (Vignali et al., 2008). Le système immunitaire inné et adaptatif est donc impliqué dans la MA et nécessite une approche globale puisque les événements initiateurs demeurent inconnus à ce jour.

PERSPECTIVES

Il apparaît que l'étude précoce de la MA permet l'identification d'altérations précoces du système immunitaire. Afin de développer la recherche des stades précoces de la MA, certaines études recrutent des patients très précocement en regroupant des patients ayant uniquement un Déclin Cognitif Subjectif (DCS) exprimé en consultation sans troubles de la mémoire mesurable par des tests neuropsychologiques (Jessen, 2014; Stewart, 2012; Reisberg et al., 2008). La caractérisation de ces stades est cruciale puisqu'elle permettrait d'identifier des facteurs initiaux et constitue un stade où les stratégies thérapeutiques ont plus de chance de fonctionner.

Le changement fonctionnel du système immunitaire le plus caractéristique de la MA est la perte des capacités d'élimination de débris cellulaires. Ces débris regroupent les agrégations de peptides amyloïdes, les DNF et les débris de neurones morts. Plusieurs mécanismes semblent engagés dans cette perte des capacités d'élimination : la perte des capacités de chimiotactisme rendant le système immunitaire insensible à la détection des débris, la perte des capacités de phagocytose et enfin l'incapacité à éliminer les débris phagocytés. Ce sont autant de voies altérées à étudier. Chez les populations NK et PMN respectivement, le chimiotactisme envers CCL19 ou IL8 est perdu. En fonction des composantes cellulaires étudiées, il apparaît que les voies touchées ne sont pas les mêmes mais que le résultat fonctionnel est le même, soit une baisse du chimiotactisme et de la phagocytose. Des essais pour restaurer ces fonctions devraient permettre de déterminer

l'importance de ces altérations dans le développement et la progression de la MA peut-être freiner le développement de la MA. Les maladies présentant des anomalies du chimiotactisme sont systématiquement associées à des anomalies des fonctions générales du système immunitaire inné comme la phagocytose et le killing. Par exemple, le syndrome de Chediak-Higashi se caractérise par des altérations des lymphocytes NK et des fonctions de chimiotactisme, de phagocytose et de killing bactérien diminuées chez les phagocytes de type neutrophiles. Les phagocytes présentent des lysosomes géants anormaux dont l'origine semblerait génétique (Lozano et al., 2014). L'inflammation initie le chimiotactisme. Seules quelques infections comme celles du VIH ou de *Brucella* sont connues pour diminuer le chimiotactisme cellulaire (Heit et al., 2006). Dans le cas du VIH, l'utilisation de GM-CSF permet une restauration de l'adhésion, du chimiotactisme et de l'émigration des PMN en stimulant la production *de novo* de PMN. Ainsi, la plupart des traitements développés aujourd'hui ne sont pas spécifiques du chimiotactisme. Les anomalies de la phagocytose associées à la MA sont multiples et affectent différentes voies, notamment celles de CD33, TLR et du complément. La compréhension des défauts fonctionnels doit faire appel à de larges études mécanistiques des voies, ce qui pourrait permettre la conceptualisation de nouveaux traitements (Guerriero et al., 2016). Plusieurs études utilisant du CpG, le ligand du TLR9, présentent des résultats prometteurs. L'injection intracérébrale de CpG dans un modèle murin de la MA a démontré une amélioration de la cognition et une diminution du nombre de plaques amyloïdes (Scholtzova et al., 2009). De plus, l'activation de la microglie par le CpG atténue la neurotoxicité associée aux peptides β - amyloïdes (Doi et al., 2009).

Quant au rôle néfaste ou bénéfique de la réponse immune associée à la MA, il reste à déterminer quelles fonctions doivent être renforcées et stimulées et, celles qui doivent être freinées pour une réponse optimale limitant la progression de la MA. Les mécanismes d'évasion des pathogènes (virus, bactéries, champignons, prions) sont souvent les instigateurs d'une réponse immune inadaptée. Si la réponse immune est trop forte ou trop faible, elle ne parvient pas à combattre l'agent infectieux entraînant dans le pire scénario le décès de l'hôte ou une cohabitation chronique. Le caractère infectieux de la MA est clairement démontré par différentes procédures expérimentales inoculant des homogénats de cerveau à des souris ou des primates (Baker et al., 1994; Ridley et al., 2006; Kane et al.,

2000; Meyer-Luhemann et al., 2006). L'analyse de l'implication des pathogènes dans la MA doit être poursuivie afin de pouvoir clairement établir son rôle dans le développement de la MA (Itzhaki et al., 2016; Bourgade et al., 2016). Les défauts de chimiotactisme, de phagocytose et de killing suggèrent que le système immunitaire inné est altéré et qu'il doit être stimulé. Il semblerait que les cellules immunes adaptatives jouent un rôle néfaste dans le développement de la MA, puisque dans un modèle murin il a été observé que l'absence de lymphocytes T et B diminue la quantité de plaques amyloïdes (Späni et al., 2015). De plus, la rupture de la tolérance par la déplétion transitoire des lymphocytes Treg foxp3⁺ dans un modèle murin de la MA a permis de restaurer les fonctions cognitives, de diminuer le nombre de plaques amyloïdes et de limiter la neuroinflammation (Baruch et al., 2015). L'augmentation précoce au stade aMCI des Treg apparaît donc comme un biomarqueur potentiel de la progression de la MA.

Il apparaît alors que les futurs traitements de la MA viendront du contrôle de l'inflammation combiné à l'immunothérapie (GM-CSF, CpG, déplétion des Treg). Une autre piste thérapeutique envisageable consiste à influencer le recrutement de cellules immunes au cerveau (Zenaro et al., 2016), mais il faut d'abord déterminer quelles composantes du système immunitaire sont bénéfiques ou néfastes ainsi que les agresseurs qui les déclenchent.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Même si plusieurs facteurs comme les stimuli à l'origine de l'activation du système immunitaire, le rôle néfaste ou protecteur de ce système demeure inconnu, cette thèse souligne l'engagement du système immunitaire dans la MA dès un stade précoce de la maladie. Notamment, le premier article montre l'activation des cellules NK dès le stade précoce aMCI associée à une perte des capacités de chimiotactisme et de killing. Ces travaux correspondent à la première analyse approfondie des NK dans le cadre de la MA, ainsi que la première identification d'altération des NK précocement au stade aMCI. Le second article présente un ensemble d'altérations phénotypiques et fonctionnelles retrouvées chez les PMN des patients aMCI et atteints de la MA. Ces anomalies affectent les fonctions de chimiotactisme, de phagocytose, de killing ainsi que la production de ROS,

de cytokines et de chimiokines. Dans cette thèse, l'implication du système immunitaire par le biais des cellules NK et PMN est décrite et quelques mécanismes sont identifiés ce qui renforce la littérature sur la perte de chimiotactisme, de phagocytose et d'élimination des débris associée à la MA et attire aussi l'attention sur la nature systémique de la maladie et des interactions probables entre la périphérie et le cerveau en termes d'immunité. Les changements identifiés chez les individus aMCI sont autant de pistes prometteuses pour une action précoce sur la MA via le système immunitaire. Une analyse du système immunitaire dans sa globalité permettra la compréhension de ce système et pourra renseigner sur la véritable nature de la MA afin de permettre ainsi une meilleure compréhension de la physiopathologie de cette maladie.

6 Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier mon directeur de recherche le Dr Tamàs Fülöp et mon co-directeur le Dr Gilles Dupuis qui m'ont fait confiance et m'ont permis de réaliser cette thèse. Grâce à leur supervision, j'ai eu le privilège de partager leurs visions de la science et de la recherche scientifique. Les discussions et réflexions que nous avons partagées ont été très enrichissantes et inspirantes. J'ai particulièrement appréciée votre sens de l'innovation scientifique ainsi que la liberté et la confiance que vous m'avez donné.

Je tiens à partager une pensée pour Mme Baril, notre infirmière de recherche qui nous a permis de recruter les patients. Toujours réactive et bien organisée, il fut très agréable de travailler avec vous. Je remercie les patients qui ont accepté de donner de leur temps et un peu de leur sang, sans eux cette thèse n'aurait pas été possible.

J'aimerai aussi remercier les membres de mon comité d'encadrement (Dr Xavier Roucou et Dr Abdelaziz Amrani) pour leur suivi et conseils.

Un chaleureux merci à tous mes proches, biologistes ou non, de Sherbrooke ou non, qui au quotidien ou ponctuellement, ont partagés mes réflexions scientifiques et personnelles et m'ont aidé par leur écoute et leurs conseils. Merci à Gilles, Isabelle (Marois), Galaxia, Daniel (Serrano), Karine, Evelyne, Laurie, Isabelle (Meunier), et Sasha. Isabelle merci pour nos discussions sur la cytométrie et la vie ! Merci Gilles pour ton soutien sans faille. Merci aussi à Laurent, Jérôme, Rachel, Jean-Pierre, Catherine, Francisco, Marianne, Brian, Chris et Daniel (Lafkas) vos rencontres et votre gout pour la biologie m'ont beaucoup inspiré et m'inspireront encore !

Un grand merci à mes parents pour leur soutien et leur confiance indéfectible.

Un merci tout particulier à Arnaud !

Enfin, merci à tous ceux que je ne cite pas mais que je n'oublie pas !

7 Liste des références

Abbott, R.D., L.R. White, G.W. Ross, K.H. Masaki, J.D. Curb, et H. Petrovitch. 2004. Walking and dementia in physically capable elderly men. *J. Amer. Med. Assoc.* 292:1447–1453.

Alliot, F., Lecain, E., Grima, B., Pessac, B. 1991. Microglial progenitors with a high proliferative potential in the embryonic and adult mouse brain. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88(4):1541–1545.

Aggarwal, A., Sharma, A., Bhatnagar, A. 2013. Biocommunications among peripheral blood fractions: A focus on NK and NKT cell biology in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* 46: 238-250.

Akiyama, H., S. Barger, S. Barnum, B. Bradt, J. Bauer, G.M. Cole, N.R. Cooper, P. Eikelenboom, M. Emmerling, B.L. Fiebich, C.E. Finch, S. Frautschy, W.S. Griffin, H. Hampel, M. Hull, G. Landreth, L. Lue, R. Mrak, I.R. Mackenzie, P.L. McGeer, M.K. O'Banion, J. Pachter, G. Pasinetti, C. Plata-Salaman, J. Rogers, R. Rydel, Y. Shen, W. Streit, R. Strohmeyer, I. Tooyoma, F.L. Van Muiswinkel, R. Veerhuis, D. Walker, S. Webster, B. Wegrzyniak, G. Wenk, et T. Wyss-Coray. 2000. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 21:383–421.

Akiyama, H., McGeer, P.L. 1990. Brain microglia constitutively express beta-2 integrins. *J. Neuroimmunol.* 1:81–93.

Albert, M.S., S.T. DeKosky, D. Dickson, B. Dubois, H.H. Feldman, N.C. Fox, A. Gamst, D.M. Holtzman, W.J. Jagust, R.C. Petersen, P.J. Snyder, M.C. Carrillo, B. Thies, et C.H. Phelps. 2011. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 7:270-279.

Aleisa, A.M., K.H. Alzoubi, N.Z. Gerges, et K.A. Alkadhi. 2006. Chronic psychosocial stress-induced impairment of hippocampal LTP: possible role of BDNF. *Neurobiol. Dis.* 22:453–462.

Almeida, O.P., G.J. Garrido, H. Alfonso, G. Hulse, N.T. Lautenschlager, G.J. Hankey, et L. Flicker. 2011. 24-month effect of smoking cessation on cognitive function and brain structure in later life. *Neuroimage.* 55:1480–1489.

Altmann, A., L. Tian, V.W. Henderson, et M.D. Greicius. 2014. Sex modifies the APOE-related risk of developing Alzheimer disease. *Ann. Neurol.* 75:563–573.

Alzheimer, A. 1907. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und phy-chish-Gerichtliche Medizin.* 64:146–148.

Alzheimer, A., R.A. Stelzmann, H.N. Schnitzlein, et F.R. Murtagh. 1995. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde". *Clin Anat.* 8:429–431.

Alzheimer Society of Canada. 2012. *A New Way of Looking at the Impact of Dementia in Canada.*

Alzheimer's Association. 2015. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia.* 11.

Alzheimer's Disease Education et Referral Center. 2011. Alzheimer's Disease Genetics: Fact Sheet. National Institute of Health. 11:6424.

Amarante, M.K., Watanabe, M.A. 2010. Toll-like receptor 3: involvement with exogenous and endogenous RNA. *Int. Rev. Immunol.* 6:557–573.

American Psychiatric Association. 2013. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder 5.* American Psychiatric Publishing.

Andel, R., M. Crowe, N.L. Pedersen, J. Mortimer, E. Crimmins, B. Johansson, et M. Gatz. 2005. Complexity of work and risk of Alzheimer's disease: a population-based study of Swedish twins. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci.* 60:251-258.

Andreadis A. 2005. Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1739: 91–103.

Anstey, K.J., N. Cherbuin, M. Budge, et J. Young. 2011. Body mass index in midlife and late-life as a risk factor for dementia: a meta-analysis of prospective studies. *Obes Rev.* 12:426–437.

Anstey, K.J., C. von Sanden, A. Salim, et R. O'Kearney. 2007. Smoking as a risk factor for dementia and cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies. *Am. J. Epidemiol.* 166:367–378.

Araga, S., Kagimoto, H., Funamoto, K., Takahashi, K. 1991. Reduced natural killer cell activity in patients with dementia of the Alzheimer type. *Acta. Neurol. Scand.* 84:259–263.

Armstrong, R.A. 2014. A critical analysis of the "amyloid cascade hypothesis". *Folia Neuropathol.* 52:211–225.

Aspinal, R., Del Giudice, G., Effros, R.B., Grubeck-Loebenstein, B., Sambhara, S. 2007. Challenges for vaccination in the elderly. *Immun. Ageing.* 4:1–9.

Baik, S.H., Cha, M.-Y.Y., Hyun, Y.-M.M., Cho, H., Hamza, B., Kim, D.K., Han, S.-H.H., Choi, H., Kim, K.H., Moon, M., Lee, J., Kim, M., Irimia, D., Mook-Jung, I., 2014.

Migration of neutrophils targeting amyloid plaques in Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiol. Aging* 35, 1286–1292.

Ball, Berch, Helmers, Jobe, et Leveck. 2002. Effects of cognitive training interventions with older adults: a randomized controlled trial. *J. Amer. Med. Assoc.* 288:2271–2281.

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

Barage, S.H., et K.D. Sonawane. 2015. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides.* 52:1–18.

Barberger-Gateau, P., C. Raffaitin, L. Letenneur, C. Berr, C. Tzourio, J.F. Dartigues, et A. Alpérovitch. 2007. Dietary patterns and risk of dementia: the Three-City cohort study. *Neurology.* 69:1921–1930.

Barnes, D.E., G.S. Alexopoulos, O.L. Lopez, J.D. Williamson, et K. Yaffe. 2006. Depressive symptoms, vascular disease, and mild cognitive impairment: findings from the Cardiovascular Health Study. *Arch. Gen. Psychiatry.* 63:273–279.

Baruch, K., Rosenzweig, N., Kertser, A., Deczkowska, A., Sharif, A.M., Spinrad, A., Tsitsou-Kampeli, A., Sarel, A., Cahalon, L., Schwartz, M. 2015. Breaking immune tolerance by targeting Foxp3(+) regulatory T cells mitigates Alzheimer's disease pathology. *Nat. Commun.* 6:7967:1–12.

Bauernfeind, F., Niepmann, S., Knolle, P.A., Hornung, V. 2016. Aging-associated TNF production primes inflammasome activation and NLRP3-related metabolic disturbances, *J. Immunol.* 197(7): 2900–2908.

Bayer, T.A., R. Cappai, C.L. Masters, K. Beyreuther, et G. Multhaup. 1999. It all sticks together--the APP-related family of proteins and Alzheimer's disease. *Mol. Psychiatry.* 4:524–528.

Becker, J.T., Y.-F.F. Chang, O.L. Lopez, M.A. Dew, R.A. Sweet, D. Barnes, K. Yaffe, J. Young, L. Kuller, et C.F. Reynolds. 2009. Depressed mood is not a risk factor for incident dementia in a community-based cohort. *Am J Geriatr Psychiatry.* 17:653–663.

Bekris, L.M., C.-E.E. Yu, T.D. Bird, et D.W. Tsuang. 2010. Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 23:213–227.

Bell, R.D., R. Deane, N. Chow, X. Long, A. Sagare, I. Singh, J.W. Streb, H. Guo, A. Rubio, W. Van Nostrand, J.M. Miano, et B.V. Zlokovic. 2009. SRF and myocardin regulate LRP-mediated amyloid-beta clearance in brain vascular cells. *Nat. Cell Biol.* 11:143–153.

Benilova, I., et B. De Strooper. 2013. Neuroscience. Promiscuous Alzheimer's amyloid: yet another partner. *Science.* 341:1354–1355.

Berchtold, N.C., et C.W. Cotman. 1998. Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s. *Neurobiol. Aging*. 19:173–189.

Berg, J. Vom, S. Prokop, K.R. Miller, J. Obst, R.E. Kälin, I. Lopategui-Cabezas, A. Wegner, F. Mair, C.G. Schipke, O. Peters, Y. Winter, B. Becher, et F.L. Heppner. 2012. Inhibition of IL-12/IL-23 signaling reduces Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. *Nat. Med.* 18:1812–1819.

Bergen, M. von, Barghorn, S., Biernat, J., Mandelkow, E.-M.M., Mandelkow, E., 2005. Tau aggregation is driven by a transition from random coil to beta sheet structure. *Biochim. Biophys. Acta* 1739, 158–166.

Beydoun, M.A., H.A. Beydoun, et Y. Wang. 2008. Obesity and central obesity as risk factors for incident dementia and its subtypes: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev.* 9:204–218.

Bian, Z., Y. Guo, B. Ha, K. Zen, et Y. Liu. 2012. Regulation of the inflammatory response: enhancing neutrophil infiltration under chronic inflammatory conditions. *J. Immunol.* 188:844–853.

Bielschowsky, M. 1903. Die Ziele bei Impregnation der Neurofibrillen. *Neurol. Centralbl.* 22:997–1006.

Biron, K.E., D.L. Dickstein, R. Gopaul, et W.A. Jefferies. 2011. Amyloid triggers extensive cerebral angiogenesis causing blood brain barrier permeability and hypervascularity in Alzheimer's disease. *PLoS ONE*. 6:e23789:1–10.

Blain, J.-F.F., N. Aumont, L. Thérout, D. Dea, et J. Poirier. 2006. A polymorphism in lipoprotein lipase affects the severity of Alzheimer's disease pathophysiology. *Eur. J. Neurosci.* 24:1245–1251.

Bloudek, L.M., D.E. Spackman, M. Blankenburg, et S.D. Sullivan. 2011. Review and meta-analysis of biomarkers and diagnostic imaging in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 26:627–645.

Bourgade, K., Dupuis, G., Frost, E.H., Fülöp, T., 2016a. Anti-Viral Properties of Amyloid- β Peptides. *J. Alzheimers Dis.* 54, 859–878.

Bourgade, K., Garneau, H., Giroux, G., Page, A.Y.Y. Le, Bocti, C., Dupuis, G., Frost, E.H., Fülöp, T., 2015. β -Amyloid peptides display protective activity against the human Alzheimer's disease-associated herpes simplex virus-1. *Biogerontology* 16, 85–98.

Bourgade, K., Page, A. Le, Bocti, C., Witkowski, J.M., Dupuis, G., Frost, E.H., Fülöp, T., 2016b. Protective Effect of Amyloid- β Peptides Against Herpes Simplex Virus-1 Infection in a Neuronal Cell Culture Model. *J. Alzheimers Dis.* 50, 1227–1241.

Bouwman, F.H., N.S. Schoonenboom, N.A. Verwey, E.J. van Elk, A. Kok, M.A.

Blankenstein, P. Scheltens, et W.M. van der Flier. 2009. CSF biomarker levels in early and late onset Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. 30:1895–1901.

Braak, H., et E. Braak. 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 82:239–259.

Bradshaw, E.M., Chibnik, L.B., Keenan, B.T., Ottoboni, L., Raj, T., Tang, A., Rosenkrantz, L.L., Imboywa, S., Lee, M., Korff, A. Von, Morris, M.C., Evans, D.A., Johnson, K., Sperling, R.A., Schneider, J.A., Bennett, D.A., Jager, P.L. De, 2013. CD33 Alzheimer's disease locus: altered monocyte function and amyloid biology. *Nat. Neurosci*. 16, 848–850.

Brunnström, H.R., et E.M. Englund. 2009. Cause of death in patients with dementia disorders. *Eur. J. Neurol*. 16:488–492.

Bullock, R. 2002. New drugs for Alzheimer's disease and other dementias. *Br J Psychiatry*. 180:135–139.

Burns, A., R. Jacoby, P. Luthert, et R. Levy. 1990. Cause of death in Alzheimer's disease. *Age Ageing*. 19:341–344.

Camous, X., Pera, A., Solana, R., Larbi, A., 2012. NK cells in healthy aging and age-associated diseases. *J. Biomed. Biotechnol*. 2012, 195956:1–9.

Capetillo-Zarate, E., L. Gracia, D. Tampellini, et G.K. Gouras. 2012. Intraneuronal A β accumulation, amyloid plaques, and synapse pathology in Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis*. 10:56–59.

Cardona, A.E., M. Li, L. Liu, C. Savarin, et R.M. Ransohoff. 2008. Chemokines in and out of the central nervous system: much more than chemotaxis and inflammation. *J. Leukoc. Biol*. 84:587–594.

Caruccio, L., Bettinotti, M., Matsuo, K., Sharon, V., Stroncek, D., 2003. Expression of human neutrophil antigen-2a (NB1) is increased in pregnancy. *Transfusion* 43, 357–363.

Carter, C. 2011. Alzheimer's Disease: APP, Gamma Secretase, APOE, CLU, CR1, PICALM, ABCA7, BIN1, CD2AP, CD33, EPHA1, and MS4A2, and Their Relationships with Herpes Simplex, C. Pneumoniae, Other Suspect Pathogens, and the Immune System. *Int J Alzheimers Dis*. 2011:501862:1–34.

Carter, C.L., E.M. Resnick, M. Mallampalli, et A. Kalbarczyk. 2012. Sex and gender differences in Alzheimer's disease: recommendations for future research. *J Womens Health (Larchmt)*. 21:1018–1023.

Cashman, J.R., S. Ghirmai, K.J. Abel, et M. Fiala. 2008. Immune defects in Alzheimer's disease: new medications development. *BMC Neurosci*. 9 Suppl 2:S13:1–8.

Cavallucci, V., M. D'Amelio, et F. Cecconi. 2012. A β toxicity in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 45:366–378.

Cevenini, E., Monti, D., Franceschi, C., 2013. Inflamm-ageing. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 16, 14–20.

Chaney, M.O., W.B. Stine, T.A. Kokjohn, Y.-M.M. Kuo, C. Esh, A. Rahman, D.C. Luehrs, A.M. Schmidt, D. Stern, S.D. Yan, et A.E. Roher. 2005. RAGE and amyloid beta interactions: atomic force microscopy and molecular modeling. *Biochim. Biophys. Acta.* 1741:199–205.

Chaplin, D.D., 2010. Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S3–23.

Chatta, G.S., Andrews, R.G., Rodger, E., Schrag, M., Hammond, W.P., Dale, D.C., 1993. Hematopoietic progenitors and aging: alterations in granulocytic precursors and responsiveness to recombinant human G-CSF, GM-CSF, and IL-3. *J Gerontol* 48, M207–212.

Chen, S.-K.K., Tvrđik, P., Peden, E., Cho, S., Wu, S., Spangrude, G., Capecchi, M.R., 2010. Hematopoietic origin of pathological grooming in *Hoxb8* mutant mice. *Cell* 141, 775–785.

Cheung, Z.H., K. Gong, et N.Y. Ip. 2008. Cyclin-dependent kinase 5 supports neuronal survival through phosphorylation of Bcl-2. *J. Neurosci.* 28:4872–4877.

Chêne, G., A. Beiser, R. Au, S.R. Preis, P.A. Wolf, C. Dufouil, et S. Seshadri. 2015. Gender and incidence of dementia in the Framingham Heart Study from mid-adult life. *Alzheimers Dement.* 11:310–320.

Chidrawar, S.M., Khan, N., Chan, Y.L., Nayak, L., Moss, P.A., 2006. Ageing is associated with a decline in peripheral blood CD56bright NK cells. *Immun Ageing* 3, 10:1–8.

Clarfield, A.M. 2003. The decreasing prevalence of reversible dementias: an updated meta-analysis. *Arch. Intern. Med.* 163:2219–2229.

Clark, C.M., J.A. Schneider, B.J. Bedell, T.G. Beach, W.B. Bilker, M.A. Mintun, M.J. Pontecorvo, F. Hefti, A.P. Carpenter, M.L. Flitter, M.J. Krautkramer, H.F. Kung, R.E. Coleman, P.M. Doraiswamy, A.S. Fleisher, M.N. Sabbagh, C.H. Sadowsky, E.P. Reiman, P.E. Reiman, S.P. Zehntner, et D.M. Skovronsky. 2011. Use of florbetapir-PET for imaging beta-amyloid pathology. *J. Amer. Med. Assoc.* 305:275–83.

Colcombe, S., et A.F. Kramer. 2003. Fitness effects on the cognitive function of older adults: a meta-analytic study. *Psychol Sci.* 14:125–130.

Cook, D.G., J.B. Leverenz, P.J. McMillan, J.J. Kulstad, S. Ericksen, R.A. Roth, G.D. Schellenberg, L.-W.W. Jin, K.S. Kovacina, et S. Craft. 2003. Reduced hippocampal

insulin-degrading enzyme in late-onset Alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein E-epsilon4 allele. *Am. J. Pathol.* 162:313–319.

Costantini, L.C., L.J. Barr, J.L. Vogel, et S.T. Henderson. 2008. Hypometabolism as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *BMC Neurosci.* 9 Suppl 2:S16:1–9.

Cox, M.A., S.M. Kahan, et A.J. Zajac. 2013. Anti-viral CD8 T cells and the cytokines that they love. *Virology.* 435:157–169.

Craft, S. 2007. Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis: potential mechanisms and implications for treatment. *Curr Alzheimer Res.* 4:147–152.

Craft, S. 2009. The role of metabolic disorders in Alzheimer disease and vascular dementia: two roads converged. *Arch. Neurol.* 66:300–305.

Crary, J.F., Trojanowski, J.Q., Schneider, J.A., Abisambra, J.F., Abner, E.L., Alafuzoff, I., Arnold, S.E., Attems, J., Beach, T.G., Bigio, E.H., Cairns, N.J., Dickson, D.W., Gearing, M., Grinberg, L.T., Hof, P.R., Hyman, B.T., Jellinger, K., Jicha, G.A., Kovacs, G.G., Knopman, D.S., Kofler, J., Kukull, W.A., Mackenzie, I.R., Masliah, E., McKee, A., Montine, T.J., Murray, M.E., Neltner, J.H., Santa-Maria, I., Seeley, W.W., Serrano-Pozo, A., Shelanski, M.L., Stein, T., Takao, M., Thal, D.R., Toledo, J.B., Troncoso, J.C., Vonsattel, J.P., White, C.L., Wisniewski, T., Woltjer, R.L., Yamada, M., Nelson, P.T., 2014. Primary age-related tauopathy (PART): a common pathology associated with human aging. *Acta Neuropathol.* 128, 755–766.

Cunnane, S., S. Nugent, M. Roy, A. Courchesne-Loyer, E. Croteau, S. Tremblay, A. Castellano, F. Pifferi, C. Bock, N. Paquet, H. Begdouri, M. Bentourkia, E. Turcotte, M. Allard, P. Barberger-Gateau, T. Fulop, et S.I. Rapoport. 2011. Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease. *Nutrition.* 27:3–20.

Damani, M.R., Zhao, L., Fontainhas, A.M., Amaral, J., Fariss, R.N., Wong, W.T., 2011. Age-related alterations in the dynamic behavior of microglia. *Aging Cell* 10, 263–76.
Demaret, J., Venet, F., Plassais, J., Cazalis, M.-A.A., Vallin, H., Friggeri, A., Lepape, A., Rimmelé, T., Textoris, J., Monneret, G., 2016. Identification of CD177 as the most dysregulated parameter in a microarray study of purified neutrophils from septic shock patients. *Immunol. Lett.* 178, 122–130.

Deane, R., R.D. Bell, A. Sagare, et B.V. Zlokovic. 2009. Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 8:16–30.

Deane, R., Z. Wu, et B.V. Zlokovic. 2004. RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke.* 35:2628–2631.

Deane, R., S. Du Yan, R.K. Subramanian, B. LaRue, S. Jovanovic, E. Hogg, D. Welch, L. Manness, C. Lin, J. Yu, H. Zhu, J. Ghiso, B. Frangione, A. Stern, A.M. Schmidt, D.L.

Armstrong, B. Arnold, B. Liliensiek, P. Nawroth, F. Hofman, M. Kindy, D. Stern, et B. Zlokovic. 2003. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat. Med.* 9:907–913.

Delaby, C., Gabelle, A., Blum, D., Schraen-Maschke, S., Moulinier, A., Boulanghien, J., Séverac, D., Buée, L., Rème, T., Lehmann, S., 2015. Central Nervous System and Peripheral Inflammatory Processes in Alzheimer's Disease: Biomarker Profiling Approach. *Front Neurol* 6, 181:1–11.

Della Chiesa, M., Marcenaro, E., Sivori, S., Carlomagno, S., Pesce, S., Moretta, A., 2014. Human NK cell response to pathogens. *Semin. Immunol.* 26, 152–160.

Dharancy, S., Louvet, A., Hollebecque, A., Desreumaux, P., Mathurin, P., Dubuquoy, L., 2008. Nuclear receptor PPAR and hepatology: Pathophysiological and therapeutical aspects. *Gastroentérologie Clinique et Biologique.* 32:339-350.

Dickerson, B.C., et D.A. Wolk. 2012. MRI cortical thickness biomarker predicts AD-like CSF and cognitive decline in normal adults. *Neurology.* 78:84–90.

Dietschy, J.M., et S.D. Turley. 2001. Cholesterol metabolism in the brain. *Curr. Opin. Lipidol.* 12:105–112.

Dimasi, D., Sun, W.Y., Bonder, C.S., 2013. Neutrophil interactions with the vascular endothelium. *Int. Immunopharmacol.* 17, 1167–1175.

Dishman, R.K., H.-R.R. Berthoud, F.W. Booth, C.W. Cotman, V.R. Edgerton, M.R. Fleshner, S.C. Gandevia, F. Gomez-Pinilla, B.N. Greenwood, C.H. Hillman, A.F. Kramer, B.E. Levin, T.H. Moran, A.A. Russo-Neustadt, J.D. Salamone, J.D. Van Hoomissen, C.E. Wade, D.A. York, et M.J. Zigmond. 2006. Neurobiology of exercise. *Obesity (Silver Spring).* 14:345–356.

Doecke, J.D., Laws, S.M., Faux, N.G., Wilson, W., Burnham, S.C., Lam, C.-P.P., Mondal, A., Bedo, J., Bush, A.I., Brown, B., Ruyck, K. De, Ellis, K.A., Fowler, C., Gupta, V.B., Head, R., Macaulay, S.L., Pertile, K., Rowe, C.C., Rembach, A., Rodrigues, M., Rumble, R., Szoeki, C., Taddei, K., Taddei, T., Tronson, B., Ames, D., Masters, C.L., Martins, R.N., 2012. Blood-based protein biomarkers for diagnosis of Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 69, 1318–1325.

Doi, Y., Mizuno, T., Maki, Y., Jin, S., Mizoguchi, H., Ikeyama, M., Doi, M., Michikawa, M., Takeuchi, H., Suzumura, A., 2009. Microglia activated with the toll-like receptor 9 ligand CpG attenuate oligomeric amyloid {beta} neurotoxicity in in vitro and in vivo models of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 175, 2121–2132.

Dubois, B., et M.L. Albert. 2004. Amnesic MCI or prodromal Alzheimer's disease? *Lancet Neurol.* 3:246–248.

Eehalt, R., P. Keller, C. Haass, C. Thiele, et K. Simons. 2003. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.* 160:113–123.

Eisele, Y.S., Obermüller, U., Heilbronner, G., Baumann, F., Kaeser, S.A., Wolburg, H., Walker, L.C., Staufenbiel, M., Heikenwalder, M., Jucker, M., 2010. Peripherally applied Abeta-containing inoculates induce cerebral beta-amyloidosis. *Science* 330, 980–982.

El Khoury, J.B., K.J. Moore, T.K. Means, J. Leung, K. Terada, M. Toft, M.W. Freeman, et A.D. Luster. 2003. CD36 mediates the innate host response to beta-amyloid. *J. Exp. Med.* 197:1657–1666.

Emanuelli, G., Lanzio, M., Anfossi, T., Romano, S., Anfossi, G., Calcamuggi, G., 1986. Influence of age on polymorphonuclear leukocytes in vitro: phagocytic activity in healthy human subjects. *Gerontology* 32, 308–316.

Emery, C.F., R.L. Schein, E.R. Hauck, et N.R. MacIntyre. 1998. Psychological and cognitive outcomes of a randomized trial of exercise among patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Health Psychol.* 17:232–240.

Emmerling, M.R., M.D. Watson, C.A. Raby, et K. Spiegel. 2000. The role of complement in Alzheimer's disease pathology. *Biochim. Biophys. Acta.* 1502:158–171.

Engelhart, M.J., M.I. Geerlings, A. Ruitenberg, J.C. van Swieten, A. Hofman, J.C. Witteman, et M.M. Breteler. 2002. Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *JAMA.* 287:3223–3229.

Etminan, M., S. Gill, et A. Samii. 2003. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on risk of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ.* 327:128–133.

Eustache, F., G. Chételat, B. Desgranges, et V. de La Sayette. 2014. Alzheimer : fatalité ou espoir. Paris. Le Muscadier.

Evans, Bennett, et Wilson. 2003. Incidence of Alzheimer disease in a biracial urban community: relation to apolipoprotein E allele status. *Arch. Neurol.* 60:185–189.

Fabre, C., K. Chamari, P. Mucci, J. Massé-Biron, et C. Préfaut. 2002. Improvement of cognitive function by mental and/or individualized aerobic training in healthy elderly subjects. *Int J Sports Med.* 23:415–421.

Fiala, M., J. Lin, J. Ringman, V. Kermani-Arab, G. Tsao, A. Patel, A.S. Lossinsky, M.C. Graves, A. Gustavson, J. Sayre, E. Sofroni, T. Suarez, F. Chiappelli, et G. Bernard. 2005. Ineffective phagocytosis of amyloid-beta by macrophages of Alzheimer's disease patients. *J. Alzheimers Dis.* 7:221–232; discussion 255–262.

Fischer, D., Mukrasch, M.D., Biernat, J., Bibow, S., Blackledge, M., Griesinger, C., Mandelkow, E., Zweckstetter, M., 2009. Conformational changes specific for pseudophosphorylation at serine 262 selectively impair binding of tau to microtubules. *Biochemistry* 48, 10047–10055.

Fitzpatrick, A., L. Kuller, D. Ives, O. Lopez, W. Jagust, J. Breitner, B. Jones, C. Lyketsos, et C. Dulberg. 2004. Incidence and prevalence of dementia in the Cardiovascular Health Study. *J. Am. Ger. Soc.* 52:195–204.

Folstein, M.F., S.E. Folstein, et P.R. McHugh. 1975. “Mini-mental state”. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 12:189–198.

Forette, F., M.-L.L. Seux, J.A. Staessen, L. Thijs, M.-R.R. Babarskiene, S. Babeanu, A. Bossini, R. Fagard, B. Gil-Extremera, T. Laks, Z. Kopalava, C. Sartori, J. Tuomilehto, H. Vanhanen, J. Webster, Y. Yodanis, et W.H. Birkenhäger. 2002. The prevention of dementia with antihypertensive treatment: new evidence from the Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) study. *Arch. Intern. Med.* 162:2046–2052.

Foster, J.K., G. Verdile, K.A. Bates, et R.N. Martins. 2009. Immunization in Alzheimer’s disease: naïve hope or realistic clinical potential? *Mol. Psychiatry.* 14:239–251.

Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., 2000. Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. *Vaccine* 18, 1717–1720.

Fratiglioni, L., S. Paillard-Borg, et B. Winblad. 2004. An active and socially integrated lifestyle in late life might protect against dementia. *Lancet Neurol.* 3:343–353.

Fratiglioni, L., et H.-X.X. Wang. 2007. Brain reserve hypothesis in dementia. *J. Alzheimers Dis.* 12:11–22.

Friedhoff, L.T., E.I. Cullen, N.S. Geoghagen, et J.D. Buxbaum. 2001. Treatment with controlled-release lovastatin decreases serum concentrations of human beta-amyloid (A beta) peptide. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 4:127–130.

Frost, B., Diamond, M.I., 2010. Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 155–159.

Frost, B., Jacks, R.L., Diamond, M.I., 2009. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J. Biol. Chem.* 284, 12845–12852.

Fukumoto, H., M. Tennis, J.J. Locascio, B.T. Hyman, J.H. Growdon, et M.C. Irizarry. 2003. Age but not diagnosis is the main predictor of plasma amyloid beta-protein levels. *Arch. Neurol.* 60:958–964.

