Développement et évaluation d'agents de contraste pour détecter la maladie d'Alzheimer par IRM : coloration par le Gadolinium et nanocorps ciblant les protéines Aβ et Tau

Clémence Dudeffant

▶ **To cite this version:**

Clémence Dudeffant. Développement et évaluation d'agents de contraste pour détecter la maladie d'Alzheimer par IRM : coloration par le Gadolinium et nanocorps ciblant les protéines Aβ et Tau. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Paris Saclay (COmUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS281 . tel-01908585

HAL Id: tel-01908585
https://theses.hal.science/tel-01908585

Submitted on 30 Oct 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2018SACLS281

Développement et évaluation d'agents de contraste pour détecter la maladie d'Alzheimer par IRM : coloration par le Gadolinium et nanocorps ciblant les protéines Aβ et Tau.

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud
Laboratoire d'accueil : MIRCen, CEA

École doctorale n°568
Signalisations et réseaux intégratifs en biologie (Biosigne)

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Fontenay-aux-Roses, le 1er octobre 2018, par

Clémence Dudeffant

Composition du Jury :

Michel Bottlaender Directeur de recherche, Université Paris-Saclay	Président
Claire Paquet Professeur, Praticien hospitalier, Université Paris-Diderot	Rapporteur
Eva Jakab Toth Directeur de recherche, Université d'Orléans	Rapporteur
Mathieu Santin Chargé de recherche, Université Paris-Sorbonne	Examinateur
Jean-Sébastien Raynaud Conseiller scientifique à l'international, Guerbet	Examinateur
Marc Dhenain Directeur de recherche, Université Paris-Saclay	Directeur de thèse

Thèse de doctorat

Remerciements

Je tiens à remercier Mme Claire Paquet, Mme Eva Jakab Toth, M. Michel Bottlaender, M. Jean-Sébastien Raynaud et M. Mathieu Santin d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je remercie tout particulièrement Mme Claire Paquet et Mme Eva Jakab Toth d'avoir accepté de rapporter ce travail. Je remercie également Marc Dhenain, mon directeur de thèse, pour son encadrement. J'adresse des remerciements tout particuliers à Anne-Sophie Hérard pour son soutien et la relecture de ma thèse. Merci pour tes conseils et ton franc-parler.

Je remercie également toutes les personnes qui m'ont apporté leur aide au cours de ces trois années de thèse.

Je remercie tous les membres des différentes plateformes pour leur expertise, leurs conseils et leur patience. Merci à Fanny Petit, Caroline Jan et Pauline Gipstein de la plateforme d'histologie du CEA pour leur aide et leurs conseils. Merci à Julien Flament et Julien Valette de la plateforme d'IRM du CEA. Merci à Martine Guillermier pour ses formations de qualité et pour son aide à la réalisation des expériences chez le macaque. Je remercie également Romina Aron-Badin de nous avoir permis de réaliser les expériences de Gadolinium-Staining chez le primate. Je remercie également Sophie Courtois et Steven Birot de la Pommeray pour leur aide dans ces expériences. Merci à Marie-Claude Gaillard pour son aide en BM. Je remercie également Matthias Vandesquille de m'avoir formée aux différentes parties de ce projets, aussi bien pour les expériences de Gadolinium-staining que sur le projet Llamalz. Je remercie également tous les autres membres du projet Llamalz. Merci à nos collaborateurs de l'Institut Pasteur : Pierre Lafaye et Sylvie Bay pour la production et l'ingénierie des VHH. Merci à C. Ganneau et H. Cahuzac pour la production des différents composés VHH utilisés dans ces travaux. Merci à nos collaborateurs de l'ICM : Benoit Delatour pour m'avoir permis d'intégrer ce projet et pour son expertise en histologie. Merci à Tengfei Li pour son aide sur la partie histologie de ce projet et à Ihsen Youssef pour la réalisation des injections chez la souris.

Je remercie également Alexis Bemelmans et Karine Cambon ainsi que leurs équipes de nous avoir fourni les souris modèles de tauopathie par transfert de gène : la production des vecteurs viraux et leurs injections ont été réalisées par Gwenaelle Aurégan, Anastasie Maté de Gérando, Charlène Joséphine et Mylène Gaudin.

Merci également à tous les thésards et post-doc de Mircen sans qui es trois années n'auraient pas été les mêmes. Le bureau 110 va me manquer.

Merci également à ma famille et particulièrement à ma tante pour sa relecture attentive de ce manuscrit. Enfin, une pensée toute particulière pour Maëlle. Merci pour ton soutien et ta compréhension qui m'ont aidée à tenir jusqu'au bout.

Table des matières

Liste de figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction

1 La maladie d'Alzheimer 25

1.1 Définition et épidémiologie 25

1.2 Symptomatologie de la MA 26

1.2.1 Tableau clinique 26

1.2.2 Progression de la pathologie 26

1.3 Neuropathologie de la MA 28

1.3.1 La pathologie amyloïde β 28

1.3.1.1 Généralités 28

1.3.1.2 Typologies des dépôts amyloïdes β dans la MA 30

1.3.1.2.1 Les dépôts parenchymateux d'Aβ 30

1.3.1.2.1.1 Les dépôts diffus d'Aβ 30

1.3.1.2.1.2 Les dépôts focaux d'Aβ 31

1.3.1.2.1.3 Autres types de dépôts d'Aβ 31

1.3.1.2.2 Les dépôts vasculaires d'Aβ – angiopathie amyloïde cérébrale 32

1.3.1.3 Topographie de la pathologie amyloïde β : les stades de Thal 33

1.3.1.4 L'hypothèse de la cascade amyloïde 34

1.3.2 La tauopathie 36

1.3.2.1 Généralités 36

1.3.2.2 Typologies des dépôts Tau dans la MA 37

1.3.2.3 Topographie de la tauopathie : les stades de Braak 38

1.3.2.4 L'hypothèse Tau 39

1.3.3 Les autres lésions de la MA 40

1.3.3.1 La perte neuronale 40

1.3.3.2 La dyshoméostasie du fer 40

1.3.3.3 Les anomalies de la barrière hémato-encéphalique 42

1.3.3.4 La neuroinflammation 44

1.3.3.5 La perte synaptique 44

1.3.4 Chronologie d'apparition des lésions. 44
2 Diagnostic actuel de la MA 47
2.1 Diagnostic clinique 47
2.2 Les biomarqueurs de la MA 50
2.2.1 Biomarqueurs actuels de la MA 50
2.2.1.1 Les biomarqueurs du LCS 50
2.2.1.2 Les biomarqueurs en neuroimagerie 51
2.2.1.2.1 L'imagerie structurale par IRM 52
2.2.1.2.2 L'imagerie métabolique en TEP au FDG 54
2.2.1.2.3 L'imagerie des lésions amyloïdes en TEP 55
2.2.2 Biomarqueurs en développement de la MA 57
2.3 La microscopie par IRM 58
2.3.1 Généralités 58
2.3.2 Résolution spatiale, rapport signal/bruit et temps d'acquisition 59
2.3.3 Artefacts 61
2.3.4 Sécurité 61
2.3.5 Application de la microscopie par IRM dans la MA. 61
2.3.5.1 Imagerie structurale à haut champ magnétique 61
2.3.5.2 Imagerie des lésions amyloïdes par IRM à haut champ magnétique 63
2.3.5.2.1 Détection des plaques sans agent de contraste 64
2.3.5.2.2 Détection des plaques amyloïdes à l'aide d'agents de contraste non ciblés : le Gadolinium-staining 69
2.3.5.2.2.1 Utilisation du Gadolinium-staining pour l'IRM structurale 69
2.3.5.2.2.2 Utilisation du Gadolinium-staining pour l'imagerie des plaques amyloïdes par IRM 71
2.3.5.2.3 Détection des plaques amyloïdes à l'aide d'agents de contraste ciblés 73
2.3.5.2.3.1 Contrastophores 73
2.3.5.2.3.1.1 Généralités 73
2.3.5.2.3.1.2 Relaxivité 74
2.3.5.2.3.1.3 Sécurité 78
2.3.5.2.3.2 Les molécules vectrices 79
2.3.5.2.3.3 Passage de la BHE 81
3 Les anticorps de camélidés 86

3.1 Rappel sur les anticorps conventionnels 86
3.2 Les anticorps de camélidés 86
3.2.1 Généralités 86
3.2.2 Structure des VHH 87
3.2.3 Obtention des VHH 88
3.2.4 Intérêts des VHH par rapport aux anticorps conventionnels 90
3.2.4.1 Haute affinité pour leur antigène sans réaction croisée 90
3.2.4.2 Solubilité et stabilité 91
3.2.4.3 Pénétration dans les tissus et marquage rapide de leur cible 92
3.2.4.4 Faible immunogénicité 93
3.2.4.5 Passage de la BHE 93
3.2.5 VHH et maladies neurodégénératives 95
3.2.6 Utilisation des VHH pour l'imagerie *in vivo* 97
3.2.7 Les VHH développés dans cette étude 98
4 La voie intrathécale 103
4.1 Anatomie des méninges 103
4.2 La voie intrathécale 105
4.2.1 Définition 105
4.2.2 Applications de la voie intrathécale 105
4.2.2.1 Administration de molécules thérapeutiques 105
4.2.2.2 Imagerie du système cérébro-spinal (cisternographie et myélographie) 105
4.2.2.3 Etude du système glymphatique cérébral 106
4.2.3 Toxicité 108
5 Les modèles de la maladie d'Alzheimer 110
5.1 Généralités sur les modèles murins transgéniques 110
5.2 Les modèles murins utilisés 111
5.2.1 Le modèle APP23 111
5.2.2 Le modèle APP_{SwDI} 112
5.2.3 Le modèle $APP_{SL}/PS1_{M146L}$ 112
5.2.4 Le modèle $APP/PS1_{dE9}$ 113

5.2.5 Le modèle PS2/APP 113
5.2.6 Le modèle 3xTg 114
5.2.7 Le modèle Tg4510 114
5.3 Les modèles primates de la MA 115

Objectifs généraux

Résultats I : Etude comparative de la détection des plaques amyloïdes par Gd-staining dans cinq modèles murins d'amyloïdose et dans des tissus humains de patients atteints de la MA

1 Objectifs 123
2 Matériels et méthodes 125
2.1 Modèles murins d'amyloïdose 125
2.2 Echantillons de cerveaux de patients atteints de la MA 128
2.3 Injections intracérébroventriculaires de Dotarem® 128
2.4 IRM *in vivo* 128
2.5 Sacrifice des animaux 129
2.6 IRM *ex vivo* 129
2.7 Histologie 130
2.8 Microscopie et quantification des immunomarquages 131
2.8.1 Mise en registre des images IRM et histologiques 131
2.8.2 Quantification à partir des images IRM et des immunomarquages 131
2.8.3 Statistiques 132
3 Résultats 133
3.1 Hétérogénéité de la détection des plaques amyloïdes après Gd-staining en fonction du modèle 133
3.2 Corrélats histologiques 135
3.2.1 Les modèles à dépôts focaux (APP/PS1, APP/PS1$_{dE9}$ et APP23) 135
3.2.2 Les modèles à dépôts diffus d'Aβ (APPS$_{SwDI}$) 142
3.2.3 Les modèles à dépôts intracellulaires d'Aβ (3xTg) 142
3.3 Détection de l'angiopathie amyloïde cérébrale 145
3.4 Détection des microhémorragies 146

3.5 Détection des plaques amyloïdes humaines par Gd-staining 147

4 Discussion 151

4.1 Détectabilité des plaques amyloïdes par IRM après Gd-staining 151

4.2 Spécificité des modifications de signal observées 153

4.3 Détection des plaques amyloïdes humaines par Gd-staining 153

Résultats II : Implémentation du Gd-staining chez le primate non-humain

1 Objectifs 157

2 Matériels et méthodes 159

2.1 Animaux 159

2.2 Gd-staining *ex vivo* 159

2.3 Injection intrathécale de Dotarem® 160

2.4 IRM *in vivo* 161

2.5 Quantification à partir des images IRM 162

3 Résultats 163

3.1 Gd-staining *ex vivo* 163

3.2 Gd-staining *in vivo* 164

3.2.1 Etude de la dose 164

3.2.1.1 Etude sur fantôme 164

3.2.1.2 Etude *in vivo* 165

3.2.2 Influence de la position 168

3.2.3 Sécurité 170

4 Discussion et conclusion 171

4.1 Influence de la dose 171

4.2 Influence du flux de circulation du LCS et de la position 172

4.3 Influence du volume d'injection 173

4.4 Conclusions et perspectives 175

Résultats III : Nouveaux agents de contraste vectorisés ciblant les lésions microscopiques de la MA : les anticorps de camélidés

1 Objectifs 179

2 Matériel et méthodes 181
2.1 Obtention des VHH 181
2.1.1 Immunisation des alpagas 181
2.1.2 Construction des banques de phage-VHH et sélection des VHH d'intérêt 181
2.1.3 Expression des VHH 182
2.2 Propriétés des VHH 183
2.3 Modèles animaux utilisés 184
2.3.1 Modèles transgéniques 184
2.3.2 Modèles de tauopathie par transfert de gène 185
2.4 Relaxométrie 185
2.5 Passage *in vivo* de la BHE 186
2.5.1 Injection intraveineuse des VHH 186
2.5.2 Immunohistochimie sur coupes paraffines 187
2.5.2.1 Inclusion en paraffine et coupe des cerveaux 187
2.5.2.2 Vérification de la fonctionnalité des VHH après application sur coupes histologiques 188
2.5.2.3 Détection directe des VHH 188
2.5.3 Intégrité de la BHE 189
2.6 IRM *in vitro* 189
2.7 IRM *ex vivo* 190
2.7.1 Injection intraveineuse des VHH 190
2.7.2 IRM *ex vivo* 190
2.7.3 Immunohistochimie 190
2.8 Statistiques 191
3 Résultats 192
3.1 Relaxométrie 192
3.2 Passage de la BHE 194
3.2.1 R3VQ 194
3.2.1.1 Fonctionnalité des VHH injectés 194

3.2.1.2 Injection intraveineuse des VHH 195
3.2.2 TauA2 197
3.2.2.1 Fonctionnalité des VHH injectés 197
3.2.2.2 Injection intraveineuse des VHH 197
3.3 IRM *in vitro* 200
3.3.1 Détection des plaques amyloïdes par IRM *in vitro* à l'aide de R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$ 200
3.3.2 Détection des DNF par IRM *in vitro* à l'aide de TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$ 203
3.4 IRM *ex vivo* 207
3.4.1 Détection des plaques amyloïdes *ex vivo* à l'aide de R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$ 207
3.4.2 Détection des DNF *ex vivo* à l'aide de TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$ 209
3.5 Discussion et perspectives 211
3.5.1 Relaxométrie 211
3.5.2 Détection des lésions microscopiques de la MA par imagerie optique à l'aide des VHH 213
3.5.3 Détection des lésions microscopiques de la MA par IRM à l'aide des VHH 214

Conclusion générale

Productions scientifiques

1 Articles 225
2 Communications orales 225
3 Communications par posters 226
4 Distinctions 226

Annexes

Publications

Références

Liste de figures

Figure 1 : Modèle des stades précliniques de la MA et des biomarqueurs associés. 27
Figure 2 : Métabolisme de l'APP et agrégation de l'Aβ. 29
Figure 3 : Aspects des dépôts d'Aβ diffus (a) et focaux (b, c). 30
Figure 4 : Aspects des dépôts d'Aβ atypiques. 32
Figure 5 : Angiopathie amyloïde cérébrale dans le parenchyme d'un patient atteint de la MA[51]. 33
Figure 6 : Distribution spatio-temporelle des plaques amyloïdes dans le cerveau des patients atteints de la MA[52]. 34
Figure 7 : Physiopathologie de la MA selon l'hypothèse de la cascade amyloïde. 35
Figure 8 : Représentation schématique des six isoformes de la protéine Tau présentes au niveau du système nerveux central. 36
Figure 9 : Aspect des dépôts de protéines Tau dans la MA. 38
Figure 10 : Distribution spatio-temporelle des DNF selon Braak et Braak (A) ou Delacourte (B). 39
Figure 11 : Augmentation de la perméabilité de la BHE au cours du vieillissement normal et chez des patients MCI. 43
Figure 12 : Modèles hypothétiques de la chronologie d'apparition des biomarqueurs de la MA selon Jack et Holtzman. 45
Figure 13 : Modèles hypothétiques de la chronologie d'apparition des lésions de la MA selon Duyckaerts et coll. 46
Figure 14 : Diminution du volume hippocampique mesuré par IRM structurale dans la MA. 53
Figure 15 : Imagerie en TEP au FDG réalisée chez le même patient atteint de la MA sur une période de 9 ans. 55
Figure 16 : Comparaison de la valeur de fixation normalisée (SUV) obtenue en imagerie TEP à l'aide du ^{11}C-PIB en fonction du stade de Thal chez des patients atteints de la MA. 56
Figure 17 : Comparaison d'images IRM d'un cerveau humain et d'un cerveau de souris. 59
Figure 18 : Visualisation des plaques amyloïdes dans un hippocampe de patient atteint de la MA en *post mortem* par IRM sur des images pondérées en T2* (A) et par histologie (B). 64
Figure 19 : Visualisation des plaques amyloïdes *in vivo* chez une souris APP/PS1 par IRM. 65
Figure 20 : Mise en registre entre les images IRM *post mortem* (A) et les marquages IHC des plaques amyloïdes par la Thioflavine-S (B) et du fer par la coloration de Perls-DAB (C) sur des échantillons de cortex entorhinal de patient atteint de la MA. 67
Figure 21 : Amélioration de l'imagerie de l'hippocampe *in vivo* chez la souris par IRM à haut champ magnétique (9,4T) après injection intracérébrale de gadopentate de diméglumine. 70

Figure 22 : Visualisation des plaques amyloïdes *in vivo* dans le cerveau de souris APP/PS1 par IRM après ouverture de la BHE par les ultra-sons et injection IV (A et B) ou ICV (C et D) de Dotarem®. 72
Figure 23 : Représentation schématique d'un complexe de Gd^{3+} en solution et des paramètres dynamiques agissant sur la relaxivité. 75
Figure 24 : Détection des plaques amyloïdes en *post mortem* dans le cerveau de souris APP/PS1 après injection d'$A\beta_{40}$ couplé au Gd. 80
Figure 25 : Représentation schématique de la BHE et des différents mécanismes de passage de celle-ci 83
Figure 26 : Représentation schématique d'une IgG conventionnelle, d'une HCAb et d'un VHH recombinant. 87
Figure 27 : Organisation de la séquence d'un VHH 88
Figure 28 : Production des VHH. 90
Figure 29 : Comparaison de la distance de diffusion d'un anticorps conventionnel (A) et d'un VHH (B) anti-GFAP dans une coupe de cortex frontal humain. 92
Figure 30 : Marquage des astrocytes par le VHH-E9 dirigé contre la GFAP, après injection intra-carotidienne chez la souris WT. 95
Figure 31 : Détection des VHH R3VQ par IHC après application directe sur des coupes de cerveaux de patients atteints de la MA (A) et de souris PS2/APP (B-C). 98
Figure 32 : Détection des VHH TauA2 par IHC après application directe sur des coupes de cerveaux de patients atteints de la MA (A) et de souris Tg4510 (B-C). 99
Figure 33 : Imagerie biphotonique *in vivo* après injection IV de VHH R3VQ-S-AF488 chez une souris PS2/APP. 100
Figure 34 : Imagerie biphotonique *in vivo* après injection IV de VHH TauA2-S-AF488 chez une souris Tg4510. 101
Figure 35 : Représentation des méninges au niveau de la moelle épinière. 103
Figure 36 : Circulation du LCS chez l'Homme. 104
Figure 37 : Modifications de signal observées, en fonction du temps, dans le LCS et le parenchyme cérébral après injection IT de Gadobutrol chez un sujet sain. 107
Figure 38 : Exemple de régions d'intérêt utilisées pour la quantification de la charge amyloïde et de la charge en fer. 132
Figure 39 : Images IRM *in vivo* d'une souris APP/PS1 avant (A) et après (B) injection intracérébroventriculaire de Dotarem®. 133
Figure 40 : Détection des plaques amyloïdes par IRM *in vivo* après Gd-staining dans le cerveau de souris APP/PS1, APP/$PS1_{dE9}$ et APP23 âgées de 9 mois (A-C) et 20 mois (D-F). 134

Figure 41 : Détection des plaques amyloïdes par IRM après Gd-staining *in vivo* (1ère colonne) et *ex vivo* (2ème colonne) dans les modèles APP/PS1 (A-D), APP/PS1$_{dE9}$ (E-H) et APP23 (I-L). 136
Figure 42 : Répartition de la proportion des plaques amyloïdes en fonction de leur diamètre dans le cerveau de souris APP/PS1 (blanc), APP/PS1$_{dE9}$ (gris) et APP23 (noir). 137
Figure 43 : Corrélation entre la charge amyloïde détectée par IRM *in vivo* après Gd-staining et la charge amyloïde détectées par IHC anti-Aβ à l'aide de l'anticorps BAM10 (A) ou la charge en fer par la coloration de Perls-DAB (B). 138
Figure 44 : Comparaison de la détection des plaques amyloïdes par IRM après Gd-staining (gauche) et par double coloration au Rouge Congo (marquage de l'Aβ fibrillaire) et Perls-DAB (marquage du fer) (droite). 140
Figure 45 : Détectabilité des plaques amyloïdes par IRM après Gd-staining en fonction de leur contenu en fer chez les souris APP/PS1, APP/PS1$_{dE9}$ et APP23. 141
Figure 46 : Détection des dépôts d'Aβ diffus par IRM après Gd-staining *in vivo* (A) et *ex vivo* (B) dans le modèle APP$_{SwDI}$. 142
Figure 47: Détection des dépôts intracellulaires d'Aβ par IRM après Gd-staining *in vivo* (A) et *ex vivo* (B) dans le modèle 3xTg, âgé de moins de 17 mois. 143
Figure 48 : Comparaison de la détection des différents types de dépôts d'Aβ par IRM après Gd-staining *in vivo* (A) et *ex vivo* (B) dans le modèle 3xTg, âgé de plus de 17 mois. 144
Figure 49 : Images IRM après Gd-staining *in vivo* (A) et *ex vivo* (B) et images histologiques (C-D) chez les souris WT. 145
Figure 50 : Détectabilité de l'AAC par IRM après Gd-staining. 146
Figure 51 : Détectabilité des microhémorragies par IRM après Gd-staining 147
Figure 52 : Détection des plaques amyloïdes humaines par IRM après Gd-staining, dans des échantillons de cortex issus de patients atteints de la MA. 149
Figure 53 : Mise en registre des images IRM après Gd-staining (A-B) avec les coupes histologiques doublement marquées par coloration au Rouge Congo et Perls-DAB (C-E) dans des échantillons de cortex issus de patients atteints de la MA. 150
Figure 54 : Schéma décrivant le protocole d'injection IT utilisé. 161
Figure 55 : Images IRM *post mortem* d'un cerveau de macaque cynomolgus après imprégnation à l'aide de Dotarem® par la technique de l' « active staining » 163
Figure 56 : Mesure du ratio IS dans le LCS rachidien (A), dans la *Cisterna Pontis* (B), dans la *Cisterna Magna* (C) et dans le 4ème ventricule (D) après injection IT de Dotarem® à la dose de 3,125 µmol/kg (points blancs), 6,25 µmol/kg (points gris) et 12,5 µmol/kg (points noirs) en fonction du temps, chez un macaque cynomolgus, sur des images pondérées en T1. 166

Figure 57 : Images IRM pondérées en T1 avant (T=0) et 90 minutes après injection IT de Dotarem® (T=90), à la dose de 12,5 µmol/kg, chez un macaque cynomolgus. 167
Figure 58 : Mesure du ratio IS dans différentes régions cérébrales avant (pointillés) et 90 minutes après injection IT de Dotarem® à la dose de 3,125 µmol/kg (blanc), 6,25 µmol/kg (gris) et 12,5 µmol/kg (noir), chez un macaque cynomolgus. 168
Figure 59 : Mesure du ratio IS en fonction du temps dans le LCS rachidien (A), dans la *Cisterna Pontis* (B), dans la *Cisterna Magna* (C) et dans le 4ème ventricule (D) après injection IT de Dotarem® (6,25 µmol/kg) avec (ronds) ou sans (triangles) mise en position de Trendelenbourg, chez un macaque cynomolgus. 169
Figure 60 : Hypothèse sur l'influence du flux de LCS sur la diffusion du Dotarem® après injection IT. 173
Figure 61 : schéma décrivant le protocole d'injection utilisant un volume d'injection important..... 174
Figure 62 : Images IRM pondérées en T1 avant (A) et après (B) injection IT de Dotarem® avec utilisation d'un grand volume d'injection, chez un singe cynomolgus. 175
Figure 63 : Représentation schématique des composés VHH et VHH-CSA..... 182
Figure 64 : Représentation schématique du couplage des VHH-CSA avec différents complexes maléimido-DOTA/Gd. 183
Figure 65 : Relaxivité longitudinale r1 des différents complexes et conjugués R3VQ en comparaison au Dotarem®. 193
Figure 66 : Relaxivité transversale r2 des différents complexes et conjugués R3VQ en comparaison au Dotarem®. 193
Figure 67 : Vérification de la fonctionnalité des différents conjugués R3VQ par IHC..... 194
Figure 68 : Détection par IHC des différents conjugués R3VQ dans le cerveau de souris PS2/APP après injection IV..... 196
Figure 69 : Vérification de la fonctionnalité des différents conjugués TauA2 par IHC. 197
Figure 70 : Détection par IHC des différents conjugués TauA2 dans le cerveau de souris Tg4510 après injection IV..... 199
Figure 71 : Détection des plaques amyloïdes par IRM *in vitro* dans le cerveau de souris PS2/APP après incubation en présence des VHH R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$. 201
Figure 72 : Mesure de la charge amyloïde (A) et du nombre de plaques amyloïdes (B) détectées par IRM *in vitro* dans le cerveau de souris PS2/APP après incubation dans une solution de R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$ (noir) ou dans du PBS (blanc). 202
Figure 73 : Mise en registre des images IRM *in vitro* (A) et des coupes histologiques marquées par IHC anti-Aβ (4G8) (B) et anti-6-His (C), au niveau de l'hippocampe de souris PS2/APP, après incubation directe dans une solution de R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$[387]. 203