- Fülöp, T., Fóris, G., Wórum, I., Leövey, A., 1985. Age-dependent alterations of Fc gamma receptor-mediated effector functions of human polymorphonuclear leucocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 61, 425–432.
- Fulop, T., Larbi, A., Douziech, N., Fortin, C., Guérard, K.-P.P., Lesur, O., Khalil, A., Dupuis, G., 2004. Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. *Aging Cell* 3, 217–226.
- Fülöp, T., Larbi, A., Pawelec, G., 2013. Human T cell aging and the impact of persistent viral infections. *Front Immunol* 4, 271.
- Fulop, T., Page, A. Le, Fortin, C., Witkowski, J.M., Dupuis, G., Larbi, A., 2014. Cellular signaling in the aging immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 29, 105–111.
- Fändrich, M. 2007. On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates. *Cell. Mol. Life Sci.* 64:2066–2078.
- Fändrich, M., M. Schmidt, et N. Grigorieff. 2011. Recent progress in understanding Alzheimer's β -amyloid structures. *Trends Biochem. Sci.* 36:338–345.
- Galasko, D., Golde, T.E., Scheltens, P., 2013. Progress in Alzheimer's disease research circa 2013: Is the glass half empty or half full? *Alzheimers Res Ther* 5, 26.
- Galli, S.J., N. Borregaard, et T.A. Wynn. 2011. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat. Immunol.* 12:1035–1044.
- Ganguli, M., H. Dodge, C. Shen, R. Pandav, et S. DeKosky. 2005. Alzheimer Disease and Mortality: A 15-Year Epidemiological Study. *Archives of Neurology.* 62:779–784.
- Gatz, M., N.L. Pedersen, S. Berg, B. Johansson, K. Johansson, J.A. Mortimer, S.F. Posner, M. Viitanen, B. Winblad, et A. Ahlbom. 1997. Heritability for Alzheimer's disease: the study of dementia in Swedish twins. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 52:117–125.
- Gerald, Z., et W. Ockert. 2013. Alzheimer's disease market: hope deferred. *Nat Rev Drug Discov.* 12:19–20.
- Giannakopoulos, P., F.R. Herrmann, T. Bussière, C. Bouras, E. Kövari, D.P. Perl, J.H. Morrison, G. Gold, et P.R. Hof. 2003. Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology.* 60:1495–1500.
- Gilman, S., M. Koller, R.S. Black, L. Jenkins, S.G. Griffith, N.C. Fox, L. Eisner, L. Kirby, M.B. Rovira, F. Forette, et J.-M.M. Orgogozo. 2005. Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology.* 64:1553–1562.

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., Samokhvalov, I.M., Merad, M., 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841–845.

Glass, C.K., K. Saijo, B. Winner, M.C. Marchetto, et F.H. Gage. 2010. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*. 140:918–934.

Glenner, G.G., et C.W. Wong. 1984. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120:885–890.

Glynn, R.J., L.A. Beckett, L.E. Hebert, M.C. Morris, P.A. Scherr, et D.A. Evans. 1999. Current and remote blood pressure and cognitive decline. *J. Amer. Med. Assoc.* 281:438–445.

Goate, A. 2006. Segregation of a missense mutation in the amyloid beta-protein precursor gene with familial Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 9:341–347.

Goate, A., M.C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, et L. James. 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 349:704–706.

Goedert, M., 2005. Tau gene mutations and their effects. *Mov. Disord.* 20 Suppl 12, S45–52.

Goldeck, D., A. Larbi, M. Pellicanó, I. Alam, I. Zerr, C. Schmidt, T. Fulop, et G. Pawelec. 2013. Enhanced Chemokine Receptor Expression on Leukocytes of Patients with Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*. 8:e66664:1–8.

Goldman, J.S., S.E. Hahn, J.W. Catania, S. LaRusse-Eckert, M.B. Butson, M. Rumbaugh, M.N. Strecker, J.S. Roberts, W. Burke, R. Mayeux, et T. Bird. 2011. Genetic counseling and testing for Alzheimer disease: joint practice guidelines of the American College of Medical Genetics and the National Society of Genetic Counselors. *Genet. Med.* 13:597–605.

Goronzy, J.J.J., Lee, W.-W.W., Weyand, C.M., 2007. Aging and T-cell diversity. *Exp. Gerontol.* 42, 400–406.

Gouras, G.K., J. Tsai, J. Naslund, B. Vincent, M. Edgar, F. Checler, J.P. Greenfield, V. Haroutunian, J.D. Buxbaum, H. Xu, P. Greengard, et N.R. Relkin. 2000. Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am. J. Pathol.* 156:15–20.

Green, R., A. Cupples, R. Go, K. Benke, T. Edeki, P. Griffith, M. Williams, Y. Hipps, N. Graff-Radford, D. Bachman, L. Farrer, et M. for the Group. 2002. Risk of Dementia Among White and African American Relatives of Patients With Alzheimer Disease. *J. Amer. Med. Assoc.* 287:329–336.

Grimm, M.O., H.S. Grimm, et T. Hartmann. 2007. Amyloid beta as a regulator of lipid homeostasis. *Trends Mol Med.* 13:337–344.

Griciuc, A., Serrano-Pozo, A., Parrado, A.R., Lesinski, A.N., Asselin, C.N., Mullin, K., Hooli, B., Choi, S.H., Hyman, B.T., Tanzi, R.E., 2013. Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of amyloid beta. *Neuron* 78:631–643.

Grossberg, G.T., et A.K. Desai. 2003. Management of Alzheimer's disease. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 58:331–353.

Grundke-Iqbal, Iqbal, Quinlan, et Tung. 1986. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 261:6084–6089.

Grundman, M., J. Corey-Bloom, T. Jernigan, S. Archibald, et L.J. Thal. 1996. Low body weight in Alzheimer's disease is associated with mesial temporal cortex atrophy. *Neurology.* 46:1585–1591.

Gu, Nieves, et Stern. 2010. Food combination and Alzheimer disease risk: a protective diet. *Arch. Neurol.* 67:699–706.

Guerriero, F., Sgarlata, C., Francis, M., Maurizi, N., Faragli, A., Perna, S., Rondanelli, M., Rollone, M., Ricevuti, G., 2016. Neuroinflammation, immune system and Alzheimer disease: searching for the missing link. *Aging Clin Exp Res.*

Gustafson, D., E. Rothenberg, K. Blennow, B. Steen, et I. Skoog. 2003. An 18-year follow-up of overweight and risk of Alzheimer disease. *Arch. Intern. Med.* 163:1524–1528.

Gustafson, D.R., K. Bäckman, M. Waern, S. Ostling, X. Guo, P. Zandi, M.M. Mielke, C. Bengtsson, et I. Skoog. 2009. Adiposity indicators and dementia over 32 years in Sweden. *Neurology.* 73:1559–1566.

Hachinski, V., C. Iadecola, R.C. Petersen, M.M. Breteler, D.L. Nyenhuis, S.E. Black, W.J. Powers, C. DeCarli, J.G. Merino, R.N. Kalaria, H.V. Vinters, D.M. Holtzman, G.A. Rosenberg, A. Wallin, M. Dichgans, J.R. Marler, et G.G. Leblanc. 2006. National Institute of Neurological Disorders and Stroke-Canadian Stroke Network vascular cognitive impairment harmonization standards. *Stroke* 37:2220–2241.

Hall, Lipton, Sliwinski, Katz, et Derby. 2009. Cognitive activities delay onset of memory decline in persons who develop dementia. *Neurology.* 73:356–361

Hardy, J.A., Higgins, G.A., 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256:184–185.

Harris, S.A., Harris, E.A., 2015. Herpes Simplex Virus Type 1 and Other Pathogens are Key Causative Factors in Sporadic Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* 48:319–53.

Hayes, G.M., Woodroffe, M.N., Cuzner, M.L., 1987. Microglia are the major cell type expressing MHC class II in human white matter. *J. Neurol. Sci.* 80:25–37.

Harvey, J., N. Solovyova, et A. Irving. 2006. Leptin and its role in hippocampal synaptic plasticity. *Prog. Lipid Res.* 45:369–378.

Hassan, M., N. Latif, et M. Yacoub. 2012. Adipose tissue: friend or foe? *Nat Rev Cardiol.* 9:689–702.

Heit, B., Jones, G., Knight, D., Antony, J.M., Gill, M.J., Brown, C., Power, C., Kubes, P., 2006. HIV and other lentiviral infections cause defects in neutrophil chemotaxis, recruitment, and cell structure: immunorestorative effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol.* 177:6405–6414.

Helzner, Scarmeas, Cosentino, Tang, Schupf, et Stern. 2008. Survival in Alzheimer disease: a multiethnic, population-based study of incident cases. *Neurology.* 71:1489–495.

Heneka, M.T., M.K. O’Banion, D. Terwel, et M.P. Kummer. 2010. Neuroinflammatory processes in Alzheimer’s disease. *J Neural Transm (Vienna).* 117:919–947.

Heppner, F.L., Ransohoff, R.M., Becher, B., 2015. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 358–372.

Herholz, K. 2012. Use of FDG PET as an imaging biomarker in clinical trials of Alzheimer’s disease. *Biomark Med.* 6:431–439.

Herholz, K., S. Westwood, C. Haense, et G. Dunn. 2011. Evaluation of a calibrated (18)F-FDG PET score as a biomarker for progression in Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *J. Nucl. Med.* 52:1218–1226.

Herrup, K. 2015. The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat. Neurosci.* 18:794–799.

Hickman, R.A., Faustin, A., Wisniewski, T., 2016. Alzheimer Disease and Its Growing Epidemic: Risk Factors, Biomarkers, and the Urgent Need for Therapeutics. *Neurol Clin* 34, 941–953.

Hitchcock, C.L. 1991. Ki-67 staining as a means to simplify analysis of tumor cell proliferation. *Am. J. Clin. Pathol.* 96:444–446.

Hoek, R.M., Ruuls, S.R., Murphy, C.A., Wright, G.J., Goddard, R., Zurawski, S.M., Blom, B., Homola, M.E., Streit, W.J., Brown, M.H., Barclay, A.N., Sedgwick, J.D., 2000. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science* 290, 1768–1771.

Hohsfield, L.A., Humpel, C., 2015. Migration of blood cells to β -amyloid plaques in Alzheimer’s disease. *Exp. Gerontol.* 65, 8–15.

- Holtzman, D.M., J. Herz, et G. Bu. 2012. Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2:a006312:1–24.
- Hong, S., Beja-Glasser, V.F., Nfonoyim, B.M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., Merry, K.M., Shi, Q., Rosenthal, A., Barres, B.A., Lemere, C.A., Selkoe, D.J., Stevens, B., 2016a. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* 352, 712–716.
- Hong, S., Dissing-Olesen, L., Stevens, B., 2016b. New insights on the role of microglia in synaptic pruning in health and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 36, 128–134.
- Hoozemans, J.J., R. Veerhuis, A.J. Rozemuller, et P. Eikelenboom. 2003. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase in Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets.* 4:461–468.
- Howard, W.A., Gibson, K.L., Dunn-Walters, D.K., 2006. Antibody quality in old age. *Rejuvenation Res* 9, 117–125.
- Huang, T.L., P.P. Zandi, K.L. Tucker, A.L. Fitzpatrick, L.H. Kuller, L.P. Fried, G.L. Burke, et M.C. Carlson. 2005. Benefits of fatty fish on dementia risk are stronger for those without APOE epsilon4. *Neurology.* 65:1409–1414.
- Huang, Y., et L. Mucke. 2012. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell.* 148:1204–1222.
- Huang, Y., K.H. Weisgraber, L. Mucke, et R.W. Mahley. 2004. Apolipoprotein E: diversity of cellular origins, structural and biophysical properties, and effects in Alzheimer's disease. *J. Mol. Neurosci.* 23:189–204.
- Huang, Y.A., Zhou, B., Werning, M., Südhof, T.C. 2017. ApoE2, ApoE3, and ApoE4 differentially stimulate APP transcription and A β secretion. *Cell.* 168:427–441.
- Hunter, R., et I. Macalpine. 1982. Three Hundred years of Psychiatry: a history presented in selected English texts. Hartsdale.
- Hänninen, T., M. Hallikainen, S. Tuomainen, M. Vanhanen, et H. Soininen. 2002. Prevalence of mild cognitive impairment: a population-based study in elderly subjects. *Acta Neurol. Scand.* 106:148–154.
- Hye, A., Riddoch-Contreras, J., Baird, A.L., Ashton, N.J., Bazenet, C., Leung, R., Westman, E., Simmons, A., Dobson, R., Sattlecker, M., Lupton, M., Lunnon, K., Keohane, A., Ward, M., Pike, I., Zucht, H.D., Pepin, D., Zheng, W., Tunnicliffe, A., Richardson, J., Gauthier, S., Soininen, H., Kłoszewska, I., Mecocci, P., Tsolaki, M., Vellas, B., Lovestone, S., 2014. Plasma proteins predict conversion to dementia from prodromal disease. *Alzheimers Dement* 10, 799–807.

- Ihara, Y. 2001. PHF and PHF-like fibrils--cause or consequence? *Neurobiol. Aging*. 22:123–126.
- Ikonomovic, M.D., L. Wecker, E.E. Abrahamson, J. Wu, S.E. Counts, S.D. Ginsberg, E.J. Mufson, et S.T. Dekosky. 2009. Cortical alpha7 nicotinic acetylcholine receptor and beta-amyloid levels in early Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 66:646–651.
- Ishii, K.J., Akira, S., 2006. Innate immune recognition of, and regulation by, DNA. *Trends Immunol.* 27, 525–532.
- Itagaki, S., P.L. McGeer, et H. Akiyama. 1988. Presence of T-cytotoxic suppressor and leucocyte common antigen positive cells in Alzheimer's disease brain tissue. *Neurosci. Lett.* 91:259–264.
- Ittner, L.M., et J. Götz. 2011. Amyloid- β and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 12:65–72.
- Itzhaki, R.F., 2016. Herpes and Alzheimer's Disease: Subversion in the Central Nervous System and How It Might Be Halted. *J. Alzheimers Dis.* 54, 1273–1281.
- Iwatsubo, T. 2004. The gamma-secretase complex: machinery for intramembrane proteolysis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14:379–383.
- Jack, C.R., M.S. Albert, D.S. Knopman, G.M. McKhann, R.A. Sperling, M.C. Carrillo, B. Thies, et C.H. Phelps. 2011. Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 7:257–262.
- Jack, C.R., et D.M. Holtzman. 2013. Biomarker modeling of Alzheimer's disease. *Neuron.* 80:1347–1358.
- Jack, C.R., D.S. Knopman, W.J. Jagust, R.C. Petersen, M.W. Weiner, P.S. Aisen, L.M. Shaw, P. Vemuri, H.J. Wiste, S.D. Weigand, T.G. Lesnick, V.S. Pankratz, M.C. Donohue, et J.Q. Trojanowski. 2013. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurol.* 12:207–216.
- Jack, C.R., V.J. Lowe, S.D. Weigand, H.J. Wiste, M.L. Senjem, D.S. Knopman, M.M. Shiung, J.L. Gunter, B.F. Boeve, B.J. Kemp, M. Weiner, et R.C. Petersen. 2009. Serial PIB and MRI in normal, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: implications for sequence of pathological events in Alzheimer's disease. *Brain.* 132:1355–1365.
- Jack, C.R., Wiste, H.J., Knopman, D.S., Vemuri, P., Mielke, M.M., Weigand, S.D., Senjem, M.L., Gunter, J.L., Lowe, V., Gregg, B.E., Pankratz, V.S., Petersen, R.C., 2014. Rates of β -amyloid accumulation are independent of hippocampal neurodegeneration. *Neurology* 82, 1605–1612.

Jagust, W.J., et S.M. Landau. 2012. Apolipoprotein E, not fibrillar β -amyloid, reduces cerebral glucose metabolism in normal aging. *J. Neurosci.* 32:18227–18233.

Jakob-Roetne, R., et H. Jacobsen. 2009. Alzheimer's disease: from pathology to therapeutic approaches. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48:3030–3059.

Jarrett, J.T., E.P. Berger, et P.T. Lansbury. 1993. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry.* 32:4693–4697.

Jellinger, K.A. 2007. The enigma of mixed dementia. *Alzheimers Dement.* 3:40–53.

Jellinger, K.A., et J. Attems. 2007. Neuropathological evaluation of mixed dementia. *J. Neurol. Sci.* 257:80–87.

Jessen, F. 2014. Subjective and objective cognitive decline at the pre-dementia stage of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 264 Suppl 1:S3–S7.

Jiang, Q., M. Heneka, et G.E. Landreth. 2008. The role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) in Alzheimer's disease: therapeutic implications. *CNS Drugs.* 22:1–14.

Jiang, Y., Zhou, F., Tian, Y., Zhang, Z., Kuang, R., Liu, J., Han, X., Hu, Q., Xu, J., Shang, H., 2013. Higher NK cell IFN- γ production is associated with delayed HIV disease progression in LTNPs. *J. Clin. Immunol.* 33, 1376–1385.

Johanson, C.E., E.G. Stopa, et P.N. McMillan. 2011. The blood-cerebrospinal fluid barrier: structure and functional significance. *Methods Mol. Biol.* 686:101–131.

Johnson, K.A., N.C. Fox, R.A. Sperling, et W.E. Klunk. 2012. Brain imaging in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2:a006213:1–24.

Jorm, A. 2001. History of depression as a risk factor for dementia: an updated review. *Austr, New Zeal. J. Psychiatry* 35:776–781.

Jäger, A., et V.K. Kuchroo. 2010. Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scand. J. Immunol.* 72:173–184.

Kalaria, R.N. 2010. Vascular basis for brain degeneration: faltering controls and risk factors for dementia. *Nutr. Rev.* 68 Suppl 2:74–87.

Kalmijn, S., L.J. Launer, A. Ott, J.C. Witteman, A. Hofman, et M.M. Breteler. 1997. Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Ann. Neurol.* 42:776–782.

Kane, M.D., Lipinski, W.J., Callahan, M.J., Bian, F., Durham, R.A., Schwarz, R.D., Roher, A.E., Walker, L.C., 2000. Evidence for seeding of beta -amyloid by intracerebral infusion

of Alzheimer brain extracts in beta -amyloid precursor protein-transgenic mice. *J. Neurosci.* 20, 3606–3611.

Kang, J., H.G. Lemaire, A. Unterbeck, J.M. Salbaum, C.L. Masters, K.H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther, et B. Müller-Hill. 1987. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature.* 325:733–736.

Kang, J.-E.E., M.M. Lim, R.J. Bateman, J.J. Lee, L.P. Smyth, J.R. Cirrito, N. Fujiki, S. Nishino, et D.M. Holtzman. 2009. Amyloid-beta dynamics are regulated by orexin and the sleep-wake cycle. *Science.* 326:1005–1007.

Kang, J.H., et F. Grodstein. 2012. Postmenopausal hormone therapy, timing of initiation, APOE and cognitive decline. *Neurobiol. Aging.* 33:1129–1137.

Karp, Paillard-Borg, et Wang. 2006. Mental, physical and social components in leisure activities equally contribute to decrease dementia risk. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 21:65–73.

Kelley, B.J., et R.C. Petersen. 2007. Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurol Clin.* 25:577–609.

Kim, T., G.S. Vidal, M. Djurisic, C.M. William, M.E. Birnbaum, K.C. Garcia, B.T. Hyman, et C.J. Shatz. 2013. Human LirB2 is a β -amyloid receptor and its murine homolog PirB regulates synaptic plasticity in an Alzheimer's model. *Science* 341:1399–1404.

Kiniwa, Y., Miyahara, Y., Wang, H.Y., Peng, W., Peng, G., Wheeler, T.M., Thompson, T.C., Old, L.J., Wang, R.-F.F., 2007. CD8+ Foxp3+ regulatory T cells mediate immunosuppression in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 13, 6947–6958.

Kivipelto, M., E.L. Helkala, T. Hänninen, M.P. Laakso, M. Hallikainen, K. Alhainen, H. Soininen, J. Tuomilehto, et A. Nissinen. 2001. Midlife vascular risk factors and late-life mild cognitive impairment: A population-based study. *Neurology* 56:1683–1689.

Kivisäkk, P., Trebst, C., Liu, Z., Tucky, B.H., Sørensen, T.L., Rudick, R.A., Mack, M., Ransohoff, R.M., 2002. T-cells in the cerebrospinal fluid express a similar repertoire of inflammatory chemokine receptors in the absence or presence of CNS inflammation: implications for CNS trafficking. *Clin. Exp. Immunol.* 129, 510–518.

Kivisäkk, P., Mahad, D.J., Callahan, M.K., Trebst, C., Tucky, B., Wei, T., Wu, L., Baekkevold, E.S., Lassmann, H., Staugaitis, S.M., Campbell, J.J., Ransohoff, R.M., 2003. Human cerebrospinal fluid central memory CD4+ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 8389–8394.

Klein, C., E.-M.M. Kramer, A.-M.M. Cardine, B. Schraven, R. Brandt, et J. Trotter. 2002. Process outgrowth of oligodendrocytes is promoted by interaction of fyn kinase with the cytoskeletal protein tau. *J. Neurosci.* 22:698–707.

- Kline, K.A., Bowdish, D.M., 2016. Infection in an aging population. *Curr. Opin. Microbiol.* 29, 63–67.
- Knopman, D., L.L. Boland, T. Mosley, G. Howard, D. Liao, M. Szklo, P. McGovern, et A.R. Folsom. 2001. Cardiovascular risk factors and cognitive decline in middle-aged adults. *Neurology.* 56:42–48.
- Koo, E.H., et S.L. Squazzo. 1994. Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 269:17386–17389.
- Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, et V.K. Kuchroo. 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27:485–517.
- Kramer, A.F., K.I. Erickson, et S.J. Colcombe. 2006. Exercise, cognition, and the aging brain. *J. Appl. Physiol.* 101:1237–1242.
- Krueger, Wilson, et Kamenetsky. 2009. Social engagement and cognitive function in old age. *Exp. Aging. Res.* 35:45–60.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W.J., Peeper, D.S., 2010. The essence of senescence. *Genes Dev.* 24, 2463–2479.
- Kukull, Higdon, et Bowen. 2002. Dementia and Alzheimer disease incidence: a prospective cohort study. *Arch. Neurol.* 59:1737–1746.
- Kumar, V., et A. Sharma. 2010. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int. Immunopharmacol.* 10:1325–1334.
- Kurz, A., K. Altland, N. Lautenschlager, R. Zimmer, R. Busch, I. Gerundt, H. Lauter, et U. Müller. 1996. Apolipoprotein E type 4 allele and Alzheimer's disease: effect on age at onset and relative risk in different age groups. *J. Neurol.* 243:452–456.
- Lacor, P.N., M.C. Buniel, P.W. Furlow, A.S. Clemente, P.T. Velasco, M. Wood, K.L. Viola, et W.L. Klein. 2007. Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 27:796–807.
- LaFerla, F.M., K.N. Green, et S. Oddo. 2007. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 8:499–509.
- Lambert, J.C., C.A. Ibrahim-Verbaas, D. Harold, A.C. Naj, R. Sims, C. Bellenguez, A.L. DeStafano, J.C. Bis, G.W. Beecham, B. Grenier-Boley, G. Russo, T.A. Thorton-Wells, N. Jones, A.V. Smith, V. Chouraki, C. Thomas, M.A. Ikram, D. Zelenika, B.N. Vardarajan, Y. Kamatani, C.F. Lin, A. Gerrish, H. Schmidt, B. Kunkle, M.L. Dunstan, A. Ruiz, M.T. Bihoreau, S.H. Choi, C. Reitz, F. Pasquier, C. Cruchaga, D. Craig, N. Amin, C. Berr, O.L. Lopez, P.L. De Jager, V. Deramecourt, J.A. Johnston, D. Evans, S. Lovestone, L. Letenneur, F.J. Morón, D.C. Rubinsztein, G. Eiriksdottir, K. Sleegers, A.M. Goate, N.

Fiévet, M.W. Huentelman, M. Gill, K. Brown, M.I. Kamboh, L. Keller, P. Barberger-Gateau, B. McGuinness, E.B. Larson, R. Green, A.J. Myers, C. Dufouil, S. Todd, D. Wallon, S. Love, E. Rogaeva, J. Gallacher, P. St George-Hyslop, J. Clarimon, A. Lleo, A. Bayer, D.W. Tsuang, L. Yu, M. Tsolaki, P. Bossù, G. Spalletta, P. Proitsi, J. Collinge, S. Sorbi, F. Sanchez-Garcia, N.C. Fox, J. Hardy, M.C. Deniz Naranjo, P. Bosco, R. Clarke, C. Brayne, D. Galimberti, M. Mancuso, F. Matthews, S. Moebus, P. Mecocci, M. Del Zompo, W. Maier, H. Hampel, A. Pilotto, M. Bullido, F. Panza, P. Caffarra, B. Nacmias, et J.R. Gilbert. 2013. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 45:1452–1458.

Langmann, T., 2007. Microglia activation in retinal degeneration. *J. Leukoc. Biol.* 81, 1345–1351.

Larbi, A., G. Pawelec, J.M. Witkowski, H.M. Schipper, E. Derhovanessian, D. Goldeck, et T. Fulop. 2009. Dramatic shifts in circulating CD4 but not CD8 T cell subsets in mild Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 17:91–103.

Launer, L.J., G.W. Ross, H. Petrovitch, K. Masaki, D. Foley, L.R. White, et R.J. Havlik. 2000. Midlife blood pressure and dementia: the Honolulu-Asia aging study. *Neurobiol. Aging.* 21:49–55.

Laurin, D., K.H. Masaki, D.J. Foley, L.R. White, et L.J. Launer. 2004. Midlife dietary intake of antioxidants and risk of late-life incident dementia: the Honolulu-Asia Aging Study. *Am. J. Epidemiol.* 159:959–967.

Lautenschlager, N.T., K.L. Cox, L. Flicker, J.K. Foster, F.M. van Bockxmeer, J. Xiao, K.R. Greenop, et O.P. Almeida. 2008. Effect of physical activity on cognitive function in older adults at risk for Alzheimer disease: a randomized trial. *J. Amer. Med. Assoc.* 300:1027–1037.

Lautenschlager, N.T., L.A. Cupples, V.S. Rao, S.A. Auerbach, R. Becker, J. Burke, H. Chui, R. Duara, E.J. Foley, S.L. Glatt, R.C. Green, R. Jones, H. Karlinsky, W.A. Kukull, A. Kurz, E.B. Larson, K. Martelli, A.D. Sadovnick, L. Volicer, S.C. Waring, J.H. Growdon, et L.A. Farrer. 1996. Risk of dementia among relatives of Alzheimer's disease patients in the MIRAGE study: What is in store for the oldest old? *Neurology.* 46:641–650.

Lee, Balin, Otvos, et Trojanowski. 1991. A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science.* 251:675–678.

Lee, V.M., M. Goedert, et J.Q. Trojanowski. 2001. Neurodegenerative tauopathies. *Annu. Rev. Neurosci.* 24:1121–1159.

Lee, J.S., Ward, W.O., Ren, H., Vallanat, B., Darlington, G.J., Han, E.-S.S., Laguna, J.C., DeFord, J.H., Papaconstantinou, J., Selman, C., Corton, J.C., 2012. Meta-analysis of gene expression in the mouse liver reveals biomarkers associated with inflammation increased early during aging. *Mech. Ageing Dev.* 133, 467–478.

Leibson, C.L., W.A. Rocca, V.A. Hanson, R. Cha, E. Kokmen, P.C. O'Brien, et P.J. Palumbo. 1997. The risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 826:422–427.

Liu, K., Gandhi, R., Chen, J., Zhang, S., 2012. Bivalent ligands targeting multiple pathological factors involved in Alzheimer's disease. *ACS Med Chem Lett* 3, 942–946.

Littman, D.R., et A.Y. Rudensky. 2010. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell.* 140:845–858.

Loef, M., et H. Walach. 2013. Midlife obesity and dementia: meta-analysis and adjusted forecast of dementia prevalence in the United States and China. *Obesity (Silver Spring).* 21:51–55.

Lopez, O.L., W.J. Jagust, S.T. DeKosky, J.T. Becker, A. Fitzpatrick, C. Dulberg, J. Breitner, C. Lyketsos, B. Jones, C. Kawas, M. Carlson, et L.H. Kuller. 2003. Prevalence and classification of mild cognitive impairment in the Cardiovascular Health Study Cognition Study: part 1. *Arch. Neurol.* 60:1385–1389.

López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., Kroemer, G., 2013. The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194–1217.

Lourida, Soni, Thompson-Coon, et Purandare. 2013. Mediterranean diet, cognitive function, and dementia: a systematic review. *Epidemiology.* 24:479–489.

Loy, C.T., P.R. Schofield, A.M. Turner, et J.B. Kwok. 2014. Genetics of dementia. *Lancet.* 383:828–840.

Lozano, M.L., Rivera, J., Sánchez-Guiu, I., Vicente, V., 2014. Towards the targeted management of Chediak-Higashi syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 9, 132.

Luchsinger, J.A., M.-X.X. Tang, S. Shea, et R. Mayeux. 2003. Antioxidant vitamin intake and risk of Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 60:203–208.

Luchsinger, J.A., M.X. Tang, Y. Stern, S. Shea, et R. Mayeux. 2001. Diabetes mellitus and risk of Alzheimer's disease and dementia with stroke in a multiethnic cohort. *Am. J. Epidemiol.* 154:635–641.

Lue, L.-F.F., Y.-M.M. Kuo, T. Beach, et D.G. Walker. 2010. Microglia activation and anti-inflammatory regulation in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 41:115–128.

Lye, T.C., et E.A. Shores. 2000. Traumatic brain injury as a risk factor for Alzheimer's disease: a review. *Neuropsychol Rev.* 10:115–129.

Lyons, A., Murphy, K.J., Clarke, R., Lynch, M.A., 2011. Atorvastatin prevents age-related and amyloid- β -induced microglial activation by blocking interferon- γ release from natural killer cells in the brain. *J Neuroinflammation* 8, 27:1–10.

- L'Italien, R., et H. Lord Dubé. 1998. *Hématologie*. 2nd ed. Montréal. Le Griffon d'argile.
- Maelicke, A., M. Samochocki, R. Jostock, A. Fehrenbacher, J. Ludwig, E.X. Albuquerque, et M. Zerlin. 2001. Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry*. 49:279–288.
- Maezawa, I., H.-S.S. Hong, R. Liu, C.-Y.Y. Wu, R.H. Cheng, M.-P.P. Kung, H.F. Kung, K.S. Lam, S. Oddo, F.M. Laferla, et L.-W.W. Jin. 2008. Congo red and thioflavin-T analogs detect Abeta oligomers. *J. Neurochem*. 104:457–468.
- Magalhães, J.P.P. de, Curado, J., Church, G.M., 2009. Meta-analysis of age-related gene expression profiles identifies common signatures of aging. *Bioinformatics* 25, 875–81.
- Mathur, S.K., Schwantes, E.A., Jarjour, N.N., Busse, W.W., 2008. Age-related changes in eosinophil function in human subjects. *Chest* 133, 412–419.
- Mantovani, A., M.A. Cassatella, C. Costantini, et S. Jaillon. 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 11:519–531.
- Marcoa, D., Marzoa, Munoz-Ruizb, et Ikramc. 2014. Modifiable lifestyle factors in dementia: A systematic review of longitudinal observational cohort studies. *J. Alzheimer Dis.* 42:119–135.
- Martins, I.J., T. Berger, M.J. Sharman, G. Verdile, S.J. Fuller, et R.N. Martins. 2009. Cholesterol metabolism and transport in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 111:1275–1308.
- Masaki, K.H., K.G. Losonczy, G. Izmirlian, D.J. Foley, G.W. Ross, H. Petrovitch, R. Havlik, et L.R. White. 2000. Association of vitamin E and C supplement use with cognitive function and dementia in elderly men. *Neurology*. 54:1265–1272.
- Masoumi, A., B. Goldenson, S. Ghirmai, H. Avagyan, J. Zaghi, K. Abel, X. Zheng, A. Espinosa-Jeffrey, M. Mahanian, P.T. Liu, M. Hewison, M. Mizwickie, J. Cashman, et M. Fiala. 2009. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 interacts with curcuminoids to stimulate amyloid-beta clearance by macrophages of Alzheimer's disease patients. *J. Alzheimers Dis.* 17:703–717.
- Massoud, F., et G.C. Léger. 2011. Pharmacological treatment of Alzheimer disease. *Can J Psychiatry*. 56:579–588.
- Matsuo, K., Lin, A., Procter, J.L., Clement, L., Stroncek, D., 2000. Variations in the expression of granulocyte antigen NB1. *Transfusion* 40, 654–662.
- McDowell, Xi, et Lindsay. 2007. Mapping the connections between education and dementia. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 29:127–141.

McGuinness, B., S. Todd, A.P. Passmore, et R. Bullock. 2008. Systematic review: Blood pressure lowering in patients without prior cerebrovascular disease for prevention of cognitive impairment and dementia. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 79:4–5.

McKhann, G., D. Drachman, M. Folstein, R. Katzman, D. Price, et E.M. Stadlan. 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology.* 34:939–944.

McLean, C.A., R.A. Cherny, F.W. Fraser, S.J. Fuller, M.J. Smith, K. Beyreuther, A.I. Bush, et C.L. Masters. 1999. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 46:860–866.

McMenamin, P.G., 1999. Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholemount preparations. *J. Comp. Neurol.* 405, 553–562.

McNamara, J., Murray, T.A., 2016. Connections Between Herpes Simplex Virus Type 1 and Alzheimer's Disease Pathogenesis. *Curr Alzheimer Res* 13, 996–1005.

Meda, L., M.A. Cassatella, G.I. Szendrei, L. Otvos, P. Baron, M. Villalba, D. Ferrari, et F. Rossi. 1995. Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature.* 374:647–650.

Medawar, P.B. 1948. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol.* 29:58–69.

Mennicken, F., R. Maki, E.B. de Souza, et R. Quirion. 1999. Chemokines and chemokine receptors in the CNS: a possible role in neuroinflammation and patterning. *Trends Pharmacol. Sci.* 20:73–78.

Merlo, S., S. Spampinato, P.L. Canonico, A. Copani, et M.A. Sortino. 2010. Alzheimer's disease: brain expression of a metabolic disorder? *Trends Endocrinol. Metab.* 21:537–544.

Meyer-Luehmann, M., Coomaraswamy, J., Bolmont, T., Kaeser, S., Schaefer, C., Kilger, E., Neuenschwander, A., Abramowski, D., Frey, P., Jaton, A.L., Vigouret, J.-M.M., Paganetti, P., Walsh, D.M., Mathews, P.M., Ghiso, J., Staufenbiel, M., Walker, L.C., Jucker, M., 2006. Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science* 313, 1781–1784.

Miklossy, J. 2011. Emerging roles of pathogens in Alzheimer disease. *Expert Rev Mol Med.* 13:e30:1–34.

Miller, C.C., D.M. McLoughlin, K.-F.F. Lau, M.E. Tennant, et B. Rogelj. 2006. The X11 proteins, Abeta production and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 29:280–285.

Min, D., Panoskaltis-Mortari, A., Kuro-O, M., Holländer, G.A., Blazar, B.R., Weinberg, K.I., 2007. Sustained thymopoiesis and improvement in functional immunity induced by exogenous KGF administration in murine models of aging. *Blood* 109, 2529–2537.

Mitri, D. Di, Azevedo, R.I., Henson, S.M., Libri, V., Riddell, N.E., Macaulay, R., Kipling, D., Soares, M.V., Battistini, L., Akbar, A.N., 2011. Reversible senescence in human CD4+CD45RA+CD27- memory T cells. *J. Immunol.* 187, 2093–2100.

Morris, G.P., I.A. Clark, et B. Vissel. 2014. Inconsistencies and controversies surrounding the amyloid hypothesis of Alzheimer’s disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2:135.

Morris, J., M. Storandt, P. Miller, D. McKeel, J. Price, E. Rubin, et L. Berg. 2001. Mild Cognitive Impairment Represents Early-Stage Alzheimer Disease. *Archives of Neurology.* 58:397–405.

Morris, M., S. Maeda, K. Vossel, et L. Mucke. 2011. The many faces of tau. *Neuron.* 70:410–426.

Morris, M.C., D.A. Evans, J.L. Bienias, C.C. Tangney, D.A. Bennett, N. Aggarwal, R.S. Wilson, et P.A. Scherr. 2002. Dietary intake of antioxidant nutrients and the risk of incident Alzheimer disease in a biracial community study. *J. Amer. Med. Assoc.* 287:3230–3237.

Motta, M., Imbesi, R., Rosa, M. Di, Stivala, F., Malaguarnera, L., 2007. Altered plasma cytokine levels in Alzheimer’s disease: correlation with the disease progression. *Immunol. Lett.* 114, 46–51.

Murman, D.L., N.L. Foster, S.P. Kilgore, C.A. McDonagh, et J.K. Fink. 1996. Apolipoprotein E and Alzheimer’s disease: strength of association is related to age at onset. *Dementia.* 7:251–255.

Murphy, K. 2011. *Janeway’s Immunobiology.* 8th ed. Garland Science.

Musiek, E.S., et D.M. Holtzman. 2015. Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and “wingmen”. *Nat. Neurosci.* 18:800–806.

Muttrux, S. 1953. Study of the anatomico clinical correlations between degenerative and arteriosclerotic dementia. *Mschr. Psychiat. Neurol.* 125:19–38.

Nasi, M., Troiano, L., Lugli, E., Pinti, M., Ferraresi, R., Monterastelli, E., Mussi, C., Salvioli, G., Franceschi, C., Cossarizza, A., 2006. Thymic output and functionality of the IL-7/IL-7 receptor system in centenarians: implications for the neolymphogenesis at the limit of human life. *Aging Cell* 5, 167–175.

Nasreddine, Z.S., N.A. Phillips, V. Bédirian, S. Charbonneau, V. Whitehead, I. Collin, J.L. Cummings, et H. Chertkow. 2005. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *J Am Geriatr Soc.* 53:695–699.

- Nelson, P.T., Braak, H., Markesbery, W.R., 2009. Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer disease: a complex but coherent relationship. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68:1–14.
- Neumann, H., Misgeld, T., Matsumuro, K., Wekerle, H., 1998. Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:5779–5784.
- Ness, S., M. Rafii, P. Aisen, M. Krams, W. Silverman, et H. Manji. 2012. Down's syndrome and Alzheimer's disease: towards secondary prevention. *Nat Rev Drug Discov.* 11:655–656.
- Ninomiya, T., T. Ohara, Y. Hirakawa, D. Yoshida, Y. Doi, J. Hata, S. Kanba, T. Iwaki, et Y. Kiyohara. 2011. Midlife and late-life blood pressure and dementia in Japanese elderly: the Hisayama study. *Hypertension.* 58:22–28.
- Nobori, S., Shimizu, A., Okumi, M., Samelson-Jones, E., Griesemer, A., Hirakata, A., Sachs, D.H., Yamada, K., 2006. Thymic rejuvenation and the induction of tolerance by adult thymic grafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:19081–19086.
- Nonaka, T., Watanabe, S.T., Iwatsubo, T., Hasegawa, M., 2010. Seeded aggregation and toxicity of {alpha}-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *J. Biol. Chem.* 285:34885–34898.
- Nordberg, A., S.F. Carter, J. Rinne, A. Drzezga, D.J. Brooks, R. Vandenberghe, D. Perani, A. Forsberg, B. Långström, N. Scheinin, M. Karrasch, K. Någren, T. Grimmer, I. Miederer, P. Edison, A. Okello, K. Van Laere, N. Nelissen, M. Vandenbulcke, V. Garibotto, O. Almkvist, E. Kalbe, R. Hinz, et K. Herholz. 2013. A European multicentre PET study of fibrillar amyloid in Alzheimer's disease. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 40:104–114.
- Nukina, N., et Y. Ihara. 1986. One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. *J. Biochem.* 99:1541–1544.
- Nunomura, A., R.J. Castellani, X. Zhu, P.I. Moreira, G. Perry, et M.A. Smith. 2006. Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65:631–641.
- Ohara, T., T. Ninomiya, J. Hata, M. Ozawa, D. Yoshida, N. Mukai, M. Nagata, T. Iwaki, T. Kitazono, S. Kanba, et Y. Kiyohara. 2015. Midlife and Late-Life Smoking and Risk of Dementia in the Community: The Hisayama Study. *J Am Geriatr Soc.* 63:2332–2339.
- Ott, A., R.P. Stolk, F. van Harskamp, H.A. Pols, A. Hofman, et M.M. Breteler. 1999. Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology.* 53:1937–1942.
- Ousman, S.S., Kubes, P., 2012. Immune surveillance in the central nervous system. *Nat. Neurosci.* 15:1096–1101.

- O'Brien, J.T., T. Erkinjuntti, B. Reisberg, G. Roman, T. Sawada, L. Pantoni, J.V. Bowler, C. Ballard, C. DeCarli, P.B. Gorelick, K. Rockwood, A. Burns, S. Gauthier, et S.T. DeKosky. 2003. Vascular cognitive impairment. *Lancet Neurol.* 2:89–98.
- Palop, J.J., et L. Mucke. 2010. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat. Neurosci.* 13:812–818.
- Panda, A., Arjona, A., Sapey, E., Bai, F., Fikrig, E., Montgomery, R.R., Lord, J.M., Shaw, A.C., 2009. Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends Immunol.* 30:325–333.
- Panza, F., C. Capurso, A. D'Introno, A.M. Colacicco, A. Zenzola, R. Menga, G. Pistoia, A. Santamato, E. Scafato, C. Gandin, A. Capurso, et V. Solfrizzi. 2008. Impact of depressive symptoms on the rate of progression to dementia in patients affected by mild cognitive impairment. The Italian Longitudinal Study on Aging. *Int J Geriatr Psychiatry.* 23:726–734.
- Papatriantafyllou, M. 2013. Immunotherapy: immunological bullets against Alzheimer's disease. *Nat Rev Drug Discov.* 12:24.
- Paradis, E., S. Clavel, P. Julien, M.R. Murthy, F. de Bilbao, D. Arsenijevic, P. Giannakopoulos, P. Vallet, et D. Richard. 2004. Lipoprotein lipase and endothelial lipase expression in mouse brain: regional distribution and selective induction following kainic acid-induced lesion and focal cerebral ischemia. *Neurobiol. Dis.* 15:312–325.
- Pasinetti, G.M. 2002. From epidemiology to therapeutic trials with anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease: the role of NSAIDs and cyclooxygenase in beta-amyloidosis and clinical dementia. *J. Alzheimers Dis.* 4:435–445.
- Patil, S., et C. Chan. 2005. Palmitic and stearic fatty acids induce Alzheimer-like hyperphosphorylation of tau in primary rat cortical neurons. *Neurosci. Lett.* 384:288–293.
- Paul, S., S. Planque, et Y. Nishiyama. 2010. Immunological origin and functional properties of catalytic autoantibodies to amyloid beta peptide. *J. Clin. Immunol.* 30 Suppl 1:43–49.
- Pawelec, G., Larbi, A., 2008. Immunity and ageing in man: Annual Review 2006/2007. *Exp. Gerontol.* 43:34–38.
- Pearson, H.A., Peers, C., 2006. Physiological roles for amyloid beta peptides. *J. Physiol. (Lond.)* 575:5–10.
- Pellicanò, M., A. Larbi, D. Goldeck, G. Colonna-Romano, S. Buffa, M. Bulati, G. Rubino, F. Iemolo, G. Candore, C. Caruso, E. Derhovanessian, et G. Pawelec. 2012. Immune profiling of Alzheimer patients. *J. Neuroimmunol.* 242:52–59.

Pendlebury, S.T., et P.M. Rothwell. 2009. Prevalence, incidence, and factors associated with pre-stroke and post-stroke dementia: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* 8:1006–1018.

Perez, R.G., S. Soriano, J.D. Hayes, B. Ostaszewski, W. Xia, D.J. Selkoe, X. Chen, G.B. Stokin, et E.H. Koo. 1999. Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including A β 42. *J. Biol. Chem.* 274:18851–18856.

Perry, V.H., et C. Holmes. 2014. Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol.* 10:217–224.

Perry, V.H., J.A. Nicoll, et C. Holmes. 2010. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol.* 6:193–201.

Petersen, R.C., G.E. Smith, S.C. Waring, R.J. Ivnik, E.G. Tangalos, et E. Kokmen. 1999. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch. Neurol.* 56:303–308.

Petersen, R.C., J.C. Stevens, M. Ganguli, E.G. Tangalos, J.L. Cummings, et S.T. DeKosky. 2001. Practice parameter: early detection of dementia: mild cognitive impairment (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology.* 56:1133–1142.

Plassman, B.L., R.J. Havlik, D.C. Steffens, M.J. Helms, T.N. Newman, D. Drosdick, C. Phillips, B.A. Gau, K.A. Welsh-Bohmer, J.R. Burke, J.M. Guralnik, et J.C. Breitner. 2000. Documented head injury in early adulthood and risk of Alzheimer's disease and other dementias. *Neurology.* 55:1158–1166.

Podlisny, M.B., Tolan, D.R., Selkoe, D.J., 1991. Homology of the amyloid beta protein precursor in monkey and human supports a primate model for beta amyloidosis in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 138:1423–1435.

Posner, H.B., M.-X.X. Tang, J. Luchsinger, R. Lantigua, Y. Stern, et R. Mayeux. 2002. The relationship of hypertension in the elderly to AD, vascular dementia, and cognitive function. *Neurology.* 58:1175–1181.

Prince, M., et J. Jackson. 2009. World Alzheimer report. Alzheimer's Disease International (ADI).

Prince, M., A. Wimo, M. Guerchet, G.-C. Ali, Y.-T. Wu, et M. Prina. 2015. The Global Impact of Dementia. Alzheimer's Disease International (ADI).

Profenno, L.A., A.P. Porsteinsson, et S.V. Faraone. 2010. Meta-analysis of Alzheimer's disease risk with obesity, diabetes, and related disorders. *Biol. Psychiatry.* 67:505–512.

Puzzo, D., L. Privitera, M. Fa', A. Staniszewski, G. Hashimoto, F. Aziz, M. Sakurai, E.M. Ribe, C.M. Troy, M. Mercken, S.S. Jung, A. Palmeri, et O. Arancio. 2011. Endogenous amyloid- β is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Ann. Neurol.* 69:819–830.

Querfurth, H.W., et F.M. LaFerla. 2010. Alzheimer's disease. *New Engl. J. Med.* 362:329–344.

Raber, J., Y. Huang, et J.W. Ashford. 2004. ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiol. Aging.* 25:641–650.

Rafii, M.S., et P.S. Aisen. 2009. Recent developments in Alzheimer's disease therapeutics. *BMC Med.* 7:7.

Rawji, K.S., Mishra, M.K., Michaels, N.J., Rivest, S., Stys, P.K., Yong, V.W., 2016. Immunosenescence of microglia and macrophages: impact on the ageing central nervous system. *Brain* 139, 653–661.

Razay, G., G. Raza, et A. Vreugdenhil. 2005. Obesity in middle age and future risk of dementia: midlife obesity increases risk of future dementia. *British Medical Journal.* 331:455; author reply 455.

Reboldi, A., Coisne, C., Baumjohann, D., Benvenuto, F., Bottinelli, D., Lira, S., Uccelli, A., Lanzavecchia, A., Engelhardt, B., Sallusto, F., 2009. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat. Immunol.* 10, 514–523.

Reiman, E.M., Y.T. Quiroz, A.S. Fleisher, K. Chen, C. Velez-Pardo, M. Jimenez-Del-Rio, A.M. Fagan, A.R. Shah, S. Alvarez, A. Arbelaez, M. Giraldo, N. Acosta-Baena, R.A. Sperling, B. Dickerson, C.E. Stern, V. Tirado, C. Munoz, R.A. Reiman, M.J. Huentelman, G.E. Alexander, J.B. Langbaum, K.S. Kosik, P.N. Tariot, et F. Lopera. 2012. Brain imaging and fluid biomarker analysis in young adults at genetic risk for autosomal dominant Alzheimer's disease in the presenilin 1 E280A kindred: a case-control study. *Lancet Neurol.* 11:1048–1056.

Reisberg, B., L. Prichep, L. Mosconi, E.R. John, L. Glodzik-Sobanska, I. Boksay, I. Monteiro, C. Torossian, A. Vedvyas, N. Ashraf, I.A. Jamil, et M.J. de Leon. 2008. The pre-mild cognitive impairment, subjective cognitive impairment stage of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 4:98–108.

Reitz, C., C. Brayne, et R. Mayeux. 2011. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 7:137–152.

Richartz-Salzbürger, E., A. Batra, E. Stransky, C. Laske, N. Köhler, M. Bartels, G. Buchkremer, et K. Schott. 2007. Altered lymphocyte distribution in Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res.* 41:174–178.

Riddell, D.R., G. Christie, I. Hussain, et C. Dingwall. 2001. Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts. *Curr. Biol.* 11:1288–1293.

Ridley, R.M., Baker, H.F., Windle, C.P., Cummings, R.M., 2006. Very long term studies of the seeding of beta-amyloidosis in primates. *J Neural Transm (Vienna)* 113, 1243–1251.

Risner, M.E., A.M. Saunders, J.F. Altman, G.C. Ormandy, S. Craft, I.M. Foley, M.E. Zvartau-Hind, D.A. Hosford, and A.D. Roses. 2006. Efficacy of rosiglitazone in a genetically defined population with mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Pharmacogenomics J.* 6:246–254.

Roberts, Cerhan, et Geda. 2010. Polyunsaturated fatty acids and reduced odds of MCI: the Mayo Clinic Study of Aging. *J. Alzheimer. Dis.* 21:853–865.

Roberts, R.O., Y.E. Geda, D.S. Knopman, R.H. Cha, V.S. Pankratz, B.F. Boeve, R.J. Ivnik, E.G. Tangalos, R.C. Petersen, et W.A. Rocca. 2008. The Mayo Clinic Study of Aging: design and sampling, participation, baseline measures and sample characteristics. *Neuroepidemiology.* 30:58–69.

Roe, C.M., Xiong C., Miller J.P., et J.C. Morris. 2007. Education and Alzheimer disease without dementia support for the cognitive reserve hypothesis. *Neurology.* 68:223–228.

Rogers, J., J. Lubner-Narod, S.D. Styren, et W.H. Civin. 1988. Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: relationship to the pathology of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 9:339–349.

Roher, A.E., C. Esh, A. Rahman, T.A. Kokjohn, et T.G. Beach. 2004. Atherosclerosis of cerebral arteries in Alzheimer disease. *Stroke.* 35:2623–2627.

Rovio, S., I. Kåreholt, E.-L.L. Helkala, M. Viitanen, B. Winblad, J. Tuomilehto, H. Soininen, A. Nissinen, et M. Kivipelto. 2005. Leisure-time physical activity at midlife and the risk of dementia and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 4:705–711.

Rubio-Perez, J.M., et J.M. Morillas-Ruiz. 2012. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *Scientific World Journal.* 756357:1–15.

Rönnekaa, E., B. Zethelius, L. Lannfelt, et L. Kilander. 2011. Vascular risk factors and dementia: 40-year follow-up of a population-based cohort. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 31:460–466.

Saczynski, J.S., A. Beiser, S. Seshadri, S. Auerbach, P.A. Wolf, et R. Au. 2010. Depressive symptoms and risk of dementia: the Framingham Heart Study. *Neurology.* 75:35–41.

Saczynski, Pfeifer, et Masaki. 2006. The effect of social engagement on incident dementia The Honolulu-Asia Aging Study. *Am. J. Epidemiol.* 163:433–440.

- Saitoh, T., M. Sundsmo, J.M. Roch, N. Kimura, G. Cole, D. Schubert, T. Oltersdorf, et D.B. Schenk. 1989. Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell*. 58:615–622.
- Sakaguchi, S., 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* 6, 345–352.
- Sallusto, F., C.E. Zielinski, et A. Lanzavecchia. 2012. Human Th17 subsets. *Eur. J. Immunol.* 42:2215–2220.
- Salminen, A., Huuskonen, J., Ojala, J., Kauppinen, A., Kaarniranta, K., Suuronen, T., 2008. Activation of innate immunity system during aging: NF-kB signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. *Ageing Res. Rev.* 7, 83–105.
- Salminen, A., Kaarniranta, K., Kauppinen, A., 2012. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging (Albany NY)* 4, 166–175.
- Samorajski, T., 1976. How the human brain responds to aging. *J Am Geriatr Soc* 24, 4–11.
- Sando S.B., Melquist S., Cannon A., Hutton M., Sletvold O., Saltvedt I., White L.R., Lydersen S., et J. Aasly. 2008. Risk-reducing effect of education in Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr Psychiatry.* 23:1156–1162.
- Sastre, M., I. Dewachter, S. Rossner, N. Bogdanovic, E. Rosen, P. Borghgraef, B.O. Evert, L. Dumitrescu-Ozimek, D.R. Thal, G. Landreth, J. Walter, T. Klockgether, F. van Leuven, et M.T. Heneka. 2006. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs repress beta-secretase gene promoter activity by the activation of PPARgamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:443–448.
- Sato, T., H. Hanyu, K. Hirao, H. Kanetaka, H. Sakurai, et T. Iwamoto. 2011. Efficacy of PPAR- γ agonist pioglitazone in mild Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging* 32:1626–1633.
- Savage, M.J., Iqbal, Loh, Trusko, S.P., Scott, Siman, 1994. Cathepsin G: Localization in human cerebral cortex and generation of amyloidogenic fragments from the β -amyloid precursor protein. *Neuroscience* 60, 607–619.
- Savva, G.M., et B.C. Stephan. 2010. Epidemiological studies of the effect of stroke on incident dementia: a systematic review. *Stroke* 41:41–46.
- Scarmeas, N., G. Levy, M.X. Tang, J. Manly, et Y. Stern. 2001. Influence of leisure activity on the incidence of Alzheimer's disease. *Neurology.* 57:2236–2242.
- Schaefer, E.J., V. Bongard, A.S. Beiser, S. Lamon-Fava, S.J. Robins, R. Au, K.L. Tucker, D.J. Kyle, P.W. Wilson, et P.A. Wolf. 2006. Plasma phosphatidylcholine docosahexaenoic acid content and risk of dementia and Alzheimer disease: the Framingham Heart Study. *Arch. Neurol.* 63:1545–1550.

Scheuner, D., C. Eckman, M. Jensen, X. Song, M. Citron, N. Suzuki, T.D. Bird, J. Hardy, M. Hutton, W. Kukull, E. Larson, E. Levy-Lahad, M. Viitanen, E. Peskind, P. Poorkaj, G. Schellenberg, R. Tanzi, W. Wasco, L. Lannfelt, D. Selkoe, et S. Younkin. 1996. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 2:864–870.

Schmidtke, K., et S. Hermeneit. 2008. High rate of conversion to Alzheimer's disease in a cohort of amnesic MCI patients. *Int Psychogeriatr.* 20:96–108.

Schneider, J.A., Z. Arvanitakis, W. Bang, et D.A. Bennett. 2007. Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons. *Neurology.* 69:2197–2204.

Scholtzova, H., Kasczak, R.J., Bates, K.A., Boutajangout, A., Kerr, D.J., Meeker, H.C., Mehta, P.D., Spinner, D.S., Wisniewski, T., 2009. Induction of toll-like receptor 9 signaling as a method for ameliorating Alzheimer's disease-related pathology. *J. Neurosci.* 29:1846–1854.

Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E., Pollard, J.W., Frampton, J., Liu, K.J., Geissmann, F., 2012. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336:86–90.

Sedel, Frédéric, et O. Lyon-Caen. 2010. *Le cerveau pour les nuls*. First-Gründ.

Selkoe, D. 2011. Alzheimer's Disease. *Cold Spr, Harbor Persp, Biol.* 3:1–17.

Selkoe, D.J., et M.S. Wolfe. 2007. Presenilin: running with scissors in the membrane. *Cell.* 131:215–221.

Serrano-Pozo, A., M.P. Frosch, E. Masliah, et B.T. Hyman. 2011. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1:1–24.

Seshadri, S., A. Beiser, M. Kelly-Hayes, C. Kase, R. Au, W. Kannel, et P. Wolf. 2006. The Lifetime Risk of Stroke Estimates From the Framingham Study. *Stroke* 37:345–350.

Shah, N.S., J.-S.S. Vidal, K. Masaki, H. Petrovitch, G.W. Ross, C. Tilley, R.B. DeMattos, R.P. Tracy, L.R. White, et L.J. Launer. 2012. Midlife blood pressure, plasma β -amyloid, and the risk for Alzheimer disease: the Honolulu Asia Aging Study. *Hypertension.* 59:780–786.

Shankar, G.M., B.L. Bloodgood, M. Townsend, D.M. Walsh, D.J. Selkoe, et B.L. Sabatini. 2007. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J. Neurosci.* 27:2866–2875.

Shankar, G.M., S. Li, T.H. Mehta, A. Garcia-Munoz, N.E. Shepardson, I. Smith, F.M. Brett, M.A. Farrell, M.J. Rowan, C.A. Lemere, C.M. Regan, D.M. Walsh, B.L. Sabatini, et D.J. Selkoe. 2008. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* 14:837–842.

Sharp E.S., Reynolds C.A., Pedersen N.L., et M. Gatz. 2010. Cognitive engagement and cognitive aging: is openness protective? *Psychol. Aging.* 25:60–73.

Shevach, E.M., 2009. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30, 636–645.

Shrikant, P., Benveniste, E.N., 1996. The central nervous system as an immunocompetent organ: role of glial cells in antigen presentation. *J. Immunol.* 157, 1819–1822.

Simard, A.R., D. Soulet, G. Gowing, J.-P.P. Julien, et S. Rivest. 2006. Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron.* 49:489–502.

Simpson, E. 2006. A historical perspective on immunological privilege. *Immunol. Rev.* 213:12–22.

Sisodia, S.S. 1992. Secretion of the beta-amyloid precursor protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 674:53–57.

Solana, R., Campos, C., Pera, A., Tarazona, R., 2014. Shaping of NK cell subsets by aging. *Curr. Opin. Immunol.* 29, 56–61.

Solana, R., Tarazona, R., Gayoso, I., Lesur, O., Dupuis, G., Fulop, T., 2012. Innate immunosenescence: effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans. *Semin. Immunol.* 24, 331–341.

Solerte, S.B., Fioravanti, M., Severgnini, S., Pezza, N., Locatelli, M., Cerutti, N., Terenzi, F., Ferrari, E., 1997. Excitatory pattern of gamma-interferon on natural killer cell activity in senile dementia of the Alzheimer type. *Dement Geriatr Cogn Disord* 8, 308–313.

Skoog, I., B. Lernfelt, S. Landahl, B. Palmertz, L.A. Andreasson, L. Nilsson, G. Persson, A. Odén, et A. Svanborg. 1996. 15-year longitudinal study of blood pressure and dementia. *Lancet* 347:1141–1145.

Small, G.W., P.V. Rabins, P.P. Barry, N.S. Buckholtz, S.T. DeKosky, S.H. Ferris, S.I. Finkel, L.P. Gwyther, Z.S. Khachaturian, B.D. Lebowitz, T.D. McRae, J.C. Morris, F. Oakley, L.S. Schneider, J.E. Streim, T. Sunderland, L.A. Teri, et L.E. Tune. 1997. Diagnosis and treatment of Alzheimer disease and related disorders. Consensus statement of the American Association for Geriatric Psychiatry, the Alzheimer's Association, and the American Geriatrics Society. *J. Amer. Med. Assoc.* 278:1363–1371.

Smith, C.C., L. Stanyer, D.J. Betteridge, et M.B. Cooper. 2007. Native and oxidized low-density lipoproteins modulate the vasoactive actions of soluble beta-amyloid peptides in rat aorta. *Clin. Sci.* 113:427–434.

Solfrizzi, V., A.M. Colacicco, A. D'Introno, C. Capurso, F. Torres, C. Rizzo, A. Capurso, et F. Panza. 2006. Dietary intake of unsaturated fatty acids and age-related cognitive decline: a 8.5-year follow-up of the Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurobiol. Aging.* 27:1694–1704.

Soscia, S.J., J.E. Kirby, K.J. Washicosky, S.M. Tucker, M. Ingelsson, B. Hyman, M.A. Burton, L.E. Goldstein, S. Duong, R.E. Tanzi, et R.D. Moir. 2010. The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS ONE.* 5:e9505:1–10.

Speciale, L., E. Calabrese, M. Saresella, C. Tinelli, C. Mariani, L. Sanvito, R. Longhi, et P. Ferrante. 2007. Lymphocyte subset patterns and cytokine production in Alzheimer's disease patients. *Neurobiol. Aging.* 28:1163–1169.

Spence, R.D., M.E. Hamby, E. Umeda, N. Itoh, S. Du, A.J. Wisdom, Y. Cao, G. Bondar, J. Lam, Y. Ao, F. Sandoval, S. Suriany, M.V. Sofroniew, et R.R. Voskuhl. 2011. Neuroprotection mediated through estrogen receptor-alpha in astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108:8867–8872.

Sperling, R.A., P.S. Aisen, L.A. Beckett, D.A. Bennett, S. Craft, A.M. Fagan, T. Iwatsubo, C.R. Jack, J. Kaye, T.J. Montine, D.C. Park, E.M. Reiman, C.C. Rowe, E. Siemers, Y. Stern, K. Yaffe, M.C. Carrillo, B. Thies, M. Morrison-Bogorad, M.V. Wagster, et C.H. Phelps. 2011. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 7:280–292.

Spinney, L. 2014. Alzheimer's disease: The forgetting gene. *Nature.* 510:26–28.

Starr, J.M., L.J. Whalley, et I.J. Deary. 1996. The effects of antihypertensive treatment on cognitive function: results from the HOPE study. *J Am Geriatr Soc.* 44:411–415.

Stern Y. 2006. Cognitive reserve and Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 20:69–74.

Stern Y. 2012. Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 11:1006–1012.

Stern, S.A., et C.M. Alberini. 2013. Mechanisms of memory enhancement. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 5:37–53.

Stewart, R. 2012. Subjective cognitive impairment. *Curr Opin Psychiatry.* 25:445–450.

Stewart, R., K. Masaki, Q.-L.L. Xue, R. Peila, H. Petrovitch, L.R. White, et L.J. Launer. 2005. A 32-year prospective study of change in body weight and incident dementia: the Honolulu-Asia Aging Study. *Arch. Neurol.* 62:55–60.

Stout, R.D., Suttles, J., 2005. Immunosenescence and macrophage functional plasticity: dysregulation of macrophage function by age-associated microenvironmental changes. *Immunol. Rev.* 205, 60–71.

Streit, W.J., Xue, Q.-S.S., 2010. The Brain's Aging Immune System. *Aging Dis* 1, 254–261.

Strindhall, J., Nilsson, B.-O.O., Löfgren, S., Ernerudh, J., Pawelec, G., Johansson, B., Wikby, A., 2007. No Immune Risk Profile among individuals who reach 100 years of age: findings from the Swedish NONA immune longitudinal study. *Exp. Gerontol.* 42, 753–761.

Stroncek, D.F., 2007. Neutrophil-specific antigen HNA-2a, NB1 glycoprotein, and CD177. *Curr. Opin. Hematol.* 14, 688–693.

Strooper, B. De, P. Saftig, K. Craessaerts, H. Vanderstichele, G. Guhde, W. Annaert, K. Von Figura, et F. Van Leuven. 1998. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391:387–390.

Stöhr, J., Watts, J.C., Mensinger, Z.L., Oehler, A., Grillo, S.K., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Giles, K., 2012. Purified and synthetic Alzheimer's amyloid beta (A β) prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 11025–11030.

Szaruga, M., Veugelen, S., Benurwar, M., Lismont, S., Sepulveda-Falla, D., Lleo, A., Ryan, N.S., Lashley, T., Fox, N.C., Murayama, S., Gijzen, H., Strooper, B. De, Chávez-Gutiérrez, L., 2015. Qualitative changes in human γ -secretase underlie familial Alzheimer's disease. *J. Exp. Med.* 212, 2003–2013.

Targonski, P.V., Jacobson, R.M., Poland, G.A., 2007. Immunosenescence: role and measurement in influenza vaccine response among the elderly. *Vaccine* 25, 3066–9.

Tejera, D., Heneka, M.T., 2016. Microglia in Alzheimer's disease: the good, the bad and the ugly. *Curr Alzheimer Res* 13, 370–380.

Tashiro, K., M. Hasegawa, Y. Ihara, et T. Iwatsubo. 1997. Somatodendritic localization of phosphorylated tau in neonatal and adult rat cerebral cortex. *Neuroreport* 8:2797–2801.

Thambisetty, M., Lovestone, S., 2010. Blood-based biomarkers of Alzheimer's disease: challenging but feasible. *Biomark Med* 4, 65–79.

Thinakaran, G., et E.H. Koo. 2008. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J. Biol. Chem.* 283:29615–29619.

Tian, Z. 2013. Frontiers in natural killer cell immunology. *Cell. Mol. Immunol.* 10:185–186.

Togo, T., Akiyama, H., Iseki, E., Kondo, H., Ikeda, K., Kato, M., Oda, T., Tsuchiya, K., Kosaka, K., 2002. Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. *Journal of Neuroimmunology* 124, 83–92.

Torack, RM. 1983. The early history of senile dementia. 23–28. Dans B. Reisberg. *Alzheimer's Disease*. New York. The Free Press.

Trojanowski, J.Q., T. Schuck, M.L. Schmidt, et V.M. Lee. 1989. Distribution of tau proteins in the normal human central and peripheral nervous system. *J. Histochem. Cytochem.* 37:209–215.

Tsuno, N., et A. Homma. 2009. What is the association between depression and Alzheimer's disease? *Expert Rev Neurother.* 9:1667–1676.

Tzourio, C., C. Anderson, N. Chapman, M. Woodward, B. Neal, S. MacMahon, et J. Chalmers. 2003. Effects of blood pressure lowering with perindopril and indapamide therapy on dementia and cognitive decline in patients with cerebrovascular disease. *Arch. Intern. Med.* 163:1069–1075.

Udan, M.L., Ajit, D., Crouse, N.R., Nichols, M.R., 2008. Toll-like receptors 2 and 4 mediate Abeta(1-42) activation of the innate immune response in a human monocytic cell line. *J. Neurochem.* 104, 524–533.

Ungar, L., A. Altmann, et M.D. Greicius. 2014. Apolipoprotein E, gender, and Alzheimer's disease: an overlooked, but potent and promising interaction. *Brain Imaging Behav.* 8:262–273.

Vaughan, D.W., Peters, A., 1974. Neuroglial cells in the cerebral cortex of rats from young adulthood to old age: an electron microscope study. *J. Neurocytol.* 3, 405–429.

Vellas, B., et P. Robert. 2013. *Traité sur la maladie d'Alzheimer*. Springer.

Verghese, J., R.B. Lipton, M.J. Katz, C.B. Hall, C.A. Derby, G. Kuslansky, A.F. Ambrose, M. Sliwinski, et H. Buschke. 2003. Leisure activities and the risk of dementia in the elderly. *N. Engl. J. Med.* 348:2508–2516.

Vetrivel, K.S., H. Cheng, S.-H.H. Kim, Y. Chen, N.Y. Barnes, A.T.T. Parent, S.S. Sisodia, et G. Thinakaran. 2005. Spatial segregation of gamma-secretase and substrates in distinct membrane domains. *J. Biol. Chem.* 280:25892–25900.

Vetrivel, K.S., H. Cheng, W. Lin, T. Sakurai, T. Li, N. Nukina, P.C. Wong, H. Xu, et G. Thinakaran. 2004. Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes. *J. Biol. Chem.* 279:44945–44954.

Vignali, D.A.A., Collison, L.W., Workman, C.J., 2008. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 523–532.

Villemagne, V.L., S. Burnham, P. Bourgeat, B. Brown, K.A. Ellis, O. Salvado, C. Szoek, S.L. Macaulay, R. Martins, P. Maruff, D. Ames, C.C. Rowe, et C.L. Masters. 2013. Amyloid β deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol.* 12:357–367.

Vincent, V.A., Tilders, F.J., Dam, A.M. Van, 1997. Inhibition of endotoxin-induced nitric oxide synthase production in microglial cells by the presence of astroglial cells: a role for transforming growth factor beta. *Glia* 19, 190–198.

Visser, P.J., F. Verhey, D.L. Knol, P. Scheltens, L.-O.O. Wahlund, Y. Freund-Levi, M. Tsolaki, L. Minthon, A.K. Wallin, H. Hampel, K. Bürger, T. Pirttila, H. Soininen, M.O. Rikkert, M.M. Verbeek, L. Spuru, et K. Blennow. 2009. Prevalence and prognostic value of CSF markers of Alzheimer's disease pathology in patients with subjective cognitive impairment or mild cognitive impairment in the DESCRIPA study: a prospective cohort study. *Lancet Neurol.* 8:619–627.

Vivier, E., E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer, et S. Ugolini. 2008. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* 9:503–510.

Viña, J., et A. Lloret. 2010. Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide. *J. Alzheimers Dis.* 20 Suppl 2:S527–S533.

Wang, H.Y., D.H. Lee, M.R. D'Andrea, P.A. Peterson, R.P. Shank, et A.B. Reitz. 2000. beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J. Biol. Chem.* 275:5626–5632.

Wang H.X., Karp A., Winblad B., et L. Fratiglioni. 2002. Late-life engagement in social and leisure activities is associated with a decreased risk of dementia: a longitudinal study from the Kungsholmen project. *Am. J. Epidemiol.* 155:1081–1087.

Watson, G.S., B.A. Cholerton, M.A. Reger, L.D. Baker, S.R. Plymate, S. Asthana, M.A. Fishel, J.J. Kulstad, P.S. Green, D.G. Cook, S.E. Kahn, M.L. Keeling, et S. Craft. 2005. Preserved cognition in patients with early Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment during treatment with rosiglitazone: a preliminary study. *Am J Geriatr Psychiatry.* 13:950–958.

Wei, R., Jonakait, G.M., 1999. Neurotrophins and the anti-inflammatory agents interleukin-4 (IL-4), IL-10, IL-11 and transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) down-regulate T cell costimulatory molecules B7 and CD40 on cultured rat microglia. *J. Neuroimmunol.* 95, 8–18.

Weingarten, M.D., A.H. Lockwood, S.Y. Hwo, et M.W. Kirschner. 1975. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72:1858–1862.

Weiskopf, D., Weinberger, B., Grubeck-Loebenstein, B., 2009. The aging of the immune system. *Transpl. Int.* 22, 1041–1050.

Weishaupt, J.H., L. Kussmaul, P. Grötsch, A. Heckel, G. Rohde, H. Romig, M. Bähr, et F. Gillardon. 2003. Inhibition of CDK5 is protective in necrotic and apoptotic paradigms of neuronal cell death and prevents mitochondrial dysfunction. *Mol. Cell. Neurosci.* 24:489–502.

Wen, Y., S.-H.H. Yang, R. Liu, E.J. Perez, A.M. Brun-Zinkernagel, P. Koulen, et J.W. Simpkins. 2007. Cdk5 is involved in NFT-like tauopathy induced by transient cerebral ischemia in female rats. *Biochim. Biophys. Acta.* 1772:473–483.

Wenisch, C., Patruta, S., Daxböck, F., Krause, R., Hörl, W., 2000. Effect of age on human neutrophil function. *J. Leukoc. Biol.* 67, 40–45.

White, M.R., Kandel, R., Tripathi, S., Condon, D., Qi, L., Taubenberger, J., Hartshorn, K.L., 2014. Alzheimer's associated β -amyloid protein inhibits influenza A virus and modulates viral interactions with phagocytes. *PLoS ONE* 9, e101364:1–9.

White, H., C. Pieper, et K. Schmader. 1998. The association of weight change in Alzheimer's disease with severity of disease and mortality: a longitudinal analysis. *J Am Geriatr Soc.* 46:1223–1227.

Whitmer, R.A., D.R. Gustafson, E. Barrett-Connor, M.N. Haan, E.P. Gunderson, et K. Yaffe. 2008. Central obesity and increased risk of dementia more than three decades later. *Neurology.* 71:1057–1064.

Whitmer, R.A., S. Sidney, J. Selby, S.C. Johnston, et K. Yaffe. 2005. Midlife cardiovascular risk factors and risk of dementia in late life. *Neurology.* 64:277–281.

Wilks, S. 1864. Clinical notes on atrophy of the brain. *J. Ment. Sci.* 10:10–19.

Wilson R.S., Bennett D.A., Bienias J.L., Aggarwal N.T., Mendes De Leon C.F., Morris M.C., Schneider J.A., et D.A. Evans. 2002a. Cognitive activity and incident AD in a population-based sample of older persons. *Neurology.* 59:1910–1914.

Wilson R.S., Boyle P.A., Yu L., Barnes L.L., Schneider J.A., et D.A. Bennett. 2013. Life-span cognitive activity, neuropathologic burden, and cognitive aging. *Neurology.* 81:314–321.

Wilson R.S., Mendes De Leon C.F., Barnes L.L., Schneider J.A., Bienias J.L., Evans D.A., et D.A. Bennett. 2002b. Participation in cognitively stimulating activities and risk of incident Alzheimer disease. *J. Amer. Med. Assoc.* 287:742–748.

Wimo, A., et M. Prince. 2010. The Global Economic Impact of Alzheimer in 2010. Alzheimer's Disease International (ADI).

Winblad, B., K. Palmer, M. Kivipelto, V. Jelic, L. Fratiglioni, L.-O.O. Wahlund, A. Nordberg, L. Bäckman, M. Albert, O. Almkvist, H. Arai, H. Basun, K. Blennow, M. de Leon, C. DeCarli, T. Erkinjuntti, E. Giacobini, C. Graff, J. Hardy, C. Jack, A. Jorm, K. Ritchie, C. van Duijn, P. Visser, et R.C. Petersen. 2004. Mild cognitive impairment--beyond controversies, towards a consensus: report of the International Working Group on Mild Cognitive Impairment. *J. Intern. Med.* 256:240–246.

Winblad, B., et N. Poritis. 1999. Memantine in severe dementia: results of the 9M-Best Study (Benefit and efficacy in severely demented patients during treatment with memantine). *Int J Geriatr Psychiatry.* 14:135–146.

Witman, G.B., D.W. Cleveland, M.D. Weingarten, et M.W. Kirschner. 1976. Tubulin requires tau for growth onto microtubule initiating sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73:4070–4074.

Wojcik, E., Carrithers, L.M., Carrithers, M.D., 2011. Characterization of epithelial V-like antigen in human choroid plexus epithelial cells: potential role in CNS immune surveillance. *Neurosci. Lett.* 495, 115–120.

Wolfe, M.S. 2002. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Nat Rev Drug Discov.* 1:859–866.

Wood J.G., Mirra S.S., Pollock N.J., et L.I. Binder. 1986. Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:4040–4043.

Wyss-Coray, T. 2006. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat. Med.* 12:1005–1015.

Wyss-Coray, T., et J. Rogers. 2012. Inflammation in Alzheimer disease—a brief review of the basic science and clinical literature. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2:a006346:1–24

Xia, M.Q., et B.T. Hyman. 1999. Chemokines/chemokine receptors in the central nervous system and Alzheimer's disease. *J. Neurovirol.* 5:32–41.

Xie, J., C. Brayne, F. Matthews, et M. et Medical Research Council Function and Ageing Study Collaborators. 2008. Survival times in people with dementia: analysis from population based cohort study with 14 year follow-up. *British Medical Journal (Clinical research ed.)*. 336:258–262.