Figure 74 : Détection des DNF par IRM *in vitro*, dans le cerveau de souris Tg4510, après incubation avec TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$. 204
Figure 75 : Mise en registre des images IRM *in vitro* (A-B, E-F) et des coupes histologiques marquées par IHC anti-Tau (AT8) (C-D) ou anti-TauA2 (G-H), au niveau de l'hippocampe de souris Tg4510, après incubation directe dans une solution de TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$. 205
Figure 76 : Images IRM *in vitro* d'un cerveau de souris Tg4510 avant (A) et après (B) incubation avec R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$. 206
Figure 77 : Détection des plaques amyloïdes par IRM *post mortem*, après injection systémique des VHH R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$ *in vivo*. 208
Figure 78 : Quantification de la charge amyloïde (A) et du nombre de plaques amyloïdes (B) détectés par IRM *post mortem*, chez des souris APP/$PS1_{dE9}$ ou PS2/APP, après injection systémique de R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$ (noir) ou de PBS (blanc) *in vivo*..... 209
Figure 79 : Détection des DNF par IRM *post mortem*, après injection systémique des VHH TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$ *in vivo.* 210

Liste des tableaux

Tableau 1 : Critères de diagnostic de la MA selon le NIA-AA et l'IWG-2[15]. 49
Tableau 2 : Résumé des différents agents de contraste ciblés pour l'imagerie des plaques amyloïdes *in vivo*. 85
Tableau 3 : Résumé des différents VHH testés en clinique pour l'imagerie des cancers[322]..... 97
Tableau 4: Quantité ^{125}I-VHH R3VQ retrouvée au niveau de différents organes après injection IV chez des souris PS2/APP ou WT, en fonction du temps. Les résultats sont exprimés en % de la dose initiale/gramme. 102
Tableau 5 : Principales caractéristiques physiopathologiques des modèles utilisés dans cette étude. 127
Tableau 6 : Mesure du ratio IS sur fantome pour différentes concentration de Dotarem®..... 165
Tableau 7: principales caractéristiques des VHH utilisés dans cette thèse 184
Tableau 8: Principales caractéristiques physiopathologiques des modèles transgéniques utilisés. .. 184
Tableau 9 : Caractéristiques des différents composés étudiés en relaxométrie. 192

Liste des abréviations

6-His	Hexa-histidine
AAC	Angiopathie amyloïde cérébrale
Aβ	Peptide amyloïde β
ADL	Activities of Daily Living
AMT	Adsorptive-mediated transcytosis
APP	Protéine précurseur de l'amyloïde
BACE1	β-sécrétase
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BOLD	Blood-oxygen-level dependent
BW	Bande passante en réception
CA	Corne d'Ammon
CDR	Complementarity determining region
CEC	Cellules endothéliales cérébrales
CERAD	Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease
DAB	Diaminobenzidine
DCE-MRI	Dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging
DLS	Dynamic light scattering
DMN	Default mode network
DNF	Dégénérescences neurofibrillaires
DSM-5	Manuel Diagnostique et Statistique des Troubles Mentaux 5ème édition
DTI	Imagerie en tenseur de diffusion
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMA	European medicines agency
FA	Flip angle
Fab_2	Fragment variable d'immunoglobuline
Fc	Fragment constant d'immunoglobuline
FDA	Food and Drug Administration
FDG	^{18}F-2-Fluoro-2-deoxy-D-glucose

FLASH	Fast low angle shot
FOV	Field of view ou champ de vue
FR	Framework regions
FTD	Démence fronto-temporale
Gd	Gadolinium
GD	Gyrus Denté
HAS	Haute Autorité de Santé
HCAb	Heavy Chain antibodies
IADL	Echelle d'Activités Instrumentales de la Vie Courante
ICV	Intracérébroventriculaire
IEF	Isoelectrique focusing
IgG	Immunoglobulines G
IHC	Immunohistochimie
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IRMf	IRM fonctionnelle
IT	Intrathécale
IV	Intraveineux
IWG	International working group
LCS	Liquide cérébro-spinal
LRP1	Low density lipoprotein receptor-related protein-1
MA	Maladie d'Alzheimer
MAP	Microtubule associated protein
MCI	Mild cognitive impairment
MGE	Multi-echo Gradient Echo
MMSE	Mini Mental State Examination
MP-RAGE	Magnetization Prepared RApid Gradient-Echo
NINCDS-ADRDA	National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
NIA/AA	National Institut of Aging/Alzheimer association
PART	Primary age-associated tauopathy
PCR	Polymerase chain reaction

PBS	Phosphate Buffered Saline
PEG	Polyéthylène glycol
PFA	Paraformaldehyde
PI	Point isoélectrique
PIB	Composé de Pittsburg B
PFH	Paires de filaments hélicoïdaux
PM	Poids moléculaire
PNH	Primate non-humain
PS1	Préséniline 1
PS2	Préséniline 2
RAGE	Receptor for advanced glycation end-products
RARE	Rapid Imaging with Refocused Echoes
ROI	Région d'intérêt
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SAR	Specific Absorption Rate ou Taux d'Absorption Spécifique
SNR	Rapport signal/bruit
SPECT	Single photon emission computed tomography
TE	Temps d'écho
TEP	Tomographie par émission de positons
TR	Temps de répétition
TSPO	Translocator protein
VHH	Fragment variable des HCAb
WT	Wild-type

Introduction

1 La maladie d'Alzheimer

1.1 Définition et épidémiologie

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative chronique d'installation progressive et irréversible. Elle affecte progressivement l'autonomie et les fonctions cognitives du patient (mémoire, langage, raisonnement, apprentissage, résolution de problèmes, prise de décision, etc.). Cette pathologie est définie par deux types de lésions moléculaires, les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF), dues à l'agrégation de protéines (peptides amyloïdes β (Aβ) et protéines Tau). Cette maladie est également caractérisée par une inflammation cérébrale et des dysfonctions métaboliques.

La MA est aujourd'hui la première cause d'altération cognitive majeure dans le monde[1]. Elle représenterait 60 à 80% des cas de démences[1]. Le nombre de personnes atteintes de la MA est difficile à évaluer mais l'incidence de cette maladie est estimée à 35 millions de cas à travers le monde dont 5,2 millions aux Etats-Unis en 2017[1].
En France, la prévalence de la MA était de 900 000 patients en 2015 et chaque année 225 000 nouveaux cas sont recensés (Alzheimer-recherche.org). Du fait du vieillissement de la population, ce chiffre augmentera dans les prochaines années. En effet, la population des personnes âgées de plus de 65 ans, estimée à 420 millions en 2000, devrait atteindre un milliard en 2030[2]. Le principal facteur de risque de cette maladie étant l'âge, l'incidence de la MA double tous les 5 ans après 65 ans[3]. Ainsi, elle touche environ 1% des personnes de plus de 60 ans et environ 30% des personnes de plus de 85 ans. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, l'incidence de cette maladie devrait s'élever à 115,4 millions de malades dans le monde en 2050 ce qui fait de cette pathologie un enjeu de santé public majeur[4].

Il est classiquement distingué deux formes de MA : la forme familiale et la forme sporadique. La première est causée par des mutations de diverses protéines : la protéine précurseur de l'amyloïde (APP), les enzymes impliquées dans son métabolisme ou encore la protéine Tau. La forme familiale touche des personnes de moins de 60 ans et représente moins de 5% des cas de MA. La forme majoritaire est la forme sporadique. Celle-ci touche des patients de plus de 60 ans et sa physiopathologie reste encore mal connue.

1.2 Symptomatologie de la MA

1.2.1 Tableau clinique

La MA est une altération cognitive majeure débutant généralement après 65 ans. D'après le Manuel Diagnostique et Statistique des Troubles Mentaux 5ème édition (DSM-5), le terme d'altération cognitive majeure englobe, de façon générale, les troubles mentaux caractérisés par un déclin cognitif dans au moins un des domaines suivants : l'apprentissage et la mémoire, le langage, les fonctions exécutives, les fonctions sensorielles et motrices, la cognition ou les capacités attentionnelles. Ces déficits cognitifs entraînent alors une altération du fonctionnement professionnel et social et mènent à la perte d'autonomie du patient[5].

Chez les patients atteints de la MA, l'altération de la mémoire est le symptôme prédominant et qui apparaît le plus précocement[6]. Aux stades précoces de la pathologie, les symptômes sont insidieux et essentiellement caractérisés par un déficit de la mémoire à court terme ou mémoire épisodique[7]. L'évolution de la MA est un déclin cognitif continu avec atteinte des autres systèmes : la mémoire de travail et la mémoire sémantique. La mémoire procédurale et le système de représentations perceptives sont relativement préservés dans un premier temps[8]. Outre les troubles mnésiques, la MA est également caractérisée par des troubles cognitifs tel que l'aphasie, l'apraxie et l'agnosie, des troubles des fonctions exécutrices et des difficultés d'orientation dans le temps et l'espace[9]. Enfin, d'autres troubles peuvent apparaître tels qu'une modification de la personnalité, des troubles de l'humeur (anxiété, dépression, irritabilité) et du sommeil. Le décès survient en général 8 à 10 ans après l'apparition des premiers symptômes[10].

1.2.2 Progression de la pathologie

La symptomatologie de la MA est lente et s'installe de façon progressive, ce qui explique que le délai moyen entre l'apparition des premiers troubles et l'annonce du diagnostic est long (24 mois en France). Les lésions neuropathologiques se développent dans le cerveau des patients plusieurs années avant le diagnostic clinique. Récemment, le développement des biomarqueurs a conduit à une redéfinition des critères de diagnostic de la MA. Ces nouveaux critères incluent les stades précliniques et prodromaux de la MA[11–13].

Le stade préclinique précède l'apparition des symptômes de 10 à 20 ans. En effet, des analyses neuropathologiques *post mortem* pratiquées chez des sujets âgés, diagnostiqués comme

cognitivement normaux, ont montré la présence des lésions caractéristiques de la MA[14]. Un certain nombre de biomarqueurs de la MA sont déjà détectables chez ces patients en l'absence de symptômes cliniques[12,15]. Ces observations ont donc considérablement encouragé la recherche et le développement de biomarqueurs pour l'identification précoce de la MA. Ainsi, les critères de diagnostic, publiés par le National Institute of Aging/Alzheimer association (NIA/AA) en 2011, reposent sur l'utilisation de ces biomarqueurs et permettent de distinguer trois stades précliniques de la MA : en présence de lésions cérébrales Aβ isolées, avec des signes de neurodégénérescence et finalement en présence de symptômes cognitifs subtils[16,17]. Les performances aux tests cognitifs sont alors normales mais en baisse par rapport aux performances précédentes du patient. Il faut également noter que certains patients peuvent présenter des lésions Aβ cérébrales sans jamais déclarer de symptômes cliniques (Figure 1)[18].

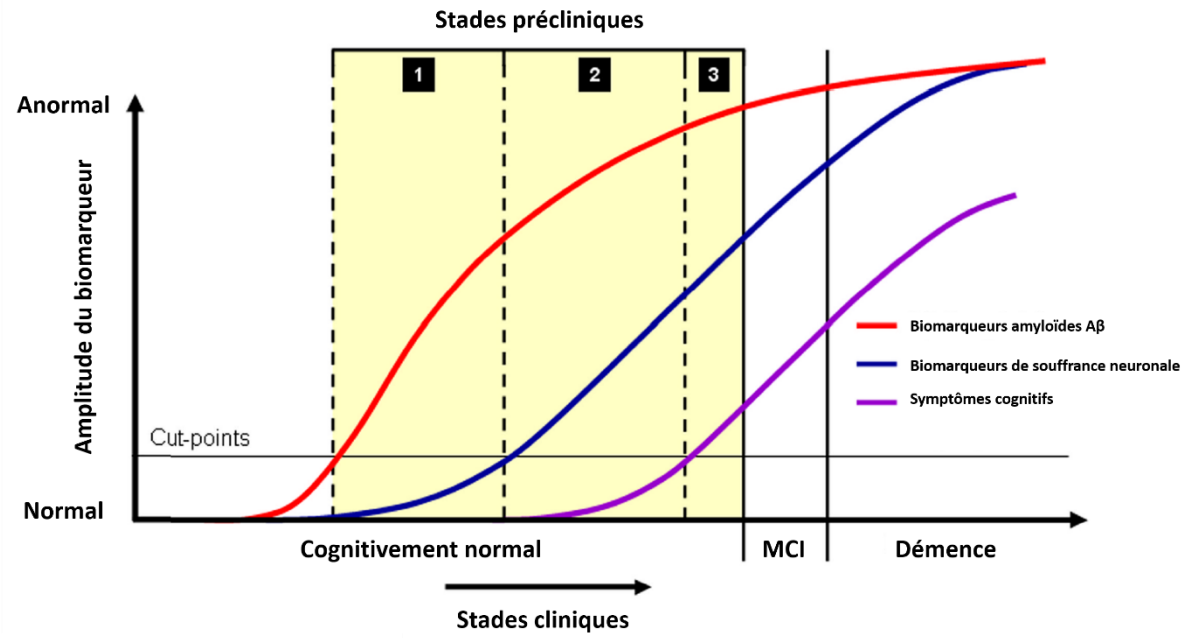


Figure 1 : Modèle des stades précliniques de la MA et des biomarqueurs associés.

L'axe horizontal correspond aux différents stades de la MA. Les trois stades précliniques sont colorés en jaune. L'axe vertical correspond aux variations des biomarqueurs de la MA. Les biomarqueurs amyloïdes (rouge) correspondent à l'imagerie par tomographie par émission de positons (TEP) à l'aide de radiotraceurs ciblant l'Aβ et à la mesure du taux d'Aβ dans le liquide cérébro-spinal (LCS). Les biomarqueurs de souffrances neuronales (bleu) correspondent à la TEP au ^{18}F-2-Fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) et à l'atrophie cérébrale visualisée en imagerie par résonance magnétique (IRM). Il est distingué trois stades précliniques de la MA. Au stade 1, les performances cognitives sont normales mais avec des signes d'amyloïdose cérébrale. Au stade 2, des signes de neurodégénérescence apparaissent. Enfin, au stade 3, les patients présentent un déclin cognitif « subtil », ne remplissant pas encore les critères de « troubles cognitifs légers » ou « mild cognitive impairment » (MCI)[17].

Progressivement, la pathologie évolue et atteint le stade prodromal du MCI. Cette phase est caractérisée par une altération notable des fonctions cognitives par rapport aux personnes de même âge et de même niveau d'éducation. Le diagnostic de MCI implique la présence d'au moins un trouble cognitif dans un des domaines suivants : mémoire, fonctions exécutives, attention, langage et capacité visuo-spatiale. Les troubles de la mémoire épisodique sont le plus fréquemment associés à un MCI dû à la MA. Ces troubles n'affectent généralement pas la vie quotidienne de façon importante et n'entraînent pas de dépendance du sujet. Chez ces patients, les biomarqueurs caractéristiques de la MA sont déjà détectables. Il est estimé qu'environ 50% des patients MCI développent une MA dans les cinq ans[19].

1.3 Neuropathologie de la MA

Dans la MA, le cerveau est victime d'un processus de dégénérescence caractérisé par deux types de lésions majeures, les plaques amyloïdes et les DNF, associées à une perte neuronale variable, à des altérations synaptiques et fréquemment à une angiopathie amyloïde cérébrale (AAC)[20,21].

1.3.1 La pathologie amyloïde β

1.3.1.1 Généralités

Les plaques amyloïdes sont un type de lésions caractéristiques de la MA. Ce sont des agrégats extracellulaires, principalement constitués d'un cœur dense d'Aβ fibrillaires, entouré de cellules inflammatoires et d'une couronne de neurites dystrophiques. Les fibrilles amyloïdes sont généralement définies par leur structure riche en feuillets β, leur permettant de fixer certains colorants tels que le Rouge Congo et la Thioflavine-S[22]. Ces colorants sont largement utilisés en histologie et en anatomo-pathologie pour mettre en évidence la présence de dépôts amyloïdes dans un tissu (MA, carcinomes médullaires de la thyroïde et parfois dans les plasmocytomes et myélomes).

L'Aβ est une famille de protéines produites de façon physiologique par le métabolisme cellulaire[23]. Il s'agit de fragments peptidiques de 38 à 43 acides aminés issus du clivage protéolytique séquentiel de l'APP, glycoprotéine transmembranaire précurseur de l'amyloïde. Le gène codant pour l'APP est situé sur le chromosome 21. En conditions physiologiques, l'APP est d'abord clivée par l'α-sécrétase libérant un fragment soluble sAPPα, puis par la γ-sécrétase libérant les fragments solubles P3. Cette voie physiologique est appelée voie non-amyloïdogénique. En conditions pathologiques, notamment dans la MA, l'APP est d'abord clivée par la β-sécrétase (BACE1) puis par la γ-sécrétase libérant les peptides

Aβ solubles. Cette voie est appelée voie amyloïdogénique (Figure 2). La γ-sécrétase est constituée de quatre sous-unités dont la Présséniline (PS1 et PS2), la nicastrine, la PEN-2 (presenilin enhancer 2) et l'Aph-1 (Anterior pharynx-defective 1)[24]. Des mutations dans les gènes de l'APP, de la PS1 (chromosome 14) ou de la PS2 (chromosome 1) sont impliquées dans les formes familiales de la MA[23,25].

En condition normale, le peptide Aβ, principalement l'isoforme $A\beta_{40}$[26], est présent sous forme de monomères solubles dans le milieu interstitiel cérébral et probablement au niveau intracellulaire[27]. Son rôle physiologique reste encore mal compris. Les dépôts amyloïdes observés dans la MA sont essentiellement composés de l'isoforme $A\beta_{42}$, constituée de 42 acides aminés[20,28]. Les peptides Aβ, et particulièrement l'$A\beta_{42}$, présentent une tendance naturelle à s'agréger du fait de leur structure secondaire riche en feuillets β. L'Aβ s'agrège en oligomères solubles, constituant probablement les formes les plus toxiques d'Aβ[29]. Les oligomères solubles d'Aβ s'assemblent ensuite pour former des protofibrilles puis des fibrilles menant à la formation de dépôts fibrillaires[30] (Figure 2).

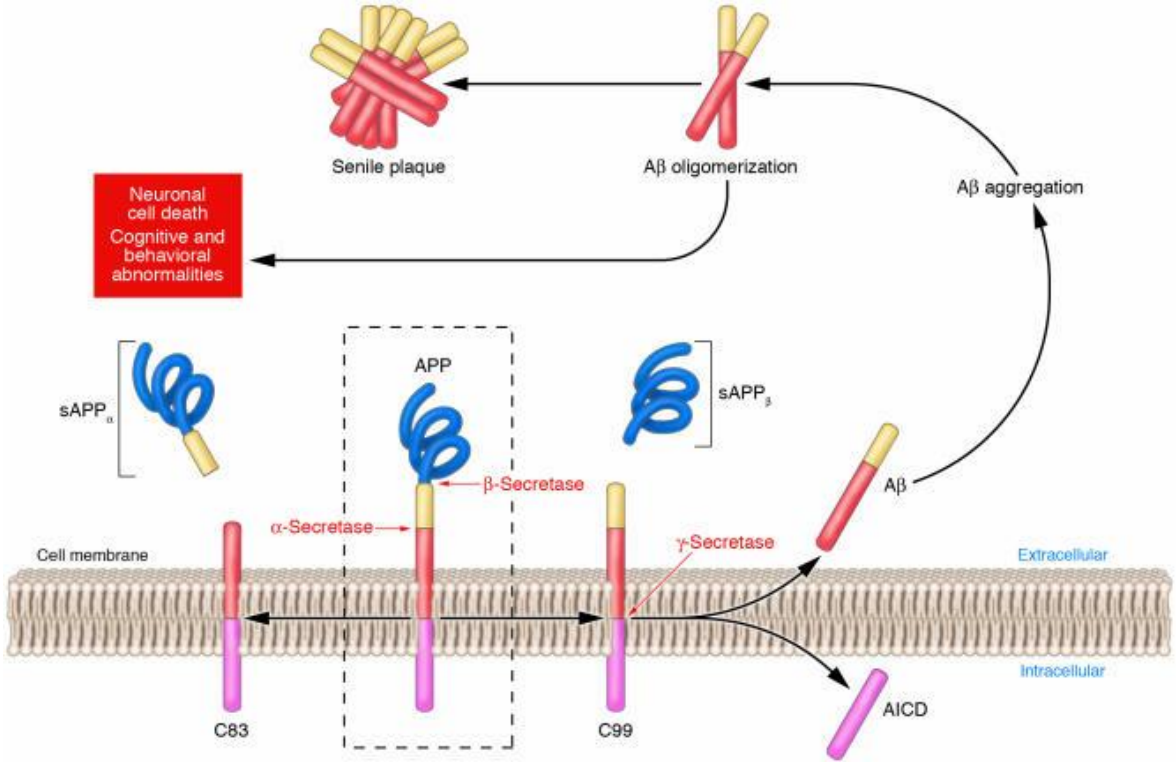


Figure 2 : Métabolisme de l'APP et agrégation de l'Aβ.

Voie non amyloïdogénique (gauche) : l'APP est clivée par l'α-sécrétase libérant les fragments C83 et sAPPα ayant des propriétés neurotrophiques. Voie amyloïdogénique (droite) : l'APP est clivée par la β-sécrétase libérant les fragments C99 et sAPPβ. Le fragment C99 est clivé également par la γ-sécrétase produisant le fragment AICD et un fragment pathologique Aβ composé de 38 à 43 acides aminés. L'Aβ soluble peut ensuite s'agréger en oligomères, fibrilles puis plaques amyloïdes. D'après l'hypothèse de la cascade amyloïde, la présence de lésions amyloïdes dans le cerveau des patients est à l'origine de la physiopathologie de la MA[30].

1.3.1.2 Typologies des dépôts amyloïdes β dans la MA

1.3.1.2.1 Les dépôts parenchymateux d'Aβ

Il est classiquement distingué deux types de dépôts d'Aβ : diffus et focaux. Cette distinction est basée sur la morphologie des dépôts et sur leur capacité à fixer la Thioflavine-S ou le Rouge Congo[31].

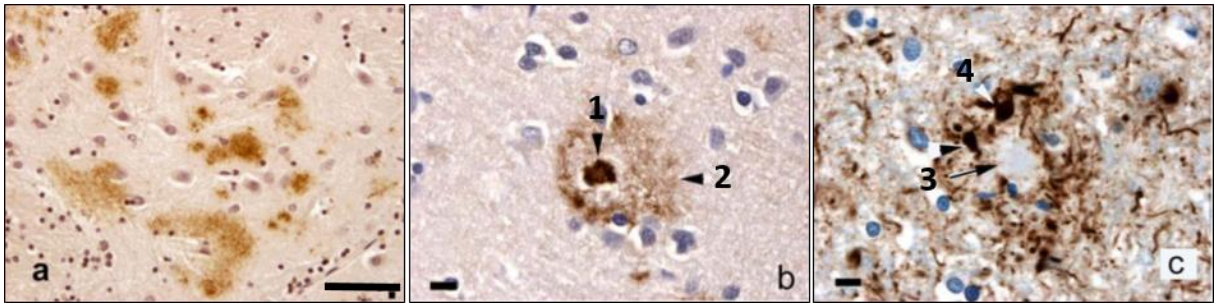


Figure 3 : Aspects des dépôts d'Aβ diffus (a) et focaux (b, c).

(a) Dépôts d'Aβ diffus marqués par immunohistochimie (IHC) anti-Aβ (anticorps 6F/3D). (b, c) Dépôts amyloïdes focaux constitués d'un cœur dense d'Aβ (flèches noires 1, 3) et d'une couronne de neurites dystrophiques contenant de la protéine Tau hyperphosphorylée (flèches noires 2, 4) marqués par IHC anti-Aβ (anticorps 6F/3D) (b) et anti-Tau (anticorps AT8) (c). Barre d'échelle = 100 µm pour (a) et 10 µm pour (b, c)[31].

1.3.1.2.1.1 Les dépôts diffus d'Aβ

Les dépôts diffus sont de larges dépôts d'Aβ (de diamètre généralement supérieur à 50 µm), peu denses et souvent mal délimités. Ces dépôts contiennent une forte teneur en $A\beta_{42}$. Ils ne sont pas amyloïdes et peuvent seulement être visualisés par immunohistochimie (IHC) à l'aide d'anticorps dirigés contre le peptide Aβ. Une hypothèse est que ces dépôts constitueraient le stade précoce de la plaque sénile en voie de constitution. Cependant, certaines régions cérébrales sont connues pour développer principalement ce type de dépôts sans évolution vers la formation de plaques neuritiques. C'est le cas, par exemple, du striatum ou du cervelet[32]. Le présubiculum présente des dépôts d'Aβ très volumineux et continus sur plusieurs couches corticales appelés dépôts « en flaques » ou « lake-like »[33]. Les dépôts du cortex entorhinal sont qualifiés de « fleecy » ou « laineux »[34]. Des dépôts diffus d'Aβ peuvent être présents en grand nombre chez des personnes âgées dépourvues de troubles intellectuels, ou bien moins marqués, ce qui suggère qu'ils sont faiblement toxiques[31].

1.3.1.2.1.2 Les dépôts focaux d'Aß

Les dépôts focaux sont des accumulations denses et sphériques d'Aβ. Ces dépôts sont de plus petite taille que les dépôts diffus (de diamètre généralement compris entre 10 à 120 µm). Contrairement aux dépôts diffus, ces lésions sont visibles après coloration par la Thioflavine-S ou le Rouge Congo[31]. Les dépôts focaux peuvent être amyloïdes ou non et entourés ou non d'une couronne neuritique[31]. Le terme de « plaque neuritique » ou « plaque amyloïde mature » désigne le dépôt focal, constitué d'un cœur dense d'Aβ entouré par une couronne neuritique et généralement de cellules gliales[31]. L'$A\beta_{42}$ est l'isoforme retrouvée en majorité dans le cœur de ces plaques[35]. De l'$A\beta_{40}$, isoforme la plus produite par la voie catabolique de l'APP, est également retrouvée. L'insolubilité de ces dépôts serait due majoritairement à la présence de l'$A\beta_{42}$, plus hydrophobe et donc plus susceptible de s'agréger[36]. La couronne est constituée de neurites dystrophiques, hypertrophiées et accumulant des paires de filaments hélicoïdaux (PFH) de protéine Tau hyperphosphorylée[31]. Ces plaques sont abondantes dans le cerveau des patients atteints de la MA au stade symptomatique mais peuvent également être observées en l'absence de troubles cognitifs.