Xie, Q., Klesney-Tait, J., Keck, K., Parlet, C., Borchering, N., Kolb, R., Li, W., Tygrett, L., Waldschmidt, T., Olivier, A., Chen, S., Liu, G.-H.H., Li, X., Zhang, W., 2015. Characterization of a novel mouse model with genetic deletion of CD177. *Protein Cell* 6, 117–126.

Xu W., Yu J.T., Tan M.S., et L. Tan. 2014. Cognitive reserve and Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 51:187–208.

Yaffe, K., M. Haan, A. Byers, C. Tangen, et L. Kuller. 2000. Estrogen use, APOE, and cognitive decline: evidence of gene-environment interaction. *Neurology* 54:1949–1954.

Yaffe, K., E. Vittinghoff, K. Lindquist, D. Barnes, K.E. Covinsky, T. Neylan, M. Kluse, et C. Marmar. 2010. Posttraumatic stress disorder and risk of dementia among US veterans. *Arch. Gen. Psychiatry.* 67:608–613.

Yamagishi, S., K. Nakamura, H. Inoue, S. Kikuchi, et M. Takeuchi. 2005. Serum or cerebrospinal fluid levels of glyceraldehyde-derived advanced glycation end products (AGEs) may be a promising biomarker for early detection of Alzheimer's disease. *Med. Hypotheses.* 64:1205–1207.

Yan, S.D., X. Chen, J. Fu, M. Chen, H. Zhu, A. Roher, T. Slattery, L. Zhao, M. Nagashima, J. Morser, A. Migheli, P. Nawroth, D. Stern, et A.M. Schmidt. 1996. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature.* 382:685–691.

Younkin, S.G. 1998. The role of A beta 42 in Alzheimer's disease. *J. Physiol. (Paris)* 92:289–92.

Zaghi, J., B. Goldenson, M. Inayathullah, A.S. Lossinsky, A. Masoumi, H. Avagyan, M. Mahanian, M. Bernas, M. Weinand, M.J. Rosenthal, A. Espinosa-Jeffrey, J. de Vellis, D.B. Teplow, et M. Fiala. 2009. Alzheimer disease macrophages shuttle amyloid-beta from neurons to vessels, contributing to amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol.* 117:111–124.

Zandi, P.P., et J.C. Breitner. 2001. Do NSAIDs prevent Alzheimer's disease? And, if so, why? The epidemiological evidence. *Neurobiol. Aging.* 22:811–817.

Zenaro, E., Pietronigro, E., Della Bianca, V., Piacentino, G., Marongiu, L., Budui, S., Turano, E., Rossi, B., Angiari, S., Dusi, S., Montresor, A., Carlucci, T., Nani, S., Tosadori, G., Calciano, L., Catalucci, D., Berton, G., Bonetti, B., Constantin, G., 2015. Neutrophils promote Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin. *Nat. Med.* 21, 880–886.

Zhang, X., Y. Li, H. Xu, et Y.W. Zhang. 2014. The γ -secretase complex: from structure to function. *Front Cell Neurosci.* 8:427–437.

Zhou, Y., Y. Su, B. Li, F. Liu, J.W. Ryder, X. Wu, P.A. Gonzalez-DeWhitt, V. Gelfanova, J.E. Hale, P.C. May, S.M. Paul, et B. Ni. 2003. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs can lower amyloidogenic Abeta42 by inhibiting Rho. *Science.* 302:1215–1217.

Zhu, X., Gui, J., Dohkan, J., Cheng, L., Barnes, P.F., Su, D.-M.M., 2007. Lymphohematopoietic progenitors do not have a synchronized defect with age-related thymic involution. *Aging Cell* 6, 663–672.

8 Annexes

La première partie de l'annexe comprend des articles qui ne sont pas reproduits dans la thèse mais auxquels j'ai participé comme co-auteur durant mes travaux de doctorat et qui ont contribué à l'avancement des connaissances. Dans la seconde partie, elle comprend les données caractéristiques de la cohorte de patients.

a) Articles dont je suis co-auteur

1) Fulop, T., **Le Page, A.**, Garneau, H., Azimi, N., Baehl, S., Dupuis, G., Pawelec, G. and Larbi, A. Aging, immunosenescence and membrane rafts: the lipid connection. *Longevity & Healthspan* 2012, Oct 4;1:6. doi: 10.1186/2046-2395-1-6. Revue.

Commentaires. Cette publication discute l'implication du cholestérol des radeaux lipidiques dans le vieillissement des lymphocytes T.

2) Fulop T, Lacombe G, Cunnane S, **Le Page A**, Dupuis G, Frost EH, Bourgade-Navarro K, Goldeck D, Larbi A, Pawelec G. Elusive Alzheimer's disease: can immune signatures help our understanding of this challenging disease? Part 1: Clinical and historical background. *Discovery Medicine* 2013 15(80):23-32. Revue.

Commentaires. Cette revue résume l'état des connaissances sur les caractéristiques cliniques de la MA et discute des conséquences de l'hypothèse amyloïde sur la compréhension de la maladie.

3) Fulop T, Lacombe G, Cunnane S, **Le Page A**, Dupuis G, Frost EH, Bourgade-Navarro K, Goldeck D, Larbi A, Pawelec G. Elusive Alzheimer's disease: can immune signatures help our understanding of this challenging disease? Part 2: New immune paradigm. *Discovery Medicine* 2013 15(80):33-42. Revue.

Commentaires. Cette seconde partie de la revue s'attache principalement aux altérations du système immunitaire qui pourraient contribuer au développement de la MA.

4) **Le Page, A.**, Fortin, C., Garneau, H., Allard, N., Tsvetkova, K., Tan, C.T., Larbi, A., Dupuis, G. and Fulop, T. Downregulation of inhibitory SRC homology 2 domain-containing phosphatase-1 (SHP-1) leads to recovery of T cell responses in elderly. *Cell Communication and Signaling* 2014, Jan 9;12, pp.2-811X-12-2.

Commentaires. Les réponses immunitaires et en particulier la réponse des lymphocytes T sont diminuées avec le vieillissement. Dans cet article, la baisse des capacités de prolifération des lymphocytes T a été associée à l'altération des signaux de rétrocontrôles négatifs associés aux étapes initiales de l'activation des lymphocytes T. Ainsi l'augmentation des signaux de rétrocontrôles négatifs à travers l'action de la tyrosine

phosphatase SHP-1 représente une cible pour ralentir l'immunosénescence des cellules T. Dans cet article, j'ai participé à une large partie des expériences, notamment des expériences de prolifération cellulaire, de mesure d'activité enzymatique, de cytométrie en flux, et de Western blot.

5) Bourgade K, Garneau H, Giroux G, **Le Page AY**, Bocti C, Dupuis G, Frost EH, Fülöp T Jr. β -Amyloid peptides display protective activity against the human Alzheimer's disease-associated herpes simplex virus-1. *Biogerontology* 2014, 16(1):85-98.

Commentaires. Cet article illustre les propriétés antivirales des peptides amyloïdes sur la réplication virale du virus HSV-1 par interaction directe des peptides avec le virus, prévenant ainsi l'entrée du virus dans la cellule.

6) Fulop T, **Le Page A**, Fortin C, Witkowski JM, Dupuis G, Larbi A. Cellular signaling in the aging immune system. *Current Opinion in Immunology* 2014 29:105-111. Revue.

Commentaires. Cette revue résume l'état des connaissances sur les changements dans la transduction du signal du système immunitaire et propose un système unificateur comme une cause de l'immunosénescence. En effet, des altérations dans la signalisation du rétro control négatif ont été décrites dans toutes les populations cellulaires de la réponse immune comprenant des cellules à durée de vie courte (les neutrophiles) et des cellules à durée de vie longue (comme les lymphocytes). Ces dérégulations penchent la balance en faveur d'une altération (baisse de l'efficacité) de la fonction du système immunitaire. La

modulation de ces voies de signalisation associées au vieillissement représente un challenge majeur pour restaurer la réponse immune à un niveau fonctionnel.

7) Baëhl S., Garneau H., **Le Page A.**, Lorrain D., Viens I., Svoitelis A., Lord J., Phillips A., Cabana F., Larbi A., Dupuis G., Fülöp T. Altered neutrophil functions in elderly patients during a 6-month follow-up period after a hip fracture. *Experimental Gerontology* 2015, 65:58-68.

Commentaires. Cet article démontre que le stress causé par une fracture de la hanche affecte la réponse initiale des neutrophiles ce qui pourrait empêcher une complète résolution à long terme de l'inflammation et donc influencer l'issue clinique du patient.

8) Fulop, T., Dupuis G., Baehl S., **Le Page, A.**, Bourgade K., Frost E., Witkowski J. M., Pawelec G., Larbi A., Cunnane S. From inflamm-aging to immune-paralysis: a slippery slope during aging for immune-adaptation. *Biogerontology*, 2015 17(1):147-157.

Commentaires. Cette revue discute de la relation entre l'immunosénescence et l'inflamm-aging comme le résultat d'une adaptation ou d'un remodelage menant d'une part à l'augmentation de l'inflammation et d'autre part à la baisse de la réponse immunitaire.

9) K. Bourgade, **A. Le Page**, C. Bocti, G. Dupuis, E.H. Frost, T. Fülöp Jr. Protective effect of amyloid- β peptides against Herpes Simplex Virus-1 infection in a neuronal cell culture model. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2016 50(4):1227-1241.

Commentaires. Cet article démontre qu'une lignée humaine de neurogliome de type H4 possède la capacité de produire des peptides β amyloïdes à la suite d'une infection par le virus de l'*herpes simplex* (HSV) et que ces peptides sont capables de limiter la réplication secondaire du HSV-1. Ce mécanisme pourrait jouer un rôle dans l'étiologie de la MA.

10) Fulop T, Witkowski JM, **Le Page A**, Fortin C, Pawelec G, Larbi A. Intracellular signaling pathways: targets to reverse immunosenescence. *Clinical and Experimental Immunology*, 2016 187(1):35-43. Revue.

Commentaires. Cette revue rassemble l'état des connaissances sur les altérations des voies de signalisation dans les cellules immunes avec le vieillissement. Elle discute des moyens et cibles pour moduler ces fonctions altérées ainsi que des dangers et bénéfices associés.

11) Mikosik A., Jasiulewicz A., Daca A., Henc I., Frackowak J. E., Ruckemann-Dziurdzinska K., Foerster J., **Le Page A.**, Bryl E., Fülöp T., Witkowski J. M. Roles of calpain-calpastatin system (CCS) in human T cell activation. *Oncotarget* 2016 7(47):76479-76495.

Commentaires. La calpaine est une protéase qui avec son inhibiteur la calpastatine constitue un système engagé dans la prolifération cellulaire, l'apoptose et le mouvement. Ce système s'activerait à la suite de signaux calciques cytoplasmiques. Dans cet article, il est démontré que tous les gènes de ce système sont exprimés constitutivement et qu'ils sont constitutivement actifs dans les lymphocytes T de type CD4 et CD8 quiescents. Ainsi, le

système calpaine-calpastatine serait un nouvel élément de contrôle de l'activation de la réponse effectrice des lymphocytes T.

12) Le Page A., Lamoureux J., Bourgade K., Frost E.H., Pawelec G., Witkowski J.M., Larbi A., Dupuis G., Fülöp T. Polymorphonuclear neutrophil functions are differentially altered in amnesic mild cognitive impairment and mild Alzheimer's patients. Soumis pour publication.

b) Caractéristiques de la cohorte de patients

Figure 1. Formulaires de consentement.

Formulaire de consentement pour patient âgé en santé.



FORMULAIRE D'INFORMATION ET DE CONSENTEMENT À LA RECHERCHE

TITRE DU PROJET DE RECHERCHE

SIGNATURES IMMUNES PRÉDISANT LE DÉVELOPPEMENT ET LA PROGRESSION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER : L'IMPACT DE L'IMMUNOSENESCENCE ET DE L'INFECTION AU CYTOMÉGALOVIRUS

CHERCHEUR RESPONSABLE DU PROJET DE RECHERCHE

Dr. Tamàs Fülöp, Service de Gériatrie, Département de médecine, Centre de Recherche sur le Vieillissement, CSSS-IUGS

COLLABORATEURS AU PROJET DE RECHERCHE

Dr Eric Frost, Département de Microbiologie et des Maladies infectieuses, Université de Sherbrooke

Professeur G. Pawelec, Institut d'immunologie, Université de Tübingen, Allemagne

PRÉAMBULE

Vous êtes une personne en bonne santé, âgée de 65 ans et plus, ne présentant aucun signe de maladie, ayant des lipides normaux, non fumeuse, et ne prenant aucun médicament et/ou antioxydant. C'est pourquoi nous sollicitons votre participation à notre projet de recherche. Cependant, avant d'accepter de participer à ce projet et de signer ce formulaire d'information et de consentement, veuillez prendre le temps de lire, de comprendre et de considérer attentivement les renseignements qui suivent.

Ce formulaire peut contenir des mots que vous ne comprenez pas. Nous vous invitons à poser toutes les questions que vous jugerez utiles au chercheur responsable du projet ou aux autres membres du personnel affecté au projet de recherche et à leur demander de vous expliquer tout mot ou renseignement qui n'est pas clair.

NATURE ET OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

Vous êtes invité(e) à participer à une étude visant à mieux connaître le système de défense de l'organisme dans la maladie d'Alzheimer. Effectivement pour mieux comprendre certains éléments de la maladie d'Alzheimer, les sujets atteints de cette maladie doivent être comparés à des sujets sains comme vous.

La réponse immune est responsable de la défense de l'organisme contre les virus, les bactéries et les autres agresseurs internes. Avec le vieillissement, la défense immune diminue, ce qui contribue à l'augmentation des maladies dégénératives (Alzheimer, maladies cardio-vasculaires).

Nous ne savons pas pourquoi la réponse immune diminue avec l'âge et comment cette diminution est reliée à la maladie d'Alzheimer. La dérégulation de la réponse immune peut résulter en une inflammation chronique telle qu'on la retrouve dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer.

Initiales : _____

Page 1 de 6

Sujets sains - Version 2, datée du 21 octobre 2010

Formulaire d'information et de consentement approuvé par le CÉR sur le vieillissement le 12 novembre 2010

*SIGNATURES IMMUNES PRÉDISANT LE DÉVELOPPEMENT ET LA PROGRESSION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER :
L'IMPACT DE L'IMMUNOSENESCENCE ET DE L'INFECTION AU CYTOMÉGALOVIRUS*

Notre but est d'investiguer et de comprendre quel rôle les altérations de la membrane cellulaire et les signaux intracellulaires, l'infection virale chronique éventuelle et les changements dans les différents types de sous-populations de lymphocytes T jouent dans la maladie d'Alzheimer. Nous allons aussi relier ces résultats au génotype de l'ApoE.

Pour cela, nous allons étudier l'interaction entre les cellules du système immunitaire (lymphocytes et macrophages) avec des protéines impliquées dans le développement de la maladie d'Alzheimer.

DÉROULEMENT DU PROJET DE RECHERCHE

Pour réaliser cette étude, qui va se dérouler sur une période de 4 ans, nous procéderons à chaque année à une prise de sang de 80 ml (environ 6 c. à table), faite au creux du bras. La première prise de sang s'effectuera tout de suite après que vous ayez lu et signé ce formulaire d'information et de consentement.

Nous vous demandons d'être à jeun depuis 6 heures pour la prise de sang.

Un déjeuner vous sera offert après la prise de sang.

Les prélèvements auront lieu au pavillon D'Youville, St Joseph, St Vincent ou au pavillon Argyll du Centre de santé et de services sociaux - Institut universitaire de gériatrie de Sherbrooke, le matin vers 8 h. Le temps requis pour la visite sera d'environ 20 minutes.

Il est très important, pour l'étude, que nous connaissions votre état de santé, de même que tous les médicaments que vous avez pris durant les six (6) derniers mois (médicaments prescrits par votre médecin ou achetés sans prescription en pharmacie). Votre état de santé sera donc évalué par un médecin. À partir du sang recueilli, nous ferons l'étude de votre taux de sucre dans le sang (glycémie), de votre cholestérol et de paramètres inflammatoires. Nous ferons également une formule sanguine, des tests de fonctions rénale, hépatique, thyroïdienne, et un test de coagulation.

Ce projet comporte également la détermination de votre génotype de l'ApoE. Les gènes ApoE régulent la production d'une protéine qui aide au transport du cholestérol et des autres gras dans le sang vers les cellules du corps.

Il y a trois variantes du gène ApoE (ApoE2, ApoE3 et ApoE4), et la variante ApoE4 est associée à un risque accru de maladie d'Alzheimer.

Cependant, bien que nos gènes soient présents dès la naissance, ils ne sont pas seuls responsables de la maladie d'Alzheimer. Cette maladie semble se développer quand les effets combinés de divers facteurs de risque franchissent un certain seuil et dépassent la capacité des mécanismes naturels de réparation du cerveau qui, normalement, aident à maintenir la santé des cellules nerveuses.

Le test du génotypage de l'ApoE4 n'est utilisé qu'en recherche. En clinique, ce test n'a pas de valeur prédictive.

Donc, notre équipe de recherche souhaite essentiellement effectuer ce test à des fins de recherche. Aucune information sur le résultat de ce test ne sera communiquée ni à vous, à votre famille, à votre médecin traitant, ni à quiconque dans les limites légales.

Initiales : _____

Page 2 de 6

Sujets sains - Version 2, datée du 21 octobre 2010
Formulaire d'information et de consentement approuvé par le CÉR sur le vieillissement le 12 novembre 2010

*SIGNATURES IMMUNES PRÉDISANT LE DÉVELOPPEMENT ET LA PROGRESSION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER :
L'IMPACT DE L'IMMUNOSENESCENCE ET DE L'INFECTION AU CYTOMÉGALOVIRUS*

Le résultat de ce test sera dénominalisé, gardé confidentiellement et exclusivement dans un dossier spécifique autre que votre dossier de recherche, ce qui implique qu'il ne sera pas inclus à votre dossier médical et sera détruit de manière sécuritaire selon les règlements en vigueur dans l'établissement après 5 ans.

RISQUES

Les prélèvements sanguins peuvent vous causer un certain inconfort, voire même vous causer des douleurs au creux de votre bras ou de légers bleus. Ces bleus disparaissent généralement au bout de deux ou trois jours.

INCONVÉNIENTS

Votre participation à cette étude vous demandera de vous déplacer à chaque année pendant 4 ans, le matin et à jeun.

AVANTAGES

Si vous acceptez de participer à cette étude, vous ne retirerez aucun bénéfice direct. Par contre, les connaissances acquises pourraient contribuer à l'avancement des connaissances dans ce domaine.

COMPENSATION

Il n'y a pas de compensation prévue pour les déplacements.

PARTICIPATION VOLONTAIRE ET POSSIBILITÉ DE RETRAIT

Votre participation à ce projet de recherche est volontaire. Vous êtes donc libre de refuser d'y participer. Vous pouvez également vous retirer de ce projet à n'importe quel moment, sans avoir à donner de raisons, en faisant connaître votre décision au chercheur responsable du projet ou à l'un des membres du personnel affecté au projet.

Si vous vous retirez du projet, l'information déjà obtenue dans le cadre de ce projet sera conservée aussi longtemps que nécessaire pour assurer votre sécurité et rencontrer les exigences réglementaires.

CONFIDENTIALITÉ

Durant votre participation à ce projet, le chercheur responsable ainsi que son personnel recueilleront et consigneront dans un dossier de recherche les renseignements vous concernant. Seuls les renseignements nécessaires pour répondre aux objectifs scientifiques de ce projet seront recueillis, soit votre nom, votre sexe, votre date de naissance ainsi que les résultats de tous les tests qui ont été obtenus durant le projet en laboratoire.

Tous les renseignements recueillis demeureront strictement confidentiels dans les limites prévues par la loi. Afin de préserver votre identité et la confidentialité des renseignements, vous ne serez identifié(e) que par un numéro de code. La clé du code, reliant votre nom à votre dossier de recherche, sera conservée par le chercheur responsable.

Le chercheur responsable du projet utilisera les données à des fins de recherche dans le but de répondre aux objectifs scientifiques du projet décrits dans le formulaire d'information et de consentement. Ces données seront conservées pendant 5 ans par le chercheur responsable. Elles seront détruites de manière sécuritaire par la suite.

Initiales : _____

Page 3 de 6

Sujets sains - Version 2, datée du 21 octobre 2010
Formulaire d'information et de consentement approuvé par le CÉR sur le vieillissement le 12 novembre 2010

*SIGNATURES IMMUNES PRÉDISANT LE DÉVELOPPEMENT ET LA PROGRESSION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER :
L'IMPACT DE L'IMMUNOSENESCENCE ET DE L'INFECTION AU CYTOMÉGALOVIRUS*

Une partie des cellules obtenues seront envoyées à notre collaborateur en Allemagne sous forme dénominalisée (sans aucune information révélant votre identité, mais seulement un numéro).

Les données pourront être publiées dans des revues spécialisées ou faire l'objet de discussions scientifiques, mais il ne sera pas possible de vous identifier.

À des fins de surveillance et de contrôle, votre dossier de recherche ainsi que vos dossiers médicaux, s'il y a lieu, pourront être consultés par une personne mandatée par le Comité d'éthique de la recherche sur le vieillissement du CSSS-IUGS ou par l'établissement, ou encore par une personne nommée par un organisme autorisé. Toutes ces personnes et ces organismes adhèrent à une politique de confidentialité.

À des fins de protection, notamment afin de pouvoir communiquer avec vous rapidement, vos noms et prénoms, vos coordonnées et la date de début et de fin de votre participation au projet seront conservés pendant un an après la fin du projet dans un répertoire maintenu par le chercheur responsable ou par l'établissement. Ce fichier sera détruit par la suite.

INDEMNISATION EN CAS DE PRÉJUDICE ET DROITS DU SUJET DE RECHERCHE

Si vous deviez subir quelque préjudice que ce soit dû à votre participation au projet de recherche, vous recevrez tous les soins et services requis par votre état de santé, sans frais de votre part.

En acceptant de participer à ce projet, vous ne renoncez à aucun de vos droits ni ne libérez les chercheurs, l'organisme subventionnaire ou l'établissement de leur responsabilité civile et professionnelle.

IDENTIFICATION DES PERSONNES-RESSOURCES

Si vous avez des questions concernant le projet de recherche ou si vous éprouvez un problème que vous croyez relié à votre participation, vous pouvez communiquer avec les personnes suivantes :

Dr Tamàs Fülöp, chercheur responsable : 819 780-2220, poste 46254

Infirmière de recherche : 819 780-2220, poste 46477

Pour toute question concernant vos droits en tant que sujet participant à ce projet de recherche ou si vous avez des plaintes ou des commentaires à formuler, vous pouvez communiquer avec le commissaire local aux plaintes et à la qualité des services du CSSS-IUGS au numéro 819 780-2220, poste 40204.

SURVEILLANCE DES ASPECTS ÉTHIQUES

Le Comité d'éthique de la recherche sur le vieillissement du CSSS-IUGS a approuvé ce projet de recherche et en assure le suivi administratif annuel. De plus, il approuvera au préalable toute révision et toute modification apportée au formulaire d'information et de consentement et au protocole de recherche.

Initiales : _____

Page 4 de 6

Sujets sains - Version 2, datée du 21 octobre 2010

Formulaire d'information et de consentement approuvé par le CÉR sur le vieillissement le 12 novembre 2010

*SIGNATURES IMMUNES PRÉDISANT LE DÉVELOPPEMENT ET LA PROGRESSION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER :
L'IMPACT DE L'IMMUNOSENESCENCE ET DE L'INFECTION AU CYTOMÉGALOVIRUS*

CONSENTEMENT

J'ai pris connaissance du formulaire d'information et de consentement. Je reconnais qu'on m'a expliqué le projet, qu'on a répondu à mes questions.

Je consens à participer à ce projet de recherche aux conditions qui y sont énoncées. Une copie signée et datée du présent formulaire d'information et de consentement me sera remise.

Nom et signature du participant

Date

AUTORISATIONS

Transmission des résultats

Lors de ce projet de recherche, nous effectuerons certains tests de dépistage. Tout résultat anormal qui en résulterait vous sera communiqué par l'entremise d'un médecin de votre choix. Ceci ne s'applique toutefois pas au test du génotypage de l'ApoE.

- > Souhaitez-vous que le chercheur responsable de ce projet informe votre médecin traitant de votre participation à ce projet ?
Oui Non
- > Autorisez-vous le chercheur responsable de ce projet à transmettre à votre médecin traitant les résultats anormaux si ces informations peuvent avoir une utilité clinique :
Oui Non
- > Autorisez-vous le chercheur responsable de ce projet, si vous n'avez pas de médecin traitant, à transmettre au CLSC de votre choix les résultats anormaux si ces informations peuvent avoir une utilité clinique pour qu'un médecin traitant vous soit trouvé et vous prenne en charge. Tant que vous n'avez pas de médecin traitant, c'est le médecin de l'étude qui fera le suivi de vos résultats anormaux :
Oui Non

Nom et adresse du médecin traitant :

Études ultérieures

Il se peut que les résultats obtenus suite à cette étude donnent lieu à une autre recherche. Dans cette éventualité, autorisez-vous le chercheur responsable de ce projet à vous contacter et à vous demander si vous seriez intéressé(e) à participer à une nouvelle recherche ?

Oui Non

Initiales : _____

Page 5 de 6

*SIGNATURES IMMUNES PRÉDISANT LE DÉVELOPPEMENT ET LA PROGRESSION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER :
L'IMPACT DE L'IMMUNOSENESCENCE ET DE L'INFECTION AU CYTOMÉGALOVIRUS*

SIGNATURE ET ENGAGEMENT DE LA PERSONNE QUI A OBTENU LE CONSENTEMENT

J'ai expliqué au participant les termes du présent formulaire d'information et de consentement et j'ai répondu aux questions qu'il m'a posées.

Nom et signature de l'infirmière de recherche

Date

SIGNATURE ET ENGAGEMENT DU CHERCHEUR RESPONSABLE DU PROJET

Je certifie qu'on a expliqué au participant les termes du présent formulaire d'information et de consentement, que l'on a répondu aux questions qu'il avait à cet égard et qu'on lui a clairement indiqué qu'il demeure libre de mettre un terme à sa participation, et ce, sans préjudice.

Je m'engage avec l'équipe de recherche à respecter ce qui a été convenu au formulaire d'information et de consentement et à en **remettre une copie signée et datée au participant.**

Nom et signature du chercheur responsable du projet

Date



Initiales : _____

Page 6 de 6

Sujets sains - Version 2, datée du 21 octobre 2010
Formulaire d'information et de consentement approuvé par le CÉR sur le vieillissement le 12 novembre 2010

Formulaire de consentement pour patient aMCI.



FORMULAIRE D'INFORMATION ET DE CONSENTEMENT À LA RECHERCHE

TITRE DU PROJET DE RECHERCHE

SIGNATURES IMMUNES PRÉDISANT LE DÉVELOPPEMENT ET LA PROGRESSION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER : L'IMPACT DE L'IMMUNOSENESCENCE ET DE L'INFECTION AU CYTOMÉGALOVIRUS.

CHERCHEURS RESPONSABLE DU PROJET DE RECHERCHE

Dr. Tamàs Fülöp, Service de Gériatrie, Département de médecine, Centre de Recherche sur le Vieillissement, CSSS-IUGS

COLLABORATEURS AU PROJET DE RECHERCHE

Dr Eric Frost, Département de Microbiologie et des Maladies infectieuses, Université de Sherbrooke

Professeur G. Pawelec, Institut d'immunologie, Université de Tübingen, Allemagne

PRÉAMBULE

Vous êtes une personne âgée atteinte de troubles cognitifs mineurs touchant principalement la mémoire (aMCI) et nous sollicitons votre participation à notre projet de recherche. Cependant, avant d'accepter de participer à ce projet et de signer ce formulaire d'information et de consentement, veuillez prendre le temps de lire, de comprendre et de considérer attentivement les renseignements qui suivent.

Ce formulaire peut contenir des mots que vous ne comprenez pas. Nous vous invitons à poser toutes les questions que vous jugerez utiles au chercheur responsable du projet ou aux autres membres du personnel affecté au projet de recherche et à leur demander de vous expliquer tout mot ou renseignement qui n'est pas clair.

NATURE ET OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

Vous êtes invité(e) à participer à une étude visant à mieux connaître le système de défense de l'organisme dans la maladie d'Alzheimer.

La réponse immune est responsable de la défense de l'organisme contre les virus, les bactéries et les autres agresseurs internes. Avec le vieillissement, la défense immune diminue, ce qui contribue à l'augmentation des maladies dégénératives (Alzheimer, maladies cardio-vasculaires).

Nous ne savons pas pourquoi la réponse immune diminue avec l'âge et comment cette diminution est reliée à la maladie d'Alzheimer. La dérégulation de la réponse immune peut résulter en une inflammation chronique telle qu'on la retrouve dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer.

Notre but est d'investiguer et de comprendre quel rôle les altérations de la membrane cellulaire et les signaux intracellulaires, l'infection virale chronique éventuelle et les changements dans les différents types de sous-populations de lymphocytes T jouent dans la maladie d'Alzheimer. Nous allons aussi relier ces résultats au génotype de ApoE.

Initiales: _____

Page 1 de 5

Sujets aMCI - Version 2, datée du 21 octobre 2010
Formulaire d'information et de consentement approuvé par le CÉR sur le vieillissement le 12 novembre 2010

SIGNATURES IMMUNES PRÉDISANT LE DÉVELOPPEMENT ET LA PROGRESSION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER : L'IMPACT DE L'IMMUNOSÉNESCENCE ET DE L'INFECTION AU CYTOMÉGALOVIRUS

Pour cela, nous allons étudier l'interaction entre les cellules du système immunitaire (lymphocytes et macrophages) avec des protéines impliquées dans le développement de la maladie d'Alzheimer.

DÉROULEMENT DU PROJET DE RECHERCHE

Pour réaliser cette étude, qui va se dérouler sur une période de 4 ans, nous procéderons à chaque année à une prise de sang de 80 ml (environ 6 c. à table), faite au creux du bras. La première prise de sang s'effectuera tout de suite après que vous ayez lu et signé ce consentement.

Nous vous demandons d'être à jeun depuis 6 heures pour la prise de sang

Un déjeuner vous sera offert après la prise de sang.

Les prélèvements auront lieu au pavillon D'Youville, St Joseph, St Vincent ou au pavillon Argyll du Centre de santé et de services sociaux – Institut universitaire de gériatrie de Sherbrooke, le matin vers 8 h 00. Le temps requis pour la visite sera d'environ 20 minutes.

Il est très important, pour l'étude, que nous connaissions votre état de santé, de même que tous les médicaments que vous avez pris durant les six (6) derniers mois (médicaments prescrits par votre médecin ou achetés sans prescription en pharmacie). Votre état de santé sera donc évalué par le médecin de l'étude. À partir du sang recueilli, nous ferons l'étude de votre taux de sucre dans le sang (glycémie), de votre cholestérol et de paramètres inflammatoires. Nous ferons également une formule sanguine, des tests de fonctions rénale, hépatique, thyroïdienne, et un test de coagulation.

Ce projet comporte également la détermination de votre génotype de l'ApoE. Les gènes ApoE régulent la production d'une protéine qui aide au transport du cholestérol et des autres gras dans le sang vers les cellules du corps.

Il y a trois variantes du gène ApoE (ApoE2, ApoE3 et ApoE4), et la variante ApoE4 est associée à un risque accru de maladie d'Alzheimer.

Cependant, bien que nos gènes soient présents dès la naissance, ils ne sont pas seuls responsables de la maladie d'Alzheimer. Cette maladie semble se développer quand les effets combinés de divers facteurs de risque franchissent un certain seuil et dépassent la capacité des mécanismes naturels de réparation du cerveau qui, normalement, aident à maintenir la santé des cellules nerveuses.

Le test du génotypage de l'ApoE4 n'est utilisé qu'en recherche. En clinique, ce test n'a pas de valeur prédictive.

Donc, notre équipe de recherche souhaite essentiellement effectuer ce test à des fins de recherche. Aucune information sur le résultat de ce test ne sera communiquée ni à vous, à votre famille, à votre médecin traitant, ni à quiconque dans les limites légales.

Le résultat de ce test sera dénominalisé, gardé confidentiellement et exclusivement dans un dossier spécifique autre que votre dossier de recherche, ce qui implique qu'il ne sera pas inclus à votre dossier médical et sera détruit de manière sécuritaire selon les règlements en vigueur dans l'établissement après 5 ans.

Votre état de cognition sera aussi réévalué à 18 mois et à 30 mois pour détecter tout signe de changements.

Initiales: _____

Page 2 de 5

Sujets aMCI - Version 2, datée du 21 octobre 2010
Formulaire d'information et de consentement approuvé par le CÉR sur le vieillissement le 12 novembre 2010

SIGNATURES IMMUNES PRÉDISANT LE DÉVELOPPEMENT ET LA PROGRESSION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER : L'IMPACT DE L'IMMUNOSÉNESCENCE ET DE L'INFECTION AU CYTOMÉGALOVIRUS

RISQUES

Les prélèvements sanguins peuvent vous causer un certain inconfort, voire même vous causer des douleurs au creux de votre bras ou de légers bleus. Ces bleus disparaissent généralement au bout de deux ou trois jours.

INCONVÉNIENTS

Votre participation à cette étude vous demandera de vous déplacer à six reprises (1 fois par an pendant quatre ans, une fois à 18 mois et une dernière fois à 30 mois) et vous devrez être à jeun le matin pour chacune des prises de sang.

AVANTAGES

Si vous acceptez de participer à cette étude, vous ne retirerez aucun bénéfice direct. Par contre, les connaissances acquises pourraient contribuer à l'avancement des connaissances dans ce domaine.

COMPENSATION

Il n'y a pas de compensation prévue pour les déplacements.

PARTICIPATION VOLONTAIRE ET POSSIBILITÉ DE RETRAIT

Votre participation à ce projet de recherche est volontaire. Vous êtes donc libre de refuser d'y participer. Vous pouvez également vous retirer de ce projet à n'importe quel moment, sans avoir à donner de raisons, en faisant connaître votre décision au chercheur responsable du projet ou à l'un des membres du personnel affecté au projet.

Si vous vous retirez, l'information déjà obtenue dans le cadre de ce projet sera conservée aussi longtemps que nécessaire pour assurer votre sécurité et rencontrer les exigences réglementaires.

CONFIDENTIALITÉ

Durant votre participation à ce projet, le chercheur responsable ainsi que son personnel recueilleront et consigneront dans un dossier de recherche les renseignements vous concernant. Seuls les renseignements nécessaires pour répondre aux objectifs scientifiques de ce projet seront recueillis, soit votre nom, votre sexe, votre date de naissance ainsi que les résultats de tous les tests qui auront été obtenus durant le projet en laboratoire.

Tous les renseignements recueillis demeureront strictement confidentiels dans les limites prévues par la loi. Afin de préserver votre identité et la confidentialité des renseignements, vous ne serez identifié(e) que par un numéro de code. La clé du code, reliant votre nom à votre dossier de recherche, sera conservée par le chercheur responsable.

Le chercheur responsable du projet utilisera les données à des fins de recherche dans le but de répondre aux objectifs scientifiques du projet décrits dans le formulaire d'information et de consentement. Ces données seront conservées pendant 5 ans par le chercheur responsable. Elles seront détruites de manière sécuritaire par la suite.

Une partie des cellules obtenues sera envoyé à notre collaborateur en Allemagne sous forme dénominalisée (sans aucune information révélant votre identité, mais seulement un numéro).

Les données pourront être publiées dans des revues spécialisées ou faire l'objet de discussions scientifiques, mais il ne sera pas possible de vous identifier.

Initiales: _____

Page 3 de 5

Sujets aMCI - Version 2, datée du 21 octobre 2010

Formulaire d'information et de consentement approuvé par le CÉR sur le vieillissement le 12 novembre 2010

SIGNATURES IMMUNES PRÉDISANT LE DÉVELOPPEMENT ET LA PROGRESSION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER : L'IMPACT DE L'IMMUNOSÉNESCENCE ET DE L'INFECTION AU CYTOMÉGALOVIRUS

À des fins de surveillance et de contrôle, votre dossier de recherche ainsi que vos dossiers médicaux, s'il y a lieu, pourront être consultés par une personne mandatée par le Comité d'éthique de la recherche du CSSS-IUGS ou par l'établissement, ou encore par une personne nommée par un organisme autorisé. Toutes ces personnes et ces organismes adhèrent à une politique de confidentialité.

À des fins de protection, notamment afin de pouvoir communiquer avec vous rapidement, vos noms et prénoms, vos coordonnées et la date de début et de fin de votre participation au projet seront conservés pendant un an après la fin du projet dans un répertoire maintenu par le chercheur responsable ou par l'établissement. Ce fichier sera détruit par la suite.

INDEMNISATION EN CAS DE PRÉJUDICE ET DROITS DU SUJET DE RECHERCHE

Si vous deviez subir quelque préjudice que ce soit dû à votre participation au projet de recherche, vous recevrez tous les soins et services requis par votre état de santé, sans frais de votre part.

En acceptant de participer à ce projet, vous ne renoncez à aucun de vos droits ni ne libérez les chercheurs, l'organisme subventionnaire ou l'établissement de leur responsabilité civile et professionnelle.

IDENTIFICATION DES PERSONNES-RESSOURCES

Si vous avez des questions concernant le projet de recherche ou si vous éprouvez un problème que vous croyez relié à votre participation, vous pouvez communiquer avec les personnes suivantes :

Dr Tamàs Fülöp, chercheur responsable : 819 780-2220, poste 46254

Infirmière de recherche : 819 780-2220, poste 46477

Pour toute question concernant vos droits en tant que sujet participant à ce projet de recherche ou si vous avez des plaintes ou des commentaires à formuler, vous pouvez communiquer avec le commissaire local aux plaintes et à la qualité des services du CSSS-IUGS au numéro 819 780-2220, poste 40204.

SURVEILLANCE DES ASPECTS ÉTHIQUES

Le Comité d'éthique de la recherche sur le vieillissement du CSSS-IUGS a approuvé ce projet de recherche et en assure le suivi administratif annuel. De plus, il approuvera au préalable toute révision et toute modification apportée au formulaire d'information et de consentement et au protocole de recherche.

CONSENTEMENT

J'ai pris connaissance du présent formulaire d'information et de consentement. Je reconnais qu'on m'a expliqué le projet, qu'on a répondu à mes questions.

Je consens à participer à ce projet de recherche aux conditions qui y sont énoncées. Une copie signée et datée du présent formulaire d'information et de consentement me sera remise.

Nom et signature du participant

Date

Initiales: _____

Page 4 de 5

Sujets aMCI - Version 2, datée du 21 octobre 2010

Formulaire d'information et de consentement approuvé par le CÉR sur le vieillissement le 12 novembre 2010

SIGNATURES IMMUNES PRÉDISANT LE DÉVELOPPEMENT ET LA PROGRESSION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER : L'IMPACT DE L'IMMUNOSÉNESCENCE ET DE L'INFECTION AU CYTOMÉGALOVIRUS

AUTORISATIONS

Transmission des résultats

Lors de ce projet de recherche, nous effectuerons certains tests de dépistage. Tout résultat anormal qui en résulterait vous sera communiqué par l'entremise d'un médecin de votre choix. Ceci ne s'applique toutefois pas au test du génotypage de l'ApoE.

- Souhaitez-vous que le chercheur responsable de ce projet informe votre médecin traitant de votre participation à ce projet ?
Oui Non
- Autorisez-vous le chercheur responsable de ce projet à transmettre à votre médecin traitant les résultats anormaux si ces informations peuvent avoir une utilité clinique :
Oui Non

Nom et adresse du médecin traitant :

Études ultérieures

Il se peut que les résultats obtenus suite à cette étude donnent lieu à une autre recherche. Dans cette éventualité, autorisez-vous le chercheur responsable de ce projet à vous contacter et à vous demander si vous seriez intéressé(e) à participer à une nouvelle recherche?

Oui Non

SIGNATURE ET ENGAGEMENT DE LA PERSONNE QUI A OBTENU LE CONSENTEMENT

J'ai expliqué au participant les termes du présent formulaire d'information et de consentement et j'ai répondu aux questions qu'il m'a posées.

Nom et signature de l'infirmière de recherche

Date

SIGNATURE ET ENGAGEMENT DU CHERCHEUR RESPONSABLE DU PROJET

Je certifie qu'on a expliqué au participant les termes du présent formulaire d'information et de consentement, que l'on a répondu aux questions qu'il avait à cet égard et qu'on lui a clairement indiqué qu'il demeure libre de mettre un terme à sa participation, et ce, sans préjudice.

Je m'engage avec l'équipe de recherche à respecter ce qui a été convenu au formulaire d'information et de consentement et à en **remettre une copie signée et datée au participant.**

Nom et signature du chercheur responsable du projet

Date



Initiales: _____

Page 5 de 5

Sujets aMCI - Version 2, datée du 21 octobre 2010

Formulaire d'information et de consentement approuvé par le CER sur le vieillissement le 12 novembre 2010

Formulaire de consentement pour patient atteints de la MA.



FORMULAIRE D'INFORMATION ET DE CONSENTEMENT À LA RECHERCHE

TITRE DU PROJET DE RECHERCHE

SIGNATURES IMMUNES PRÉDISANT LE DÉVELOPPEMENT ET LA PROGRESSION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER : L'IMPACT DE L'IMMUNOSENESCENCE ET DE L'INFECTION AU CYTOMÉGALOVIRUS.

CHERCHEUR RESPONSABLE DU PROJET DE RECHERCHE

Dr. Tamàs Fülöp, Service de Gériatrie, Département de médecine, Centre de Recherche sur le Vieillessement, CSSS-IUGS

COLLABORATEURS AU PROJET DE RECHERCHE

Dr Eric Frost, Département de Microbiologie et des Maladies infectieuses, Université de Sherbrooke

Professeur G. Pawelec, Institut d'immunologie, Université de Tübingen, Allemagne

PRÉAMBULE

Vous êtes une personne âgée atteinte de la maladie d'Alzheimer et nous sollicitons votre participation à notre projet de recherche. Cependant, avant d'accepter de participer à ce projet et de signer ce formulaire d'information et de consentement, veuillez prendre le temps de lire, de comprendre et de considérer attentivement les renseignements qui suivent.

Ce formulaire peut contenir des mots que vous ne comprenez pas. Nous vous invitons à poser toutes les questions que vous jugerez utiles au chercheur responsable du projet ou aux autres membres du personnel affecté au projet de recherche et à leur demander de vous expliquer tout mot ou renseignement qui n'est pas clair.

NATURE ET OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

Vous êtes invité(e) à participer à une étude visant à mieux connaître le système de défense de l'organisme dans la maladie d'Alzheimer.

La réponse immune est responsable de la défense de l'organisme contre les virus, les bactéries et les autres agresseurs internes. Avec le vieillissement, la défense immune diminue, ce qui contribue à l'augmentation des maladies dégénératives (Alzheimer, maladies cardio-vasculaires).

Nous ne savons pas pourquoi la réponse immune diminue avec l'âge et comment cette diminution est reliée à la maladie d'Alzheimer. La dérégulation de la réponse immune peut résulter en une inflammation chronique telle qu'on la retrouve dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer.

Notre but est d'investiguer et de comprendre quel rôle les altérations de la membrane cellulaire et les signaux intracellulaires, l'infection virale chronique éventuelle et les changements dans les différents types de sous-populations de lymphocytes T jouent dans la maladie d'Alzheimer. Nous allons aussi relier ces résultats au génotype de l'ApoE.

Pour cela, nous allons étudier l'interaction entre les cellules du système immunitaire (lymphocytes et macrophages) avec des protéines impliquées dans le développement de la maladie d'Alzheimer.

Initiales: _____

Page 1 de 5

Sujets Alzheimer - Version 2, datée du 21 octobre 2010
Formulaire d'information et de consentement approuvé par le CÉR sur le vieillissement le 12 novembre 2010

SIGNATURES IMMUNES PRÉDISANT LE DÉVELOPPEMENT ET LA PROGRESSION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER : L'IMPACT DE L'IMMUNOSENESCENCE ET DE L'INFECTION AU CYTOMÉGALOVIRUS

DÉROULEMENT DU PROJET DE RECHERCHE

Pour réaliser cette étude, qui va se dérouler sur une période de 4 ans, nous procéderons à chaque année à une prise de sang de 80 ml (environ 6 c. à table), faite au creux du bras. La première prise de sang s'effectuera tout de suite après que vous ayez lu et signé ce consentement.

Nous vous demandons d'être à jeun depuis 6 heures pour la prise de sang.

Un déjeuner vous sera offert après la prise de sang.

Les prélèvements auront lieu au pavillon D'Youville, St Joseph, St Vincent ou au pavillon Argyll du Centre de santé et de services sociaux – Institut universitaire de gériatrie de Sherbrooke, le matin vers 8 h 00. Le temps requis pour la visite sera d'environ 20 minutes.

Il est très important, pour l'étude, que nous connaissions votre état de santé, de même que tous les médicaments que vous avez pris durant les six (6) derniers mois (médicaments prescrits par votre médecin ou achetés sans prescription en pharmacie). Votre état de santé sera donc évalué par le médecin de l'étude. À partir du sang recueilli, nous ferons l'étude de votre taux de sucre dans le sang (glycémie), de votre cholestérol et de paramètres inflammatoires. Nous ferons également une formule sanguine, des tests de fonctions rénale, hépatique, thyroïdienne, et un test de coagulation.

Ce projet comporte également la détermination de votre génotype de l'ApoE. Les gènes ApoE régulent la production d'une protéine qui aide au transport du cholestérol et des autres gras dans le sang vers les cellules du corps.

Il y a trois variantes du gène ApoE (ApoE2, ApoE3 et ApoE4), et la variante ApoE4 est associée à un risque accru de maladie d'Alzheimer.

Cependant, bien que nos gènes soient présents dès la naissance, ils ne sont pas seuls responsables de la maladie d'Alzheimer. Cette maladie semble se développer quand les effets combinés de divers facteurs de risque franchissent un certain seuil et dépassent la capacité des mécanismes naturels de réparation du cerveau qui, normalement, aident à maintenir la santé des cellules nerveuses.

Le test du génotypage de l'ApoE4 n'est utilisé qu'en recherche. En clinique, ce test n'a pas de valeur prédictive.

Donc, notre équipe de recherche souhaite essentiellement effectuer ce test à des fins de recherche. Aucune information sur le résultat de ce test ne sera communiquée ni à vous, à votre famille, à votre médecin traitant, ni à quiconque dans les limites légales.

Le résultat de ce test sera dénominalisé, gardé confidentiellement et exclusivement dans un dossier spécifique autre que votre dossier de recherche, ce qui implique qu'il ne sera pas inclus à votre dossier médical et sera détruit de manière sécuritaire selon les règlements en vigueur dans l'établissement après 5 ans.

Enfin, votre état de cognition sera évalué de nouveau à 18 mois et à 30 mois pour détecter tout signe de changements.

Initiales: _____

Page 2 de 5

Sujets Alzheimer - Version 2, datée du 21 octobre 2010
Formulaire d'information et de consentement approuvé par le CÉR sur le vieillissement le 12 novembre 2010

SIGNATURES IMMUNES PRÉDISANT LE DÉVELOPPEMENT ET LA PROGRESSION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER : L'IMPACT DE L'IMMUNOSÉNESCENCE ET DE L'INFECTION AU CYTOMÉGALOVIRUS

RISQUES

Les prélèvements sanguins peuvent vous causer un certain inconfort, voire même vous causer des douleurs au creux de votre bras ou de légers bleus. Ces bleus disparaissent généralement au bout de deux ou trois jours.

INCONVÉNIENTS

Votre participation à cette étude vous demandera de vous déplacer à six reprises (1 fois par an pendant quatre ans, une fois à 18 mois et une dernière fois à 30 mois) et vous devrez être à jeun le matin pour chacune des prises de sang.

AVANTAGES

Si vous acceptez de participer à cette étude, vous ne retirerez aucun bénéfice direct. Par contre, les connaissances acquises pourraient contribuer à l'avancement des connaissances dans ce domaine.

COMPENSATION

Il n'y a pas de compensation prévue pour les déplacements.

PARTICIPATION VOLONTAIRE ET POSSIBILITÉ DE RETRAIT

Votre participation à ce projet de recherche est volontaire. Vous êtes donc libre de refuser d'y participer. Vous pouvez également vous retirer de ce projet à n'importe quel moment, sans avoir à donner de raisons, en faisant connaître votre décision au chercheur responsable du projet ou à l'un des membres du personnel affecté au projet.

Si vous vous retirez, l'information déjà obtenue dans le cadre de ce projet sera conservée aussi longtemps que nécessaire pour assurer votre sécurité et rencontrer les exigences réglementaires.

CONFIDENTIALITÉ

Durant votre participation à ce projet, le chercheur responsable ainsi que son personnel recueilleront et consigneront dans un dossier de recherche les renseignements vous concernant. Seuls les renseignements nécessaires pour répondre aux objectifs scientifiques de ce projet seront recueillis, soit votre nom, votre sexe, votre date de naissance ainsi que les résultats de tous les tests qui ont été obtenus durant le projet en laboratoire.

Tous les renseignements recueillis demeureront strictement confidentiels dans les limites prévues par la loi. Afin de préserver votre identité et la confidentialité des renseignements, vous ne serez identifié(e) que par un numéro de code. La clé du code, reliant votre nom à votre dossier de recherche, sera conservée par le chercheur responsable.

Le chercheur responsable du projet utilisera les données à des fins de recherche dans le but de répondre aux objectifs scientifiques du projet décrits dans le formulaire d'information et de consentement. Ces données seront conservées pendant 5 ans par le chercheur responsable. Elles seront détruites de manière sécuritaire par la suite.

Une partie des cellules obtenues sera envoyé à notre collaborateur en Allemagne sous forme dénominalisée (sans aucune information révélant votre identité, mais seulement un numéro). Les données pourront être publiées dans des revues spécialisées ou faire l'objet de discussions scientifiques, mais il ne sera pas possible de vous identifier.

À des fins de surveillance et de contrôle, votre dossier de recherche ainsi que vos dossiers médicaux, s'il y a lieu, pourront être consultés par une personne mandatée par le Comité d'éthique de la recherche du CSSS-IUGS ou par l'établissement, ou encore par une personne nommée par

Initiales: _____

Page 3 de 5

Sujets Alzheimer - Version 2, datée du 21 octobre 2010
Formulaire d'information et de consentement approuvé par le CÉR sur le vieillissement le 12 novembre 2010

SIGNATURES IMMUNES PRÉDISANT LE DÉVELOPPEMENT ET LA PROGRESSION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER : L'IMPACT DE L'IMMUNOSENESCENCE ET DE L'INFECTION AU CYTOMÉGALOVIRUS

un organisme autorisé. Toutes ces personnes et ces organismes adhèrent à une politique de confidentialité.

À des fins de protection, notamment afin de pouvoir communiquer avec vous rapidement, vos noms et prénoms, vos coordonnées et la date de début et de fin de votre participation au projet seront conservés pendant un an après la fin du projet dans un répertoire maintenu par le chercheur responsable ou par l'établissement. Ce fichier sera détruit par la suite.

INDEMNISATION EN CAS DE PRÉJUDICE ET DROITS DU SUJET DE RECHERCHE

Si vous deviez subir quelque préjudice que ce soit dû à votre participation au projet de recherche, vous recevrez tous les soins et services requis par votre état de santé, sans frais de votre part.

En acceptant de participer à ce projet, vous ne renoncez à aucun de vos droits ni ne libérez les chercheurs, l'organisme subventionnaire ou l'établissement de leur responsabilité civile et professionnelle.

IDENTIFICATION DES PERSONNES-RESSOURCES

Si vous avez des questions concernant le projet de recherche ou si vous éprouvez un problème que vous croyez relié à votre participation, vous pouvez communiquer avec les personnes suivantes :

Dr Tamàs Fülöp, chercheur responsable : 819 780-2220, poste 46254

Infirmière de recherche : 819 780-2220, poste 46477

Pour toute question concernant vos droits en tant que sujet participant à ce projet de recherche ou si vous avez des plaintes ou des commentaires à formuler, vous pouvez communiquer avec le commissaire local aux plaintes et à la qualité des services du CSSS-IUGS au numéro 819 562-9121, poste 40204.

SURVEILLANCE DES ASPECTS ÉTHIQUES

Le Comité d'éthique de la recherche sur le vieillissement du CSSS-IUGS a approuvé ce projet de recherche et en assure le suivi administratif annuel. De plus, il approuvera au préalable toute révision et toute modification apportée au formulaire d'information et de consentement et au protocole de recherche.

CONSENTEMENT

J'ai pris connaissance du formulaire d'information et de consentement. Je reconnais qu'on m'a expliqué le projet, qu'on a répondu à mes questions.

Je consens à participer à ce projet de recherche aux conditions qui y sont énoncées. Une copie signée et datée du présent formulaire d'information et de consentement me sera remise.

Nom et signature du participant

Initiales: _____

Page 4 de 5

Sujets Alzheimer - Version 2, datée du 21 octobre 2010
Formulaire d'information et de consentement approuvé par le CÉR sur le vieillissement le 12 novembre 2010

SIGNATURES IMMUNES PRÉDISANT LE DÉVELOPPEMENT ET LA PROGRESSION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER : L'IMPACT DE L'IMMUNOSENESCENCE ET DE L'INFECTION AU CYTOMÉGALOVIRUS

AUTORISATIONS

Transmission des résultats

Lors de ce projet de recherche, nous effectuerons certains tests de dépistage. Tout résultat anormal qui en résulterait vous sera communiqué par l'entremise d'un médecin de votre choix. Ceci ne s'applique toutefois pas au test du génotypage de l'ApoE.

- Souhaitez-vous que le chercheur responsable de ce projet informe votre médecin traitant de votre participation à ce projet?
Oui Non
- Autorisez-vous le chercheur responsable de ce projet à transmettre à votre médecin traitant les résultats anormaux si ces informations peuvent avoir une utilité clinique :
Oui Non

Nom et adresse du médecin traitant : _____

Études ultérieures

Il se peut que les résultats obtenus suite à cette étude donnent lieu à une autre recherche. Dans cette éventualité, autorisez-vous le chercheur responsable de ce projet à vous contacter et à vous demander si vous seriez intéressé(e) à participer à une nouvelle recherche?

Oui Non

SIGNATURE ET ENGAGEMENT DE LA PERSONNE QUI A OBTENU LE CONSENTEMENT

J'ai expliqué au participant les termes du présent formulaire d'information et de consentement et j'ai répondu aux questions qu'il m'a posées.

Nom et signature de l'infirmière de recherche

Date

SIGNATURE ET ENGAGEMENT DU CHERCHEUR RESPONSABLE DU PROJET

Je certifie qu'on a expliqué au participant les termes du présent formulaire d'information et de consentement, que l'on a répondu aux questions qu'il avait à cet égard et qu'on lui a clairement indiqué qu'il demeure libre de mettre un terme à sa participation, et ce, sans préjudice.

Je m'engage avec l'équipe de recherche à respecter ce qui a été convenu au formulaire d'information et de consentement et à en **remettre une copie signée et datée au participant.**

Nom et signature du chercheur responsable du projet

Date



Initiales: _____

Page 5 de 5

Formulaire de consentement pour le représentant légal d'un patient atteint de la MA.



FORMULAIRE D'INFORMATION ET DE CONSENTEMENT À LA RECHERCHE

TITRE DU PROJET DE RECHERCHE

SIGNATURES IMMUNES PRÉDISANT LE DÉVELOPPEMENT ET LA PROGRESSION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER : L'IMPACT DE L'IMMUNOSENESCENCE ET DE L'INFECTION AU CYTOMÉGALOVIRUS.

CHERCHEUR RESPONSABLE DU PROJET DE RECHERCHE

Dr. Tamàs Fülöp, Service de Gériatrie, Département de médecine, Centre de Recherche sur le Vieillissement, CSSS-IUGS

COLLABORATEURS AU PROJET DE RECHERCHE

Dr Eric Frost, Département de Microbiologie et des Maladies infectieuses, Université de Sherbrooke

Professeur G. Pawelec, Institut d'immunologie, Université de Tübingen, Allemagne

PRÉAMBULE

Vous êtes le représentant légal d'une personne âgée atteinte de maladie d'Alzheimer dont nous sollicitons la participation à notre projet de recherche. Cependant, avant d'accepter qu'elle participe à ce projet et de signer ce formulaire d'information et de consentement, veuillez prendre le temps de lire, de comprendre et de considérer attentivement les renseignements qui suivent.

Ce formulaire peut contenir des mots que vous ne comprenez pas. Nous vous invitons à poser toutes les questions que vous jugerez utiles au chercheur responsable du projet ou aux autres membres du personnel affecté au projet de recherche et à leur demander de vous expliquer tout mot ou renseignement qui n'est pas clair.

NATURE ET OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

La personne que vous représentez est invitée à participer à une étude visant à mieux connaître le système de défense de l'organisme dans la maladie d'Alzheimer.

La réponse immune est responsable de la défense de l'organisme contre les virus, les bactéries et les autres agresseurs internes. Avec le vieillissement, la défense immune diminue, ce qui contribue à l'augmentation des maladies dégénératives (Alzheimer, maladies cardio-vasculaires).

Nous ne savons pas pourquoi la réponse immune diminue avec l'âge et comment cette diminution est reliée à la maladie d'Alzheimer. La dérégulation de la réponse immune peut résulter en une inflammation chronique telle qu'on la retrouve dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer.

Initiales: _____

Page 1 de 6

Représentant légal - Version 2, datée du 21 octobre 2010

Formulaire d'information et de consentement approuvé par le CÉR sur le vieillissement le 12 novembre 2010

*SIGNATURES IMMUNES PRÉDISANT LE DÉVELOPPEMENT ET LA PROGRESSION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER :
L'IMPACT DE L'IMMUNOSENESCENCE ET DE L'INFECTION AU CYTOMÉGALOVIRUS*

Notre but est d'investiguer et de comprendre quel rôle les altérations de la membrane cellulaire et les signaux intracellulaires, l'infection virale chronique éventuelle et les changements dans les différents types de sous-populations de lymphocytes T jouent dans la maladie d'Alzheimer. Nous allons aussi relier ces résultats au génotype de l'ApoE.

Pour cela, nous allons étudier l'interaction entre les cellules du système immunitaire (lymphocytes et macrophages) avec des protéines impliquées dans le développement de la maladie d'Alzheimer.

DÉROULEMENT DU PROJET DE RECHERCHE

Pour réaliser cette étude, qui va se dérouler sur une période de 4 ans, nous procéderons à chaque année à une prise de sang de 80 ml (environ 6 c. à table), faite au creux du bras de la personne que vous représentez. La première prise de sang s'effectuera tout de suite après que vous ayez lu et signé ce consentement.

Nous demandons à la personne que vous représentez d'être à jeun depuis 6 heures pour la prise de sang.

Un déjeuner lui sera offert après la prise de sang.

Les prélèvements auront lieu au pavillon D'Youville, St Joseph, St Vincent ou au pavillon Argyll du Centre de santé et de services sociaux – Institut universitaire de gériatrie de Sherbrooke, le matin vers 8 h. Le temps requis pour la visite sera d'environ 20 minutes.

Il est très important, pour l'étude, que nous connaissions l'état de santé de la personne que vous représentez, de même que tous les médicaments qu'elle a pris durant les six (6) derniers mois (médicaments prescrits par son médecin ou achetés sans prescription en pharmacie). Son état de santé sera donc évalué par un médecin. À partir du sang recueilli, nous ferons l'étude de son taux de sucre dans le sang (glycémie), de son cholestérol et de paramètres inflammatoires. Nous ferons également une formule sanguine, des tests de fonctions rénale, hépatique, thyroïdienne, et un test de coagulation.

Ce projet comporte également la détermination du génotype de l'ApoE. Les gènes ApoE régulent la production d'une protéine qui aide au transport du cholestérol et des autres gras dans le sang vers les cellules du corps.

Il y a trois variantes du gène ApoE (ApoE2, ApoE3 et ApoE4), et la variante ApoE4 est associée à un risque accru de maladie d'Alzheimer.

Cependant, bien que nos gènes soient présents dès la naissance, ils ne sont pas seuls responsables de la maladie d'Alzheimer. Cette maladie semble se développer quand les effets combinés de divers facteurs de risque franchissent un certain seuil et dépassent la capacité des mécanismes naturels de réparation du cerveau qui, normalement, aident à maintenir la santé des cellules nerveuses.

Le test du génotypage de l'ApoE4 n'est utilisé qu'en recherche. En clinique, ce test n'a pas de valeur prédictive.

Donc, notre équipe de recherche souhaite essentiellement effectuer ce test à des fins de recherche. Aucune information sur le résultat de ce test ne sera communiquée ni à vous, à la famille ou au médecin traitant de la personne que vous représentez, ni à quiconque dans les limites légales.

Initiales: _____

Page 2 de 6

Représentant légal - Version 2, datée du 21 octobre 2010
Formulaire d'information et de consentement approuvé par le CÉR sur le vieillissement le 12 novembre 2010

*SIGNATURES IMMUNES PRÉDISANT LE DÉVELOPPEMENT ET LA PROGRESSION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER :
L'IMPACT DE L'IMMUNOSENESCENCE ET DE L'INFECTION AU CYTOMÉGALOVIRUS*

Le résultat de ce test sera dénominalisé, gardé confidentiellement et exclusivement dans un dossier spécifique autre que le dossier de recherche de la personne que vous représentez, ce qui implique qu'il ne sera pas inclus à son dossier médical et sera détruit de manière sécuritaire selon les règlements en vigueur dans l'établissement après 5 ans.

Son état de cognition sera aussi réévalué à 18 mois et à 30 mois pour détecter tout signe de changements.

RISQUES

Les prélèvements sanguins peuvent causer un certain inconfort, voire même causer des douleurs au creux du bras ou de légers bleus. Ces bleus disparaissent généralement au bout de deux ou trois jours.

INCONVÉNIENTS

La participation de la personne que vous représentez à cette étude lui demandera de se déplacer à six reprises (1 fois par an pendant quatre ans, une fois à 18 mois et une dernière fois à 30 mois) et elle devra être à jeun le matin pour chacune des prises de sang.

AVANTAGES

Si vous acceptez que la personne que vous représentez participe à cette étude, cette dernière ne retirera aucun bénéfice direct. Par contre, les connaissances acquises pourraient contribuer à l'avancement des connaissances dans ce domaine.

COMPENSATION

Il n'y a pas de compensation prévue pour les déplacements.

PARTICIPATION VOLONTAIRE ET POSSIBILITÉ DE RETRAIT

Votre décision quant à la participation de la personne que vous représentez à ce projet est volontaire. Vous êtes donc libre de refuser qu'elle y participe. Vous pouvez également la retirer de ce projet à n'importe quel moment, sans avoir à donner de raisons, en faisant connaître votre décision au chercheur responsable du projet ou à l'un des membres du personnel affecté au projet.

Si vous la retirez, l'information déjà obtenue dans le cadre de ce projet sera conservée aussi longtemps que nécessaire pour assurer votre sécurité et rencontrer les exigences réglementaires.

CONFIDENTIALITÉ

Durant la participation de la personne que vous représentez à ce projet, le chercheur responsable ainsi que son personnel recueilleront et consigneront dans un dossier de recherche les renseignements la concernant. Seuls les renseignements nécessaires pour répondre aux objectifs scientifiques de ce projet seront recueillis, soit son nom, son sexe, sa date de naissance ainsi que les résultats de tous les tests qui auront été obtenus durant le projet en laboratoire.

Tous les renseignements recueillis demeureront strictement confidentiels dans les limites prévues par la loi. Afin de préserver l'identité de la personne que vous représentez et la confidentialité des renseignements, elle ne sera identifiée que par un numéro de code. La clé du code, reliant son nom à son dossier de recherche, sera conservée par le chercheur responsable.

Initiales: _____

Page 3 de 6

Représentant légal - Version 2, datée du 21 octobre 2010
Formulaire d'information et de consentement approuvé par le CÉR sur le vieillissement le 12 novembre 2010

*SIGNATURES IMMUNES PRÉDISANT LE DÉVELOPPEMENT ET LA PROGRESSION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER :
L'IMPACT DE L'IMMUNOSENESCENCE ET DE L'INFECTION AU CYTOMÉGALOVIRUS*

Le chercheur responsable du projet utilisera les données à des fins de recherche dans le but de répondre aux objectifs scientifiques du projet décrits dans le formulaire d'information et de consentement. Ces données seront conservées pendant 5 ans par le chercheur responsable. Elles seront détruites de manière sécuritaire par la suite.

Une partie des cellules obtenues sera envoyée à notre collaborateur en Allemagne sous forme dénominalisée (sans aucune information révélant l'identité de la personne que vous représentez mais seulement par un numéro).

Les données pourront être publiées dans des revues spécialisées ou faire l'objet de discussions scientifiques, mais il ne sera pas possible d'identifier la personne que vous représentez.

À des fins de surveillance et de contrôle, le dossier de recherche de la personne que vous représentez ainsi que ses dossiers médicaux, s'il y a lieu, pourront être consultés par une personne mandatée par le Comité d'éthique de la recherche du CSSS-IUGS ou par l'établissement, ou encore par une personne nommée par un organisme autorisé. Toutes ces personnes et ces organismes adhèrent à une politique de confidentialité.

À des fins de protection, notamment afin de pouvoir communiquer avec vous rapidement, vos nom et prénom, ainsi que ceux de la personne, que vous représentez, ses coordonnées et la date de début et de fin de la participation du sujet au projet seront conservés pendant un an après la fin du projet dans un répertoire maintenu par le chercheur responsable ou par l'établissement. Ce fichier sera détruit par la suite.

INDEMNISATION EN CAS DE PRÉJUDICE ET DROITS DU SUJET DE RECHERCHE

Si la personne que vous représentez devait subir quelque préjudice que ce soit dû à sa participation au projet de recherche, elle recevra tous les soins et services requis par son état de santé, sans frais de votre part.

En acceptant de participer à ce projet, la personne que vous représentez et vous-même ne renoncez à aucun de vos droits ni ne libérez les chercheurs, l'organisme subventionnaire ou l'établissement de leur responsabilité civile et professionnelle.

IDENTIFICATION DES PERSONNES-RESSOURCES

Si vous avez des questions concernant le projet de recherche ou si la personne que vous représentez éprouve un problème que vous croyez relié à sa participation, vous pouvez communiquer avec les personnes suivantes :

Dr Tamàs Fülöp, chercheur responsable : 819 780-2220, poste 46254

Infirmière de recherche : 819 780-2220, poste 46477

Pour toute question concernant les droits de la personne que vous représentez en tant que sujet participant à ce projet de recherche ou si vous avez des plaintes ou des commentaires à formuler, vous pouvez communiquer avec le commissaire local aux plaintes et à la qualité des services du CSSS-IUGS au numéro 819 780-2220, poste 40204.

SURVEILLANCE DES ASPECTS ÉTHIQUES

Le Comité d'éthique de la recherche sur le vieillissement du CSSS-IUGS a approuvé ce projet de recherche et en assure le suivi administratif annuel. De plus, il approuvera au préalable toute révision et toute modification apportée au formulaire d'information et de consentement et au protocole de recherche.

Initiales: _____

Page 4 de 6

Représentant légal - Version 2, datée du 21 octobre 2010

Formulaire d'information et de consentement approuvé par le CÉR sur le vieillissement le 12 novembre 2010

*SIGNATURES IMMUNES PRÉDISANT LE DÉVELOPPEMENT ET LA PROGRESSION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER :
L'IMPACT DE L'IMMUNOSENESCENCE ET DE L'INFECTION AU CYTOMÉGALOVIRUS*

CONSENTEMENT

En tant que représentant légal de _____, j'ai pris connaissance du formulaire d'information et de consentement. Je reconnais qu'on m'a expliqué le projet, qu'on a répondu à mes questions et qu'on m'a laissé le temps voulu pour prendre une décision.

Je consens à ce que _____ participe à ce projet de recherche aux conditions qui y sont énoncées. Une copie signée et datée du présent formulaire d'information et de consentement me sera remise.

Nom et signature du représentant légal

Date

AUTORISATIONS

Transmission des résultats

Lors de ce projet de recherche, nous effectuerons certains tests de dépistage. Tout résultat anormal qui en résulterait vous sera communiqué par l'entremise d'un médecin de votre choix. Ceci ne s'applique toutefois pas au test du génotypage de l'ApoE.

- Souhaitez-vous que le chercheur responsable de ce projet informe le médecin traitant de la personne que vous représentez de sa participation à ce projet ?
Oui Non
- Autorisez-vous le chercheur responsable de ce projet à transmettre au médecin traitant de la personne que vous représentez ses résultats anormaux si ces informations peuvent avoir une utilité clinique :
Oui Non

Nom et adresse du médecin traitant :

Études ultérieures

Il se peut que les résultats obtenus suite à cette étude donnent lieu à une autre recherche. Dans cette éventualité, autorisez-vous le chercheur responsable de ce projet à vous contacter et à vous demander si vous seriez intéressé(e) à ce que la personne que vous représentez participe à une nouvelle recherche ?
Oui Non

Initiales: _____

Page 5 de 6

Représentant légal - Version 2, datée du 21 octobre 2010
Formulaire d'information et de consentement approuvé par le CÉR sur le vieillissement le 12 novembre 2010

*SIGNATURES IMMUNES PRÉDISANT LE DÉVELOPPEMENT ET LA PROGRESSION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER :
L'IMPACT DE L'IMMUNOSENESCENCE ET DE L'INFECTION AU CYTOMÉGALOVIRUS*

SIGNATURE ET ENGAGEMENT DE LA PERSONNE QUI A OBTENU LE CONSENTEMENT

J'ai expliqué au représentant légal du participant les termes du présent formulaire d'information et de consentement et j'ai répondu aux questions qu'il m'a posées.

Nom et signature de l'infirmière de recherche

Date

SIGNATURE ET ENGAGEMENT DU CHERCHEUR RESPONSABLE DU PROJET

Je certifie qu'on a expliqué au représentant légal du participant les termes du présent formulaire d'information et de consentement, que l'on a répondu aux questions qu'il avait à cet égard et qu'on lui a clairement indiqué qu'il demeure libre de mettre un terme à sa participation, et ce, sans préjudice.

Je m'engage avec l'équipe de recherche à respecter ce qui a été convenu au formulaire d'information et de consentement et à en **remettre une copie signée et datée au représentant légal du participant.**

Nom et signature du chercheur responsable du projet

Date



Initiales:

Page 6 de 6

Représentant légal - Version 2, datée du 21 octobre 2010
Formulaire d'information et de consentement approuvé par le CÉR sur le vieillissement le 12 novembre 2010

COHORTE

RECRUTEMENT DES PATIENTS

Des antécédents de cancer, de maladie psychiatrique connue (dépression majeure, schizophrénie), de maladie inflammatoire, d'accident cardio-vasculaire, d'épilepsie, de maladie de Parkinson ou tout autre maladie dégénérative, de diabète insulino-dépendant, de dyslipidémie traitée ou non (avec un taux de cholestérol $\geq 6,5$ mmol/L), d'alcoolisme (actif, en sevrage ou sevré depuis peu) ont été des paramètres d'exclusion pour cette étude. De même, la consommation de cigarettes, la prise de médicaments anticoagulants (tels que le Coumadin), d'anti-oxydants, d'anti-inflammatoires, et d'immunosuppresseurs (tels que la prednisone), ont été d'autres critères d'exclusion, ces substances pouvant influencer les résultats des paramètres immuns et inflammatoires. Les patients âgés en santé recrutés satisfaisaient au protocole SENIEUR (Ligthart et al., 1984; Ligthart, 2001). Ce protocole définit les paramètres de recrutement de patients âgés en santé de choix pour l'étude du système immunitaire permettant de dissocier les effets de l'âge et des maladies.

La cohorte de patients était constituée de 95 personnes âgées entre 65 ans et 85 ans, avec une majorité de femmes (77%, 73/95). Vint quatre personnes âgées en santé (dont 17 femmes et 7 hommes) et 25 patients aMCI (dont 20 femmes et 5 hommes) ont été recrutés. Parmi les patients atteints de la MA, 18 patients avait été diagnostiqués au stade léger (dont 15 femmes et 3 hommes), 12 patients au stade modéré (dont 10 femmes et 2 hommes) et 16 patients au stade sévère (dont 11 femmes et 5 hommes) ont été recrutés. Les moyennes d'âge des personnes âgées en santé, des personnes aMCI et des personnes atteintes de la MA à des stades légers, modérés et sévères étaient respectivement de 71, 74, 79, 81 et 81 ans. Les personnes âgées en santé et aMCI étaient significativement plus jeunes que les patients atteints de la MA avec des valeurs de p d'au moins $p \leq 0,001$ (***) et $p \leq 0,05$ (*).