1.3.1.2.1.3 Autres types de dépôts d'Aß

D'autres types de dépôts, plus rares, peuvent également être observés (Figure 4). Les plaques en « laine de coton » ou « cotton wool plaques » sont des dépôts focaux non congophiles, principalement constitués d'$A\beta_{42}$ et dépourvus de couronne neuritique. Ces dépôts ont été initialement décrits dans des cas de MA familiale due à une délétion de l'exon 9 du gène codant pour la PS1[37]. Plus récemment, elles ont aussi été décrites dans des cas sporadiques de la MA mais toujours associées à des plaques neuritiques[38]. Les « plaques inflammatoires » sont caractérisées par une forte réactivité microgliale et sont également observées dans des formes familiales de la MA dues à des mutations sur le gène codant la PS1[39]. Les plaques stellaires sont des dépôts denses et de petite taille présents entre les plaques neuritiques. Ces dépôts peuvent être observés chez des sujets sans troubles cognitifs[40]. Enfin, l'Aβ peut également être présent à l'intérieur des neurones. Ces dépôts intraneuronaux sont principalement constitués d'$A\beta_{42}$[41]. L'Aβ intraneuronal pourrait être un évènement précoce dans la pathogénèse de la MA et du syndrome de Down[42]. En effet, des études immunohistochimiques sur coupes de cerveaux de patients MCI ont mis en évidence la présence de ces dépôts intraneuronaux d'Aβ au niveau de l'hippocampe et du cortex entorhinal. Egalement, l'accumulation intraneuronale d'Aβ précède l'apparition de plaques amyloïdes chez des patients atteints du syndrome de Down[43].

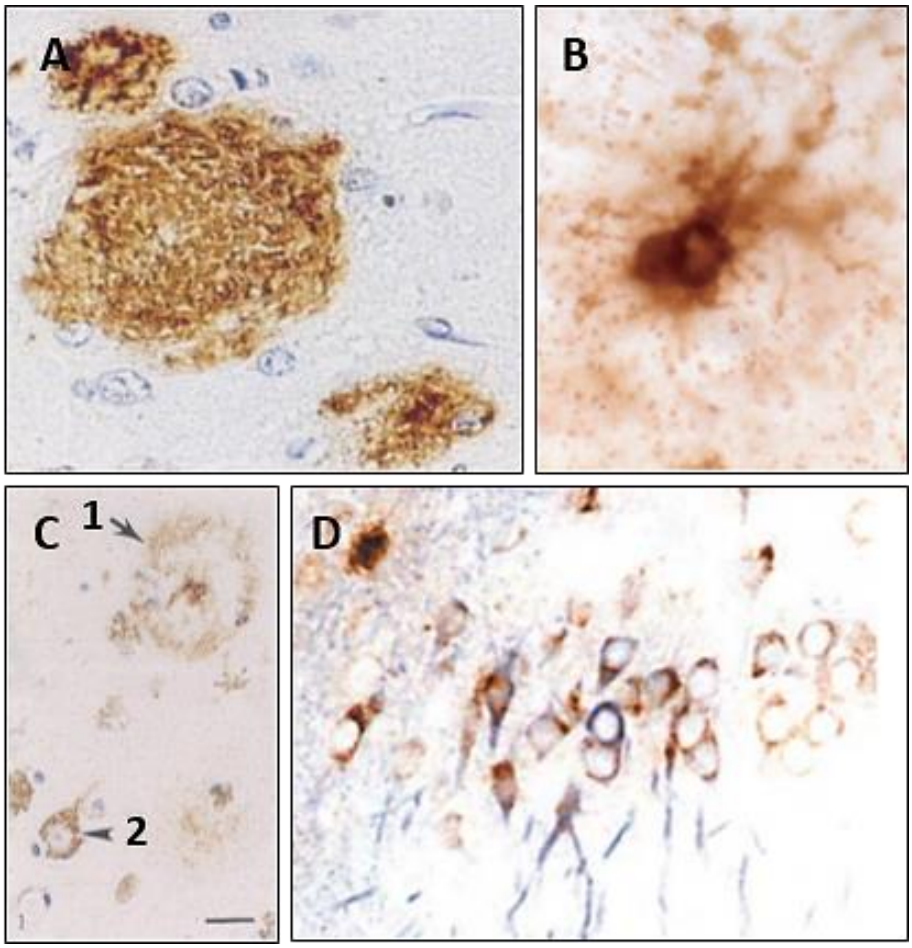


Figure 4 : Aspects des dépôts d'Aβ atypiques.

(A) Plaques amyloïdes en « laine de coton » marquées par IHC anti-Aβ (anticorps BAM10)[38]. (B) Plaques inflammatoires marquées par IHC anti-HLA-DR montrant de nombreuses microglies présentes au niveau du cœur de la plaque amyloïde[39]. (C) Plaques amyloïdes focales (1) et dépôts intracellulaires d'Aβ (2) marqués par IHC anti-Aβ au niveau des neurones pyramidaux de l'hippocampe[44]. (D) Dépôts intracellulaires d'Aβ marqués par IHC anti-Aβ (anticorps 6E10) dans le cerveau d'une souris 3xTg[45].

1.3.1.2.2 Les dépôts vasculaires d'Aβ – angiopathie amyloïde cérébrale

Le peptide Aβ (notamment de l'$A\beta_{40}$) peut aussi s'accumuler dans la paroi des vaisseaux sanguins. L'AAC est un ensemble de pathologies caractérisées par des dépôts amyloïdes dans la paroi des vaisseaux sanguins cérébraux (Figure 5). Dans le cas de la MA, l'AAC est présente chez environ 90% des patients. Elle atteint principalement les artères de petit et de moyen calibre, les veines corticales et leptoméningées et, dans les cas les plus sévères, les capillaires corticaux[46]. La présence de ces lésions peut conduire à l'apparition d'infarctus ou d'hémorragies. De plus, le débit sanguin cérébral est diminué chez les patients atteints de la MA notamment dans le cortex temporo-pariétal et le cortex cingulaire postérieur[47].

L'AAC est particulièrement sévère dans des cas associés à certaines mutations de l'APP ou de la PS1. Par exemple, les mutations Dutch et Iowa de l'APP sont caractérisées par une AAC sévère et des hémorragies cérébrales. Dans le cas de la mutation Flemish, des vaisseaux amyloïdes sont observés au centre des plaques neuritiques, alors appelées « plaques angiocentriques »[31,48,49]. La progression de l'AAC est stéréotypée et divisée en trois stades[50]:

- Stade 1 : vaisseaux de l'isocortex
- Stade 2 : vaisseaux de l'allocortex, du cervelet et du mésencéphale
- Stade 3 : vaisseaux des ganglions de la base, du thalamus, du pont et de la *medulla oblongata*.

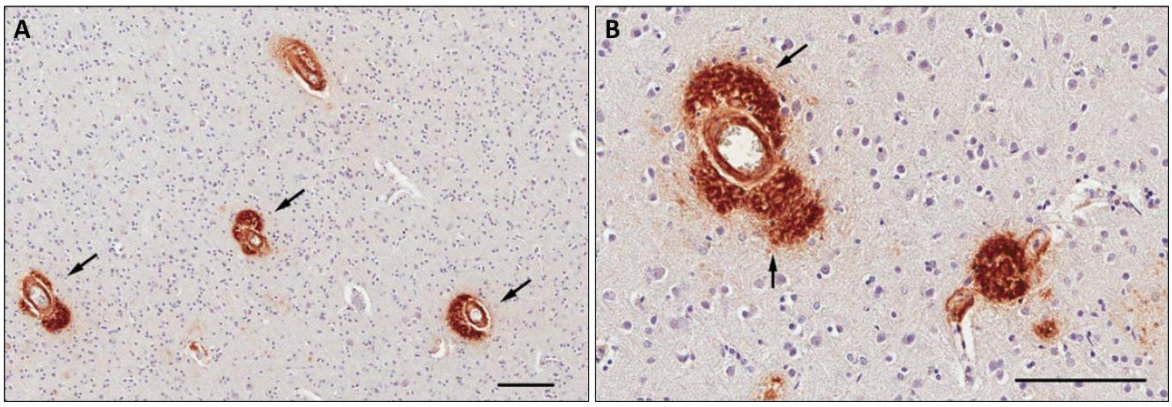


Figure 5 : Angiopathie amyloïde cérébrale dans le parenchyme d'un patient atteint de la MA[51].

Angiopathie amyloïde cérébrale marquée par IHC anti-Aβ au niveau d'artérioles cérébrales. L'Aβ est présent au niveau de la paroi vasculaire (A, flèches noires) et du neuropil périvasculaire (B, flèches noires). Barre d'échelle = 100 µm pour A et 50 µm pour B.

1.3.1.3 Topographie de la pathologie amyloïde β : les stades de Thal

La majorité des dépôts Aβ sont localisés dans la substance grise bien que des dépôts diffus aient également été observés dans la substance blanche. Les plaques amyloïdes sont présentes et s'accumulent dans le cerveau des patients bien avant l'apparition des premiers symptômes de la MA. La topographie des lésions est variable mais elle correspond à un schéma de progression précis, en six stades décrites par Thal et coll. (Figure 6)[52] :

- Stade 1 : isocortex (frontal, pariétal, temporal et occipital)
- Stade 2 : cortex entorhinal et hippocampe
- Stade 3 : régions sous-corticales (striatum et diencéphale dont le thalamus et l'hypothalamus)
- Stade 4 : tronc cérébral (dont le noyau rouge, la substance noire et le colliculus supérieur et inférieur)
- Stade 5 : pont

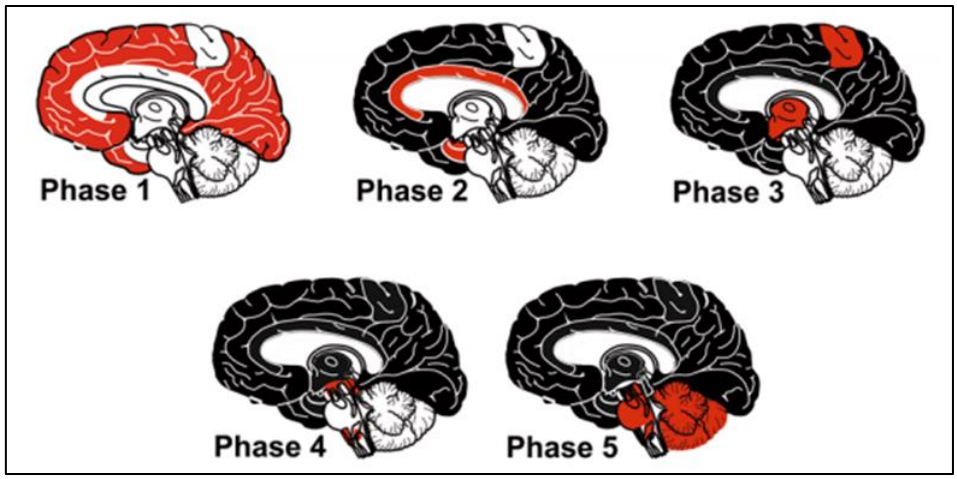


Figure 6 : Distribution spatio-temporelle des plaques amyloïdes dans le cerveau des patients atteints de la MA[52].

1.3.1.4 L'hypothèse de la cascade amyloïde

Selon l'hypothèse de la cascade amyloïde, la perturbation du métabolisme de l'Aβ est à l'origine de l'ensemble des lésions de la MA[53]. L'accumulation d'Aβ, résultant d'un excès de production et/ou d'un défaut de clairance, serait à l'origine de la cascade d'événements menant au développement de la MA[20]. Cette hypothèse s'appuie sur la constatation que les mutations retrouvées dans les formes familiales de la MA sont présentes dans le gène de l'APP ou des enzymes responsables de son métabolisme (Figure 7).

Cependant, l'hypothèse de la cascade amyloïde est considérablement remise en cause actuellement. Tout d'abord, des études histopathologiques *post mortem* ont montré qu'une proportion importante de la population présente des DNF en l'absence de dépôts Aβ[54–56]. Il faut cependant noter que ces observations ont été pratiquées sur un nombre limité de régions cérébrales et ne permettent pas d'exclure de manière définitive la présence de dépôts amyloïdes chez ces patients. Plus récemment, Braak et Braak ont montré qu'environ deux tiers de la population âgée de plus de 50 ans et presque la totalité de la population de plus de 70 ans présente des DNF au niveau du lobe temporal médian, généralement en l'absence de pathologie amyloïde. De plus, des lésions Tau ont été observées dans le cerveau de patients jeunes, avant 30 ans, sans lésions amyloïdes associées[57]. La précession des lésions Tau sur l'apparition des lésions amyloïdes remet en cause l'hypothèse de la cascade amyloïde. Ces observations histopathologiques ont été confirmées par l'utilisation des biomarqueurs de la MA. Notamment, les études de TEP utilisant des traceurs ciblant spécifiquement l'Aβ ont confirmé *in vivo* que 20% des sujets cognitivement normaux présentent des dépôts amyloïdes en TEP[58,59].

De plus, la charge amyloïde dans le cerveau des patients n'est pas corrélée aux signes cliniques ni à la mort neuronale et des plaques amyloïdes sont fréquemment retrouvées dans le cerveau d'individus non déments[59–61]. La localisation spatio-temporelle des lésions amyloïde corrèle peu avec les signes cliniques observés[60,62,63]. A l'inverse, il existe une forte corrélation entre la charge en DNF et les symptômes avec une topographie des lésions suivant l'évolution clinique. Enfin, de nombreuses thérapies anti-Aβ potentielles, montrant des résultats prometteurs dans les modèles transgéniques murins de MA, se sont révélées inefficaces en clinique où la plupart des patients inclus présentent des formes sporadiques de la MA[64]. Des études ont montré qu'il existait cependant une corrélation entre les taux d'oligomères d'Aβ présents dans le parenchyme cérébral et dans le LCS et le statut cognitif[65,66]. Ces résultats suggèrent que les plaques amyloïdes ne seraient pas responsables de la neurodégénérescence mais qu'elle serait due aux petits oligomères solubles qui constituent l'espèce la plus toxique d'Aβ.

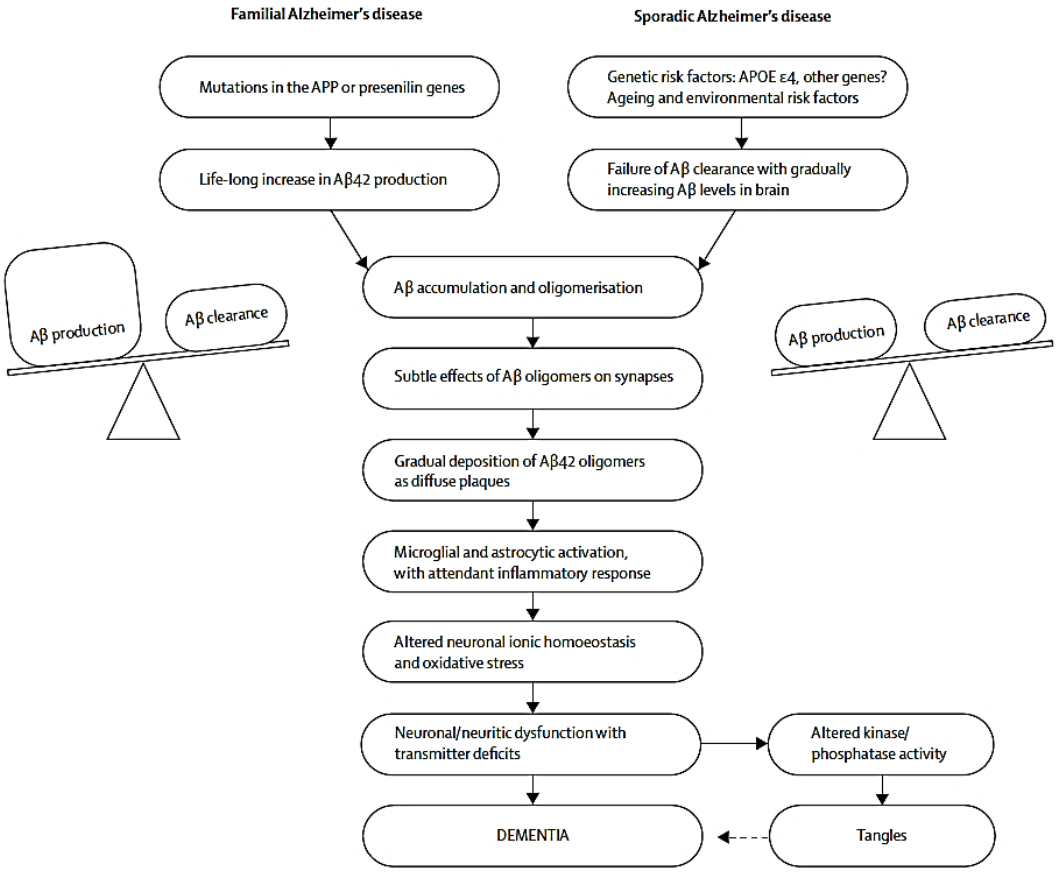


Figure 7 : Physiopathologie de la MA selon l'hypothèse de la cascade amyloïde.

Selon cette hypothèse, l'évènement causal de la physiopathologie de la MA est un déséquilibre entre la production et l'élimination d'Aβ. Les oligomères solubles d'Aβ peuvent induire directement des dysfonctions synaptiques et une altération de la potentialisation à long-terme dans l'hippocampe. Les dépôts d'Aβ engendrent une réponse inflammatoire importante et un stress oxydatif menant à une toxicité neuronale et à des dysfonctions synaptiques. Il en résulte le développement de la pathologie Tau et les signes cliniques de la MA[20].

1.3.2 La tauopathie

1.3.2.1 Généralités

Les tauopathies sont des pathologies neurodégénératives caractérisées par l'agrégation anormale de protéines Tau hyperphosphorylées dans les neurones et les cellules gliales. La protéine Tau est une protéine associée aux microtubules (microtubule associated protein ou MAP) codée par le gène MAPT situé sur le chromosome 17. En condition physiologique, la protéine Tau est principalement localisée dans les axones des neurones et joue un rôle essentiel dans la polymérisation des microtubules. La fixation de Tau induit l'assemblage et favorise la stabilité de ces derniers. Elle joue donc un rôle primordial pour le maintien de l'architecture neuronale et le transport axonal. Par épissage alternatif, elle peut exister sous six isoformes de 352 à 441 acides aminés dans le cerveau adulte. Les isoformes diffèrent par la présence de trois ou quatre régions répétitives en C-terminale, sites de liaison aux microtubules, et par la présence ou l'absence d'un ou deux inserts (de 29 ou 58 acides aminés) en N-terminale (Figure 8)[67].

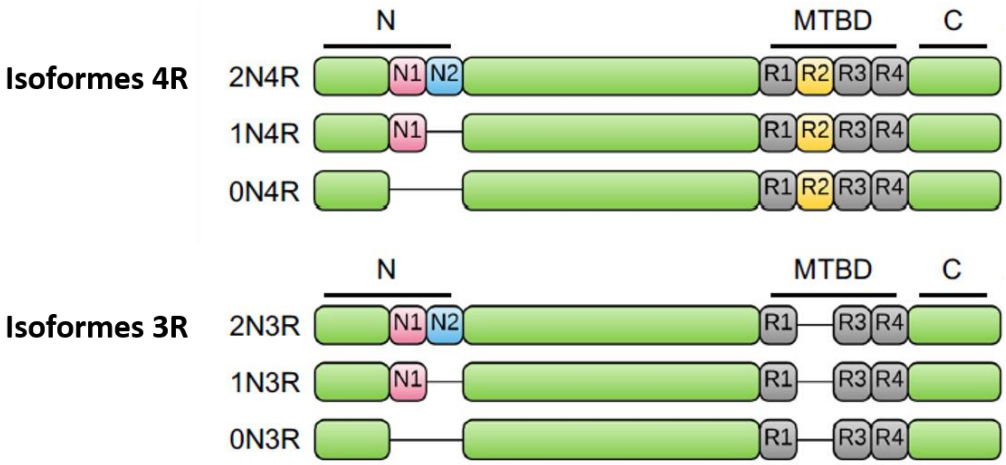


Figure 8 : Représentation schématique des six isoformes de la protéine Tau présentes au niveau du système nerveux central.

Les isoformes de Tau diffèrent en fonction de leur taille, de la présence d'inserts en partie N-terminale (N1 en rose et N2 en bleu) et du nombre de sites de liaison aux microtubules en partie C-terminale (R1 à R4 en noir et jaune). Ces derniers résultent d'un épissage alternatif dans le domaine de liaison aux microtubules (MTBD ou microtubule binding domain)[68].

La fixation de Tau aux microtubules dépend de son état de phosphorylation. Sous forme non phosphorylée, elle est capable de se lier à la tubuline et favorise l'assemblage des microtubules. A l'inverse, l'hyperphosphorylation de Tau supprime sa capacité de liaison des microtubules. Le degré de

phosphorylation de Tau est contrôlé par plusieurs kinases telles que la Glycogen synthase kinase 3β (GSK-3), des cyclin-dependant kinase (CDK5 et CDK2), la 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), des mitogen-activated protein kinases (p38MAPK et ERK/MAPK), la tau-tubuline kinase, ou encore des SAP kinases. L'action de ces enzymes est contrebalancée par l'action de phosphatases (PP-1 et PP-2A/B/C)[69].

On distingue la phosphorylation anormale et l'hyperphosphorylation de la protéine Tau. La phosphorylation anormale consiste en la phosphorylation de sites qui ne sont pas concernés par la phosphorylation dans des conditions physiologiques. On parle d'épitope non-physiologique. Ce sont par exemple les épitopes reconnus par les anticorps AT100 et TG-3. En revanche, la protéine Tau est considérée comme hyperphosphorylée lorsqu'elle est phosphorylée au niveau d'épitopes physiologiques en plus grand nombre que dans un cerveau adulte normal ou lorsque pour un site donné un pourcentage élevé de protéine Tau est phosphorylée[67,70]. Il faut noter que l'hyperphosphorylation de la protéine Tau n'est pas spécifique à la MA. Ces lésions sont notamment retrouvées dans d'autres pathologies telles que la paralysie supranucléaire progressive, la dégénérescence cortico-basale ou la maladie de Pick[71].

1.3.2.2 Typologies des dépôts Tau dans la MA

Dans la MA, la protéine Tau hyperphosphorylée s'accumule majoritairement dans les neurones dont elle occupe les différents compartiments cellulaires. Dans le soma, la protéine Tau s'accumule et s'agrège pour former des DNF, composées de fibrilles de Tau hyperphosphorylées organisées en PFH. Le processus de formation des DNF est constitué de plusieurs stades. Au stade de pré-DNF, des agrégats diffus ou granulaires de Tau sont observés dans le cytoplasme et en périphérie du noyau des neurones. Au stade de DNF intracellulaire, de larges inclusions constituées de fibrilles de Tau s'accumulent dans le soma et sont généralement associées à des signes de dégénérescences des neurites. Enfin, les DNF peuvent subsister, à l'état de « fantômes » ou DNF extracellulaires, lorsque les neurones dont elles occupaient le cytoplasme meurent. Les DNF sont également présentes dans les axones entourant le cœur des plaques neuritiques et formant sa « couronne ». Les « fibres tortueuses » sont principalement liées à l'accumulation de Tau dans les dendrites des neurones (Figure 9)[31]. Les caractéristiques de l'agrégation de la protéine Tau ont été essentiellement décrites par des études *in vitro*. La protéine Tau est flexible et soluble dans de nombreuses circonstances. Cependant, de nombreux fragments peptidiques de Tau s'agrègent facilement. Les séquences répétées semblent être impliquées dans sa fibrillogenèse[67].

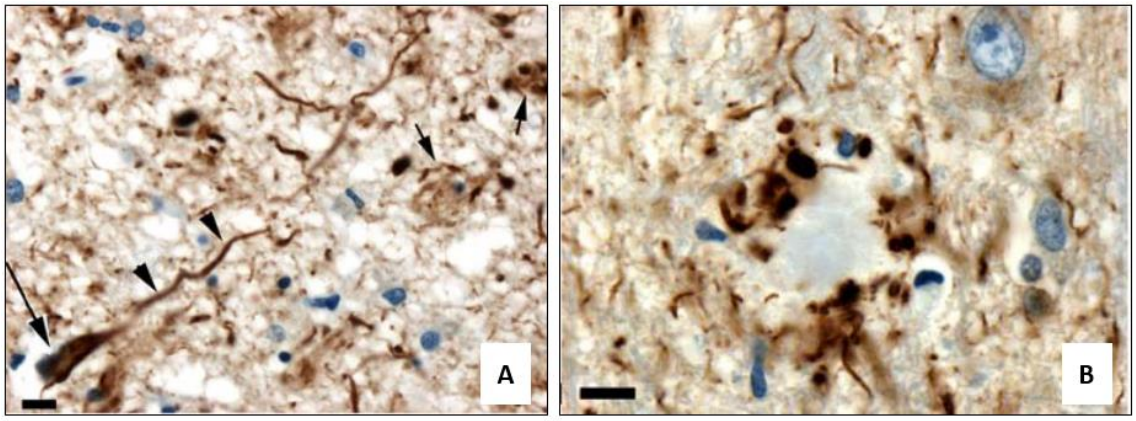


Figure 9 : Aspect des dépôts de protéines Tau dans la MA.

(A) DNF intracellulaires marquées par IHC anti-Tau à l'aide de l'anticorps AT8. La protéine Tau s'accumule dans le corps cellulaire (flèches) et dans les dendrites (têtes de flèche) des neurones. (B) Couronne d'une plaque amyloïde neuritique contenant des neurites dystrophiques riches en protéine Tau hyperphosphorylées. Barre d'échelle = 10 µm[72].

1.3.2.3 Topographie de la tauopathie : les stades de Braak

La propagation spatio-temporelle des DNF se fait également de façon stéréotypée. Braak et Braak ont décrit six stades de progression des DNF (Figure 10). Elles se localisent tout d'abord au niveau de la région transentorhinale (stade I) avant de s'étendre au cortex entorhinal et dans une moindre mesure à l'hippocampe (stade II). Au stade III, les DNF atteignent plus largement l'hippocampe ainsi que le thalamus et l'amygdale. Les DNF s'étendent ensuite au néocortex associatif, d'abord légèrement (stade IV), puis plus sévèrement (stade V), avant d'atteindre tout le cerveau, y compris le cortex primaire au stade VI. Il est à noter que les stades I et II peuvent être regroupés sous le terme de « stade transentorhinal », tandis que les stades III et IV font référence au « stade limbique » et que les stades V et VI sont appelés « stade isocortical »[56]. La progression des DNF a ensuite été précisée par Delacourte et coll. en distinguant dix stades (Figure 10)[73].

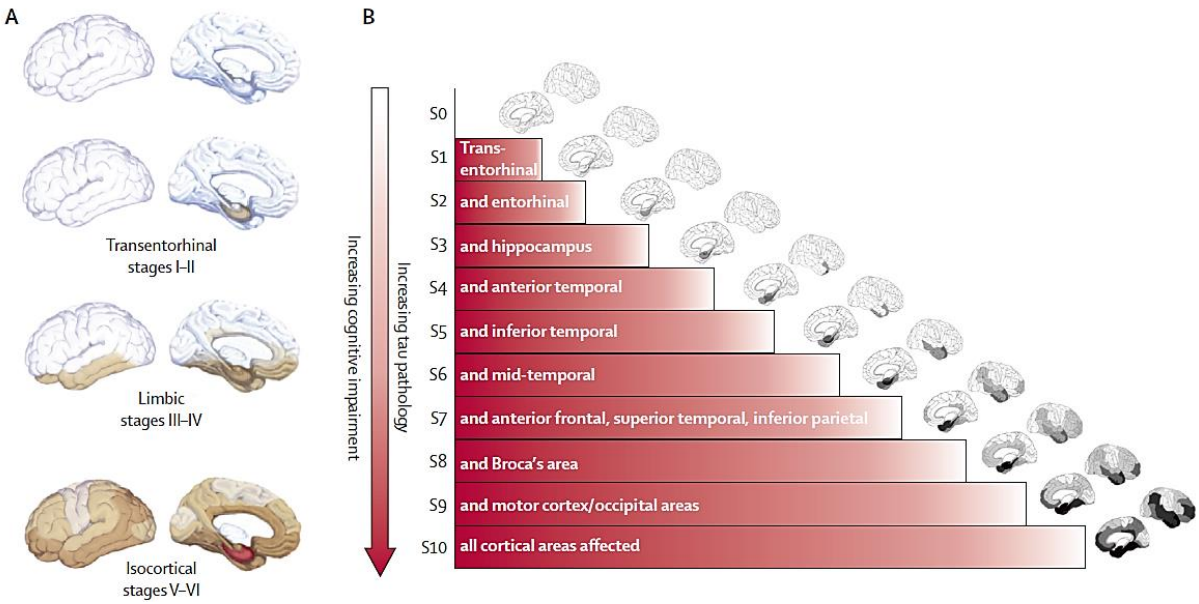


Figure 10 : Distribution spatio-temporelle des DNF selon Braak et Braak (A) ou Delacourte (B).

Les parties colorées indiquent la localisation des DNF (A)[56] et l'intensité de la couleur indique l'intensité des lésions (B)[73].

1.3.2.4 L'hypothèse Tau

L'hypothèse Tau est une alternative à l'hypothèse de la cascade amyloïde. Selon cette hypothèse, l'hyperphosphorylation de la protéine Tau, conduisant à son agrégation en DNF et au désassemblage des microtubules, serait l'évènement causal de la mort neuronale et de la cascade physiopathologique de la MA. En effet, plusieurs études clinico-pathologiques ont montré qu'il existait une corrélation entre la charge en DNF et la sévérité de la démence[60,62,63]. De plus, la topographie des DNF correspond au profil neuropsychologique classiquement observé dans la MA. Les troubles de la mémoire épisodique, symptôme initial classique de la MA, peuvent s'expliquer par la DNF massive touchant le lobe temporal médian (stade II-IV). Puis, l'atteinte des aires d'association de l'isocortex (stade V-VI) entraîne les différents symptômes cognitifs observés dans la MA : troubles des fonctions d'exécution (cortex préfrontal), apraxie (cortex pariétal), désorientation visuo-spatiale (cortex occipito pariétal) et enfin la mémoire sémantique (cortex occipito temporal)[74].

1.3.3 Les autres lésions de la MA

1.3.3.1 La perte neuronale

La perte neuronale touche principalement, au début de la maladie, la région temporale interne et notamment le cortex entorhinal et l'hippocampe[75]. Des pertes neuronales sont également rapportées dans le gyrus temporal supérieur[62] et dans le gyrus supramarginal[76]. En conséquence, les ventricules latéraux se dilatent[74,77]. Généralement, le volume cérébral des patients atteints de la MA est environ 8-15% inférieur à celui de personnes non démentes du même âge[78]. Par ailleurs, il existe une étroite corrélation entre le volume du lobe temporal et l'état cognitif du patient[79]. Le mécanisme de la mort neuronale dans la MA est discuté. Plusieurs arguments suggèrent un rôle prédominant de la tauopathie. En effet, la perte neuronale est corrélée avec la densité en DNF[76]. Cependant, Gomez-Isla et coll. ont montré que la perte neuronale corticale (notamment dans le cortex entorhinal) dépasse le nombre de DNF qui pourraient donc ne pas être les seules impliquées[62]. De plus, chez la souris, la délétion de Tau *in vivo* n'est pas létale ce qui suggère l'implication de mécanismes compensatoires[80]. Cette atrophie corticale peut être détectée à des stades précoces de la maladie par IRM.

1.3.3.2 La dyshoméostasie du fer

Le fer est un métal de transition essentiel à de nombreux processus cérébraux tels que le transport de l'oxygène, la respiration mitochondriale ou encore la synthèse de la myéline. Ainsi, le fer est principalement présent au niveau des oligodendrocytes, stocké sous forme de ferrihydrite ($5Fe_2O_3$ $9H_20$, oxyde de fer constitué d'ions ferriques) associé au cœur de la ferritine. Le fer peut exister sous deux états d'oxydation. Le fer ferreux Fe^{2+}, forme oxydante, est principalement présent au niveau des hèmes. Le fer ferrique Fe^{3+}, forme non oxydante, est principalement présent au niveau de la ferritine forme de stockage du fer. Ce dernier est un ion fortement ferromagnétique. Physiologiquement, la quantité de fer cérébral augmente progressivement avec l'âge jusqu'à atteindre un plateau à partir de 60 ans. Les régions les plus concernées sont les ganglions de la base (substance noire, globus pallidus, putamen et noyau caudé) et le cortex cérébral. Cependant, une charge trop importante en fer est neurotoxique en raison de la production d'espèces réactives de l'oxygène par la réaction de Fenton (équation 1) et de Harber-Weiss (équation 2) [81,82].

(1) Réaction de Fenton :

$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH\bullet$

(2) Réaction d'Haber–Weiss :

$Fe^{3+} + \bullet O2^{-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$

$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{-} + OH\bullet$

Une dyshoméostasie du fer (ainsi que du cuivre et du zinc) est présente dans de nombreuses pathologies neurodégénératives dont la MA. De nombreuses études neuropathologiques et IRM ont rapporté des taux anormalement élevés de fer dans le cerveau des patients notamment au niveau des ganglions de la base (globus pallidus et putamen), du cortex et de l'hippocampe[83–85]. Les causes de cette accumulation de fer sont encore inconnues. Il faut cependant noter que des méta-analyses de la littérature révèlent une sidérémie inchangée ou légèrement diminuée chez des patients atteints de la MA comparés à des sujets sains d'âge équivalent. Le fer qui s'accumule dans le cerveau de ces patients ne semble donc pas avoir une origine périphérique[86,87]. Plusieurs études *in vitro* ont montré que le fer favorise l'agrégation et l'oligomérisation d'Aβ ainsi que la phosphorylation et l'agrégation de la protéine Tau. Le lien entre fer et amyloïdose est renforcé par le fait que la transcription de l'APP est directement régulée par la concentration cérébrale en fer. En effet, des éléments de réponse au fer (« iron responsive elements » ou IRE) sont présents en 5' de l'ARNm de l'APP. Une augmentation de la sidérémie cérébrale induit alors une augmentation de la transcription de l'APP et donc de la production d'Aβ[88]. Enfin, Everett et coll. ont montré *in vitro* que l'Aβ induisait la conversion du fer ferrique en fer ferreux, favorisant ainsi la production d'espèces réactives de l'oxygène par la réaction de Fenton[89].

Deux types de dépôts de fer sont observés dans le cerveau des patients atteints de la MA. D'une part, une quantité élevée de fer est présente au niveau du cœur des plaques neuritiques sous forme de magnétite (Fe_30_4, oxyde de fer constitué d'un mélange de fer ferreux et ferrique)[90]. Cette observation est importante puisque la magnétite pourrait être une source d'ion Fe^{2+} pour alimenter la réaction de Fenton et le stress oxydant. D'autre part, le fer est présent dans les microglies activées de la couronne neuritique sous forme de ferritine[91]. Des cellules gliales activées riches en ferritine sont également présentes en périphérie des vaisseaux sanguins[21]. La présence de fer au niveau des dépôts diffus d'Aβ est moins documentée. A ce jour, une seule étude a rapporté la présence de fer au niveau des plaques diffuses sous forme d'un mélange de Fe^{3+} soluble et de magnétite[92].

Au vu de ces observations, les molécules chélatantes du fer seraient donc des candidats médicaments intéressants pour la MA. Ainsi, la déféroxamine a montré une efficacité pour diminuer la charge amyloïde et en DNF, conduisant à une amélioration des fonctions cognitives, chez la souris et chez l'Homme[93–95]. Egalement, l'Huperzine A, inhibiteur des acétylcholinestérases et chélatant du fer induit une diminution de la charge amyloïde et en DNF ainsi que des oligomères solubles d'Aβ dans le cortex et l'hippocampe de souris modèles d'amyloïdose[82].

1.3.3.3 Les anomalies de la barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une barrière physique et métabolique entre la circulation sanguine générale et le système nerveux central. Elle est essentielle pour le maintien de l'homéostasie cérébrale, par la régulation des échanges entre le sang et les fluides extracellulaires du cerveau. La BHE est localisée au niveau des cellules endothéliales cérébrales (CEC) qui tapissent la paroi des capillaires cérébraux. Elle est composée également de péricytes, de cellules musculaires lisses enchâssées dans la membrane basale et des pieds astrocytaires. L'ensemble de ces cellules forme une unité fonctionnelle appelée « unité neurovasculaire ». Contrairement aux cellules endothéliales périphériques, les CEC ne sont pas fenêtrées. Elles expriment peu de vacuoles d'endocytose mais de nombreuses protéines intervenant dans l'édification de jonctions serrées et adhérentes empêchant le passage de molécules par voie paracellulaire. Les échanges entre le sang et le cerveau se font alors à travers le cytoplasme des CEC qui expriment à leur face abluminale ou luminale des récepteurs et des transporteurs. La BHE est également une barrière métabolique. En effet, le cytoplasme des CEC contient de nombreuses enzymes telles que la monoamine oxydase (MAO) ou la γ-glutamyl transpeptidase (γ-GT), capables d'hydrolyser des substrats potentiellement toxiques. De plus, des pompes d'efflux telles que la P-gp (P-glycoprotéine), les protéines de la famille des MRP (multidrug resistance-associated proteins) ou BCRP (breast cancer resistant protein) sont exprimées par les CEC et empêchent certaines substances d'atteindre le cerveau ou facilitent leur élimination. Tous ces éléments restreignent de façon drastique l'entrée de molécules exogènes, notamment des médicaments, dans le cerveau.

Des altérations de la BHE sont impliquées dans de nombreuses maladies neurodégénératives dont la MA. Des altérations de la perméabilité de la BHE seraient présentes chez 25% des patients atteints de cette maladie[96,97]. Comme discuté précédemment, des anomalies vasculaires (AAC, hypoperfusion cérébrale, microhémorragies) sont très fréquemment observées chez ces patients et suggèrent que des modifications d'intégrité de la BHE seraient impliquées dans la physiopathologie de la MA (hypothèse dite « vasculaire » de la MA).

Il est important de noter que les peptides Aβ transitent à travers la BHE par un mécanisme de transcytose induite par des récepteurs dont les LRP1 (low density lipoprotein receptor-related protein-1), les P-gp (P-glycoprotéines) ou les RAGE (receptor for advanced glycation end-products). Ces récepteurs sont impliqués respectivement dans la clairance et dans l'influx des peptides Aβ. La mise en évidence, au niveau de microvaisseaux cérébraux de patients atteints de la MA, d'une diminution d'expression de LRP1 et au contraire d'une augmentation de l'expression de RAGE semblent indiquer leur implication dans cette maladie[98]. Des études *in vitro* et *post mortem* ont également montré des

altérations morphologiques des péricytes[99] et de l'endothélium induites par l'Aβ telles qu'un amincissement de la lame basale et des anomalies de l'expression et de la localisation de certaines protéines de jonctions serrées[100,101]. Il n'est cependant pas possible aujourd'hui de déterminer si ces altérations sont une cause ou une conséquence de la pathologie[102]. En effet, les souris transgéniques produisant un excès de peptides Aβ développent des lésions de la BHE comparées aux souris sauvages[103,104]. Il faut noter que l'intégrité de la BHE décroît au cours du vieillissement en l'absence de pathologies associées[105].

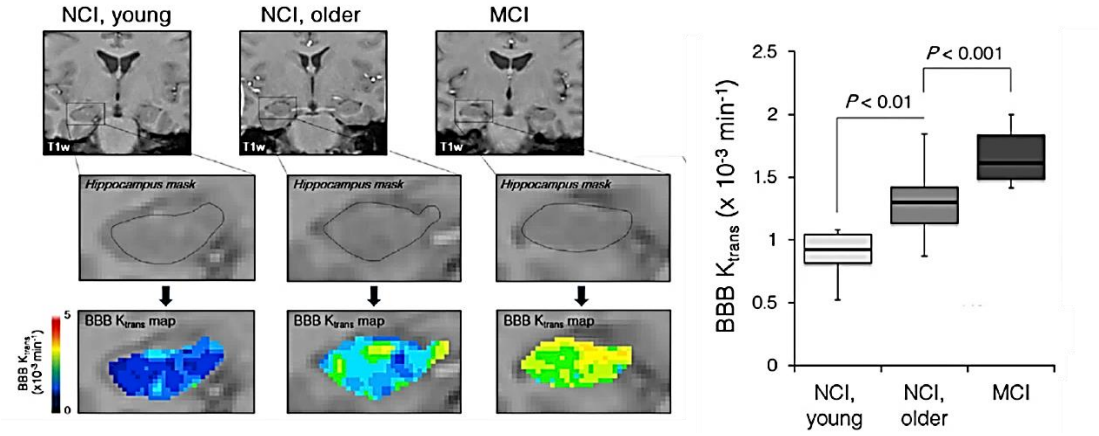


Figure 11 : Augmentation de la perméabilité de la BHE au cours du vieillissement normal et chez des patients MCI.

La perméabilité de la BHE est mesurée à l'aide de l'indice K_{trans} traduisant la pénétration d'un agent de contraste dans le parenchyme cérébral, après injection systémique. Le K_{trans} augmente au cours du vieillissement normal (NCI = non cognitive impairment) dans l'hippocampe. Le K_{trans} dans l'hippocampe est significativement augmenté chez les patients MCI en comparaison à des sujets sains du même âge (NCI older)[106].

La perméabilité de la BHE peut être évaluée par histologie en *post mortem* ou par la mesure du ratio entre concentration cérébrale et plasmatique de protéines plasmatiques comme l'albumine ou les IgG. Egalement, il est possible d'évaluer la perméabilité de la BHE par IRM via la mesure de l'extravasation dans le parenchyme cérébral d'un agent de contraste après injection systémique (Dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging ou DCE-MRI). Cette dernière méthode, très utilisée, a permis de mettre en évidence une augmentation de la perméabilité de la BHE au niveau de l'hippocampe dès le stade MCI (Figure 11)[106] et dans tout le cerveau au stade clinique de la MA[107,108]. Des études d'imagerie par IRM ont aussi pu mettre en évidence des dysfonctions de la BHE se traduisant notamment par des microhémorragies et des anomalies de la perfusion cérébrale[109]. La prévalence des microhémorragies cérébrales dans la MA est évaluée à 23 %. Elles sont visibles par IRM sur des images pondérées en T2*, où elles apparaissent sous formes de lésions hypointenses, arrondies et homogènes, de diamètre compris entre 5 et 10 mm[110].

1.3.3.4 La neuroinflammation

Une forte neuroinflammation est observée dans le cerveau des patients atteints de la MA. Elle est caractérisée par une réactivité astrocytaire, une réactivité microgliale, voire par le recrutement de cellules immunitaires périphériques. De nombreuses microglies activées et astrocytes réactifs sont observés à proximité des plaques neuritiques[31]. De plus, l'intensité de l'astrocytose et de la microgliose sont corrélées à la charge en DNF (ainsi qu'en Aβ pour la seconde)[111]. Les cellules microgliales joueraient un rôle protecteur via la phagocytose des dépôts d'Aβ. Cependant, leur activation entraîne la sécrétion de nombreuses molécules proinflammatoires telles que des cytokines, chimiokines, molécules du complément, acides aminés excitateurs ou oxyde nitrique. A forte concentration, ces molécules sont toxiques pour les neurones.

1.3.3.5 La perte synaptique

Chez les patients atteints de la MA, des pertes synaptiques importantes ont été décrites au sein des régions frontale[112] et temporale[113], et au niveau de l'hippocampe[114,115]. L'origine de ces pertes synaptiques est peu connue. Plusieurs études suggèrent une influence de l'Aβ soluble notamment des formes oligomériques sur cette perte synaptique et en amont sur le dysfonctionnement synaptique[116,117].

1.3.4 Chronologie d'apparition des lésions.

La chronologie d'apparition des différentes lésions de la MA est encore discutée. D'après l'hypothèse de la cascade amyloïde, Jack et coll. ont proposé plusieurs modèles hypothétiques de la dynamique des biomarqueurs de la MA (Figure 12). Dans ces modèles, l'apparition des marqueurs reflétant la présence d'une amyloïdose cérébrale précède celle des marqueurs de neurodégénérescence. Les dépôts anormaux d'Aβ seraient les premières lésions à apparaître dans le cerveau des patients atteints de la MA comme le suggère la diminution du taux d'$A\beta_{42}$ observée dans le LCS et l'augmentation de la rétention des traceurs TEP spécifiques des plaques amyloïdes. Par la suite, l'accumulation de protéines Tau hyperphosphorylées, agrégées sous forme de DNF, mènerait au début de la perte neuronale comme le suggère l'augmentation des taux de protéines Tau hyperphosphorylées et totales observée dans le LCS. Les marqueurs de dysfonctions synaptiques apparaîtraient ensuite avec une diminution de la capture du FDG observée en imagerie TEP. A mesure que la dégénérescence neuronale se poursuit, l'atrophie de certaines régions cérébrales deviendrait alors détectable par IRM. Enfin, en conséquence de ces processus pathologiques, les symptômes cliniques apparaitraient en dernier[118].

Cette séquence temporelle est cependant remise en cause par plusieurs études *post mortem* montrant la précession des dépôts de protéines Tau hyperphosphorylées par rapport aux dépôts amyloïdes[56,118,119]. Un autre modèle hypothétique de la dynamique des biomarqueurs de la MA a alors été proposé par Jack et coll., plaçant l'apparition des lésions Tau avant celle des lésions Aβ[118].

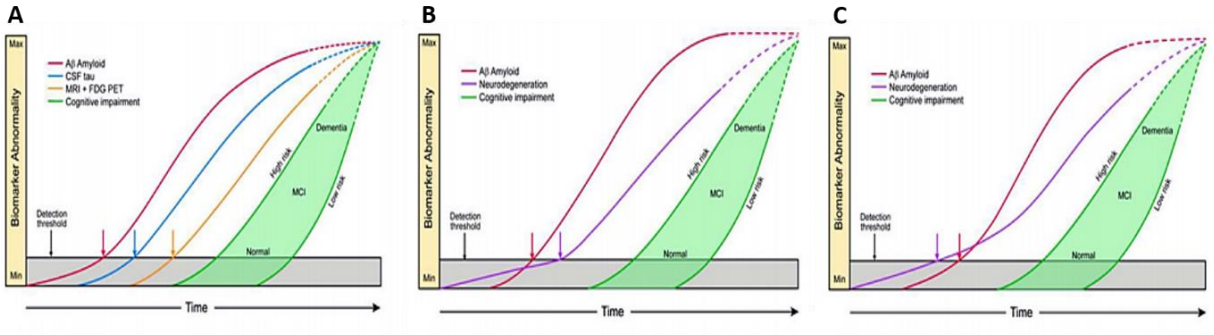


Figure 12 : Modèles hypothétiques de la chronologie d'apparition des biomarqueurs de la MA selon Jack et Holtzman.

(A) Modèle initial proposé par Jack et coll. en 2003 basé sur l'hypothèse de la cascade amyloïde. Les biomarqueurs amyloïdes (en rouge) apparaissent et sont détectables les premiers (diminution du taux d'$A\beta_{42}$ dans le LCS, TEP amyloïde positive), suivis des biomarqueurs de neurodégénérescence (augmentation des taux de protéines Tau totales et hyperphosphorylées dans le LCS (en bleu), anomalies du métabolisme cérébral détectées par TEP au FDG et atrophie cérébrale détectée par IRM (en jaune)). Enfin, les signes cliniques sont les derniers à apparaître (en vert). (B) Modèle « amyloïdes-first » valable pour les formes précoces (familiales) de la MA. Les biomarqueurs de neurodégénérescence (en violet) sont les premiers à apparaître mais restent en dessous du seuil de détection. Les biomarqueurs amyloïdes (en rouge) sont les premiers à être détectables. (C) Modèle « neurodegeneration-first » valable pour les formes tardives (sporadiques) de la MA. Les biomarqueurs de neurodégénérescence (en violet) sont les premiers à apparaître et à être détectables suivis des biomarqueurs amyloïdes (en rouge)[118].

Un autre modèle plaçant l'apparition de la tauopathie avant celle des lésions Aβ a également été proposé par Duyckaerts et coll[120]. L'observation de dépôts de protéines Tau dans l'hippocampe et le cortex entorhinal, en l'absence de pathologie Aβ associée, a conduit à la définition d'une nouvelle entité pathologique appelée « tauopathie primaire liée à l'âge » (PART ou « Primary age-associated tauopathy »)[121]. Le lien entre la PART et la MA est encore débattu. La PART pourrait être le stade initial du développement de la MA avec un *continuum* entre l'apparition des lésions Tau et celle des lésions Aβ. Une autre hypothèse suggère que ces deux pathologies résulteraient de processus pathologiques différents. La pathologie Tau relèverait d'un processus lié au vieillissement alors que la pathologie Aβ serait liée à la MA (Figure 13)[120].

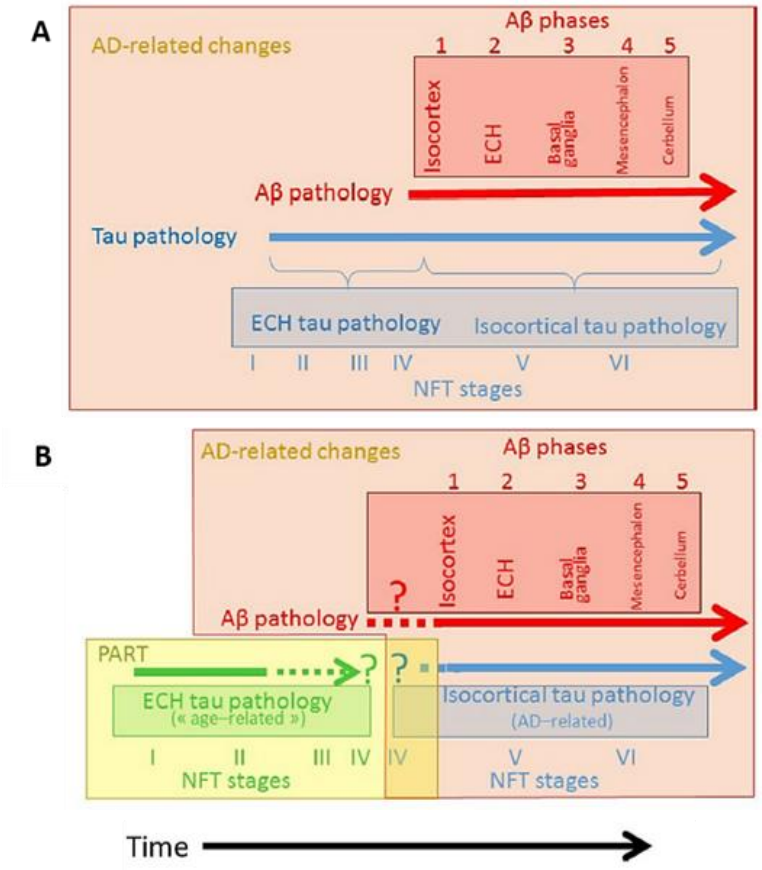


Figure 13 : Modèles hypothétiques de la chronologie d'apparition des lésions de la MA selon Duyckaerts et coll.

(A) Selon une première hypothèse, la présence de lésions Tau, dans le cortex entorhinal et l'hippocampe (ECH), en l'absence de lésions Aβ associées, serait le stade initial de la MA avec un *continuum* entre l'apparition des lésions Tau et celle des lésions Aβ. (B) L'hypothèse de la PART propose que la pathologie Tau, observée dans le cortex entorhinal et l'hippocampe, serait un évènement lié à l'âge et indépendant de la MA. Les points d'interrogation représentent des questions encore non résolues, soulevées par cette hypothèse : la pathologie Aβ peut-elle précéder la PART ? La PART peut-elle coexister avec la présence de dépôts amyloïdes (stade 1 et 2) ? A quel moment et comment la PART devient-elle la tauopathie associée à la MA ?[120]

L'ensemble des lésions caractéristiques de la MA apparaissent donc bien avant les premiers symptômes et la densité de ces lésions est souvent importante quand les signes cliniques permettent l'établissement du diagnostic. La reconnaissance et l'étude de ces stades précliniques et prodromaux ont conduit à une accélération de la recherche sur les biomarqueurs pour la détection précoce et le suivi de la MA. Même s'il n'existe, pour l'heure, aucun traitement curatif, il est essentiel de pouvoir poser rapidement un diagnostic afin de mettre en place un plan d'aide adapté (aides médicales, médico-sociales, financières, etc.) et également l'initiation de stratégies thérapeutiques dès les stades précliniques (www.francealzheimer.org).