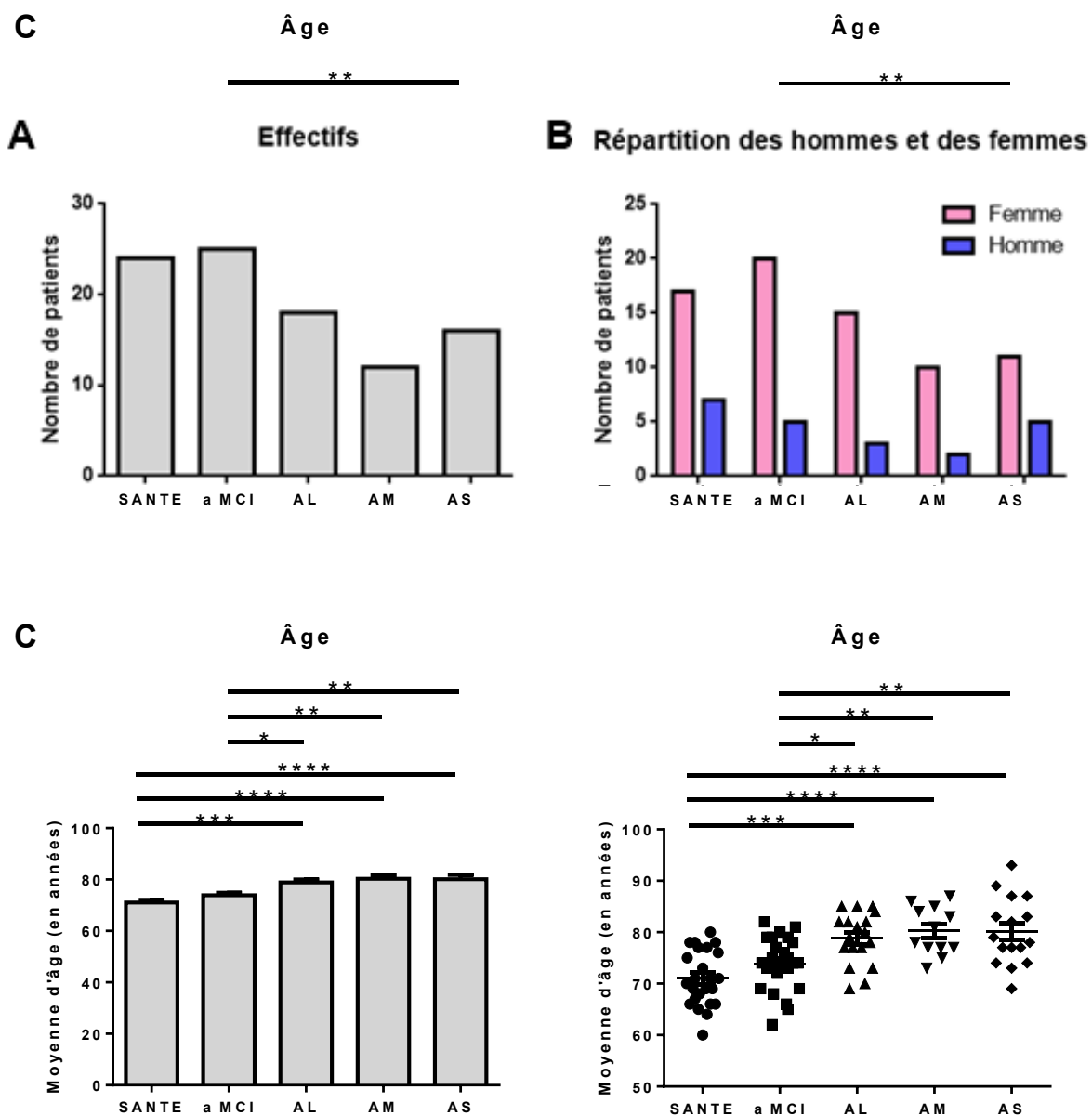


Figure 2. Composition de la cohorte de patient: nombre de patients, répartition hommes-femmes et âge. Figure 2A. Nombre de patients recrutés pour chaque groupe de patients. Figure 2B. Répartition hommes-femmes pour chaque groupe de patients. Figure 2C. Moyenne d'âge des patients pour chaque groupe de patients, présenté en colonne (Figure de gauche) ou en valeurs individuelles (Figure de droite). Les colonnes en rose représentent les femmes et les colonnes en bleu, les hommes. L'abréviation aMCI est utilisée pour les patients amnestique Mild Cognitive Impairment, AL pour Alzheimer léger, AM pour Alzheimer modéré et AS pour Alzheimer sévère. Les astérisques (*, **, ***, ****) correspondent respectivement à $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$, et $p \leq 0,0001$.

CLASSIFICATION DES PATIENTS AU MOYEN DES TESTS NEUROPSYCHOLOGIQUES

Des tests neuropsychologiques ont été effectués afin de mettre en évidence les troubles de la mémoire évocateurs de la MA. La neuropsychologie s'attache à étudier les rapports entre les facultés intellectuelles comportementales et émotionnelles d'une part, et le fonctionnement du cerveau d'autre part. Les tests neuropsychologiques permettent de quantifier les troubles et leur évolution. Pour la MA, on réalise habituellement le test de Folstein appelé aussi *Mini-Mental State Evaluation* (MMSE) et le test cognitif de Montréal (*Montreal Cognitive Assessment*, MoCA) (Folstein et al., 1975; Molloy et Standish, 1997; Nasreddine et al., 2005; Ismail et al., 2010). Par la suite, le diagnostic probable ou possible de la MA est déterminé par le médecin selon les critères définis par le groupe de travail de l'Institut National de Neurologie et des Désordres de Communication et des Attaques Cérébro-Vasculaires avec l'Association pour la maladie d'Alzheimer et autres troubles associés NINCDS-ADRDA (McKhann et al., 1984; Small et al., 1997; Croisile et al., 2012; McKhann et al., 2011). En fonction du diagnostic et des résultats aux tests neuropsychologiques, les patients ont été répartis en 5 groupes: des personnes âgées en bonne santé (SANTÉ), des personnes aMCI (MMSE de 26 et plus), des patients aux stades léger (AL) (MMSE de 25 à 22), modéré (AM) (MMSE de 21 à 14), et sévère (AS) (MMSE de 14 et moins) de la MA. Par ailleurs, si le résultat au test MMSE était inférieur à 24, le test MoCa n'a pas été fait. Au stade sévère de la MA, la plupart des patients, ne sont plus capables d'effectuer les tests cognitifs, ces tests n'ont donc pas été réalisés pour ce groupe de patients.

Centre de santé et de services sociaux –
Institut universitaire de gériatrie
de Sherbrooke

MÉDECIN

ÉCHELLE DE STATUT MENTAL MODIFIÉE (3 MS)*
et
ÉCHELLE DE STATUT MENTAL DE FOLSTEIN (MMSE)**

Traduction et adaptation française du Modified Mini-Mental State (3 MS)* et du Mini Mental Examination ** par le Centre de recherche en gériatrie-géronte du C3SS-HUG3 Hôpital et centre d'hébergement d'Youville (1038, rue Belvédère Sud, Sherbrooke, Qc, Canada J1H 4C4)

* Teng, E.L., Chu, H.C., «The Modified Mini-Mental State (3MS) examination», J. Clin. Psychiatry, 48: 314-317, 1987
** Folstein, M.F., Folstein S.E., Mc Hugh, P.R., «Mini-Mental State, A practical method for grading the clinician», J. Psychiatric Res., 12: 129-136, 1975

3 MS	MMSE	LIEU ET DATE DE NAISSANCE	3 MS	MMSE	3 MS	MMSE	ÉVOCATION DE MOTS	3 MS	MMSE
5		Date: année _____ mois _____ jour _____	0 1 2 3		10		Animaux à quatre pattes (1 point chacun) (30 secondes)		
		Lieu: ville _____	0 1 2		5		ASSOCIATIONS SEMANTIQUES		
		Province _____					<i>Bras - jambes</i>		
3	3	ENREGISTREMENT # _____ (Nombre d'essais _____)	0 1 2 3	0 1 2 3			Parties du corps, membres, extrémités	2	
		#1 CHEMISE, BLEU, HONNÊTETÉ					Se plient, sont longs, ont des os, des muscles...	1	
		#2 (ou CHAUSSURE, BRUN, MODESTIE)					incorrect, ne sait pas, sont différents	0	
		#3 (ou CHANDAIL, BLANC, CHARITÉ)					<i>Rire - pleurer</i>		
7	5	REVERSBILITÉ MENTALE					Sentiments, émotions	2	
		Compte à rebours de 5 à 1					Expressions, bruits, faits avec la bouche...	1	
		Exact	2				incorrect, ne sait pas, sont différents	0	
		1 à 2 erreurs ou omissions	1				<i>Manger - dormir</i>		
		3 erreurs et plus	0				Essentiels à la vie	2	
		Épeler à l'envers le mot: MONDE (ednom)	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5			Fonctions corporelles, activités quotidiennes.		
9	3	PREMIER RAPPEL					« bons pour nous »...	1	
		Rappel spontané	3	0 1			incorrect, ne sait pas, sont différents	0	
		Après: « Quelque chose pour se vêtir »	2		5	1	RÉPÉTITION		
		Après: « CHAUSSURE, CHEMISE, CHANDAIL »	1				« JE VEUX ALLER CHEZ MOI »	2	
		Encore incorrect	0				1 ou 2 mots omis ou erronés	1	
		Rappel spontané	3	0 1			Plus de 2 mots omis ou erronés	0	
		Après: « Une couleur »	2				« PAS DE - SI NI - DE MAIS »	0 1 2 3	0 1
		Après: « BRUN, BLANC, BLEU »	1				CONSIGNES ÉCRITES « FERMEZ VOS YEUX »		
		Encore incorrect	0				Ferme les yeux sans incitation	3	0 1
		Rappel spontané	3	0 1	3	1	Ferme les yeux après incitation	2	
		Après: « Une qualité »	2				Lit à haute voix seulement (spontanément ou sur demande) mais ne ferme pas les yeux	1	
		Après: « HONNÊTETÉ, CHARITÉ, MODESTIE »	1				Ne lit pas correctement et ne ferme pas les yeux	0	
		Encore incorrect	0				ÉCRITURE (1 minute)		
15	5	ORIENTATION TEMPORELLE					JE VEUX ALLER CHEZ MOI	0 1 2 3 4 5	
		Année			5	1	*(MMSE demander au sujet d'écrire une phrase)		0 1
		Exacte	8	0 1			COPIE DE DEUX PENTAGONES (1 minute)		
		Marge d'erreur d'un (1) an	4		10	1	Chaque pentagone		
		Marge d'erreur de 2 - 5 ans	2				5 côtés approximativement égaux	4 4	
		Erreur de plus de 5 ans	0				5 côtés inégaux (>2:1)	3 3	
		Saison		0 1			Autre figure fermée	2 2	
		Exacte ou erreur d'un mois	1				2 lignes ou plus	1 1	
		Erreur de plus d'un mois	0				Moins que 2 lignes	0 0	
		Mots		0 1			Intersection		
		Exact ou marge d'erreur de 5 jours	2				Intersection à 4 angles fermés	2	
		Erreur d'un mois	1				Intersection de moins de 4 angles fermés	1	
		Erreur de plus d'un mois	0				Pas d'intersection	0	
		Date du jour		0 1			CONSIGNES EN 3 ÉTAPES		
		Exacte	3		3	3	PRENEZ CE PAPIER DE LA MAIN DROITE/GAUCHE	0 1	0 1
		Erreur de 1-2 jours	2				PUEZ-LE EN DEUX ET	0 1	0 1
		Erreur de 3-5 jours	1				REDONNEZ-LE MOI	0 1	0 1
		Erreur de plus de 5 jours	0				DEUXIÈME RAPPEL		
		Jour de la semaine		0 1			Rappel spontané	3	
		Exact	1				Après: « Quelque chose pour se vêtir »	2	
		Inexact	0		9		Après: « CHAUSSURE, CHEMISE, CHANDAIL »	1	
5	5	ORIENTATION SPATIALE					Encore incorrect	0	
		Province ou département	0 2	0 1			Rappel spontané	3	
		Pays	0 1	0 1			Après: « Une couleur »	2	
		Ville ou village	0 1	0 1			Après: « BRUN, BLANC, BLEU »	1	
		HÔPITAL (CLINIQUE)/MAGASIN/MAISON	0 1				Encore incorrect	0	
		*(MMSE Hôpital _____ étage _____)		0 1 2			Rappel spontané	3	
5	2	DÉNOMINATION					Après: « Une qualité »	2	
		Front _____ Menton _____ Épaule _____					Après: « HONNÊTETÉ, CHARITÉ, MODESTIE »	1	
		Coude _____ Jointure _____	0 1 2 3 4 5	0 1 2			Encore incorrect	0	
		*(MMSE Crayon _____ Montre _____)		0 1 2					

3 MS MMSE

100 30

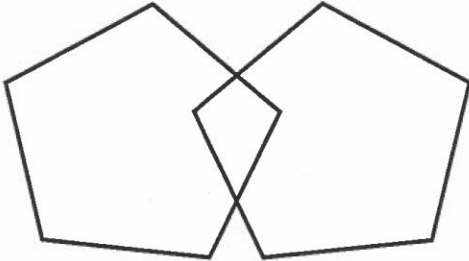
*Consigne et pointage spécifiques au MMSE

EXAMEN MENTAL

MÉDECIN

Figure 3a. Test MMSE (ou de Foldstein) (page 1).

FERMEZ VOS YEUX



Scolarité _____ ans Droitier Gaucher

Commentaires de l'évaluateur (trice) _____

À mon avis,

Le test est valide

Le test est possiblement non valide en raison :

<input type="checkbox"/> d'un problème de vision	<input type="checkbox"/> d'un problème moteur	<input type="checkbox"/> d'un problème d'attention ou de vigilance
<input type="checkbox"/> d'un problème d'audition	<input type="checkbox"/> d'un problème de langage	<input type="checkbox"/> d'un problème psychique (anxiété...)
<input type="checkbox"/> d'un inconfort physique	<input type="checkbox"/> d'un problème environnemental (bruits, distraction...)	
<input type="checkbox"/> d'un manqué de collaboration		
<input type="checkbox"/> autre (précisez) _____		

Signature _____ Date : _____

Approuvé par le comité des dossiers/intégré/rév.08-04-01
 \pub-861\Dossier médical\Examen mental CSSS-IUGS rév.2008.doc

MÉDECIN
EXAMEN MENTAL

Figure 3b Test MMSE (ou de Folstein) (page 2).

Document retiré pour respect du droit d'auteur

Document retiré pour respect du droit d'auteur

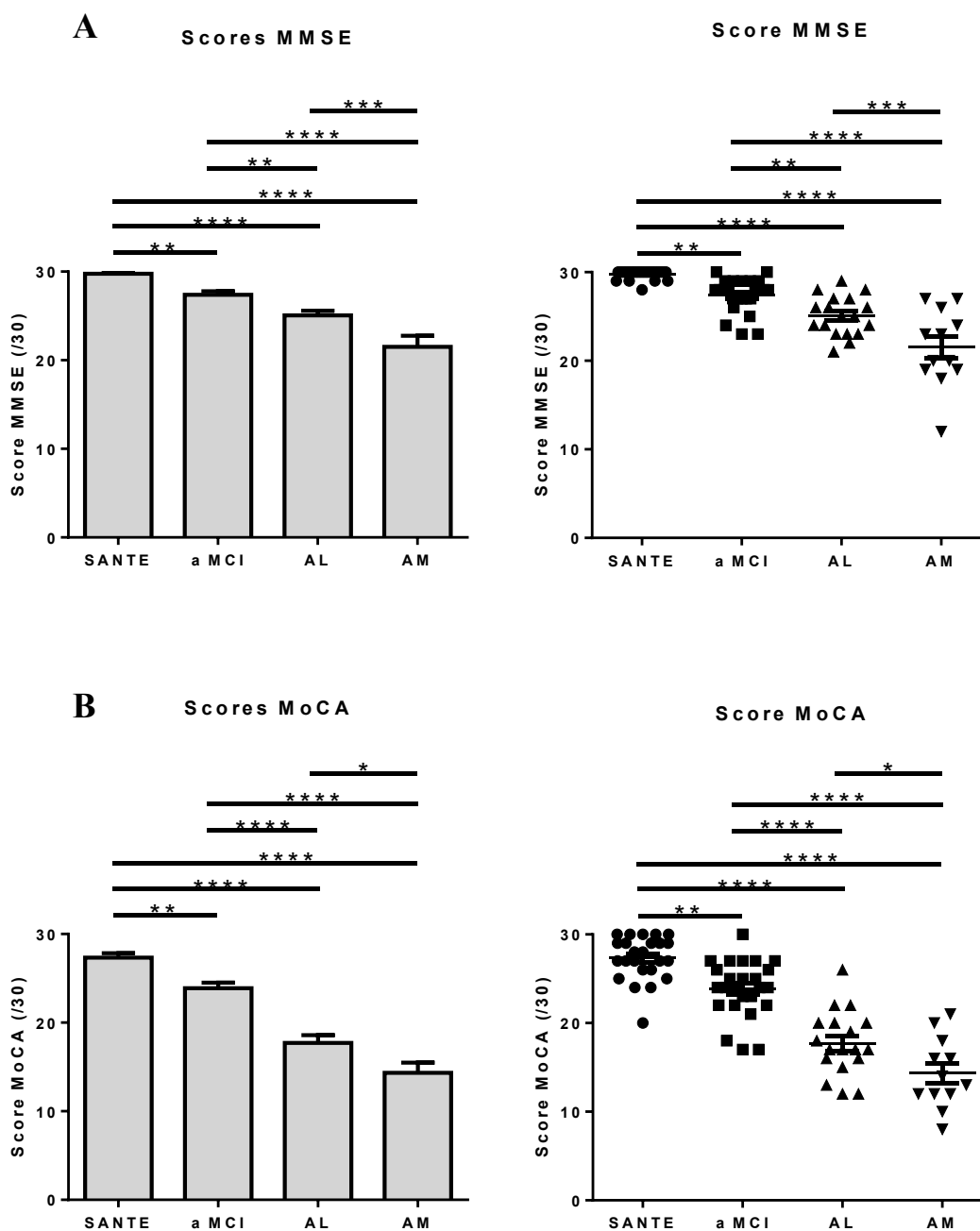


Figure 5. Résultats aux tests MMSE et MoCA des patients de la cohorte. Figure 5A. Scores au test MMSE des patients de la cohorte. Figure 5B. Scores au test MoCA des patients de la cohorte. Présentation en colonne (figures de gauche) ou en point (figures de droite). Les astérisques (*, **, ***, ****) correspondent respectivement à $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$, et $p \leq 0,0001$.

DONNÉES CLINIQUES ASSOCIÉES À LA COHORTE

Chaque patient recruté a fourni 80 ml de sang à jeun. Des paramètres cliniques sanguins indicatifs des fonctions rénales (dosage de la créatinine et de l'azote uréique) et hépatiques (dosage des transaminases, aspartate et alanine aminotransférases), des fonctions thyroïdiennes (dosage de la thyroxine (T4), de la thyroïdostimuline (*Thyroid-Stimulating Hormone*, TSH) et du cortisol), de la coagulation sanguine (dosage du niveau de fibrinogène et mesure du temps de prothrombine (Ratio Normalisé International, RNI), du métabolisme lipidique (mesure des concentrations en cholestérol total, en triglycérine, en cholestérol de type HDL et LDL et glucidique (dosage du glucose) et de l'état nutritif (à travers la mesure des vitamines D, B9 et B12) ont été vérifiés. De plus, un hémogramme ou une numération formule sanguine (NFS) a été effectué.

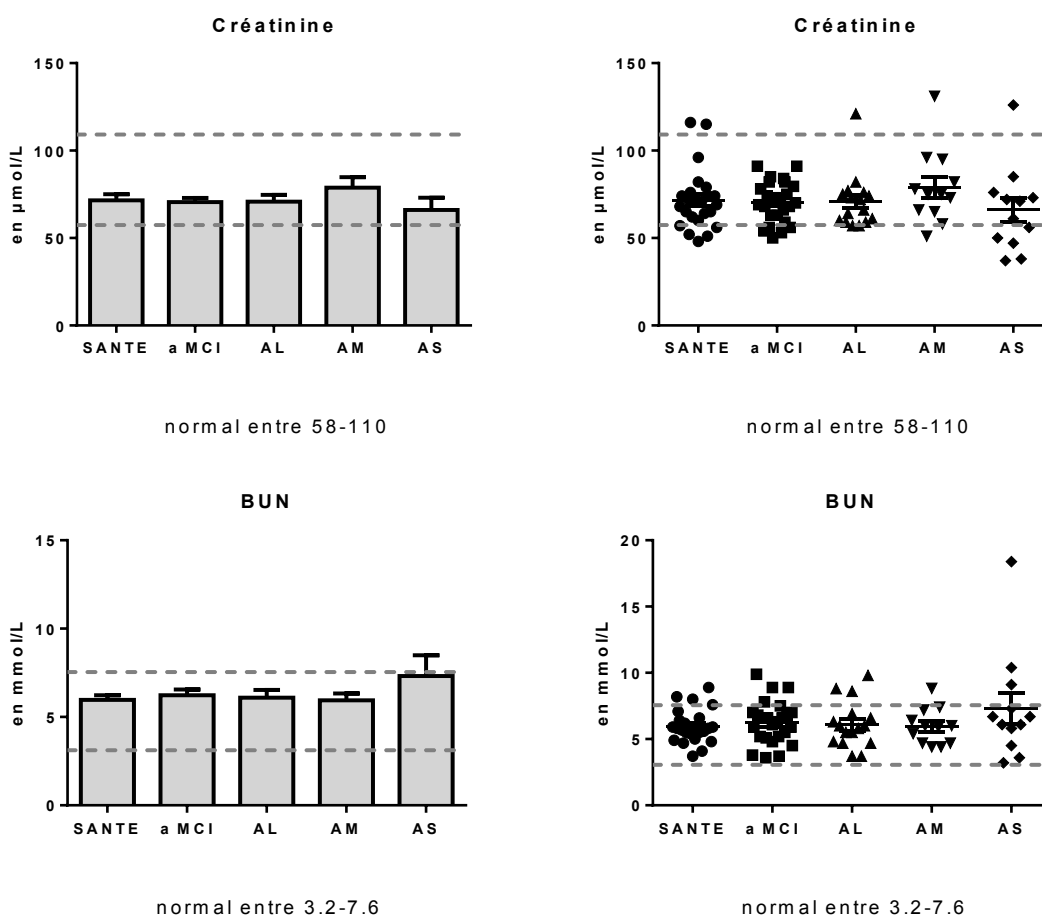


Figure 6. Mesure des fonctions rénales des patients de la cohorte. BUN: *Blood Urea Nitrogen* (azote urique sanguin).

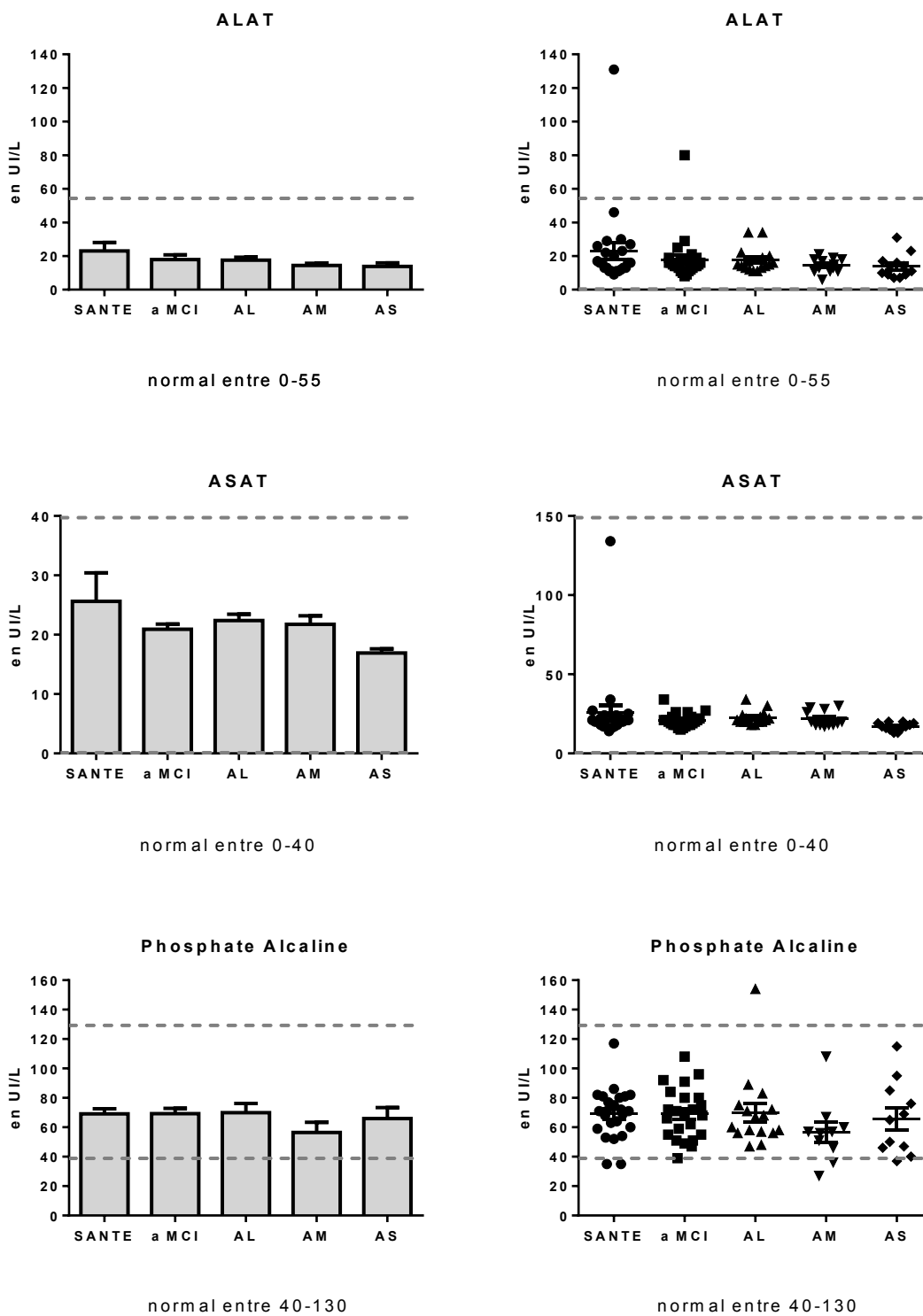


Figure 7. Mesure des fonctions hépatiques des patients de la cohorte. ALAT: Alanine aminotransférase, ASAT: Aspartate aminotransférase.

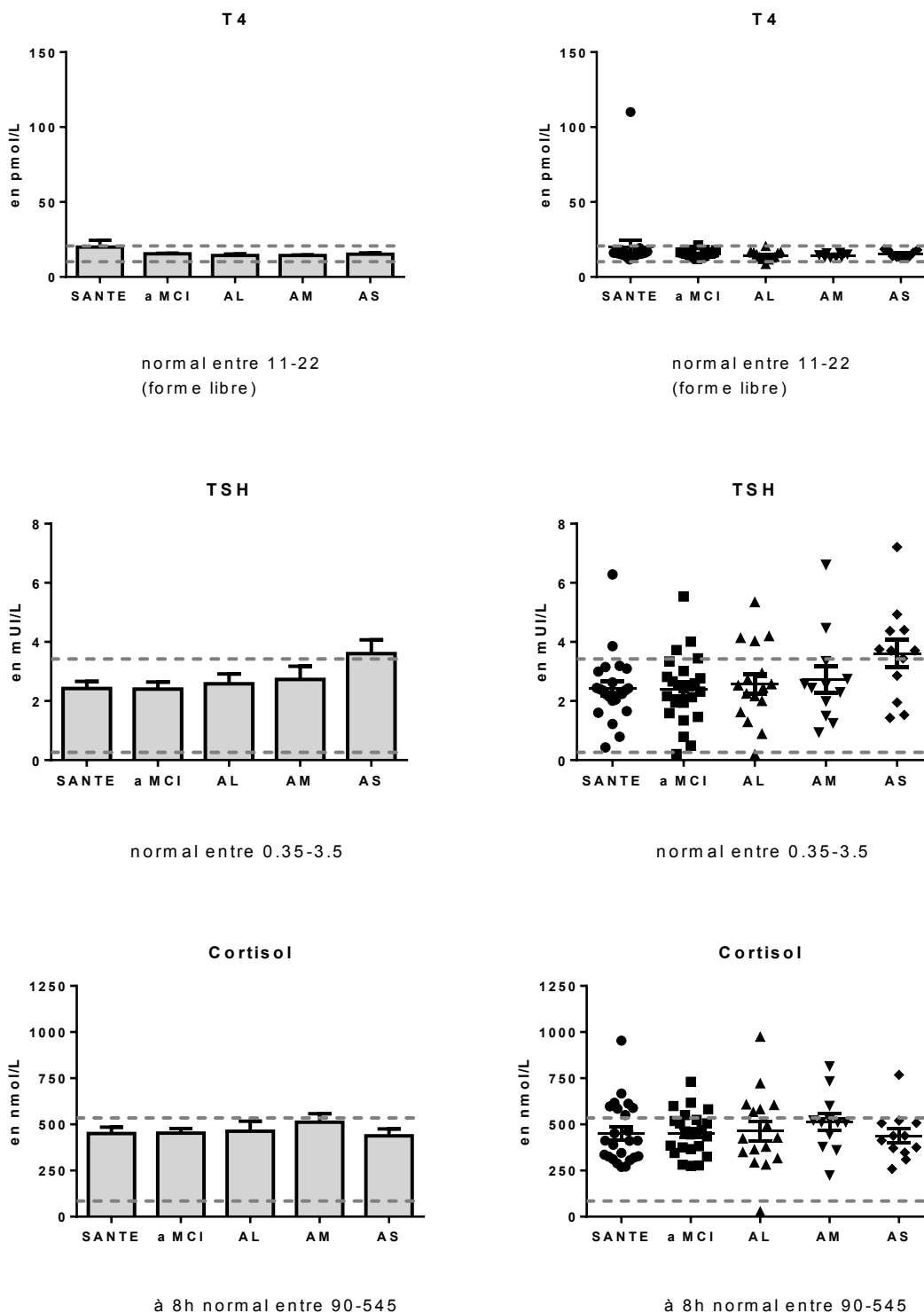


Figure 8. Dosages hormonaux des patients de la cohorte. T4 : thyroxine, TSH : hormone stimulant la thyroïde (*Thyroid-Stimulating Hormone*).

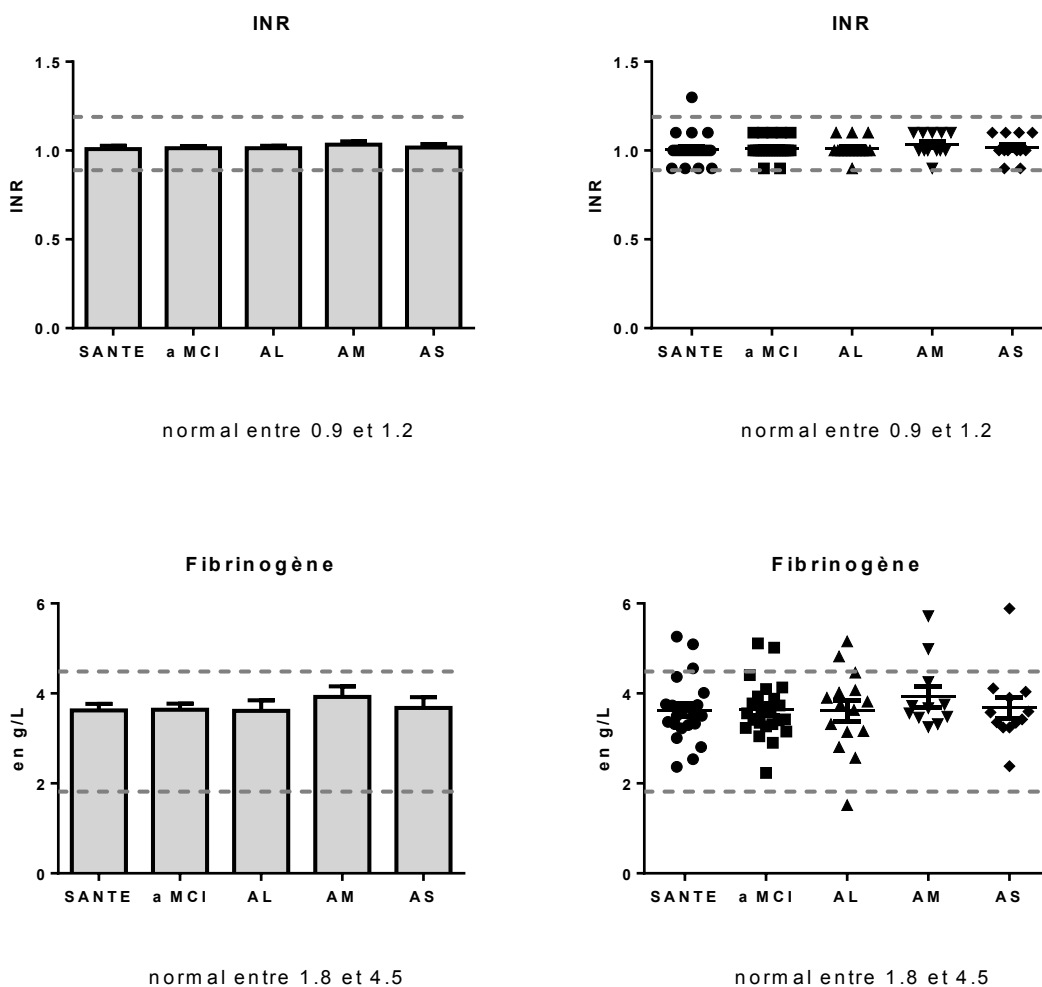
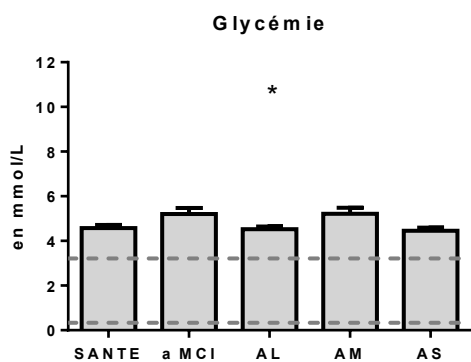
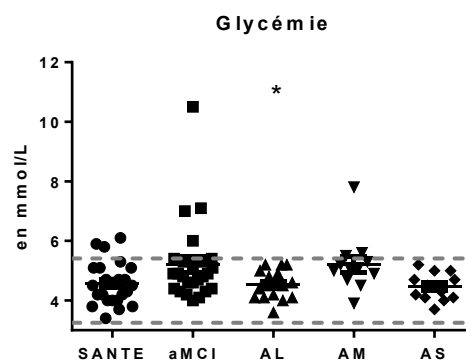


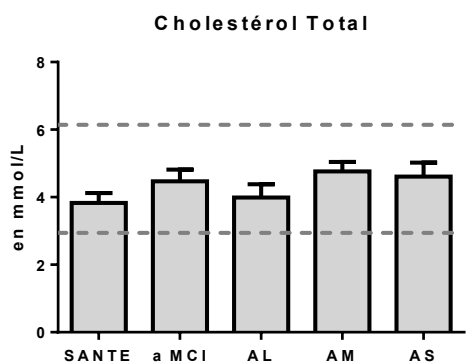
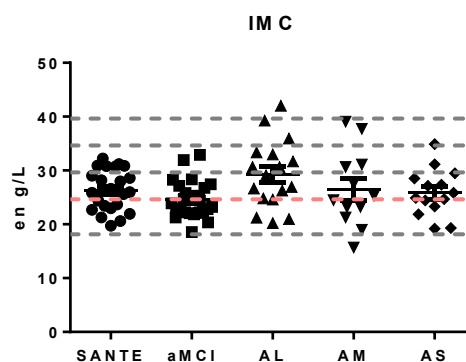
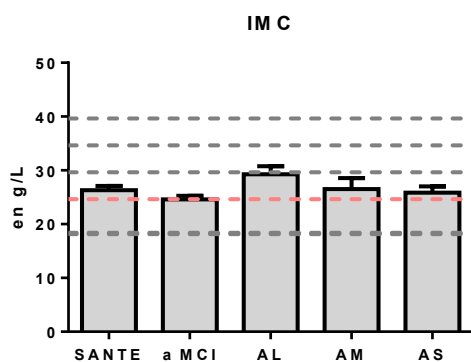
Figure 9. Mesure des capacités de coagulation sanguine des patients de la cohorte.
 INR: Ratio Normalisé International (mesure du temps de coagulation de la prothrombine).