2 Diagnostic actuel de la MA

2.1 Diagnostic clinique

Actuellement, le diagnostic de la MA repose majoritairement sur l'évaluation clinique des fonctions cognitives des patients. En premier lieu, la Haute Autorité de Santé (HAS) recommande un examen neurologique et psychiatrique visant à détecter les signes cliniques caractéristiques de la MA. Les cliniciens utilisent classiquement les critères de la NINCDS-ADRDA (mis à jour en 2011)[11]. Ces critères reposent sur la mise en évidence d'un syndrome démentiel impliquant des altérations d'au moins deux fonctions cognitives, une diminution progressive des capacités mnésiques, une déclaration entre 40 et 90 ans et l'absence d'autres pathologies cérébrales pouvant expliquer le déclin cognitif observé. Ce diagnostic est dit « probabiliste » car il permet d'établir un score de maladie « possible », « probable » ou « certaine ». Le diagnostic de certitude n'étant possible qu'après l'analyse *post mortem* du cerveau et la recherche des deux lésions caractéristiques de la maladie : plaques amyloïdes et DNF. En effet, certains symptômes pris en compte, comme les troubles de la mémoire, ne sont pas spécifiques de la MA. Ces critères permettent de diagnostiquer la MA avec une sensibilité de 70% et une spécificité de 80%[11].

En pratique courante, les cliniciens utilisent des échelles simplifiées telles que le MMSE (Mini Mental State Examination), test de référence recommandé par l'HAS lorsqu'une démence est suspectée. L'ADL (Activities of Daily Living) ou encore l'IADL (Echelle d'Activités Instrumentales de la Vie Courante) sont également utilisées.

Le MMSE est un test permettant de réaliser une évaluation cognitive globale. Il explore l'orientation spatio-temporelle, l'apprentissage et la mémoire, l'attention et le calcul, le langage, les praxies constructives. Chaque question est notée 0 ou 1. Le score total varie de 0 à 30 points. Un score de 28 ou plus exclut un diagnostic de MA. Un score de 23 ou moins révèle une dysfonction cognitive et d'autres examens seront alors nécessaires pour en comprendre l'origine. Cependant, ce test est influencé par le niveau socio-culturel et les résultats doivent donc être interprétés en conséquence.

L'IADL permet une évaluation fonctionnelle du patient. Il comporte quatre items (utilisation du téléphone, utilisation des transports, prise de médicaments et gestion des finances). La nécessité d'une aide, du fait des troubles cognitifs, à au moins un de ces items constitue un retentissement significatif de ces troubles sur l'activité quotidienne du patient.

D'autres tests de repérage et d'évaluation cognitive peuvent être utilisés mais il n'existe pas de consensus concernant leur utilisation :

- Des tests de repérage : test de l'horloge, tests de fluence verbale, etc.
- Des tests de mémoire : test des cinq mots, Memory Impairment Screen, l'épreuve de Grober et Buschke, etc.

Il existe cependant une réelle difficulté diagnostique, liée à une faible spécificité, notamment aux stades précoces de la maladie (MCI) ou chez les patients jeunes qui peuvent présenter des tableaux cliniques atypiques. Le seul diagnostic de certitude possible est l'analyse anatomo-pathologique après le décès du patient pour confirmer la présence des lésions caractéristiques de la maladie. Les critères de la CERAD (Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease) permettent d'établir un score évaluant l'étendue des plaques neuritiques dans le cerveau du patient. Un score CERAD de 0 correspond à l'absence de plaques neuritiques. Un score CERAD de 1, 2 ou 3 correspond à une amyloïdose faible, modérée ou abondante respectivement[122]. Le NIA/AA recommande quant à lui l'utilisation du score ABC, basé sur les stades de Thal (A = amyloïde), les stades de Braak (B = tauopathie) et l'étendue des plaques neuritiques (C = CERAD).

En 2007, le groupe de travail international (IWG) pour la recherche de nouveaux critères pour le diagnostic de la MA a proposé de nouveaux critères pour permettre un diagnostic du vivant des patients, même en l'absence d'altération cognitive majeure. Deux types de critères sont alors recherchés. Le premier correspond à un déficit de la mémoire épisodique avec un faible rappel libre non normalisé par un indiçage. Ce profil de troubles de la mémoire permet notamment de distinguer la MA des troubles de la mémoire dus au vieillissement normal mais aussi d'autres altérations cognitives majeures telles que la démence fronto-temporale (FTD) ou la paralysie supra-nucléaire progressive. Le deuxième est la présence d'au moins un des biomarqueurs d'imagerie (IRM et TEP) ou biochimiques du LCS caractéristiques de la MA. Ce deuxième aspect est le plus novateur puisqu'il s'agit des premières recommandations internationales encourageant l'utilisation des biomarqueurs pour le diagnostic de la MA et de ses stades prodromaux.

Ces critères ont ensuite été mis à jour en 2010, 2014 et 2016[12,13,123]. En 2010, l'IWG a proposé un nouveau lexique pour qualifier les différents stades de la pathologie. Il distingue alors la pathologie clinique (« maladie d'Alzheimer ») caractérisée par les symptômes cliniques englobant les stades prodromaux et la pathologie biologique (« pathologie Alzheimer ») caractérisée par la présence des différentes lésions de la MA (plaques amyloïdes et DNF) mais pouvant être asymptomatique. Cette nouvelle définition élargit le spectre de la MA pour inclure ses stades précliniques où les lésions cérébrales sont déjà présentes mais pas les signes cliniques. Deux stades de MA préclinique sont décrits : les individus asymptomatiques à risque de développer une MA (présence d'au moins un

biomarqueur) et la MA pré-symptomatique (présence d'une mutation autosomale dominante). Ce nouveau lexique inclut également la définition de « MA typique », « MA atypique » et « MA mixte » ainsi qu'une nouvelle classification des biomarqueurs[123]. En 2014, l'IWG a de nouveau affiné ses critères de diagnostic. Le diagnostic de MA peut alors être posé *in vivo* suite à l'observation d'un syndrome amnésique de type hippocampique, pouvant être associé ou non à divers troubles cognitifs ou comportementaux, et à la présence d'au moins un des biomarqueurs suivants : une diminution du taux d'$A\beta_{42}$ associée à une augmentation des taux de protéines Tau totales et hyperphosphorylées dans le LCS ou une augmentation de la rétention d'un traceur TEP ciblant l'amyloïde[12].

Enfin, en 2016, l'IGW a précisé les critères diagnostic de MA préclinique. Le terme de « MA préclinique » correspondrait aux individus présentant des biomarqueurs amyloïdes et Tau alors que le terme de « MA asymptomatique à risque » correspondrait aux individus présentant un seul type de pathologie[13].

À la suite de ces publications, la NIA/AA a également mis à jour ses critères de diagnostic en 2011 pour inclure les différents stades de la MA : MA préclinique (asymptomatique), MA pré-démentielle (MCI) et démence (MA). Ces nouveaux critères sont similaires à ceux de l'IWG puisqu'ils incluent également l'utilisation des biomarqueurs pour le diagnostic de la MA et la reconnaissance des stades précliniques de la maladie. Il est alors distingué trois stades de MA préclinique. De plus, les biomarqueurs sont utilisés chez les patients MA et MCI pour préciser la probabilité que la démence soit attribuable à la MA. La plus forte probabilité correspondant aux cas où les biomarqueurs amyloïdes et de neurodégénérescence sont retrouvés[11,16,124]. Un résumé de ces différents critères de diagnostic est présenté dans le tableau 1.

	NIA-AA criteria	IWG-2 criteria	Proposed preclinical AD criteria from Dubois *et al.*
Asymptomatic individuals			
Evidence of Aβ pathology only	Stage 1 preclinical AD	Asymptomatic at risk for AD	Asymptomatic at risk for AD (asymptomatic A+)
Evidence of tau pathology only	–	–	Asymptomatic at risk for AD (asymptomatic T+)
Evidence of both Aβ and tau pathology	Stage 2 preclinical AD Stage 3 preclinical AD (when additional subtle cognitive changes exist which do not meet criteria for mild cognitive impairment)	Asymptomatic at risk for AD	Preclinical AD
Symptomatic individuals			
Symptoms that do not meet criteria for dementia	Mild cognitive impairment due to AD • High likelihood (requires positive Aβ and neuronal injury biomarkers) • Intermediate likelihood (requires either positive Aβ or neuronal injury biomarker, where other biomarker not tested or unavailable) • Unlikely (negative Aβ and neuronal injury biomarkers) • Uninformative (biomarkers ambiguous or conflict with each other)	Prodromal AD (typical or atypical) Requires consistent history plus biomarker evidence (CSF Aβ and tau or amyloid PET)	
Symptoms that meet criteria for dementia (both typical and atypical phenotypes)	Dementia due to AD • Probable (no biomarker evidence required, based on clinical picture) • Possible (no biomarker evidence required, based on clinical picture) • Probable or possible with evidence of AD pathophysiological process (Aβ and/or neuronal injury biomarker evidence – high likelihood, intermediate likelihood, unlikely and uninformative)	Typical or atypical AD Requires consistent history plus biomarker evidence (CSF Aβ and tau or amyloid PET)	

Tableau 1 : Critères de diagnostic de la MA selon le NIA-AA et l'IWG-2[15].

2.2 Les biomarqueurs de la MA

Il est donc établi que les lésions cérébrales caractéristiques de la MA apparaissent dans le cerveau des patients plusieurs années avant l'apparition des signes cliniques. Les biomarqueurs prennent donc une importance grandissante pour le diagnostic précoce de la MA notamment dans le cas des stades précliniques. Un biomarqueur est une caractéristique biologique pouvant être mesurée objectivement renseignant sur un processus physiologique ou pathologique ou sur une réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique[125].

2.2.1 Biomarqueurs actuels de la MA

Récemment, l'utilisation des biomarqueurs a été approuvée par la Food and Drug Administration (FDA)[126] et l'Agence européenne des médicaments (EMA)[127] pour l'aide au diagnostic et le suivi des essais cliniques dans la MA[11–13,16]. La validité de ces biomarqueurs a été établie par des études corrélatives avec des données d'autopsie. Ces biomarqueurs peuvent être divisés en deux catégories :

- les biomarqueurs reflétant les dépôts d'Aβ dont une diminution du taux d'$A\beta_{42}$ mesurée dans le LCS et une imagerie TEP amyloïde positive. Ces deux biomarqueurs sont étroitement corrélés quand ils sont mesurés chez le même sujet.
- les biomarqueurs reflétant la neurodégénérescence dont une augmentation des taux de protéines Tau totales et hyperphosphorylées mesurée dans le LCS, une diminution de signal en imagerie TEP au FDG et une atrophie cérébrale observée par IRM[128].

Pour plus de clarté, les biomarqueurs de la MA seront séparés en deux catégories dans la suite de ce manuscrit : les biomarqueurs du LCS et les biomarqueurs en neuroimagerie.

2.2.1.1 Les biomarqueurs du LCS

Le LCS est en contact direct avec l'espace extracellulaire cérébral. Ainsi, les modifications biochimiques du LCS sont le reflet de celles du cerveau. Les biomarqueurs les plus utilisés sont directement liés aux deux processus dégénératifs observés dans la MA : l'amyloïdogénèse et la DNF. Ainsi, de nombreuses études ont permis de mettre en évidence une diminution significative du taux d'$A\beta_{42}$ et une augmentation significative des taux de protéines Tau totales et hyperphosphorylées dans le LCS des patients atteints de la MA par rapport à des sujets contrôles non déments du même âge[129,130]. La

sensibilité et la spécificité de ces tests est de l'ordre de 80% et 90% respectivement et augmente jusqu'à 90-95% lorsque plusieurs biomarqueurs sont associés[14].

L'augmentation des taux de protéines Tau totales et hyperphosphorylées peut s'expliquer par le fait que la DNF est un processus induisant à terme la mort du neurone. Le contenu intracellulaire, dont les fibrilles de protéines Tau, est alors libéré dans le parenchyme puis vers le sang. Il est ainsi observé une augmentation du taux de protéines Tau après un accident vasculaire cérébral, corrélée positivement avec la taille de l'infarctus[129]. La diminution de l'$A\beta_{42}$ peut s'expliquer par le fait que celui-ci s'agrège dans le cerveau pour former les plaques amyloïdes, y est retenu et diffuse donc moins de l'espace extracellulaire vers le LCS[131–133]. Ainsi, Strozyk et coll. ont montré qu'il existait une corrélation inverse entre les taux d'$A\beta_{42}$ du LCS et la charge amyloïde corticale chez des patients atteints de la MA[131].

Cependant, l'observation seule d'une diminution de l'$A\beta_{42}$ dans le LCS ne permet pas de poser un diagnostic de MA de façon certaine puisqu'une diminution similaire peut également être observée dans d'autres pathologies telles que la démence vasculaire ou la démence à corps de Lewy. L'association des trois biomarqueurs est généralement nécessaire. Cette combinaison s'est montrée hautement prédictive de la MA dans trois études internationales multicentriques menées dans le cadre de plusieurs programmes internationaux de recherche : l' « Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative » (ADNI), le « Development of Screening Guidelines and Criteria for Predementia Alzheimer's Disease » (DESCRIPA) et le projet « Swedish Brain Power » (SBP). Ces biomarqueurs mesurés dans le LCS sont maintenant validés pour le diagnostic, en particulier précoce, de la MA ce qui conduit à une harmonisation des procédures et des index entre les laboratoires, afin de standardiser ces dosages et de définir des algorithmes décisionnels. La nécessité de réaliser une ponction lombaire freine cependant l'utilisation en routine de ces biomarqueurs et explique le développement en cours des dosages plasmatiques des mêmes marqueurs spécifiques de la MA.

2.2.1.2 Les biomarqueurs en neuroimagerie

Les biomarqueurs d'imagerie se développent de manière considérable grâce aux progrès techniques et méthodologiques ainsi que grâce à une meilleure connaissance de la physiopathologie de la MA. Actuellement, l'imagerie de la MA repose sur deux types d'approches : l'IRM et l'imagerie nucléaire par TEP. Il est distingué principalement deux types de biomarqueurs en imagerie : les biomarqueurs indirects permettant de visualiser la topographie du processus lésionnel neuronal (IRM structurale avec analyse volumétrique et TEP au FDG) et les biomarqueurs directs permettant de visualiser les agrégats protéiques caractéristiques de la MA (imagerie TEP des lésions amyloïdes).

2.2.1.2.1 L'imagerie structurale par IRM

Actuellement, la HAS recommande un examen d'imagerie cérébrale par IRM systématiquement pour tout trouble cognitif avéré de découverte récente. Le but de cet examen est principalement d'éliminer une autre cause pouvant induire une démence (processus expansif intracrânien, tumeur, hydrocéphalie à pression normale, etc.).

L'IRM structurale permet de mesurer *in vivo* les changements morphologiques du cerveau et notamment l'atrophie corticale caractéristique de la MA. Les patients atteints de la MA présentent une atrophie par perte de la substance grise corticale touchant d'abord le lobe temporal médian (notamment le cortex entorhinal et l'hippocampe), avant de s'étendre aux régions temporales et pariétales, tandis que les aires primaires unimodales ne sont altérées que tardivement dans la maladie. Cette atrophie est plus rapidement évolutive que chez les sujets non déments, de 2,5% par an contre 0,4-0,9% par an[134,135]. L'atrophie suit une topologie caractéristique de la MA et est corrélée avec la perte neuronale[136], le stade de Braak[137] et la tauopathie[77] mais pas avec l'amyloïdose[138]. Des études longitudinales menées dans des cas de MA familiale ont montré que ces modifications structurales sont présentes plus de 20 ans avant apparition des premiers signes cliniques de la maladie[26,139,140]. Ce biomarqueur peut donc être utilisé comme marqueur de diagnostic précoce. De plus, l'évolution de l'atrophie corticale est étroitement corrélée au déclin cognitif ce qui fait de ce biomarqueur un bon prédicteur de l'évolution de la pathologie[141]. Cependant, cette atrophie cérébrale globale peut également être observée chez des sujets âgés sains et dans d'autres pathologies. Des protocoles de volumétrie ciblée sur certaines régions cérébrales se révèlent plus spécifiques de la MA. Le lobe temporal médian, particulièrement l'hippocampe et le cortex entorhinal, sont les premières régions touchées par l'atrophie. Ces deux régions ont donc fait l'objet d'études de volumétrie en IRM à des fins diagnostiques[142].

L'atrophie hippocampique est particulièrement intéressante pour un diagnostic précoce de la MA. En effet, elle est détectable très tôt, dès le stade de MCI (Figure 14). Des échelles visuelles permettant d'évaluer cette atrophie ont été mises au point et permettent de distinguer les patients atteints de la MA de sujets sains avec une sensibilité de 80-85%[143]. Différentes études ont rapporté des résultats variés, avec une diminution du volume hippocampique allant de 12% à 50%[142]. Elles permettent de prédire une conversion de MCI en MA avec 80% de sensibilité. De plus l'atrophie hippocampique est plus rapidement évolutive chez les patients atteints de la MA que chez les sujets non déments, de 3 à 7% par an contre 0,9% par an, respectivement[20,134]. Le volume de l'hippocampe est corrélé à la perte neuronale mesurée en histologie[144] et à la pathologie Tau[145,146].

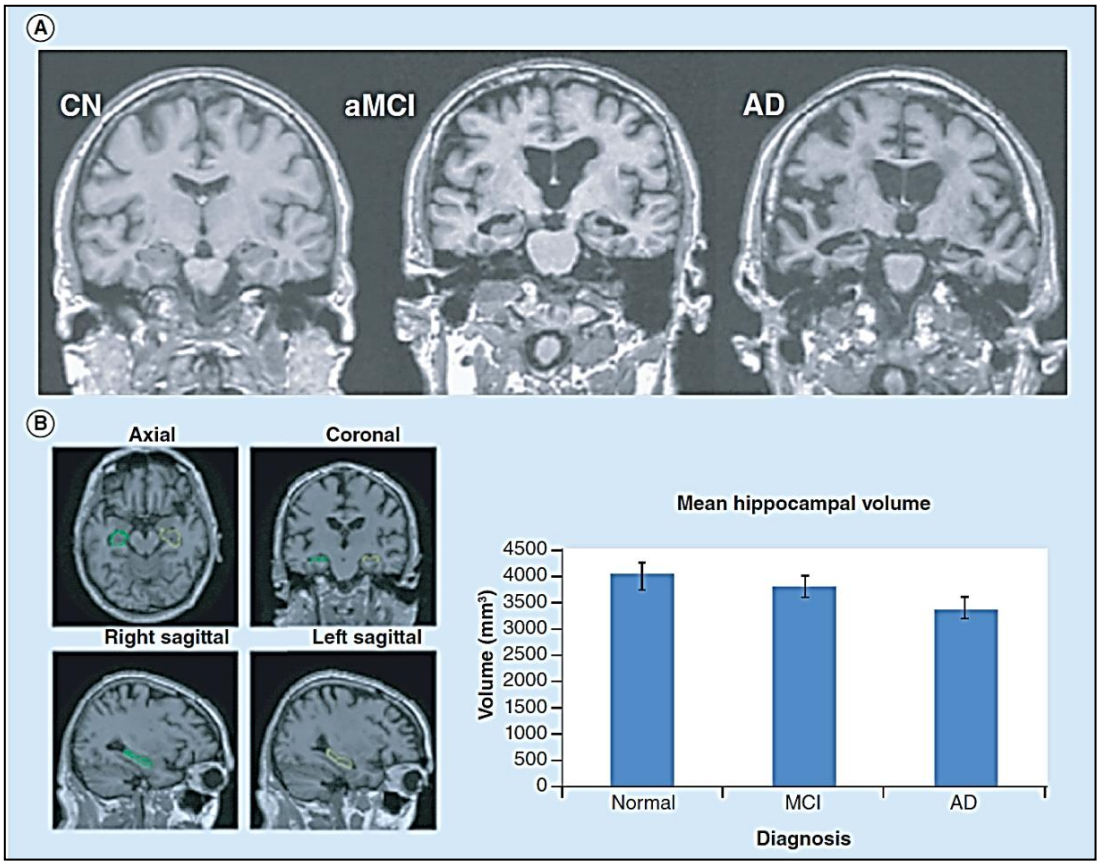


Figure 14 : Diminution du volume hippocampique mesuré par IRM structurale dans la MA.

(A) IRM structurale chez un sujet contrôle sain (CN), un sujet MCI (aMCI) et un patient atteint de la MA (AD). (B) Mesure automatique du volume hippocampique. Le volume hippocampique est significativement inférieur chez les MCI et les patients atteints de la MA par rapport aux contrôles[147].

Cependant, ce biomarqueur n'est pas non plus spécifique de la MA puisqu'une atrophie hippocampique est également observée dans d'autres pathologies telles que la FTD, les démences vasculaires, la sclérose hippocampique, les tauopathies primaires ou encore la maladie de Creutzfel-Jacob[128,148]. Les autres régions cérébrales montrant une diminution de leur volume et un amincissement cortical sont le cortex cingulaire postérieur et précunéus ainsi que certaines régions du lobe temporal, pariétal et frontal à des stades avancés de la maladie[147].

La principale limite de cette technique réside dans le fait que le volume de l'hippocampe ou du cerveau est généralement évalué visuellement. Le volume de la région d'intérêt (ROI) est délimité manuellement et classé en fonction d'échelles visuelles selon le taux d'atrophie. Cette mesure peut donc varier d'un clinicien à l'autre et il est difficile d'établir des valeurs seuils standardisées. Ainsi, il est estimé qu'il existe une variabilité de mesure de 2,5 à 3,5%. Pour pallier cette limite, des protocoles de segmentation semi-automatique[149,150] et automatique (mesures au niveau du voxel, épaisseur du cortex, mesures des sillons corticaux, etc.)[151,152] ont été développés.

2.2.1.2.2 L'imagerie métabolique en TEP au FDG

L'activité synaptique nécessite un apport d'énergie, assuré par les cellules gliales avoisinant la synapse via une augmentation de l'apport en glucose proportionnelle à l'activité. L'imagerie TEP au FDG utilise du fluorodéoxyglucose marqué au ^{18}F. Dans l'organisme, ce composé va être capté par les cellules comme le glucose et va donc permettre de visualiser les zones du cerveau en fonction de l'intensité de leur activité métabolique, reflet de l'activité synaptique.

Dans la MA, il est observé une diminution de la consommation de glucose, et donc de l'activité synaptique, suivant une topographie stéréotypée touchant principalement le cortex pariéto-temporal, cingulaire postérieur et précunéus avant de s'étendre au cortex pré-frontal[153]. L'extension et l'intensité de l'hypométabolisme sont corrélées à la sévérité des détériorations cognitives observées en clinique (Figure 15)[154]. De plus, ces régions ont été décrites comme hypométaboliques dès le stade MCI[155,156]. Cette technique d'imagerie permet de différencier avec une très bonne sensibilité les patients MA de sujets âgés non déments[153,157] ou d'autres démences telles que la FTD ou la démence à corps de Lewy[158,159], le diagnostic étant confirmé en *post mortem* par autopsie. Par exemple, Heroltz et coll. ont montré que l'imagerie TEP au FDG permet de diagnostiquer la MA avec une sensibilité et une spécificité de 93% lors d'une étude multicentrique incluant 395 patients MA et 110 sujets contrôles non déments[157]. Egalement, une diminution du métabolisme frontal semble prédire la conversion de patients MCI vers le stade démentiel avec une bonne sensibilité et une bonne spécificité (environ 90%)[160,161]. Enfin, des études longitudinales menées dans des cas de MA familiale ont permis de montrer des altérations métaboliques dès les stades pré-symptomatiques de la MA, 10 à 15 ans avant apparition des premiers symptômes cliniques, s'aggravant avec l'évolution de la démence[162]. Les causes de ce phénomène ne sont pas bien connues mais cet hypométabolisme du glucose témoignerait de plusieurs processus pathologiques qui sous-tendent la MA par exemple la perte synaptique, la gliose et les dépôts de plaques amyloïdes.

Aujourd'hui la TEP au FDG n'est pas recommandée en routine pour établir un diagnostic de MA. Cela est dû principalement aux limites inhérentes à la TEP. Tout d'abord, cet examen nécessite d'exposer le patient à de la radioactivité. De plus, cet examen est coûteux et difficile à mettre en place du fait du faible nombre de centres médicaux équipés d'un cyclotron. Enfin, la délimitation de la région anatomique d'intérêt est généralement réalisée manuellement. Or, la résolution du TEP scanner est faible ce qui nécessite l'utilisation d'une image IRM anatomique pour délimiter les différentes régions cérébrales.

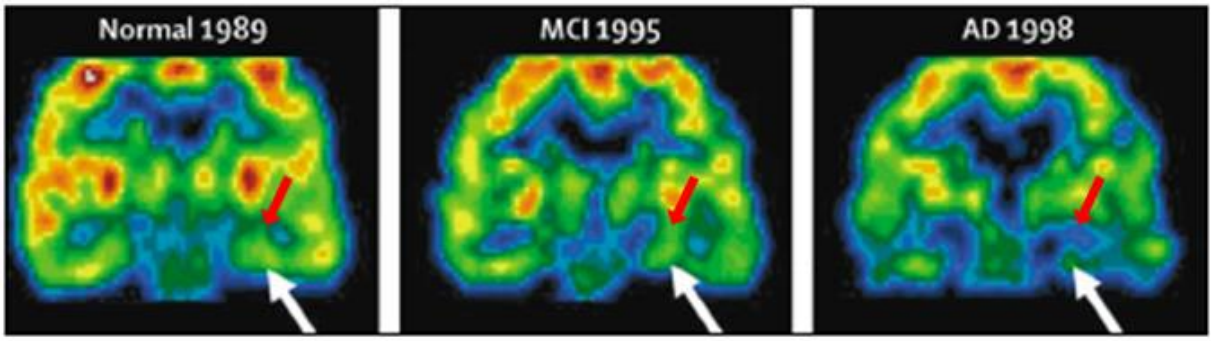


Figure 15 : Imagerie en TEP au FDG réalisée chez le même patient atteint de la MA sur une période de 9 ans.

Le métabolisme du glucose diminue progressivement au niveau du cortex entorhinal (flèche blanche) et de l'hippocampe (flèche rouge)[162].

2.2.1.2.3 L'imagerie des lésions amyloïdes en TEP

Depuis une quinzaine d'années, de nombreux traceurs spécifiques des plaques amyloïdes ont été développés afin de mesurer la quantité et la topographie des dépôts d'Aβ dans le cerveau des patients atteints de la MA. Les traceurs les plus utilisés sont le composé de Pittsburg B ou PIB[163] marqué au ^{11}C et trois traceurs marqués au ^{18}F, le Florbetaben, le Flutemetamol et le Florbetapir[164,165]. Actuellement, seuls ces trois derniers sont autorisés par la FDA pour l'aide au diagnostic et l'évaluation de la densité en plaques amyloïdes chez des patients atteints de MA ou présentant des altérations cognitives[166,167]. Le PIB est capable de lier les formes fibrillaires de l'Aβ avec une haute affinité. Il se lie aux dépôts intracellulaires et extracellulaires d'Aβ mais pas aux DNF ni aux corps de Lewy. Ainsi, après injection intraveineuse (IV), la rétention du PIB est supérieure chez les sujets atteints de la MA par rapport à des sujets non-déments (Figure 16)[165,168]. Chez ces patients, le PIB se localise essentiellement dans le cortex frontal, cingulaire, précunéus, pariétal et temporal médian, régions connues pour être touchées par l'amyloïdose, mais peu dans le cortex occipital et sensori-moteur ainsi que dans le cervelet, régions généralement épargnées. Ainsi, il existe une très bonne corrélation entre l'imagerie TEP *ante mortem* et la topographie des dépôts amyloïdes observée en *post mortem* avec respect de la séquence temporelle décrite par les stades de Thal[168,169]. Egalement, cette modalité d'imagerie a permis de mettre en évidence le stade préclinique de la MA, au cours duquel les patients présentent des plaques amyloïdes PIB positives, en absence d'altération cognitive[170]. Cependant, le pourcentage d'individus présentant des plaques amyloïdes PIB positives qui progresseront vers une phase symptomatique n'est pas établi, compliquant les possibilités de diagnostic précoce[1]. Le PIB est aussi capable de lier l'Aβ vasculaire, ce qui est un avantage dans le cas de patients atteints de la MA pour visualiser une

éventuelle AAC associée, mais qui peut induire une erreur de diagnostic puisque l'AAC est également présente chez des sujets non atteints de la MA[167,171].

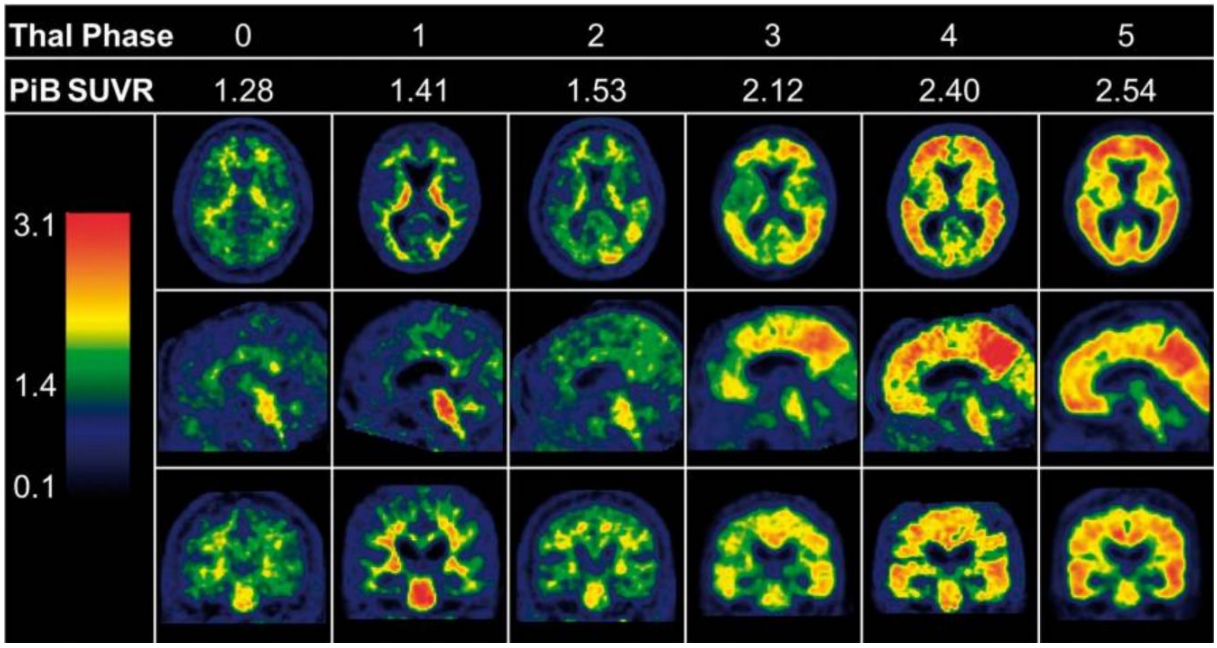


Figure 16 : Comparaison de la valeur de fixation normalisée (SUV) obtenue en imagerie TEP à l'aide du ^{11}C-PIB en fonction du stade de Thal chez des patients atteints de la MA.

La distribution du radiotraceurs en imagerie TEP correspond aux dépôts amyloïdes observés en *post mortem* selon les stades de Thal[71].

Cependant, le PIB présente un certain nombre de limites. Chez les patients atteints de la MA, la rétention du PIB est variable et n'est pas corrélée avec la sévérité de la démence[168,172]. De plus, environ 25 - 35 % des personnes âgées ayant un fonctionnement cognitif normal montrent un fort marquage amyloïde, principalement dans les régions pré-frontales et cingulaires postérieures[162,170]. Une rétention non spécifique a également été observée chez des patients atteints de la MA notamment au niveau de la substance blanche[173]. Enfin, le ^{11}C a une demi-vie courte, de 20 minutes, ce qui oblige à avoir un cyclotron dans le centre où est réalisé l'examen et ce qui limite donc l'utilisation en routine de cette technique. Des traceurs marqués au ^{18}F, dont la demi-vie est plus longue (110 minutes), se révèlent donc particulièrement intéressants et ont fait l'objet de nombreuses recherches. Bien que l'intérêt clinique de ces traceurs soit clairement établi, l'utilisation de ces molécules pour la détection des plaques amyloïdes en préclinique, notamment chez le rongeur, reste controversée[174]. Des résultats contradictoires sont obtenus en fonction des études et du modèle animal utilisé. Par exemple, Snellman et coll. ont réussi à suivre la progression de l'amyloïdose à l'aide du PIB chez la souris APP23 mais aucune augmentation de signal n'a pu être détectée chez les souris Tg2576 et APP/PS1$_{dE9}$[175].

2.2.2 Biomarqueurs en développement de la MA

La place grandissante des biomarqueurs dans le diagnostic et le suivi de la MA a conduit à une augmentation considérable du nombre de biomarqueurs potentiels de cette maladie. Cependant, peu de ces biomarqueurs affichent une haute sensibilité et spécificité et leur robustesse reste à être démontrée. Ces biomarqueurs incluent des biomarqueurs du LCS (APOE, 24S-hydroxycholesterol, etc.) mais également des biomarqueurs présents dans d'autres liquides biologiques, plus accessibles, comme le plasma (peptides Aβ, cholestérol, protéines de l'inflammation)[148] ou encore dans la salive[176].

Des biomarqueurs en neuroimagerie se développent également. Parmi eux, les nouveaux traceurs TEP, notamment des traceurs spécifiques des lésions Tau, prennent une place majeure dans le paysage de la recherche actuelle. En comparaison à l'imagerie amyloïde, le développement de traceurs Tau se confronte à des difficultés supplémentaires. Tout d'abord, les concentrations cérébrales de Tau sont plus faibles que celles d'Aβ. De plus, la protéine Tau peut exister sous six isoformes différentes. Dans la MA, des isoformes à trois et quatre domaines de liaison aux microtubules sont retrouvées. Un traceur Tau devra donc pouvoir se lier à ces différentes isoformes. Enfin, les agrégats de protéines Tau sont situés à l'intérieur des cellules. Un traceur Tau devra donc être capable de traverser la BHE mais également la membrane cytoplasmique des neurones pour atteindre sa cible. Trois familles de traceurs Tau sont actuellement en développement : les dérivés du THK5117, les dérivés du AV-1451 (ou Flortaucipir) et les dérivés du PBB3. Ces différentes molécules diffèrent principalement par leurs propriétés pharmacocinétiques, leur affinité et leur spécificité pour les PFH de Tau. Ces traceurs ont permis de mettre en évidence des DNF dans les régions temporo-pariétales (dont l'hippocampe) et orbito-frontales chez des patients atteints de la MA et dès les stades MCI[168,177,178]. Cependant, une rétention non spécifique est fréquemment observée dans la substance blanche et dans certaines régions cérébrales chez des sujets sains[168,179].
L'imagerie TEP peut également être utilisée pour quantifier la neuroinflammation. La cible la plus fréquemment étudiée est la TSPO (Translocator protein), protéine hautement exprimée par les microglies activées et les astrocytes réactifs[180]. Des radiotraceurs ciblant les astrocytes tels que le ^{11}C-octanoate[181] ou le ^{18}F-fluoroacetate[182] ont également été étudiés dans des modèles de glioblastome et d'ischémie.

En parallèle de l'IRM anatomique, d'autres techniques d'imagerie se développent. L'IRM fonctionnelle (IRMf) et l'imagerie en tenseur de diffusion (DTI) sont actuellement les deux techniques les plus étudiées. Comme décrit précédemment, les lésions caractéristiques de la MA progressent de façon stéréotypée dans le cerveau des patients. Plusieurs études neuropathologiques suggèrent que les

lésions de la MA se propageraient en suivant les voies anatomiques cérébrales. Depuis quelques années, cette hypothèse est renforcée par plusieurs études d'IRMf (étude de la connectivité fonctionnelle) et d'imagerie DTI (étude de la connectivité structurelle).

L'IRMf permet de visualiser indirectement l'activité neuronale par la mesure du signal BOLD (Blood-oxygen-level dependent). Des anomalies des réseaux neuronaux, notamment du réseau dit du « mode par défaut » (« Default mode network » ou DMN), ont ainsi pu être mises en évidence chez des patients atteints de la MA et dès le stade MCI[147,183,184]. Le DMN correspond à l'ensemble des zones cérébrales co-activées au repos et désactivées lors de tâches cognitives complexes. De façon intéressante, la répartition des dépôts d'Aβ a été décrite comme topographiquement similaire à ce réseau[185].

L'imagerie DTI permet d'étudier *in vivo* la microstructure des tissus. Elle donne des indications sur d'éventuelles anomalies des fibres nerveuses de substance blanche ou de la moelle épinière non visibles en imagerie conventionnelle. Plusieurs études se sont intéressées à l'utilisation de l'imagerie DTI comme biomarqueur de la MA et ont permis de mettre en évidence des anomalies de la substance blanche, dans plusieurs régions cérébrales, chez les patients atteints de la MA par rapport à des contrôles âgés sains[147,186]. De façon intéressante, les fibres connectant les différentes régions du DMN (dont le corps calleux et le cingulum) ont été décrites comme altérées dans la MA[187].

Une des principales limites de l'IRM est sa sensibilité limitée, ce qui se traduit par une résolution spatiale relativement faible. Depuis une vingtaine d'années, le développement d'IRM à haut champ magnétique ouvre de nombreuses possibilités pour étudier la MA en permettant l'acquisition d'images avec une résolution spatiale bien supérieure à celle utilisée en clinique.

2.3 La microscopie par IRM

2.3.1 Généralités

Actuellement, la puissance des appareils utilisés en clinique varie de 1,5T à 3T permettant d'atteindre une résolution spatiale de l'ordre du millimètre. Depuis une vingtaine d'année, des IRM dotés de champs magnétiques plus puissants ont fait leur apparition. Ainsi, des IRM de 7T à 21T sont utilisés en préclinique et jusqu'à 7T en clinique. L'utilisation de ces machines permet d'atteindre des résolutions spatiales beaucoup plus élevées. Ainsi, le terme de « microscopie par IRM » regroupe l'ensemble des techniques permettant l'acquisition d'images avec une résolution spatiale inférieure à 100 µm dans au moins une dimension[188]. Le développement de ces techniques, non invasives et non irradiantes, est particulièrement intéressant pour l'imagerie du petit animal en préclinique. En effet, la taille du

cerveau de souris étant environ 3000 fois inférieure à celle du cerveau humain, la résolution spatiale nécessaire est donc beaucoup plus élevées (Figure 17). Ces outils représentent une avancée majeure en préclinique puisque l'évolution de la pathologie peut alors être suivie de façon longitudinale chez le même animal vivant, sur une période longue. Cette approche permet donc de faciliter l'étude de l'Histoire naturelle de la maladie ainsi que le suivi de l'effet de candidats médicaments tout en limitant le nombre d'animaux et le temps nécessaire. Dans le contexte de la MA, la plupart des études de microscopie par IRM publiées à ce jour se sont concentrées sur l'utilisation de tels appareils pour l'amélioration de l'imagerie structurale, l'imagerie des lésions moléculaires des lésions de la MA (notamment des plaques amyloïdes) et l'imagerie des microhémorragies fréquemment rencontrés dans la MA.

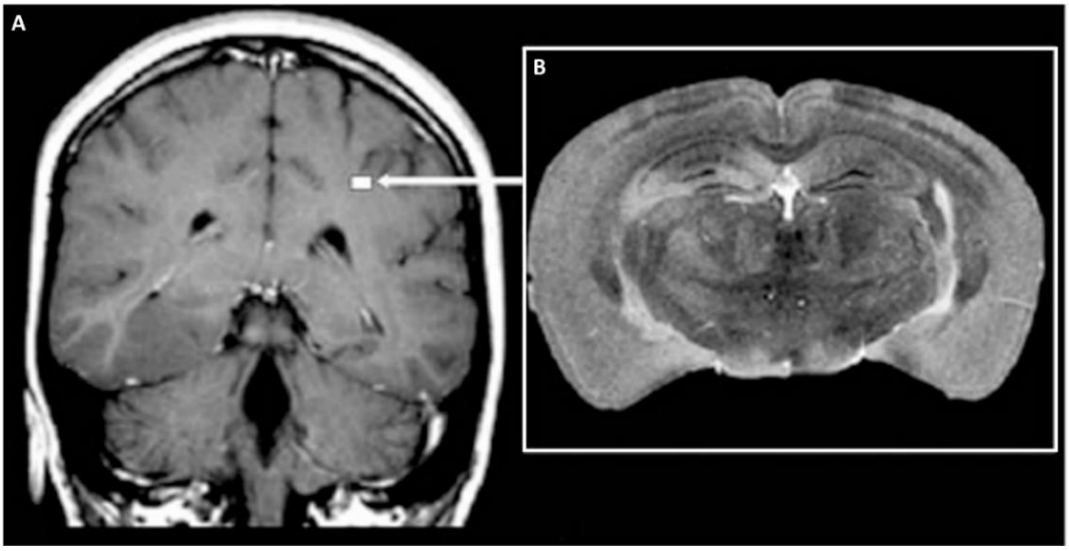


Figure 17 : Comparaison d'images IRM d'un cerveau humain et d'un cerveau de souris.

(A) Les images du cerveau humain ont été acquises avec une résolution dans le plan de 1x1 mm^2 et une épaisseur de coupe de 5 mm. (B) Les images du cerveau de souris ont été acquises avec une résolution dans le plan de 40x40 μm^2 et une épaisseur de coupe de 40 µm. Le volume occupé par le cerveau de souris, en comparaison au volume occupé par le cerveau humain, est représenté par le rectangle blanc. Le volume du voxel nécessaire chez la souris est alors 80 000 fois inférieur au voxel utilisé chez l'Homme[189,190].

2.3.2 Résolution spatiale, rapport signal/bruit et temps d'acquisition

L'augmentation de l'intensité du champ magnétique est une stratégie intéressante permettant principalement d'obtenir une meilleure résolution spatiale et un meilleur rapport signal/bruit (SNR). Cependant, les conséquences physiques de la montée en champ sont plus vastes que le simple accroissement du rapport signal/bruit.

De façon simplifiée, le SNR, en fonction des paramètres de l'acquisition, peut être décrit par l'équation suivante[191] :

$$SNR = K \,.\, (V_{voxel}) \,.\, \frac{\sqrt{N_{acq}}}{\sqrt{BW}}$$

Où :

- *K* est une constante variant linéairement avec l'intensité du champ magnétique et dépendante de l'antenne utilisée, de la séquence et des paramètres de relaxation du tissu (T1, T2, densité de proton).
- V_{voxel} est le volume du voxel = $\frac{FOV_x}{N_x} \,.\, \frac{FOV_y}{N_y} \,.\, \frac{FOV_z}{N_z}$ où la *FOV* est la dimension du champ de vue et *N* est le nombre de points d'encodage de phase ou de fréquence.
- N_{acq} est le nombre de mesures = $N_x \,.\, N_y \,.\, N_z \,.\, N_{rep}$ où N_{rep} est le nombre de répétition
- *BW* est la bande passante en réception.

Le SNR augmente théoriquement de façon linéaire avec l'intensité du champ magnétique. En effet, l'augmentation de l'intensité du champ magnétique s'accompagne d'une accentuation de la différence entre les populations de spins parallèles et antiparallèles au champ magnétique principal.
A l'inverse, le SNR diminue avec la résolution spatiale. En effet, l'intensité du signal IRM, originaire d'un voxel, dépend du nombre de spin excités présents dans ce voxel. L'intensité du signal est donc inversement proportionnelle à la résolution spatiale. Par exemple, si on divise les dimensions d'un voxel par 2, on divise par 8 son volume, et donc d'autant la quantité de signal par voxel. Or, comme nous l'avons vu précédemment, l'imagerie du petit animal oblige à réduire drastiquement la résolution spatiale et donc le SNR. L'augmentation de l'intensité du champ magnétique permet ainsi de compenser cette perte de signal. Les autres moyens les plus couramment utilisés pour augmenter le SNR sont l'optimisation de l'antenne de radiofréquence et/ou l'allongement du temps d'acquisition. Cependant, l'augmentation de la résolution spatiale est très coûteuse en temps d'acquisition. Par exemple, comme le SNR augmente en fonction de $\sqrt{N_{rep}}$ lorsqu'on accumule du signal, un volume de voxel divisé par 8 nécessite un temps d'acquisition multiplié par 64 pour conserver le même SNR et le même champ de vue. Or, le temps d'acquisition reste limité par un certain nombre de considérations physiologiques : durée de l'anesthésie, mouvements pouvant induire des artéfacts, etc.
Il faut également noter que les temps de relaxation des différents tissus varient en fonction de l'intensité du champ magnétique. Le T1 augmente pour la plupart des tissus alors que le T2 diminue. L'utilisation d'IRM à haut champ entraîne une diminution du contraste en T1[189,191].

2.3.3 Artefacts

L'utilisation de tels champs magnétiques n'est pas sans inconvénients. Certains artefacts vont être amplifiés par l'augmentation de l'intensité du champ magnétique et peuvent conduire à une dégradation de la qualité des images.

Les artefacts de déplacement chimique sont exacerbés à haut champ. En effet, le décalage en fréquence entre différentes molécules est proportionnel à l'intensité du champ magnétique et au déplacement chimique entre celles-ci. La différence de signal entre l'eau et la graisse est donc plus importante.

Les artefacts liés aux différences de susceptibilité magnétique entre les tissus sont nettement plus marqués à haut champ magnétique et peuvent altérer la qualité de l'image (distorsions d'image et perte de signal). Cela peut également représenter un avantage pour une meilleure détection des séquelles hémorragiques ou des calcifications en écho de gradient. Enfin, les inhomogénéités de champ magnétique sont également plus difficiles à maîtriser à haut champ magnétique[189,191].

2.3.4 Sécurité

A bas champ magnétique, la quantité d'énergie RF déposée (SAR ou « Specific Absorption Rate ») est peu importante et donc généralement non limitante. La SAR est proportionnelle au carré de l'intensité du champ magnétique et devient donc importante à haut champ magnétique. Celle-ci devra être contrôlée pour éviter un échauffement des tissus lié à une trop grande quantité d'énergie déposée.

Le nombre d'effets indésirables observés augmente avec l'utilisation d'IRM à haut champ magnétique. Notamment, des vertiges, des nausées, des phosphènes ou encore la présence d'un gout métallique dans la bouche sont les effets indésirables les plus fréquemment observés avec l'utilisation d'IRM 7T en clinique[189].

2.3.5 Application de la microscopie par IRM dans la MA.

2.3.5.1 Imagerie structurale à haut champ magnétique

L'imagerie structurale, désignant l'imagerie anatomique des différentes structures du cerveau en condition normale ou pathologique, constitue l'une des principales applications de la microscopie par IRM. Dans le contexte de la MA, cela est particulièrement intéressant pour le suivi de l'atrophie cérébrale caractéristique de cette maladie. En effet, comme discuté précédemment, une atrophie cérébrale stéréotypée, hautement liée aux DNF et à la perte neuronale, se développe dans le cerveau

des patients atteints de la MA. L'atrophie de l'hippocampe est un biomarqueur particulièrement intéressant car précoce et plus spécifique de la MA que la volumétrie du cerveau entier. De nombreuses études se sont intéressées de manière plus précise aux changements morphologiques survenant dans l'hippocampe au cours de la MA. Anatomiquement, l'hippocampe est divisé en trois régions imbriquées les unes dans les autres : le Gyrus Denté (GD), la Corne d'Ammon (CA), elle-même subdivisée en quatre sous-champs cellulaires (CA1, CA2, CA3 et CA4) et le subiculum[192]. Ces différentes régions se distinguent par leurs caractéristiques cyto-architecturales. Le GD est principalement formé de cellules granulaires alors que la CA et le subiculum sont constitués de cellules pyramidales. En plus de leurs différences cytologiques, ces régions sont également impliquées dans des processus cérébraux différents[193]. Ces sous-régions sont reliées fonctionnellement par deux voies intra-hippocampiques principales. La voie polysynaptique relie le cortex entorhinal au GD, à la CA3, à la CA1 et au subiculum puis au thalamus et enfin au cortex cingulaire et rétrosplénial. La voie directe relie le cortex entorhinal à la CA1 puis au subiculum et enfin aux cortex temporal et pré-frontal[194].

Dans la MA, les différentes régions hippocampiques sont affectées de manière différentes selon le stade de la pathologie. Lace et coll. ont décrit la progression des DNF au sein de l'hippocampe selon cinq stades :

- Stade 1 : cortex transentorhinal
- Stade 2 : cortex entorhinal médian
- Stade 3 : CA1 et CA2
- Stade 4 : couche moléculaire du GD et subiculum
- Stade 5 : CA3 et CA4

La mort neuronale touche principalement la CA1 mais également le subiculum et le hile avec, respectivement, 68%, 47% et 25% de perte neuronale chez les patients atteints de la MA en comparaison à des sujets sains d'âges similaires[195]. Cette perte neuronale est corrélée à la charge en DNF[196,197].

Le gain en résolution spatiale et en SNR, permis par l'utilisation d'IRM à haut champ magnétique, rend aujourd'hui possible de distinguer suffisamment de repères anatomiques pour identifier les sous-régions hippocampiques et ainsi étudier en détails les modifications morphologiques survenant au cours de la MA. Les techniques d'imagerie permettant de visualiser en détails les différentes régions de l'hippocampe sont particulièrement intéressantes pour étudier les différences de sensibilités observées et mieux comprendre la physiopathologie de la maladie. De plus, certaines études ont montré que la volumétrie des sous-champs hippocampiques était plus sensible que la volumétrie de l'hippocampe entier pour détecter les stades prodromaux de la MA[198,199]. La volumétrie des sous-

champs hippocampiques serait donc un biomarqueur intéressant pour la détection précoce de la MA[198–200]. Au stade MCI, l'atrophie se localise principalement au niveau de la CA1. La perte moyenne de volume dans cette région a été estimée à 20%. De plus, cette atrophie serait prédictive de la conversion vers le stade clinique[155,201]. Certaines études ont également montré une atteinte du cortex entorhinal, de la CA3, du GD ou du subiculum. Chez les patients aux stades symptomatiques de la maladie, une atrophie est observée dans l'ensemble des sous-champs hippocampiques avec une atteinte prédominante dans la CA1. L'atteinte de ce dernier est retrouvée de manière consensuelle dans la majorité des études mais les résultats concernant les autres régions sont contradictoires. En effet, certaines études ont également montré une relative préservation de certaines régions, notamment CA3/GD[198,202] ou CA2[203]. Cette hétérogénéité des résultats peut être attribuée à un défaut d'harmonisation des protocoles de mesure volumétrique. En effet, la plupart des études repose sur une segmentation manuelle de l'hippocampe à partir des images IRM. Les sous-régions sont délimitées à la main à l'aide de repères anatomiques et suivant des règles géométriques. Ces mesures sont donc des approximations du volume réel de chaque région et peuvent varier d'un expérimentateur à un autre ou d'un protocole à un autre (atlas utilisé, nombre de régions segmentées, images IRM de base, etc.). Pour obtenir une meilleure reproductibilité inter-individuelle, des méthodes de segmentation automatiques ont été développées. Cependant, les résultats obtenus sont alors dépendants de la technique et du logiciel utilisés[151,204]. La principale limite de ces techniques est donc le manque d'harmonisation des protocoles rendant difficile la comparaison des différentes études bien que des initiatives internationales visent à pallier ce problème. Ainsi, l'HSG (Hippocampal Subfield Group) a pour objectif de mettre au point un protocole de segmentation harmonisé.