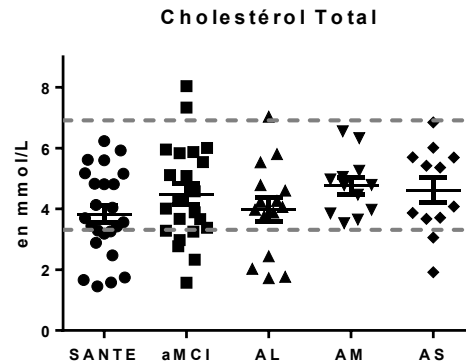
normal entre 3.3-5.5



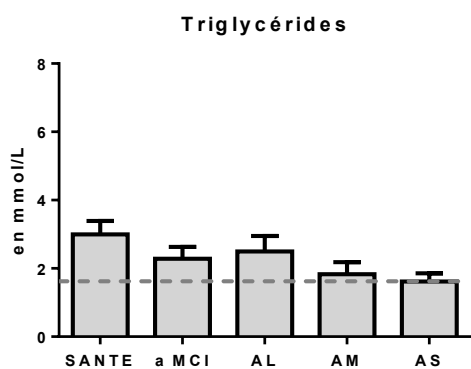
normal entre 3.3-5.5



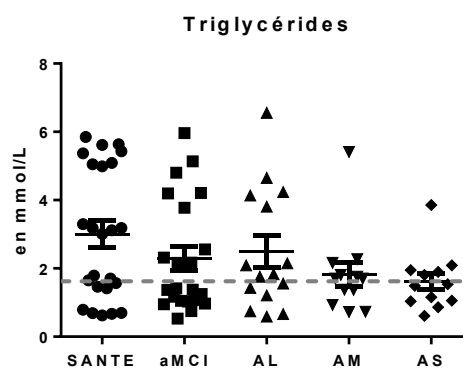
normal entre 3-6.2



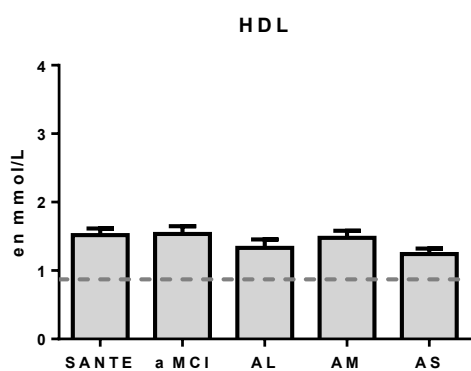
normal entre 3-6.2



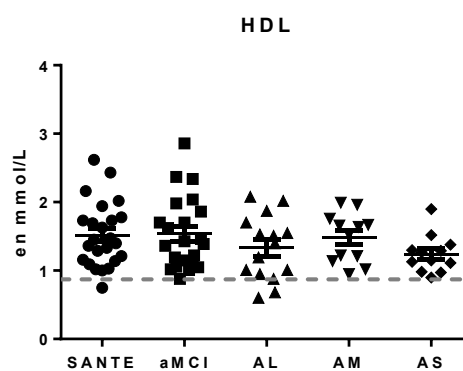
normal < 1.7



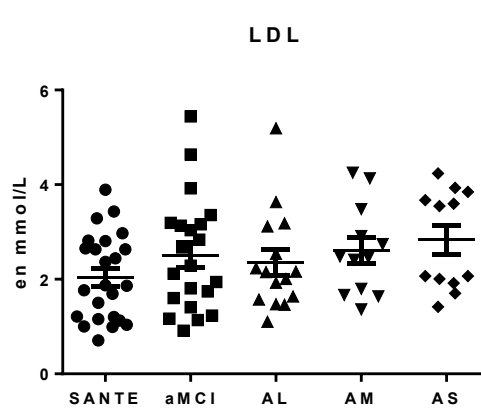
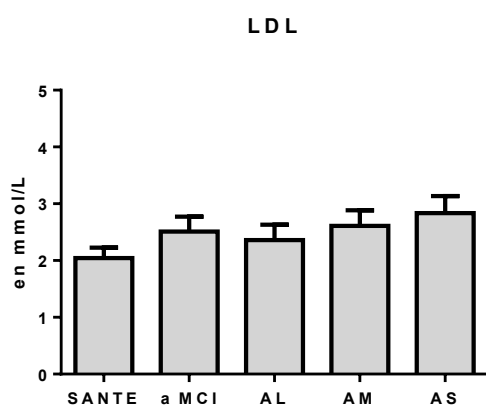
normal < 1.7



normal > 0.9



normal > 0.9



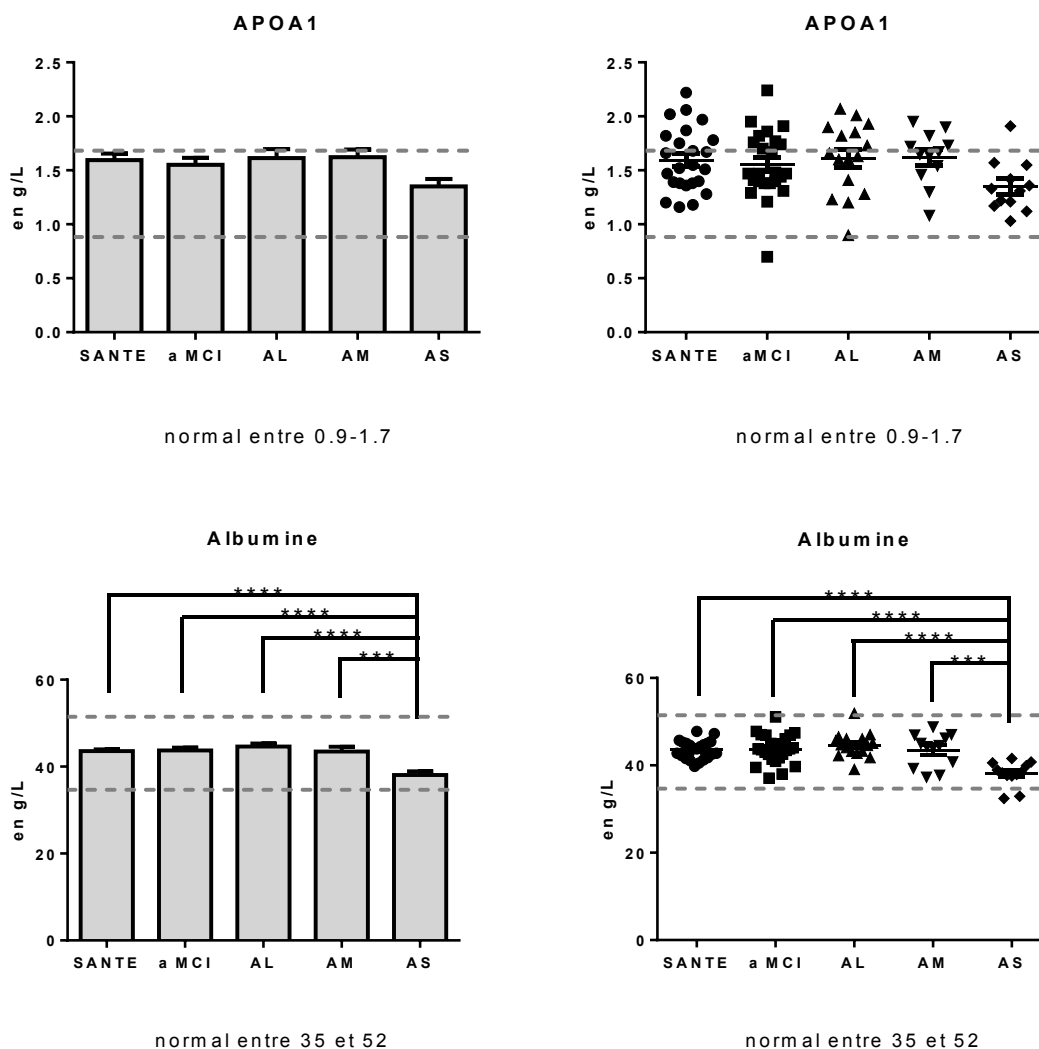


Figure 10. Mesures du métabolisme glucidique, lipidique et protéique des patients de la cohorte. L'IMC, pour Indice de Masse Corporelle, est le ratio entre le poids (en kg) et la taille au carré (en mètre). Selon les lignes directrices canadiennes pour la classification du poids chez l'adulte, un IMC inférieur à 18,5 représente une maigreur, cette maigreur est qualifiée d'extrême si l'IMC est inférieur à 16. L'IMC normal se situe entre 18,5 et 24,9. Au-delà, on parle d'embonpoint (entre 24,9 et 30) et d'obésité de classe 1 à 3 (entre 30 et 35, 35 et 40, et au-delà de 40). L'obésité de classe 3 est l'obésité morbide. HDL : lipoprotéine de densité élevée, LDL : lipoprotéine de faible densité, APOA1 : apolipoprotéine A1. Les astérisques (*, ***, ****) correspondent à $p \leq 0,05$, $p \leq 0,001$, et $p \leq 0,0001$.

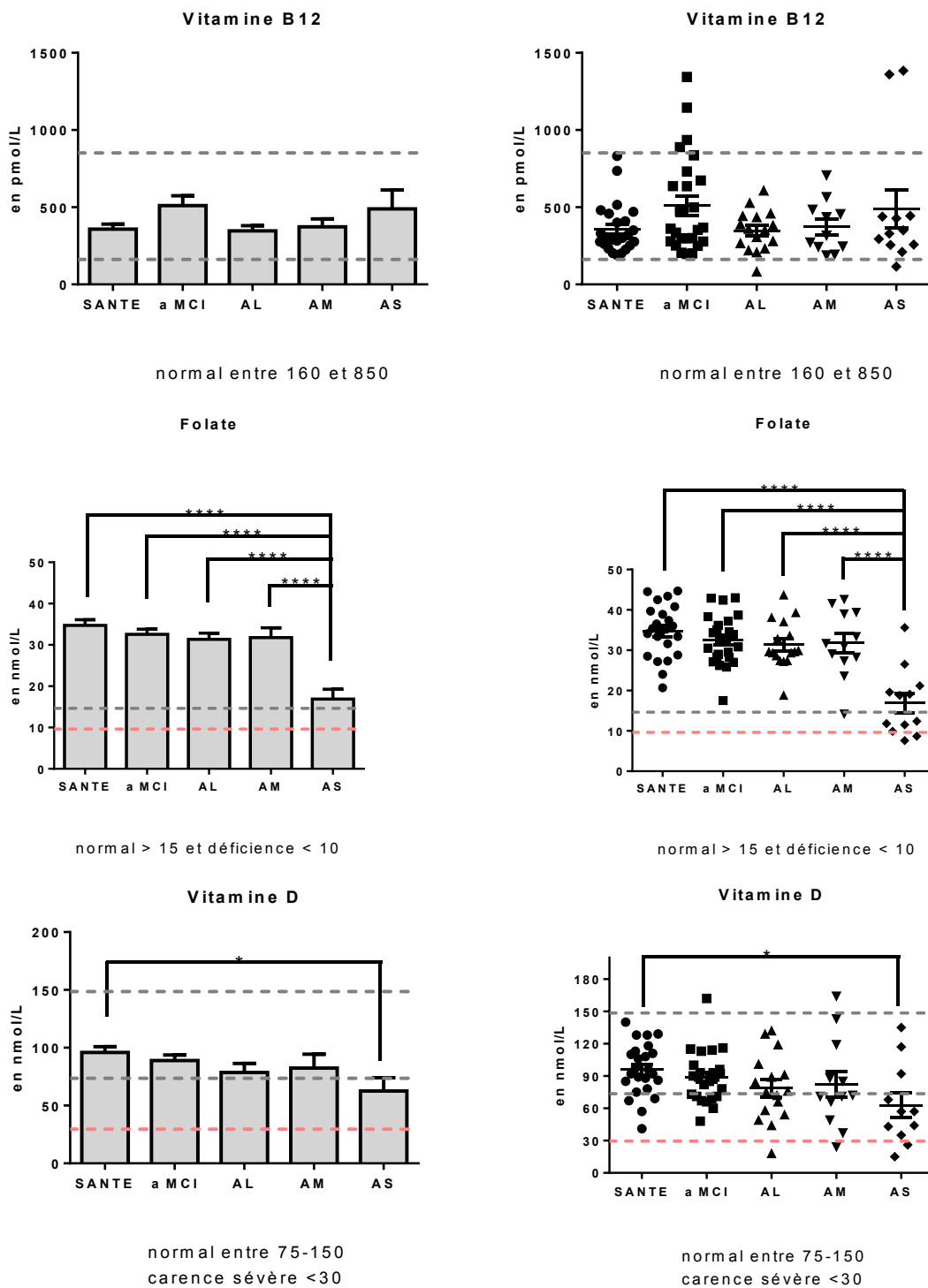
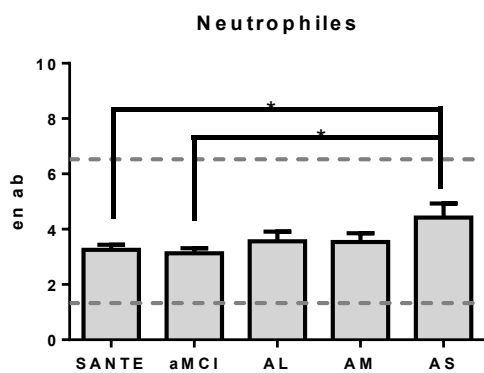
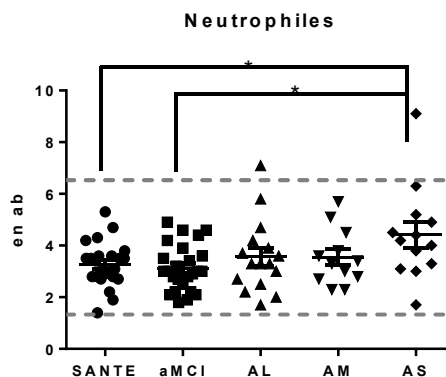


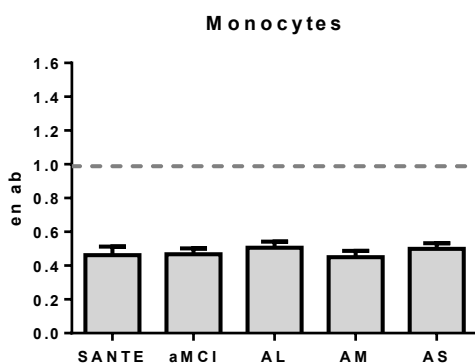
Figure 11. Dosage sanguin des vitamines B12, B9 (folates), et D des patients de la cohorte. Les astérisques (* et **) correspondent à $p \leq 0,05$ et $p \leq 0,0001$.**



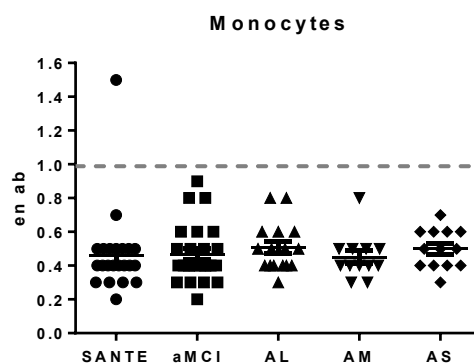
normal entre 1.4-6.6



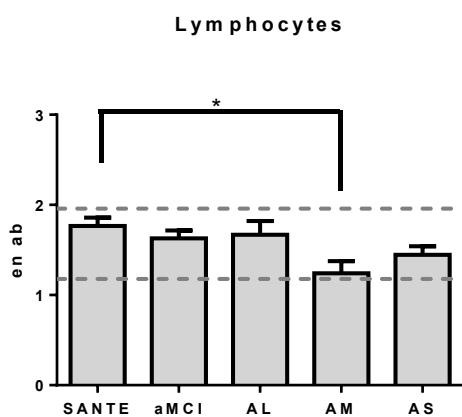
normal entre 1.4-6.6



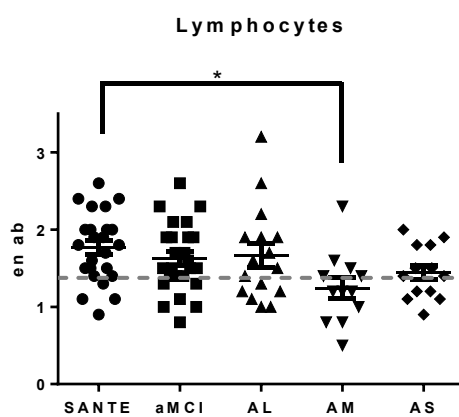
normal entre 0-1



normal entre 0-1



normal entre 1.2-3.5



normal entre 1.2-3.5

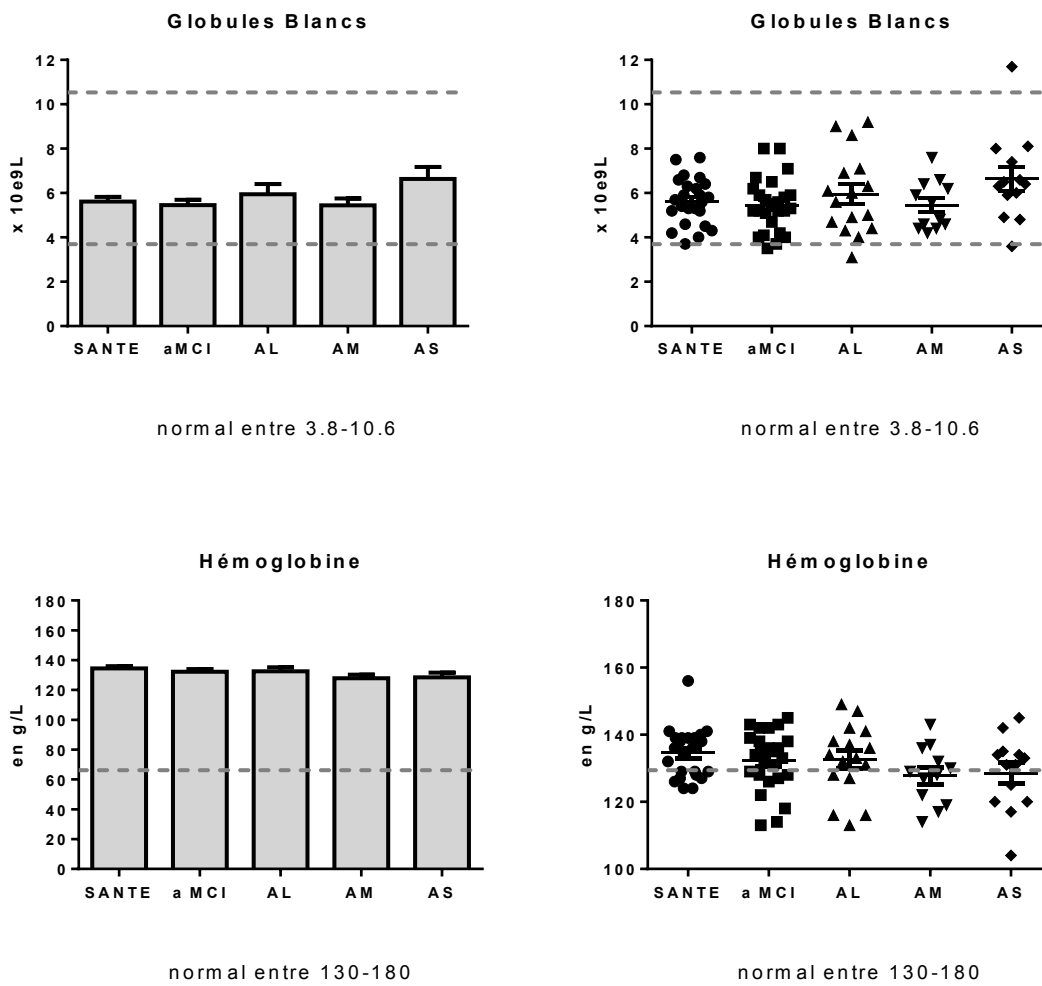


Figure 12. Numération formule sanguine (NFS) des patients de la cohorte. L'astérisque (*) correspond à $p \leq 0,05$.

INFLUENCE DU STATUT APOE SUR LES DONNÉES CLINIQUES DE LA COHORTE

La présence d'un allèle APOE 4 est un facteur de risque pour la MA. Les données cliniques ont donc été analysées en fonction du génotype APOE des patients de manière à investiguer l'influence de cet allèle sur les fonctions physiologiques étudiées dans nos travaux. A l'inverse du facteur de risque de l'apolipoprotéine E4, plusieurs études s'accordent à penser que l'allèle E2 serait plutôt protecteur contre le développement de la MA. Dans la cohorte étudiée ici, on observe que le génotype E4/E4 n'est pas retrouvé chez les patients en santé. Le génotype «protecteur» E2/E3 ne se retrouve pas dans les groupes de patients AM et AS. Enfin, les génotypes E3/E4 et E4/E4 sont majoritaires dans les groupes AS avec respectivement 53 et 20 % des patients de la cohorte (Figure 13).

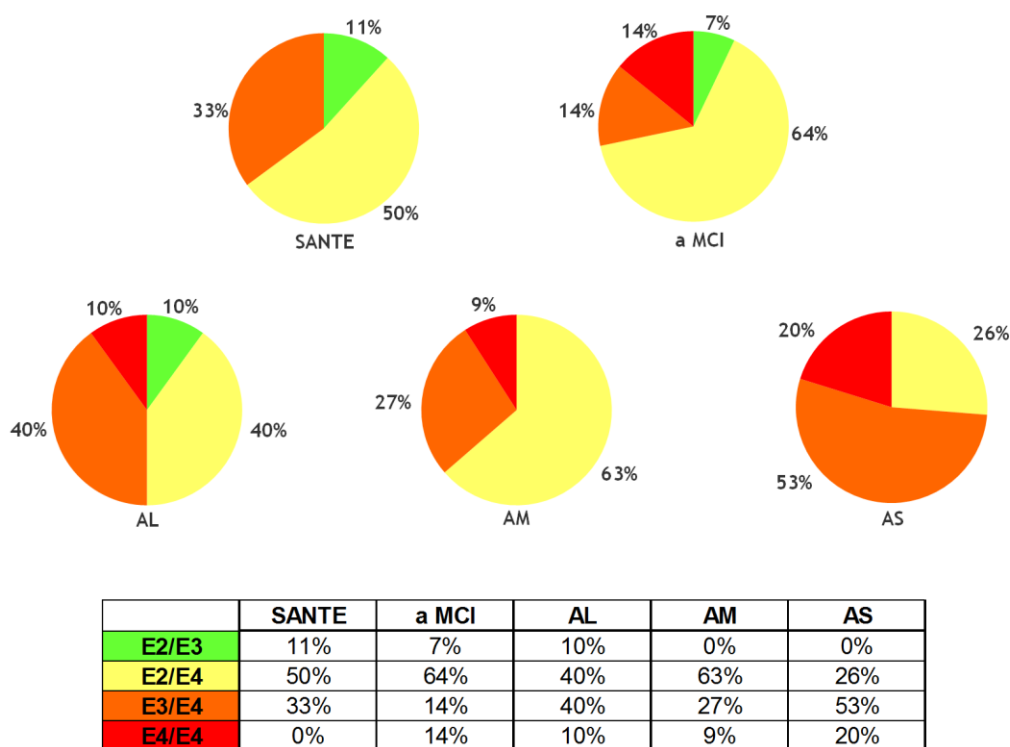
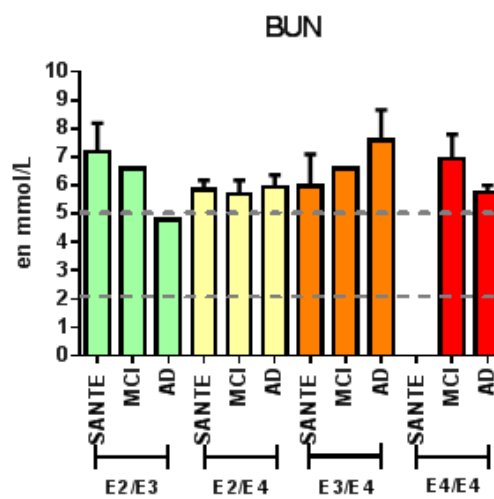
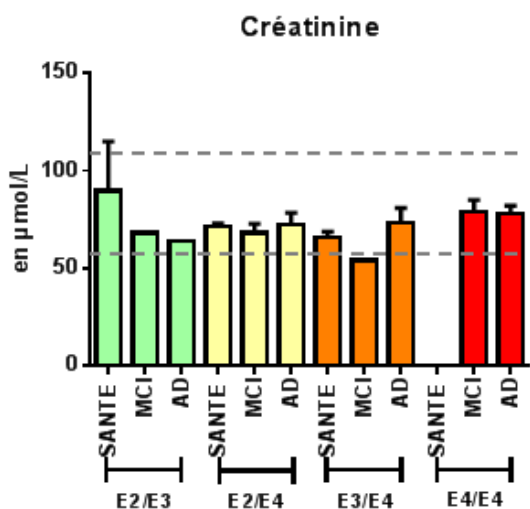
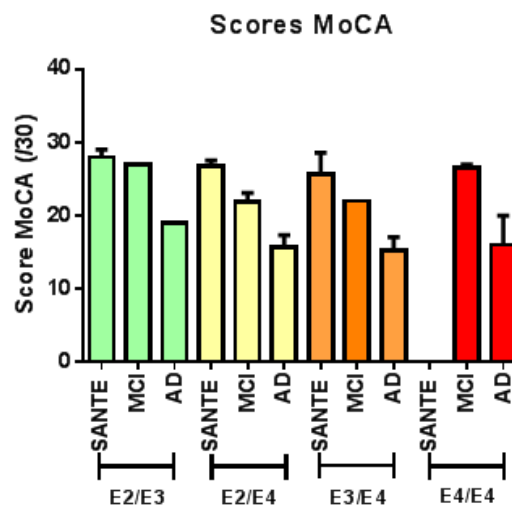
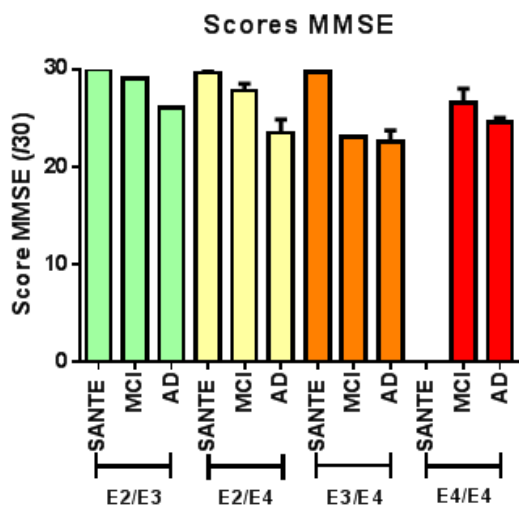
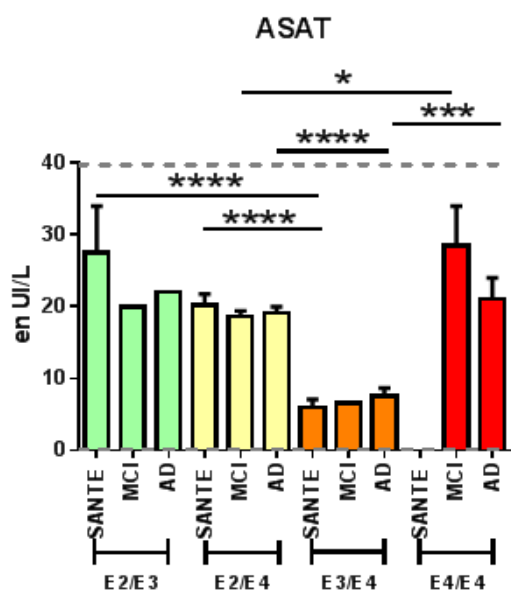


Figure 13. Répartition des génotypes de la protéine APOE dans les 5 groupes de patient de la cohorte.

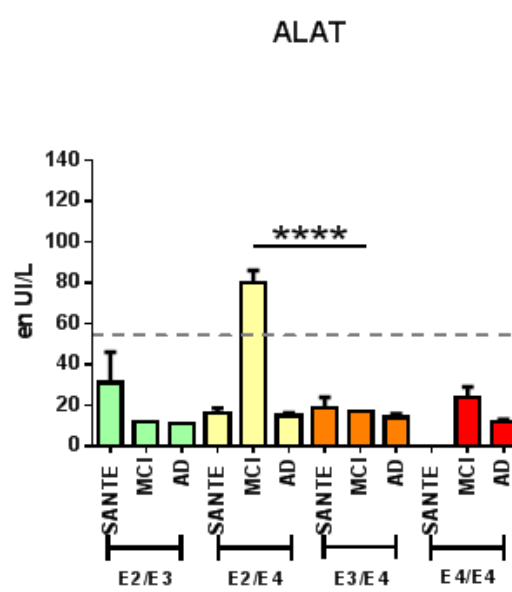


normal entre 58-110

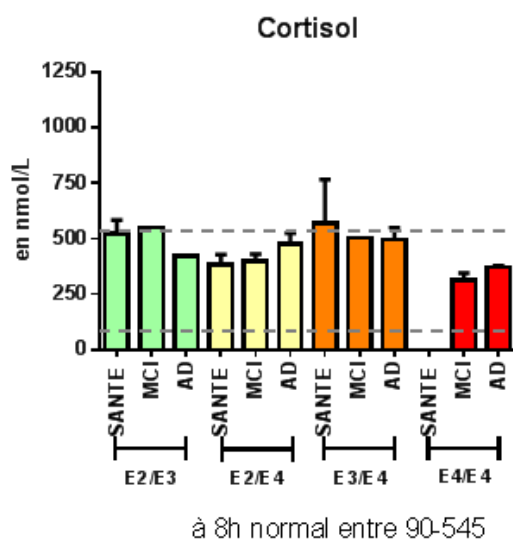
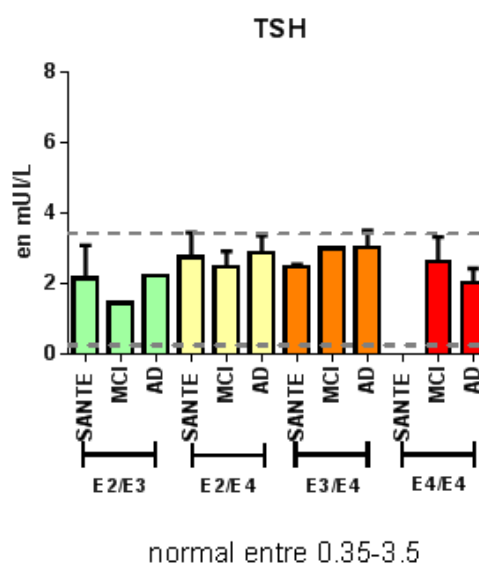
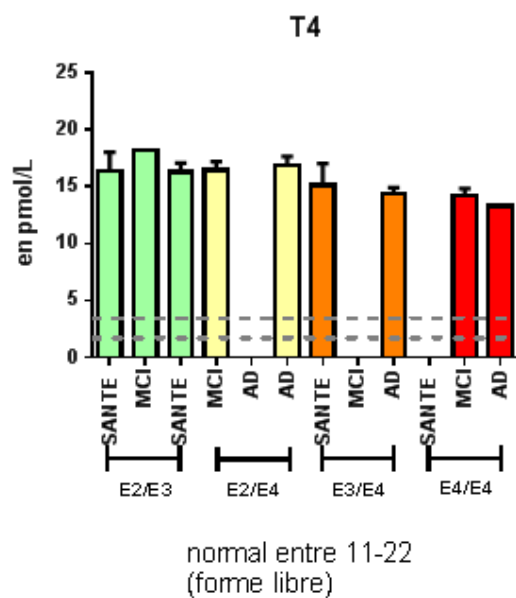
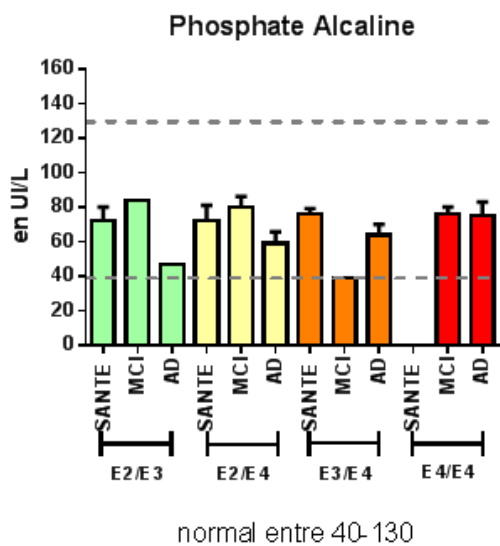
normal entre 3.2-7.6

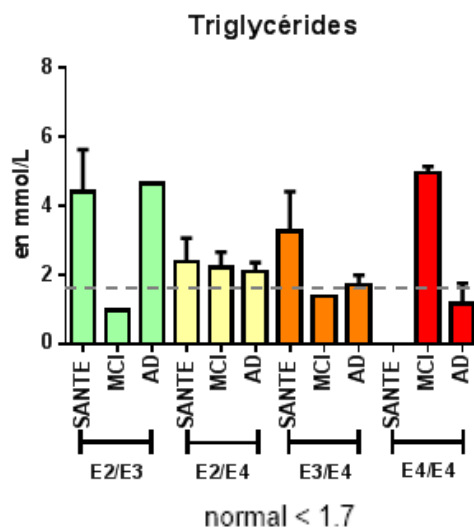
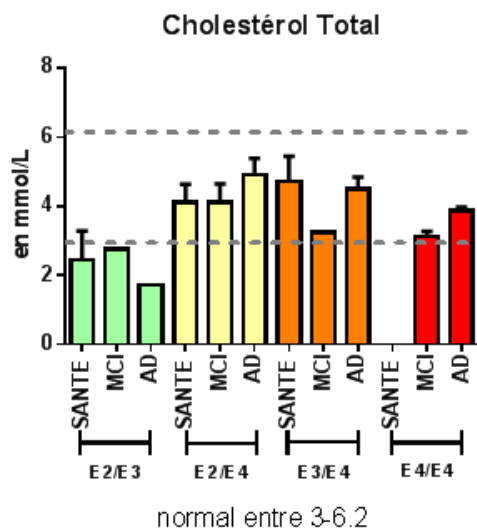
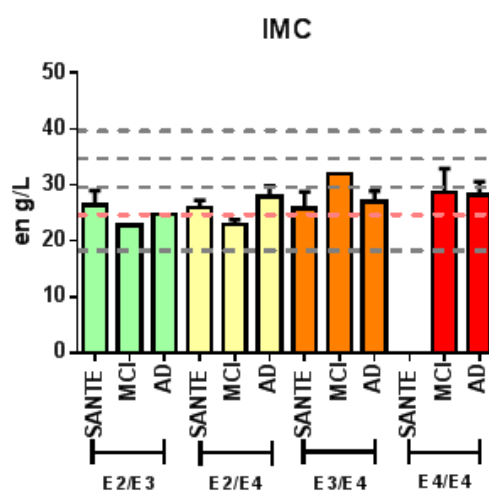
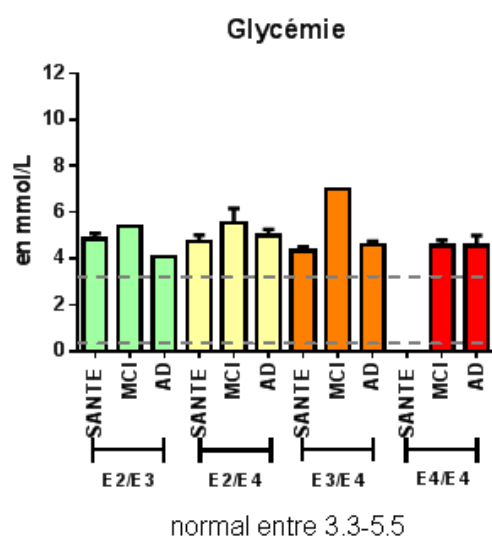
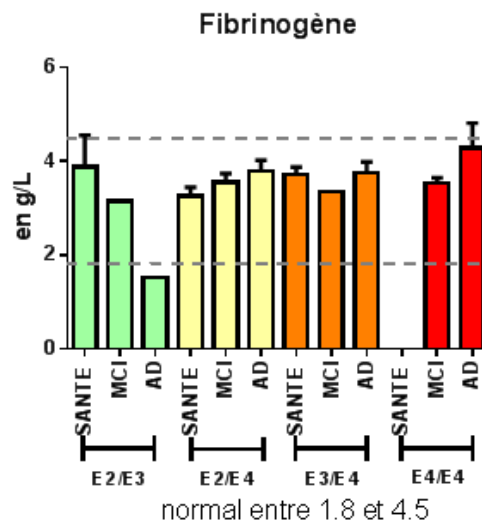
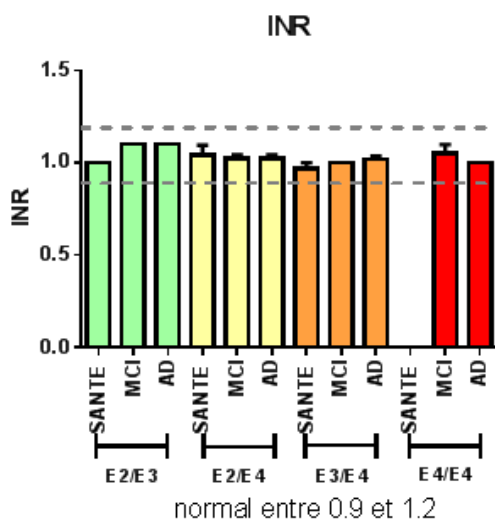


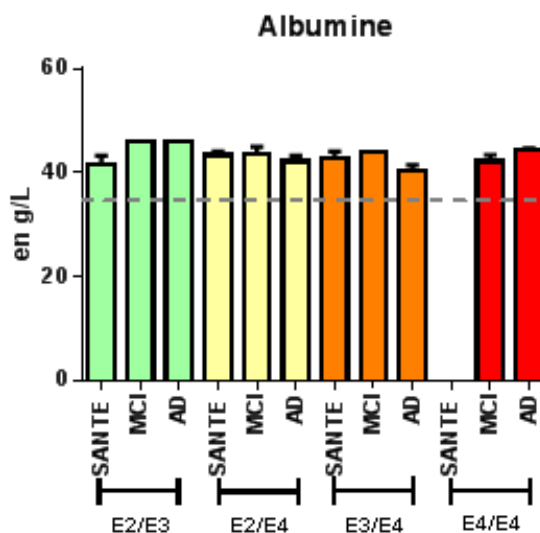
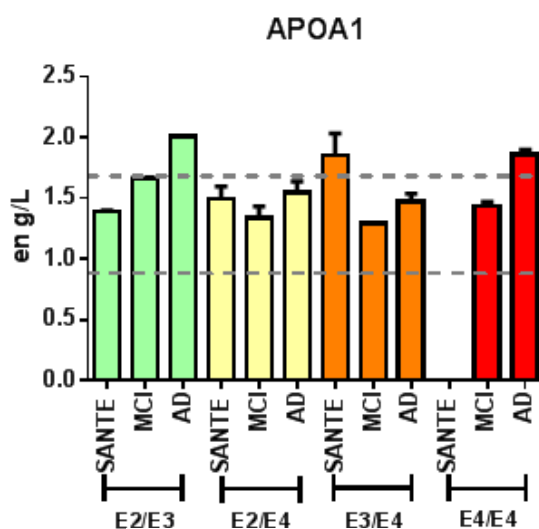
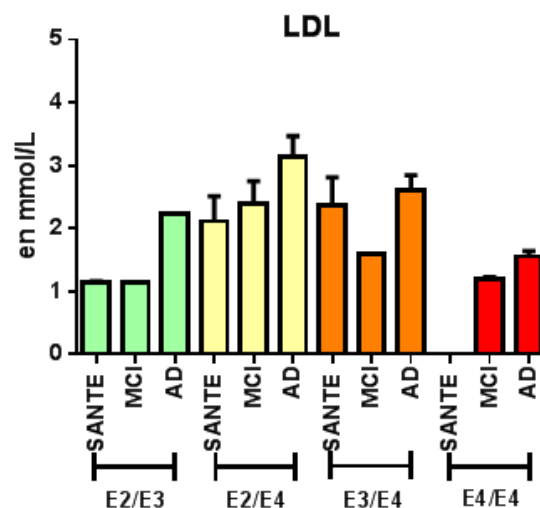
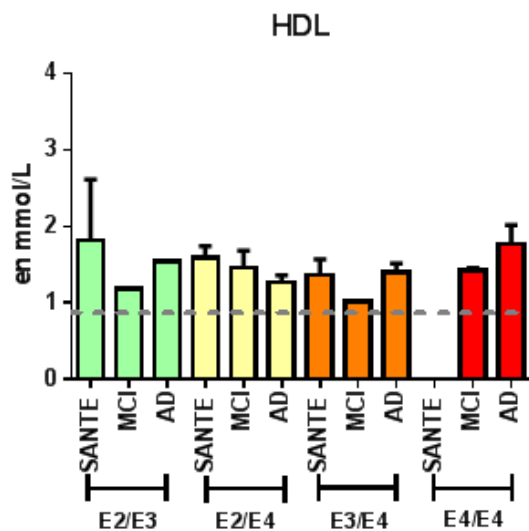
normal entre 0-40



normal entre 0-55

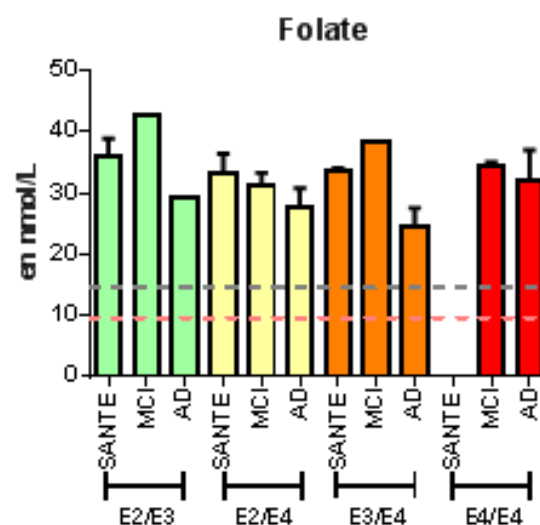
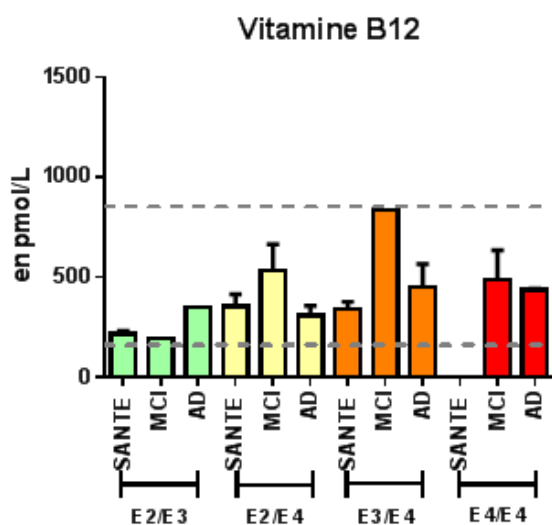