Une autre limite de cette technique est que la mesure de l'atrophie hippocampique (ou globale) est une mesure indirecte des processus pathologiques se produisant dans le cerveau des patients. En effet, comme discuté précédemment, l'atrophie cérébrale est hautement corrélée à la charge en DNF et à la mort neuronale. La visualisation directe *in vivo* des DNF par IRM est actuellement impossible du fait de la trop faible taille de ces lésions. Cependant, de nombreuses études se sont intéressées à l'utilisation d'IRM à haut champ magnétique pour la détection des plaques amyloïdes, deuxième signature moléculaire de la MA.

2.3.5.2 Imagerie des lésions amyloïdes par IRM à haut champ magnétique

Depuis une vingtaine d'années, de nombreux efforts ont été faits pour mettre au point des méthodes pour détecter les plaques amyloïdes par IRM. La principale contrainte rencontrée est la résolution spatiale de l'IRM. En effet, la taille des plaques amyloïdes varie de 5 à 200 µm de diamètre avec une majorité de tailles inférieures à 25 µm[74,205,206]. La détection des plaques amyloïdes nécessite donc

l'utilisation d'IRM à haut champ magnétique, dotées de gradients plus puissants, ainsi que l'optimisation des séquences pour atteindre une résolution spatiale suffisante, de l'ordre du µm, avec un SNR suffisant.

2.3.5.2.1 Détection des plaques sans agent de contraste

Les premières études visant à détecter les plaques amyloïdes par IRM ont été réalisées par Benveniste et coll. en 1999[207]. Ces études ont été réalisées en *post mortem* sur des échantillons d'hippocampe de patients atteints de la MA. Ce groupe a montré que les plaques amyloïdes étaient visibles sous formes de points sphériques hypointenses d'environ 100 µm de diamètre sur des images pondérées en T2*. La présence de plaques amyloïdes dans ces échantillons a ensuite été confirmée par histologie avec une localisation similaire aux points hypointenses observés en IRM laissant supposer que ces hypointensités étaient bien des plaques amyloïdes (Figure 18). Aucune modification de contraste n'a été observée en imagerie pondérée en T1 ou en densité de proton du fait de la présence de plaques amyloïdes[208,209].

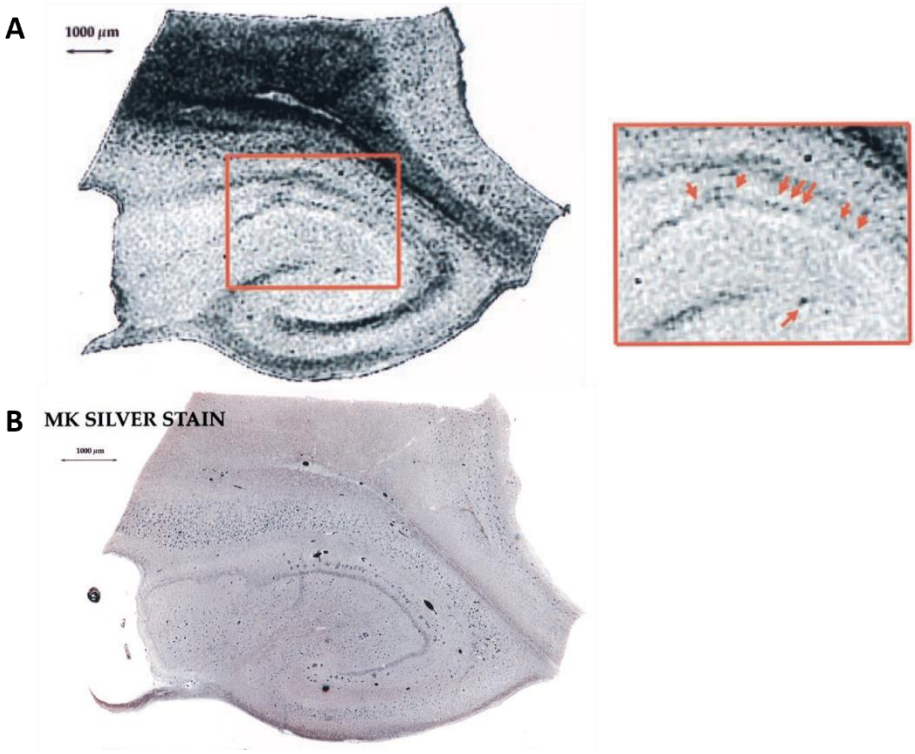


Figure 18 : Visualisation des plaques amyloïdes dans un hippocampe de patient atteint de la MA en *post mortem* par IRM sur des images pondérées en T2* (A) et par histologie (B).

(A) Les plaques amyloïdes apparaissent sous forme de points hypointenses (flèches rouges) dans l'hippocampe d'un patient atteint de la MA (stade de Braak VI). (B) Les plaques amyloïdes détectées par histologie par coloration à l'argent ont une localisation similaire à celle des points hypointenses détectés par IRM[207].

La principale limite de cette étude était l'absence de mise en registre exacte entre les images IRM et histologiques permettant de valider la nature des hypointensités observées. De plus, des temps d'acquisition très longs (de plus de 20h) ont été utilisés pour obtenir un SNR suffisant. Par la suite, Van Rooden et coll. ont réussi à répliquer ces résultats avec des temps d'acquisition réduits, rendant envisageable l'utilisation de ces protocoles en clinique[210]. Par ailleurs, cette étude a été remise en cause par Dhenain et coll. en 2002. Ces auteurs ont également réalisé des acquisitions pondérées en T2* sur des échantillons de cerveaux de patients atteints de la MA, suivies de la mise en registre de ces images avec des marquages immunohistochimiques des plaques amyloïdes et du fer. Les points hypointenses observés sur les images IRM ont alors pu être mis en registre avec des vaisseaux sanguins mais pas avec des plaques amyloïdes. Cette absence de détection était alors attribuée à la faible taille des plaques amyloïdes par rapport à la résolution spatiale atteinte en IRM et à l'absence de fer au cœur de ces lésions[211].

Suite à ces travaux, de nombreuses études ont été réalisées pour visualiser les plaques amyloïdes *ex vivo*[212] puis *in vivo*[205,206,208,209,213–217] dans plusieurs modèles murins d'amyloïdose tels que l'APP/PS1[205,206,208], l'APP23[213] ou encore la Tg2576 (Figure 19)[215]. Ces études ont permis de distinguer deux catégories de plaques amyloïdes détectables par IRM : les plaques thalamiques et les plaques corticales/hippocampiques. Les premières apparaissent sous forme de larges points hypointenses en pondération T2*[205,206,213]. Ces modifications de signal seraient liées à une forte accumulation de fer et de calcium au cœur de ces lésions[205]. Les plaques corticales et hippocampiques apparaissent également sous forme de points hypointenses en pondération T2* mais de plus petite taille. Ces lésions contiennent une quantité beaucoup plus faible de fer que les plaques thalamiques mais restent détectables par IRM.

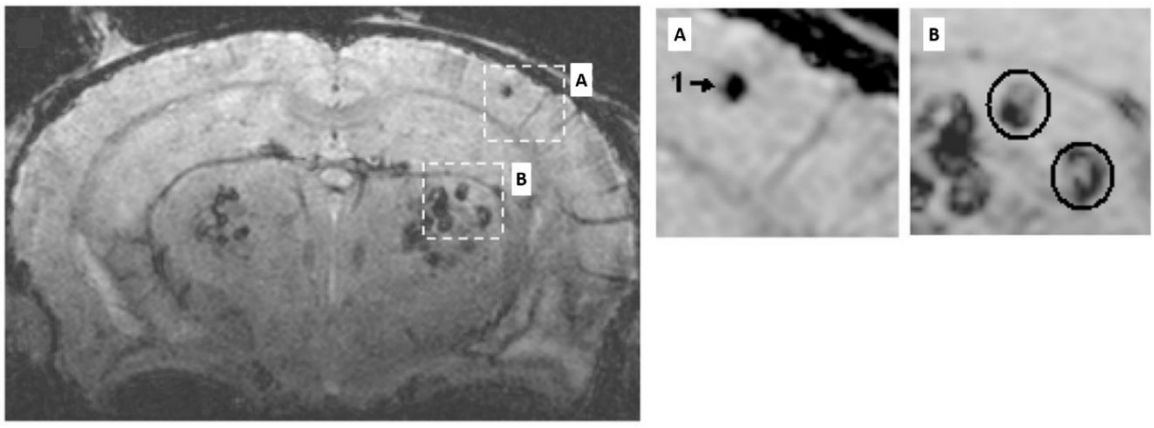


Figure 19 : Visualisation des plaques amyloïdes *in vivo* chez une souris APP/PS1 par IRM.

Les plaques amyloïdes apparaissent sous forme de points hypointenses sur des images pondérées en T2* dans le cortex (A) et le thalamus (B)[206].

Chez l'Homme, peu d'études ont été menées pour détecter les plaques amyloïdes *in vivo*. En 2008, Nakada et coll. ont montré pour la première fois qu'une visualisation directe de ces lésions était possible à l'aide d'un IRM 7T[218]. Cette étude a été menée sur dix patients atteints de la MA et dix sujets âgés sains d'âge équivalent. De nombreuses hypointensités ont pu être observées dans l'ensemble du cortex pariétal des dix patients et de deux contrôles. Cependant, cette étude n'a pas pu être validée par histologie et n'a pas encore été répliquée. D'autres études menées chez l'Homme ont permis une détection indirecte des plaques amyloïdes à l'aide de séquences en écho de gradient pondérées en T2* par la technique « QSM » (« Quantitative Susceptibility Mapping »)[210,219–221]. Cette technique permet de mesurer les différences de susceptibilités magnétiques dans chaque voxel et est corrélée à la charge en fer cérébral. Van Rooden et coll. ont montré que cette technique permet de distinguer des patients atteints de la MA de sujets âgés sains avec une sensibilité de 50-70% et une spécificité de 90-100%[219]. De plus, les différences de susceptibilités magnétiques observées sont corrélées avec le score obtenu au MMSE. Van Bergen et coll. ont montré que cette détection est également possible chez des sujets MCI et est corrélée avec la charge amyloïde détectée par imagerie TEP au ^{11}C-PIB. Ces images ont été acquises à hautes résolutions (0,156 à 0,5 mm^2). Cependant, comme chez l'animal, ces résolutions n'étaient pas suffisantes pour détecter la plupart des plaques amyloïdes[220].

L'hypothèse la plus reconnue, expliquant la détection des plaques amyloïdes par IRM, est la présence de fer au cœur de celles-ci. Comme discuté précédemment, deux types de dépôts de fer sont observés au niveau des plaques amyloïdes humaines : des dépôts focaux de magnétite (oxyde de fer constitué d'un mélange de fer ferrique et ferreux) au cœur de la plaque et des dépôts cellulaires de ferritine (protéine de stockage du fer capable de lier les ions ferriques) présents dans les microglies activées de la couronne neuritique. Les ions ferriques sont des ions ferromagnétiques agissant comme des « agents de contraste naturels ». Ces particules ont un effet T2 prépondérant et entraînent plus particulièrement une chute du signal en pondération T2*. La concentration cérébrale en ions ferriques est considérée comme suffisante pour altérer le contraste dans le cerveau humain. Les effets des ions ferreux sont moins prononcés. Cette hypothèse est renforcée par l'observation d'un effet « blooming » caractéristique de certains métaux comme le fer. Les plaques amyloïdes, notamment thalamiques, apparaissent plus grosses que leur taille réelle sur des images pondérées en T2*.
Plusieurs études se sont donc intéressées au lien entre présence de fer et visualisation des plaques amyloïdes. Certaines études considèrent que la présence de fer au cœur de la plaque est un élément obligatoire pour sa détection par IRM[213,222]. A l'inverse, certains auteurs émettent l'hypothèse que la présence de ce métal n'est pas l'unique cause des anomalies de contraste induites par les plaques amyloïdes[205,223]. Par exemple, El Tannir El Tayara et coll. ont montré que les plaques amyloïdes du subiculum, dépourvues de fer chez les souris APP/PS1 jeunes, étaient détectables par IRM[224]. Le même

groupe a également montré que, chez la souris APP/PS1, les plaques amyloïdes étaient responsables d'une diminution du T2 mesuré dans différentes régions cérébrales (notamment le cortex pariétal et visuel et l'hippocampe) sans corrélation avec la charge en fer[224]. De façon intéressante, Meadowcroft et coll. ont utilisé une antenne IRM particulière permettant l'imagerie de coupes histologiques. Cette technique permet une mise en registre parfaite entre les images IRM et histologiques pour étudier précisément les relations entre les deux. Ces auteurs ont réalisé plusieurs mises en registre entre les images IRM et les marquages IHC anti-Aβ (marquage par la Thioflavine-S) et du fer (coloration de Perls-DAB) sur des tissus humains et de souris modèles d'amyloïdose (Figure 20).

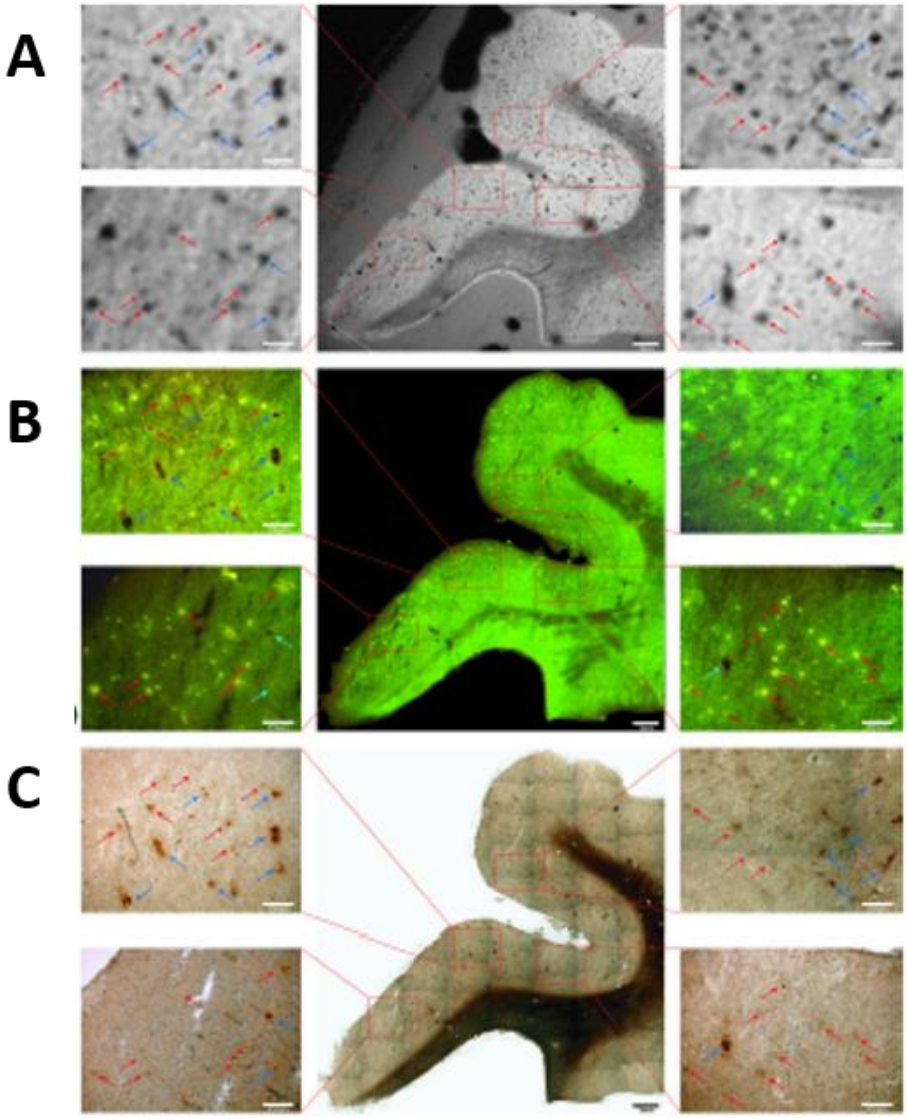


Figure 20 : Mise en registre entre les images IRM *post mortem* (A) et les marquages IHC des plaques amyloïdes par la Thioflavine-S (B) et du fer par la coloration de Perls-DAB (C) sur des échantillons de cortex entorhinal de patient atteint de la MA.

Les spots hypointenses observés en IRM (flèches rouges) co-localisent avec les plaques amyloïdes et le fer. Ces images indiquent que le cœur des plaques humaines semble contenir une forte concentration en fer[223].

Chez l'Homme, ils ont ainsi pu montrer que les plaques amyloïdes visibles en IRM étaient celles contenant une forte concentration de fer. Cependant, comme précédemment, certaines plaques amyloïdes corticales et hippocampiques, dépourvues de ce métal ont pu être détectées par IRM sur des tissus de souris APP/PS1. Toutes ces observations semblent indiquer que le fer n'est pas obligatoire pour la détection des plaques amyloïdes par IRM[223–225]. Cette hypothèse est renforcée par une étude de Meadowcroft et coll. montrant que la détection des plaques amyloïdes par IRM est possible même après traitement par un agent chélatant du fer sur des tissus de patients atteints de la MA[226].
Ces auteurs émettent l'hypothèse que la morphologie de la plaque serait également un élément déterminant pour sa détection par IRM. Leur nature dense, fibrillaire et hydrophobe induirait des différences de susceptibilités magnétiques entre les plaques et le tissu voisin s'additionnant à celles liées à la présence de fer et induisant une chute du signal en pondération T2*[223–225]. La détection des plaques amyloïdes par contraste spontané semble donc efficace pour la détection des dépôts focaux d'Aβ mais peu sensible aux dépôts diffus, moins denses et moins hydrophobes. Cette hypothèse est renforcée par une étude de Nabuurs et coll. montrant que les plaques focales mais pas diffuses étaient détectables par IRM *post mortem* sur des échantillons de cortex de patients atteints de la MA[227].

Chez la souris, la relation entre détection des plaques par IRM et présence de fer est peu claire. Comme chez l'Homme, une accumulation physiologique de fer est observée au cours du vieillissement normal dans le cerveau des souris jusqu'à atteindre un plateau à l'âge de 17 mois[228]. Dans les souris modèles de la MA, la présence de fer au cœur des plaques amyloïdes est controversée. L'accumulation de fer chez la souris semble variable en fonction de la région cérébrale, du modèle et de l'âge des animaux. Certains groupes ont montré que les plaques amyloïdes matures contenaient du fer en leur cœur[206,222,225,229] alors que certaines études ont montré que le contenu en fer de ces lésions était très faible[223]. Par exemple, chez des souris APP/PS1 âgées, El Tannir et Tayara et coll. ont montré une forte accumulation de fer au cœur des plaques amyloïdes, principalement au niveau du subiculum mais également au niveau du cortex, de l'hippocampe et du thalamus[225]. A l'inverse, Meadowcroft et coll. rapportent des concentrations en fer faibles à nulles dans les plaques corticales de ces souris[223]. De plus, l'accumulation de fer au cœur des plaques amyloïdes semble dépendre de leur localisation anatomique avec les plaques thalamiques, riches en fer et les plaques corticales et hippocampiques, pauvres en fer[205,206].

Le fait de pouvoir visualiser les lésions amyloïdes chez l'animal vivant représente une avancée majeure pour l'étude de la MA. L'IRM étant peu invasive, l'évolution de la pathologie peut être suivie longitudinalement chez le même animal sur une longue période. L'amyloïdose peut être monitorée aux différents stades de la maladie et facilite donc l'étude de sa physiopathologie. Cette technique

peut également être utilisée pour évaluer l'efficacité de thérapeutiques expérimentales ciblant l'amyloïdose tout en limitant le nombre d'animaux et le temps nécessaires.

Cependant, toutes les plaques amyloïdes ne peuvent pas être visualisées directement par IRM. Comme discuté précédemment, la présence de fer au cœur de la plaque et/ou la morphologie des dépôts sont critiques pour leur détection par IRM. Seuls les dépôts focaux semblent être détectés efficacement. De plus, l'accumulation de fer chez la souris est variable en fonction de l'âge des animaux, de la région cérébrale et du modèle. La détection des plaques amyloïdes par IRM est donc difficile chez les animaux jeunes et selon la région étudiée. Enfin, la taille des plaques est un facteur déterminant pour leur visualisation en IRM. L'utilisation d'IRM à haut champ magnétique permet d'atteindre des résolutions spatiales de l'ordre de 35 à 50 µm. Seules les plaques de taille supérieure peuvent donc être observées. Ainsi, il est estimé que moins de 30% des plaques amyloïdes totales (détectées par IHC) sont visibles en IRM bien que ce taux augmente avec l'âge[206]. De plus, comme discuté précédemment, l'augmentation de la résolution spatiale nécessaire pour l'imagerie de ces lésions s'accompagne d'une diminution importante du SNR pouvant de nouveau compromettre leur détection. L'utilisation d'agent de contraste s'est révélée efficace pour améliorer le rapport contraste sur bruit et donc la visualisation des plaques amyloïdes.

2.3.5.2.2 Détection des plaques amyloïdes à l'aide d'agents de contraste non ciblés : le Gadolinium-staining

2.3.5.2.2.1 Utilisation du Gadolinium-staining pour l'IRM structurale

Le « Gadolinium (Gd) staining » est une technique basée sur l'administration intracérébrale de chélates de Gd. En effet, l'utilisation d'IRM à haut champ magnétique permet d'atteindre des résolutions spatiales de l'ordre du micromètre. Cette amélioration de la résolution permet d'imager des structures de très faible taille et de visualiser en détail certaines sous-structures cérébrales (sous-régions de l'hippocampe, différentes couches corticales, etc.). Par exemple, Boretius et coll. ont pu identifier les différentes couches cellulaires constituant le néocortex cérébral, l'hippocampe et le cervelet *in vivo* chez la souris à l'aide d'un IRM 9,4T[230]. Cependant, cette diminution de la taille des voxels s'accompagne également d'une diminution du SNR. Or, la discrimination de structures spécifiques nécessite un contraste suffisant et donc un SNR important, tout en respectant un temps d'imagerie raisonnable. L'utilisation d'agent de contraste est une stratégie intéressante pour rehausser ce contraste tissulaire et permettre l'étude des différentes structures et sous-structures cérébrales.

Le Gd-staining s'inspire de travaux réalisés par Benveniste en 2000[231] et Johnson en 2002[232] qui furent les premiers à développer la technique de l' « *active staining* ». Il s'agit d'augmenter le contraste IRM dans tous les tissus, chez la souris, en *post mortem* par une perfusion intracardiaque d'un mélange de formaline et de gadopentate de diméglumine (Magnevist®). L'agent de contraste peut alors diffuser dans tous les tissus (à l'exception de la graisse) où il induit principalement une diminution du T1 et donc une augmentation du SNR. Ces auteurs ont ainsi obtenu un SNR multiplié par 6 par rapport à l'imagerie sans agent de contraste. Cette même méthode a aussi été appliquée spécifiquement au cerveau. Benveniste et coll. ont montré qu'il était possible d'obtenir des résultats similaires dans plusieurs régions cérébrales clés : l'hippocampe, le pallidum et le putamen (mais peu dans le cortex). Chez la souris vivante, plusieurs études ont montré l'intérêt de l'utilisation d'agents de contraste pour l'imagerie fine de structures cérébrales telles que l'hippocampe, le cortex, le cervelet ou encore les bulbes olfactifs. Par exemple, chez la souris après injection intracérébrale de Gd, Watanabe et coll. ont pu identifier très finement les différentes couches cellulaires constituant les sous-régions de l'hippocampe, du cervelet et des bulbes olfactifs (Figure 21)[233].

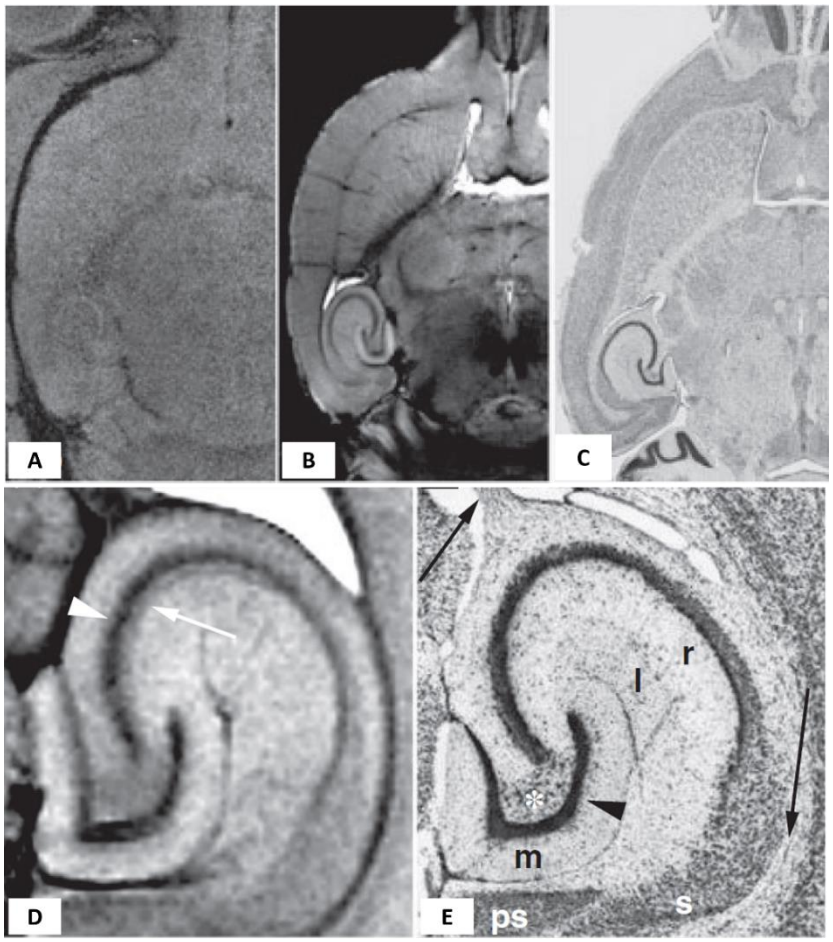


Figure 21 : Amélioration de l'imagerie de l'hippocampe *in vivo* chez la souris par IRM à haut champ magnétique (9,4T) après injection intracérébrale de gadopentate de diméglumine.