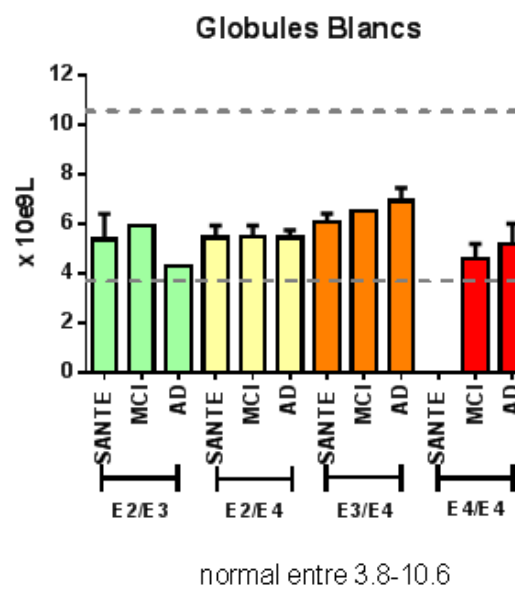
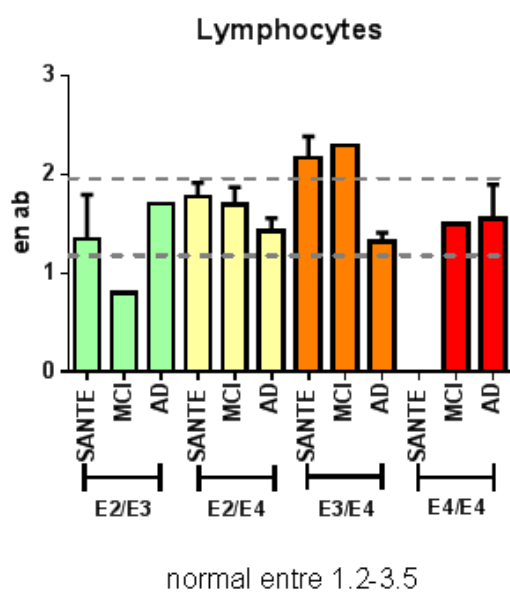
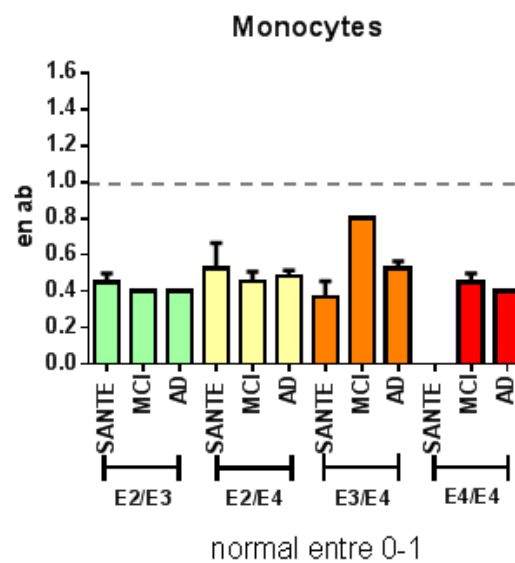
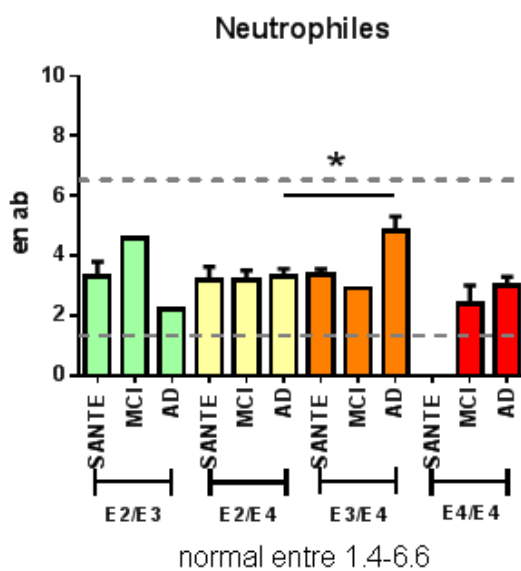
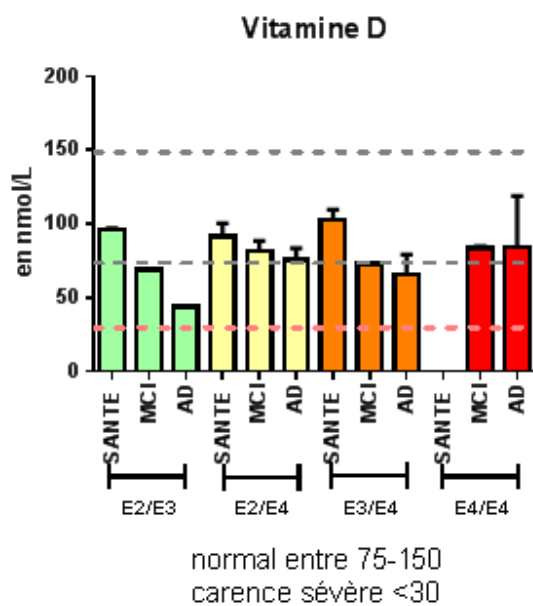
normal entre 0.9-1.7

normal entre 35 et 52



normal entre 160 et 850

normal > 15 et déficience < 10



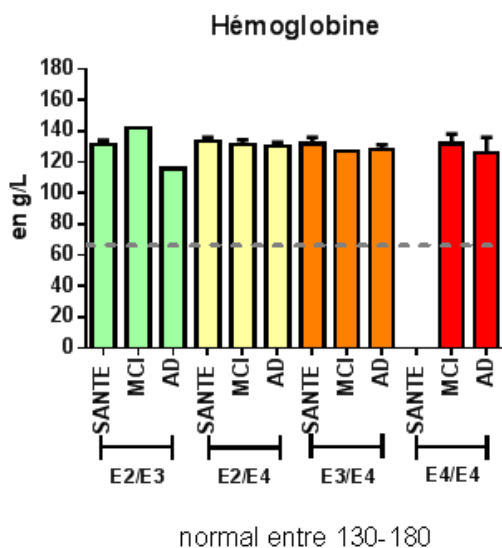


Figure 14. Résultats cliniques analysés en fonction du groupe de patients et du génotype APOE. ALAT: alanine aminotransférase, APOA1: apolipoprotéine A1, ASAT: aspartate aminotransférase, BUN: azote urique sanguin, HDL: lipoprotéine de densité élevée, INR: ratio normalisé international, IMC: indice de masse corporelle, LDL: lipoprotéine de faible densité, T4: thyroxine, TSH: hormone stimulant la thyroïde. Les astérisques (*, ***, ****) correspondent à $p \leq 0,05$, $p \leq 0,001$, et $p \leq 0,0001$.

Il n'y a pas de tendance qui se dégage de l'analyse des paramètres cliniques en fonction du génotype APOE du patient et du groupe de patient.

INFLUENCE DE LA SÉROLOGIE AU *CYTOMEGALOVIRUS* SUR LES DONNÉES CLINIQUES DE LA COHORTE

La réorganisation des groupes selon la sérologie au *Cytomégalo*virus permet de caractériser l'influence de ce paramètre sur les données cliniques des patients.

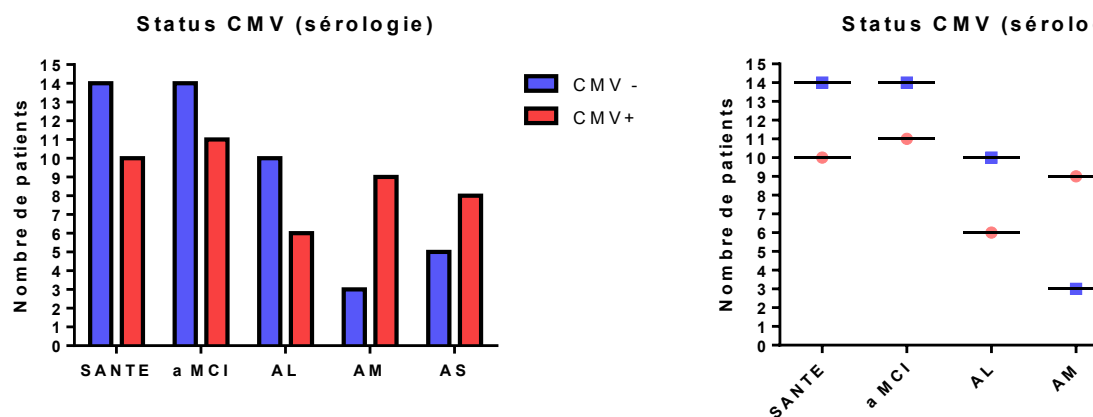
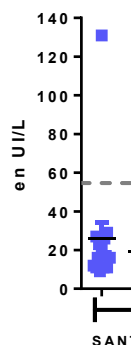
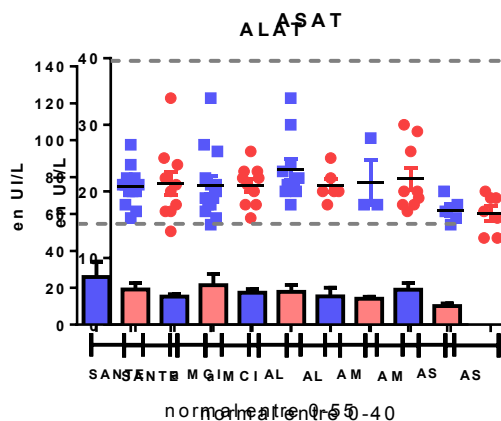
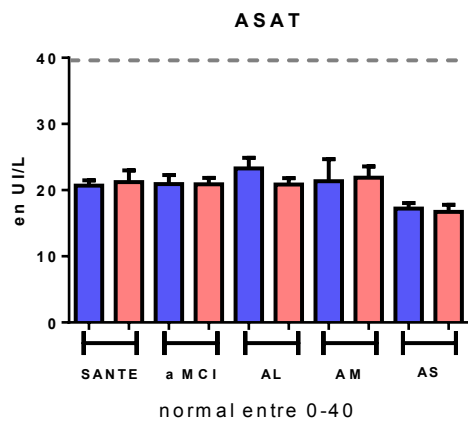
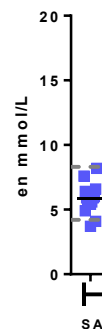
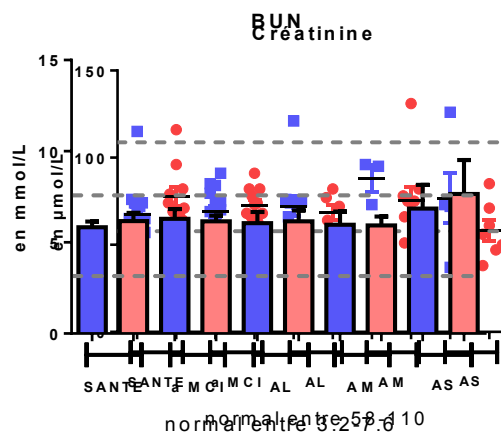
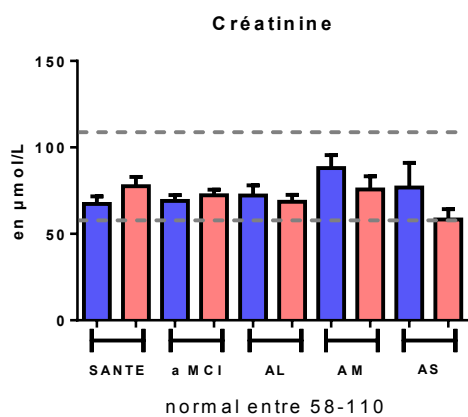
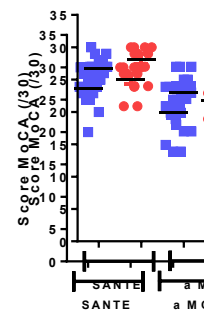
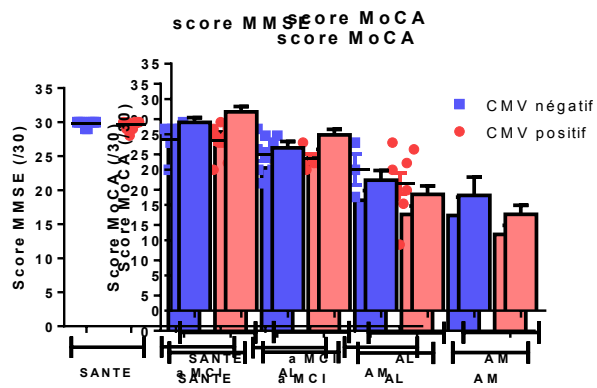
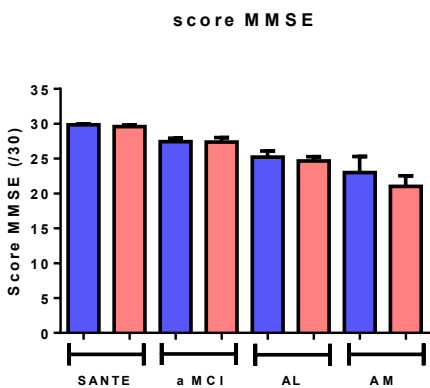
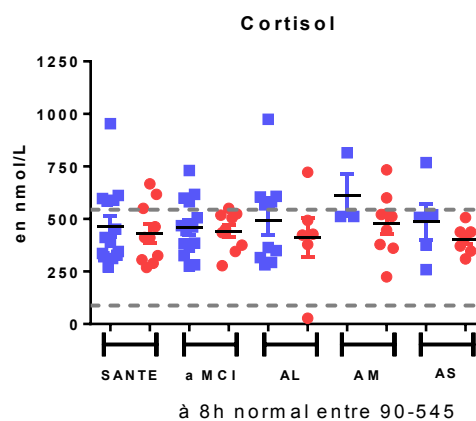
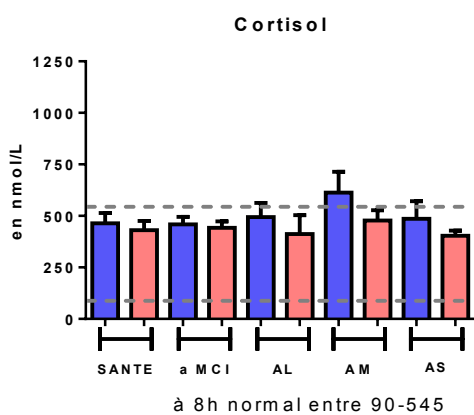
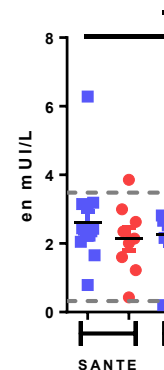
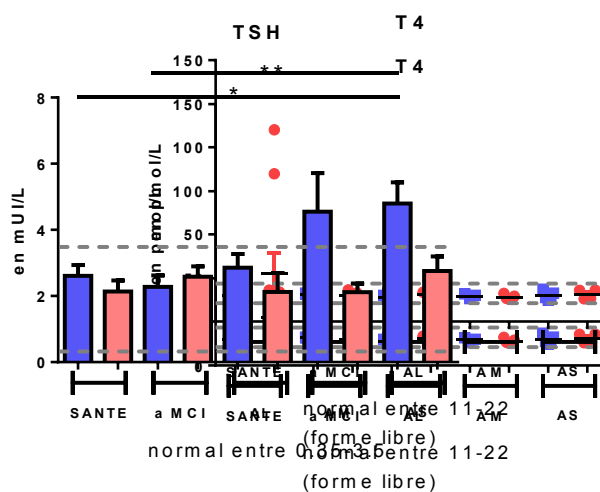
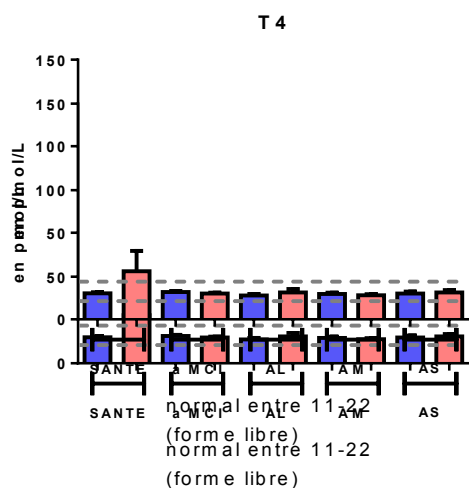
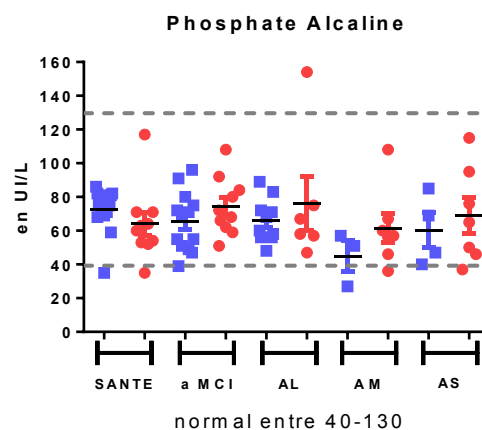
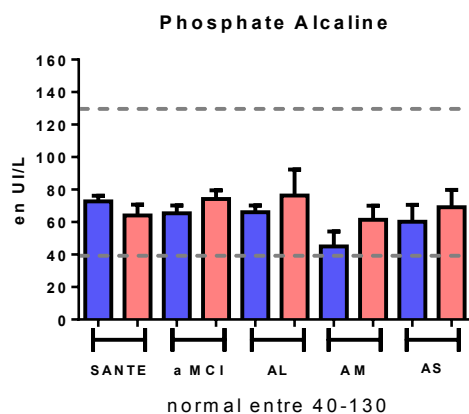
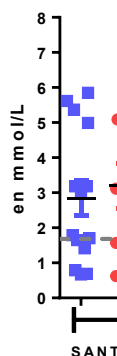
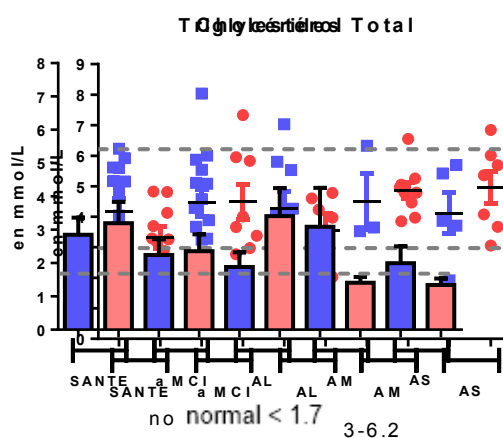
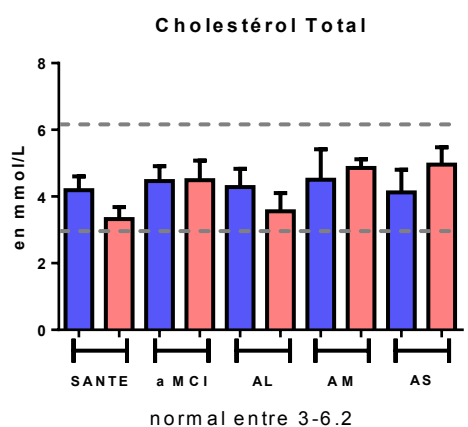
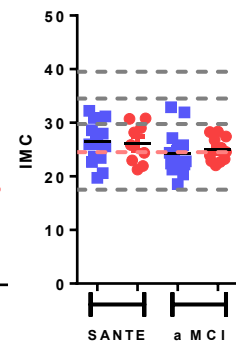
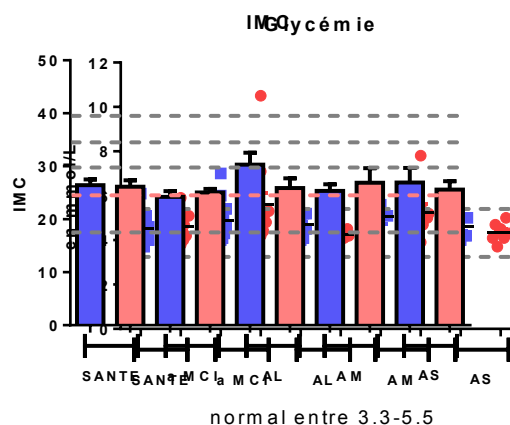
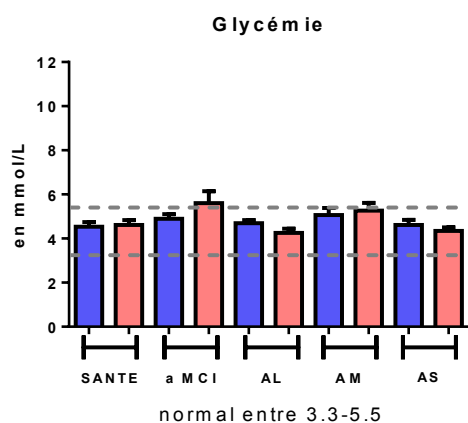
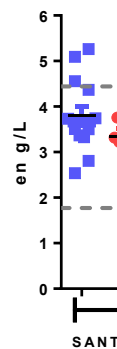
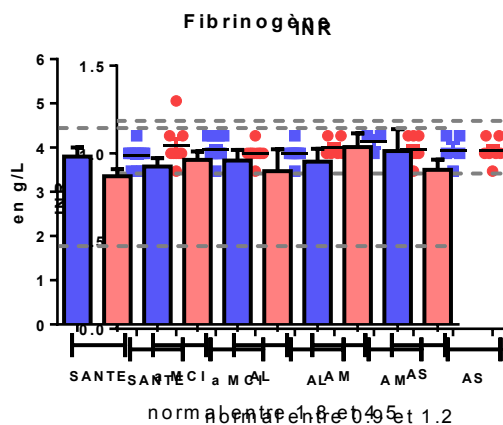
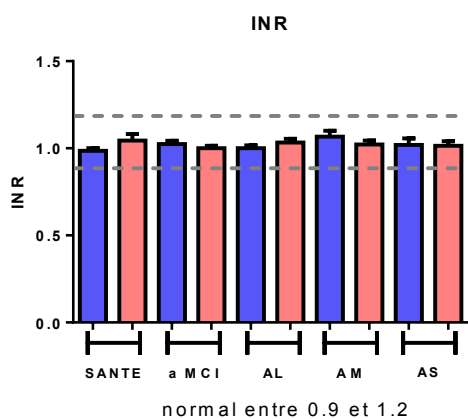


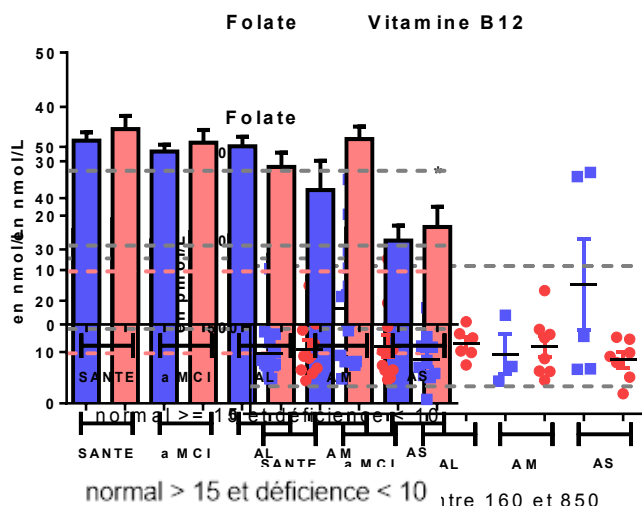
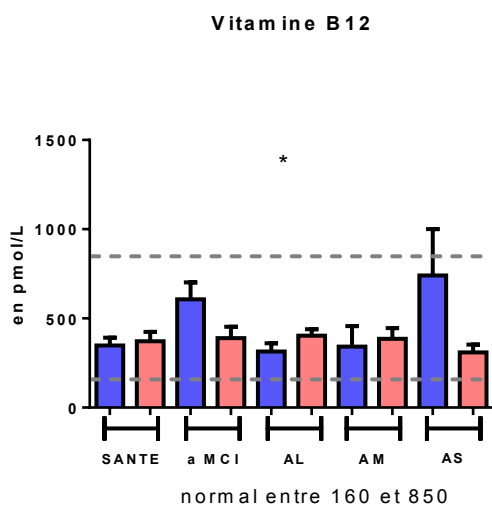
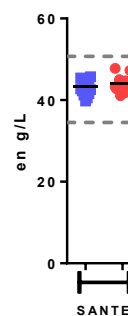
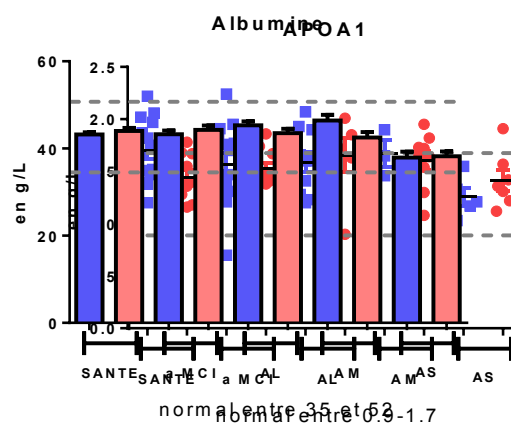
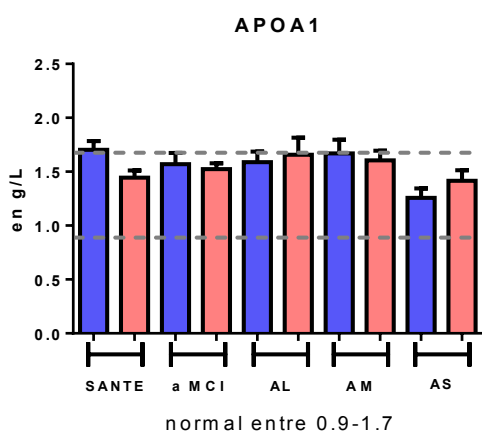
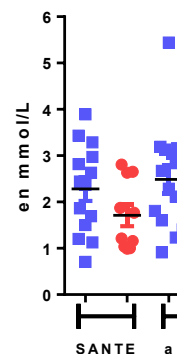
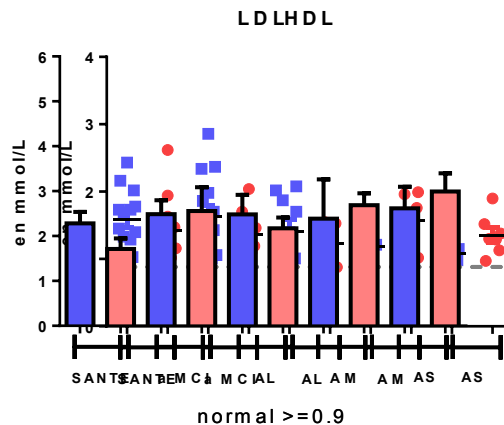
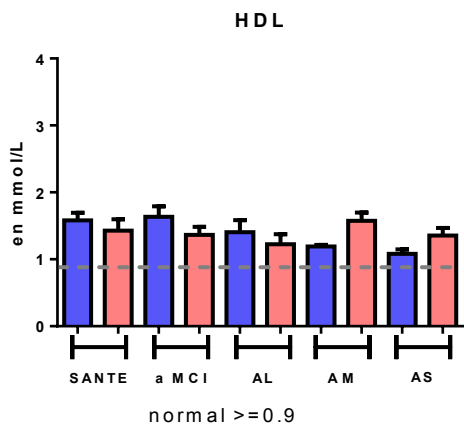
Figure 15. Répartition des patients en fonction de leur sérologie au *Cytomegalovirus* et du groupe de patient.

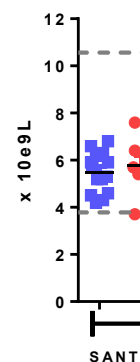
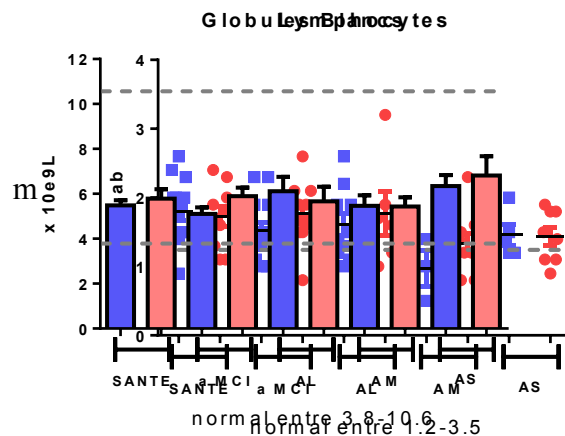
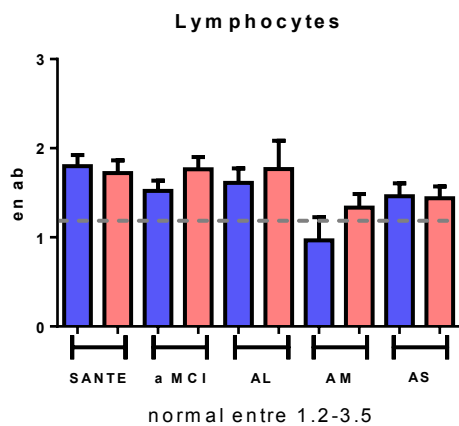
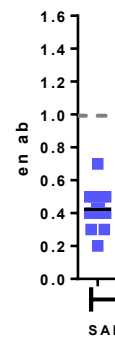
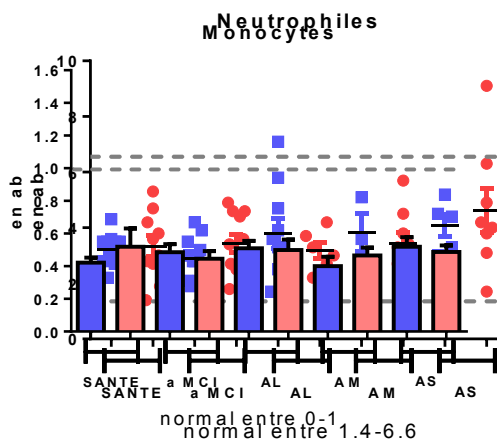
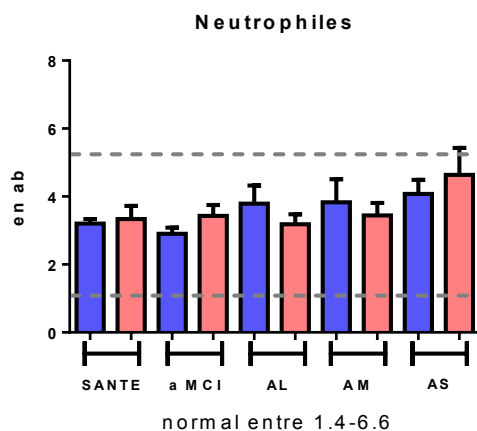
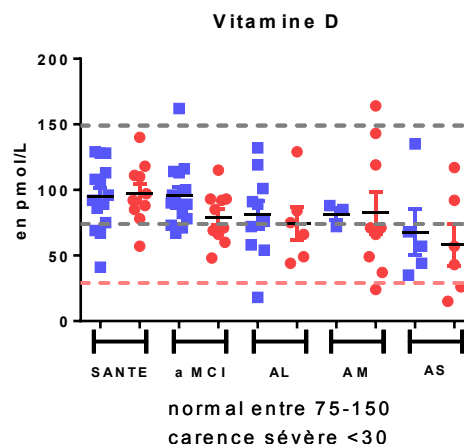
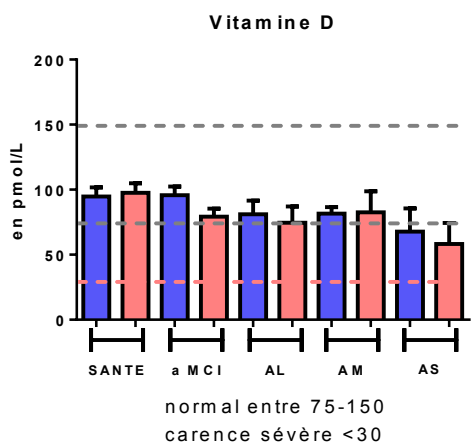
Les patients séro-négatifs pour le CMV sont représentés par les colonnes bleues, tandis que les patients séro-positifs sont représentés par les colonnes rouges.











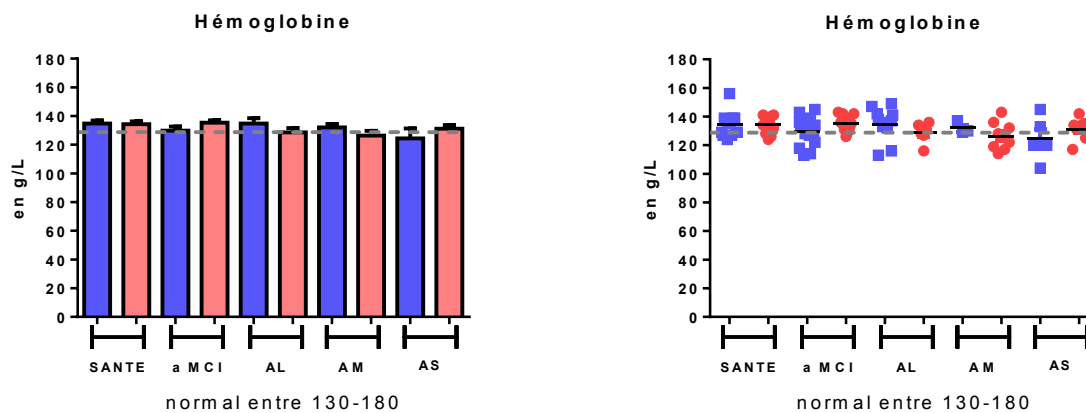


Figure 16. Résultats cliniques analysés en fonction du groupe de patients et de la sérologie au CMV. ALAT: alanine aminotransférase, APOA1: apolipoprotéine A1, ASAT: aspartate aminotransférase, BUN: azote urique sanguin, HDL: lipoprotéine de densité élevée, INR: ratio normalisé international, IMC: indice de masse corporelle, LDL: lipoprotéine de faible densité, T4: thyroxine, TSH: hormone stimulant la thyroïde. Les astérisques (* et **) correspondent à $p \leq 0,05$, et $p \leq 0,01$.

CONVERSIONS DES PATIENTS

Durant cette étude, un certain nombre de patients aMCI ont converti en MA. Cinq patients en santé ont évolué vers un stade aMCI, un seul d'entre eux a par la suite converti au stade AL. Chez les aMCI, 6 patients ont converti sur une période de deux ans vers un stade AL, et un patient a converti en seulement un an vers un stade AM. Parmi les AL, 5 patients ont évolué en AM en un an (à l'exception d'un patient qui a mis 2 ans). Enfin un AM a converti en un an vers un stade AS. Ainsi 18 conversions chez 17 patients ont pu être observées. Aucune amélioration des scores cognitifs n'a été observée.

Tableau 1 Evolution des patients de la cohorte

Evolution des patients		
visite 1	Visite 2	Visite 3
Santé 1	MCI 27	
Santé 5	MCI 28	
Santé 6	MCI 30	AL 22
Santé 15	MCI 31	
Santé 17	MCI 13	
MCI 2	MCI 2	AL 27
MCI 8	MCI 8	AL 26
MCI 10	AL 25	
MCI 18	AL 23	
MCI 23	AL 24	
MCI 29	AM 21	
AL 9	AL 9	AM 19
AL 13	AM 12	
AL 15	AM 18	
AL 17	AM 17	
AL 21	AM 16	
AM 3	AS 18	