Les images IRM (A, B, D) ont été acquises en pondération T1 à une résolution de 25 × 25 × 250 µm^3. Le SNR et le contraste entre les différents tissus étaient fortement améliorés après injection de l'agent de contraste (B) en comparaison aux images acquises avant injection (A). Les résultats IRM ont été comparés aux images histologiques après coloration de Nissl (C et E). Les images IRM, acquises après injection, ont permis de distinguer différentes structures cellulaires notamment au niveau de l'hippocampe (D-E) : substance blanche (flèche noire), *stratum lucidum* (flèche blanche), couche granulaire du GD (tête de flèche noire), couche pyramidale de la CA (tête de flèche blanche), *stratum multiforme* (astérisque), *stratum lacunosum-moleculare* (l), *stratum moleculare* (m), parasubiculum (ps) *stratum radiatum* (r) et subiculum (s)[234].

2.3.5.2.2.2 Utilisation du Gadolinium-staining pour l'imagerie des plaques amyloïdes par IRM

Dans le cas de la MA, le Gd-staining est efficace pour l'imagerie des plaques amyloïdes par IRM. Cette technique a tout d'abord été développée *ex vivo* chez la souris APP/PS1[235]. Pour cela, le cerveau est incubé directement dans une solution de gadotérate de méglumine (Dotarem®, Guerbet) avant d'être imagé par IRM. Le Gd étant un agent hydrophile, il diffuse dans tout le parenchyme cérébral mais pas dans les plaques amyloïdes hydrophobes. Le SNR est alors augmenté dans tout le parenchyme mais pas dans les plaques amyloïdes qui apparaissent sous forme de points hypointenses sur des images pondérées en T2*. Cette méthode présente l'avantage d'être rapide et facile à mettre en œuvre. De plus, les chélates de Gd sont des agents de contraste paramagnétiques bien connus et largement utilisés chez l'Homme. Cependant, le Gd ne traverse pas la BHE. Deux approches ont été développées pour permettre le passage de l'agent de contraste dans le parenchyme cérébral *in vivo* : par injection intracérébroventriculaire (ICV) et par injection IV après ouverture artificielle de la BHE par les ultra-sons.

La première approche a été développée par Petiet et coll. en 2012. Cette étude a été menée sur des souris APP/PS1 *in vivo* puis *ex vivo*. Avant l'injection de Gd en ICV, les plaques amyloïdes étaient visibles uniquement dans le thalamus, sur des images pondérées en T2*. Après l'injection, de nombreuses plaques amyloïdes corticales et hippocampiques supplémentaires ont pu être observées. Environ 70% des plaques détectées en histologie étaient alors visibles par IRM (contre moins de 30% sans agent de contraste). L'imagerie des plaques est donc grandement améliorée par rapport aux études précédentes. Cette méthode reste cependant très invasive et non applicable en clinique[236].

Le Gd peut également être injecté par voie IV après ouverture de la BHE par une association d'ultrasons focalisés et d'une injection IV de microbulles (Figure 22). Cette technique permet d'obtenir une ouverture transitoire et localisée de la BHE autorisant l'entrée du Gd dans le parenchyme cérébral[237]. Cette technique est peu toxique chez la souris[238] et chez le primate non humain (PNH)[239]. En effet, l'association des microbulles permet de réduire l'intensité de l'onde acoustique ce qui évite des

dommages sur les tissus environnants. De façon intéressante, l'amélioration de l'imagerie des plaques amyloïdes obtenue par le Gd-staining a permis son utilisation pour évaluer, en longitudinal, l'efficacité d'une thérapie anti-amyloïde chez la souris APP/PS1[240]. Cette technique semble donc être un outil prometteur en préclinique pour l'évaluation de nouveaux traitements anti-amyloïdes ou pour étudier la pathologie de manière non-invasive, tout au long de la vie de l'animal.

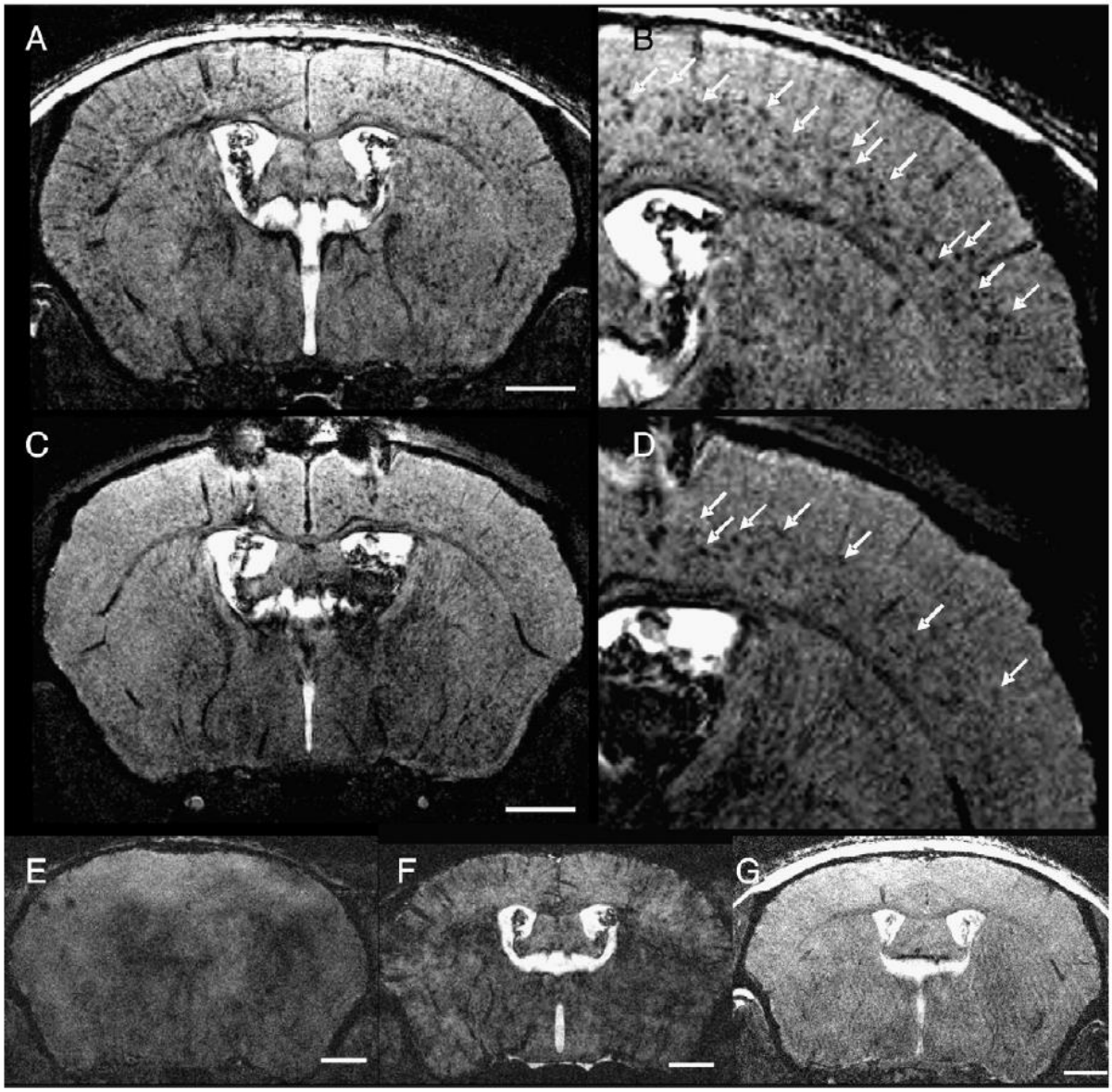


Figure 22 : Visualisation des plaques amyloïdes *in vivo* dans le cerveau de souris APP/PS1 par IRM après ouverture de la BHE par les ultra-sons et injection IV (A et B) ou ICV (C et D) de Dotarem®.

De nombreux points hypointenses (A-D, flèches blanches), correspondant à des plaques amyloïdes, sont visibles après injection de l'agent de contraste. Aucune hypointensité n'est observée sur les images IRM de souris APP/PS1 sans agent de contraste (E) ou sans ouverture de la BHE (F). Aucune hypointensité n'est observée sur les images IRM de souris wild-type (WT) après ouverture de la BHE par les ultra-sons et injection IV de Dotarem®[241]. Barre d'échelle = 2 mm.

Cependant, le Gd-staining présente un certain nombre de limites. Bien que la proportion de plaques amyloïdes détectées soit augmentée par rapport aux techniques d'imagerie basées sur le contraste spontané des plaques, une certaine proportion de ces lésions, visibles par histologie, reste non détectée après Gd-staining en IRM. Une autre limite est la nécessité d'administrer le Gd par injection ICV ou après ouverture de la BHE. Ces techniques invasives rendent impossible la translation du Gd-staining en clinique. Enfin, la spécificité des modifications de signal observées, après Gd-staining ou en contraste spontané, reste une question d'intérêt. En effet, ces études utilisent majoritairement des séquences en écho de gradient pour acquérir des images pondérées en T2*, très sensibles à la présence de fer. D'autres sources de fer cérébral (vaisseaux sanguins ou microhémorragies) peuvent donc être visualisées sur ces images et confondues avec des plaques amyloïdes. Une alternative au Gd-staining est donc l'utilisation d'agent de contraste ciblant spécifiquement les lésions amyloïdes.

2.3.5.2.3 Détection des plaques amyloïdes à l'aide d'agents de contraste ciblés

Un agent de contraste ciblé idéal pour l'imagerie des plaques amyloïdes doit présenter plusieurs caractéristiques. Il doit se lier de façon spécifique avec une forte affinité aux plaques amyloïdes et induire des modifications locales de contraste visualisables en IRM, passer la BHE, être stable *in vivo* et être non toxique. Depuis une quinzaine d'années, de nombreux agents de contraste vectorisés ont été développés pour détecter les plaques amyloïdes. Ces agents sont composés d'une molécule vectrice (ayant une affinité pour les plaques amyloïdes) associée à un contrastophore.

2.3.5.2.3.1 Contrastophores

2.3.5.2.3.1.1 Généralités

Deux grandes classes de contrastophores sont actuellement utilisées[242] :

- les agents de contraste paramagnétiques, ayant principalement un effet en pondération T1. Les plus utilisés sont les chélates de Gd et le manganèse.
- les agents de contraste super-paramagnétiques, ayant principalement un effet en pondération T2 ou T2*. Les plus utilisés sont les particules d'oxydes de fer comme les « monocrystalline iron oxide nanoparticles » (MION), les « small paramagnetic iron oxide » (SPIO) ou les « ultra-small paramagnetic iron oxide » (USPIO).

De nos jours, les chélates de Gd sont les agents de contraste les plus utilisés en clinique. Le premier agent de contraste IRM à base de Gd, le gadopentate de diméglumine (Magnévist®), a été utilisé chez

l'Homme pour la première fois en 1984 pour améliorer le contraste entre le système vasculaire et des lésions intracrâniennes ou pour détecter des ruptures de la BHE. Il faut noter que ce ne sont pas les agents de contraste qui sont visualisés directement sur les images IRM mais le raccourcissement des temps de relaxation T1 et/ou T2 qu'ils entraînent sur les noyaux d'hydrogène situés à leur proximité et qui est à l'origine des modifications de contraste. Le Gd a un effet T1 prédominant. Il induit un raccourcissement du T1 qui se traduit par une augmentation du signal. L'effet T2 de ces agents de contraste n'est visible qu'à fortes concentrations. Une diminution du signal sur des images pondérées en T2 et T2* est alors observée. Dans le cadre de cette thèse, il est important de noter que les propriétés des agents de contraste paramagnétiques sont modifiées à haut champ magnétique par rapport à des champs magnétiques utilisés en clinique (inférieur à 3T). La relaxivité longitudinale (r1) diminue alors que les effets T2* deviennent plus importants[243,244].

2.3.5.2.3.1.2 Relaxivité

L'efficacité d'un agent de contraste à accélérer la relaxation longitudinale et/ou transversale est décrite par sa relaxivité longitudinale et transversale (r1 et r2 respectivement). La relaxivité des agents de contraste paramagnétiques a été décrite par les équations de Solomon-Bloembergen-Morgan. En solution, en présence d'un agent de contraste paramagnétique, les vitesses de relaxation longitudinale $\left(\frac{1}{T_1}\right)$ et transversale $\left(\frac{1}{T_2}\right)$ des protons du solvant (H_20) seront toutes les deux accélérées. La vitesse de relaxation des protons observés $\left(\frac{1}{T_{i,obs}}\right)$ est la résultante de leur vitesse de relaxation intrinsèque en l'absence d'agent de contraste $\left(\frac{1}{T_{i,int}}\right)$ et de la vitesse accélérée sous l'effet de l'agent de contraste paramagnétique$\left(\frac{1}{T_{i,P}}\right)$.

$$\frac{1}{T_{i,obs}} = \frac{1}{T_{i,int}} + \frac{1}{T_{i,P}} \qquad i = 1\ ou\ 2$$

La contribution de l'agent de contraste à la relaxation est linéairement proportionnelle à sa concentration ([Gd]). Le facteur de proportionnalité est la relaxivité (r_i) et dépend de la température et du champ magnétique appliqué.

$$\frac{1}{T_{i,obs}} = \frac{1}{T_{i,int}} + r_{i,P}\,.[Gd] \qquad i = 1\ ou\ 2$$

La contribution de l'agent de contraste à la relaxation des protons dans une solution d'agent de contraste, $\left(\frac{1}{Ti,P}\right)$ ou $r_{i,P}$, peut-être décrite par un modèle considérant la contribution des protons selon trois sphères d'hydratation (Figure 23). La sphère interne (SI) correspond aux molécules d'eau directement coordonnées avec le Gd. La seconde sphère d'hydratation (SS) se compose des molécules d'eau maintenues au voisinage du complexe par des liaisons hydrogène. Enfin, la sphère externe (SE) correspond aux molécules d'eau de la solution non liées au Gd diffusant à proximité du complexe. La contribution de la sphère externe résulte de la diffusion de l'eau, depuis le milieu aqueux environnant jusqu'à la couche interne.

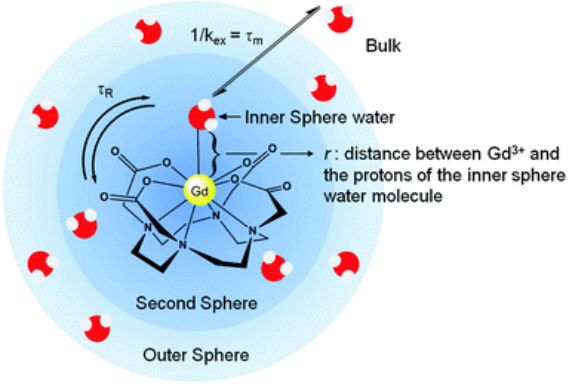


Figure 23 : Représentation schématique d'un complexe de Gd^{3+} en solution et des paramètres dynamiques agissant sur la relaxivité.

Temps de corrélation rotationnel du complexe (τ_r), temps de résidence des molécules d'eau dans la sphère interne (τ_m) égal à l'inverse du taux d'échange des molécules d'eau entre la sphère interne et externe (K_{ex}) et distance inter-atomique entre l'atome de Gd et les protons des molécules d'eau de la sphère interne (r)[245].

La contribution paramagnétique de l'agent de contraste à la relaxation des protons est alors :

$$\left(\frac{1}{Ti,p}\right) = \left(\frac{1}{Ti,p}\right)^{SI} + \left(\frac{1}{Ti,p}\right)^{SS} + \left(\frac{1}{Ti,p}\right)^{SE}$$

$$r_{i,p} = \left(r_{i,p}\right)^{SI} + \left(r_{i,p}\right)^{SS} + \left(r_{i,p}\right)^{SE}$$

Le développement de nouveaux agents de contraste se concentre principalement sur la contribution de la sphère interne et la modification des paramètres dont elle dépend.

$$\left(\frac{1}{T1,p}\right)^{SI} = \frac{[Gd]q}{55{,}5}\frac{1}{T_{1m}+\tau_m} = P_m\frac{1}{T_{1m}+\tau_m}$$

$$\left(\frac{1}{T2,p}\right)^{SI} = \frac{P_m}{\tau_m}\frac{T_{2m}^{-2} + \tau_m^{-1} + T_{2m}^{-1} + \Delta\omega_m^2}{(\tau_m^{-1} + T_{2m}^{-1})^2 + \Delta\omega_m^2}$$

Où :

- [Gd] est la concentration molaire en Gd.
- q est le nombre d'hydratation. Il représente le nombre de molécules d'eau coordonnées au Gd. La plupart des agents de contraste commerciaux possèdent une seule molécule d'eau dans leur sphère interne. Augmenter le nombre d'hydratation permet donc d'augmenter efficacement la relaxivité des agents de contraste mais est également accompagné d'une diminution de la stabilité du complexe et est donc associé à un plus grand risque de toxicité. De plus, d'autre molécules endogènes (phosphates, bicarbonates, etc.) peuvent alors se coordonner au complexe à la place de l'eau et diminuer drastiquement sa relaxivité.
- $\left(\frac{1}{Ti,m}\right)$ est le taux de relaxation longitudinal ou transversal des protons coordonnés au Gd.
- τ_m est le temps de résidence des molécules d'eau dans la sphère interne. Un temps τ_m court permet donc d'augmenter la relaxivité.
- $\Delta\omega_m$ est la différence de déplacement chimique entre les molécules d'eau liées et libres.

Les vitesses de relaxation longitudinale et transversale des protons coordonnés au Gd $\left(\frac{1}{Ti,m}\right)$ peuvent être décrites par les équations Solomon-Bloembergen-Morgan :

$$\frac{1}{T_{1m}} = \frac{2}{15}\frac{\gamma_I^2 g^2 \mu_B^2}{r^6} S(S+1)\left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \left[7\frac{\tau_{c2}}{1+\omega_S^2\tau_{c2}^2} + 3\frac{\tau_{c1}}{1+\omega_I^2\tau_{c1}^2}\right]$$

$$\frac{1}{T_{2m}} = \frac{1}{15}\frac{\gamma_I^2 g^2 \mu_B^2}{r^6} S(S+1)\left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \left[13\frac{\tau_{c2}}{1+\omega_S^2\tau_{c2}^2} + 3\frac{\tau_{c1}}{1+\omega_I^2\tau_{c1}^2} + 4\tau_{c1}\right]$$

Où :

- γ_I est le rapport gyromagnétique nucléaire du proton.
- g est le facteur de Landé pour l'électron libre.
- μ_B est le magnéton de Bohr.
- S est le nombre quantique de spin électronique.
- r est la distance entre le spin électronique S et le spin nucléaire I (du proton).
- ω_I et ω_S sont les fréquences de Larmor du proton et de l'électron.
- $\tau_{c,i}$ (i = 1, 2) est le temps de corrélation relatif à la dynamique du couplage S-I.

Une forme très simplifiée de ces équations peut être décrite par l'équation suivante :

$$\left(\frac{1}{Ti,m}\right) = k\,.\frac{1}{r^6}\,.f(\tau_c)$$

D'après cette équation, augmenter le temps de corrélation τ_c est une façon efficace d'augmenter le taux de relaxation du complexe. Ce dernier dépend du temps de résidence des molécules d'eau dans la sphère interne (τ_m), du temps de corrélation de rotation du complexe (τ_r) et du temps de relaxation électronique (τ_s) du Gd chélaté. Les paramètres les plus utilisés pour améliorer la relaxivité des agents de contraste sont le τ_m et le τ_r.

$$\frac{1}{\tau_c} = \frac{1}{\tau_m} + \frac{1}{\tau_r} + \frac{1}{\tau_s}$$

La vitesse d'échange de l'eau entre la sphère interne et le reste du volume du solvant (sphère externe) joue un rôle majeur dans la relaxivité. Plus l'eau est échangée rapidement, plus l'effet de relaxation de l'agent de contraste peut être transmis rapidement aux protons du solvant. Le temps de résidence des molécules d'eau dans la sphère interne (τ_m) est donc un paramètre critique pour la relaxivité. La valeur optimale de τ_m dépend du champ magnétique utilisé. De façon générale, le τ_m doit être court pour augmenter la relaxivité (10-30 ns pour des champs magnétiques cliniques d'environ 1,5T). Pour des champs magnétiques plus élevés, comme utilisés dans cette thèse, des τ_m encore plus courts seront nécessaires. La valeur de τ_m dépend principalement de la charge nette du complexe, de l'accessibilité et des contraintes stériques au voisinage du site de liaison de l'eau et des mécanismes d'échange de l'eau, facteurs étroitement dépendants de la conformation du ligand.

Le temps de corrélation de rotation du complexe (τ_r), représentant son temps de basculement moléculaire, est un des paramètres le plus fréquemment utilisé pour optimiser la relaxivité des agents de contraste. Plus ce mouvement est lent (τ_r long), plus la liaison avec une molécule d'eau est facilitée. Il est possible de ralentir le τ_r en chélatant le Gd avec un ligand volumineux ou en augmentant le poids moléculaire (PM) du complexe. Ainsi, la liaison covalente ou non, d'un complexe de Gd à une macromolécule (protéines plasmatiques, polymères, etc.) induit une augmentation de sa relaxivité. Le ralentissement du τ_r dépend alors de la structure et de la rigidité de la macromolécule. Par exemple, la liaison à des macromolécules dendrimériques, plus rigides, est généralement plus efficace pour augmenter la relaxivité que la liaison à des polymères linéaires. La nature de la molécule de liaison

entre le chélate de Gd et la macromolécule influence également la rigidité du complexe et donc sa relaxivité[243,244,246,247].

2.3.5.2.3.1.3 Sécurité

Le Gd sous forme ionique (Gd^{3+}) libre est toxique. Il doit donc être est associé à un chélateur ou à un ligand qui inhibe ses propriétés toxiques. Les premières molécules envisagées pour complexer les ions Gd ont été des polyacides carboxyliques polyaminés de types DTPA (complexes linéaires) ou DOTA (complexes macrocycliques). Les diverses déclinaisons autour de ces deux chélates ont conduit majoritairement aux produits de contraste aujourd'hui commercialisés. La plupart de ces agents de contraste sont des agents extracellulaires (à l'exception du Multihance® et du Primovist®). Ces chélates de Gd ne sont pas métabolisés et sont excrétés dans les urines sous forme inchangée[248].

La stabilité des chélates de Gd est l'élément le plus important pour garantir la sécurité de la molécule en évitant la libération d'ions Gd^{3+} libres dans la circulation générale. Les chélates macrocycliques présentent une stabilité supérieure aux chélates linéaires. Ainsi, quatre agents de contraste linéaires (acide gadobénique (Multihance®), le gadodiamide (Omniscan®), l'acide gadopentétique (Magnevist®) et le gadoversetamide (OptiMARK®)) ont récemment vu leur autorisation de mise sur le marché, comme agents de contraste intravasculaires, suspendue par l'EMA. Le Multihance® reste autorisé pour l'imagerie hépatique uniquement, du fait de l'absence de molécule alternative pour cette application. Le Magnevist® reste également autorisé par injection intra-articulaire car les doses administrées sont alors beaucoup plus faibles que par injection IV[249,250].
Ces recommandations font suite à plusieurs études ayant montré une accumulation résiduelle de Gd dans le cerveau des patients en cas d'administrations répétées d'agents de contraste linéaires[251]. Les dépôts de Gd ont majoritairement été observés au niveau du noyau denté et du globus pallidus avec une forte corrélation entre le nombre d'administrations de Gd et l'intensité du signal observé[252]. Rarement, une accumulation de Gd au niveau d'autres structures cérébrales (substance noire, noyau rouge, thalamus, putamen, etc.) a été rapportée. Cependant, ces études ont été menées chez des patients ayant reçu un très grand nombre d'injections d'agent de contraste (>35 injections)[253,254]. Ces dépôts ne semblent pas être observés avec les agents de contraste macrocycliques[255,256]. Ces observations *in vivo* ont ensuite été confirmées en *post mortem* par des études de spectrométrie de masse[256].

Hormis le risque de dépôts intracérébraux de Gd, la principale toxicité liée à l'utilisation de ces agents de contraste est une néphrotoxicité. Chez les patients ayant une fonction rénale normale, l'utilisation de chélates de Gd n'est en général pas néphrotoxique. Cependant, de nombreux cas de néphrotoxicité ont été rapportés chez des patients insuffisants rénaux. Egalement, des cas de fibroses systémiques néphrogéniques ont été rapportées chez des patients insuffisants rénaux après administrations répétées de chélates de Gd[257].

2.3.5.2.3.2 Les molécules vectrices

Une molécule ayant une forte affinité pour les dépôts amyloïdes est l'Aβ lui-même. En effet, des études *in vitro* ont montré que des fragments d'Aβ ou dérivés d'Aβ radiomarqués étaient capables de lier les plaques amyloïdes, permettant leur visualisation sur coupes de tissus par autoradiographie. De même, *in vivo*, des dérivés fluorescents de l'Aβ sont capables de lier les plaques amyloïdes et de permettre leur visualisation par microscopie biphotonique[258]. Le groupe de Poduslo et coll. a donc utilisé une forme synthétique du peptide $A\beta_{40}$ humain comme vecteur pour amener le Gd au niveau des plaques amyloïdes. Ils ont ainsi pu visualiser *ex vivo* les plaques amyloïdes chez la souris APP/PS1, sur des images pondérées en T1 et en T2* (Figure 24)[259].
Cette stratégie a été reprise par Wadghiri et coll. qui ont réalisé les mêmes expériences *in vivo*[258]. À la suite de ces expériences, ces complexes ont été utilisés avec succès pour montrer l'efficacité d'une thérapie anti-Aβ chez la souris[260]. Le même groupe a également développé un complexe composé d'un peptide $A\beta_{42}$ couplé à des particules d'oxydes de fer, les USPIO. Ils ont ainsi pu imager les plaques amyloïdes chez la souris APP/PS1 grâce à une amélioration du contraste sur des images pondérées en T2*.
Cependant, une limite majeure de cette approche est la toxicité probable de l'Aβ[261]. Pour pallier ce problème, Sigurdsson et coll. ont utilisé une forme tronquée d'Aβ, non amyloïdogène, de seulement trente acides aminés[262] mais conservant une forte affinité pour l'$A\beta_{42}$[263].

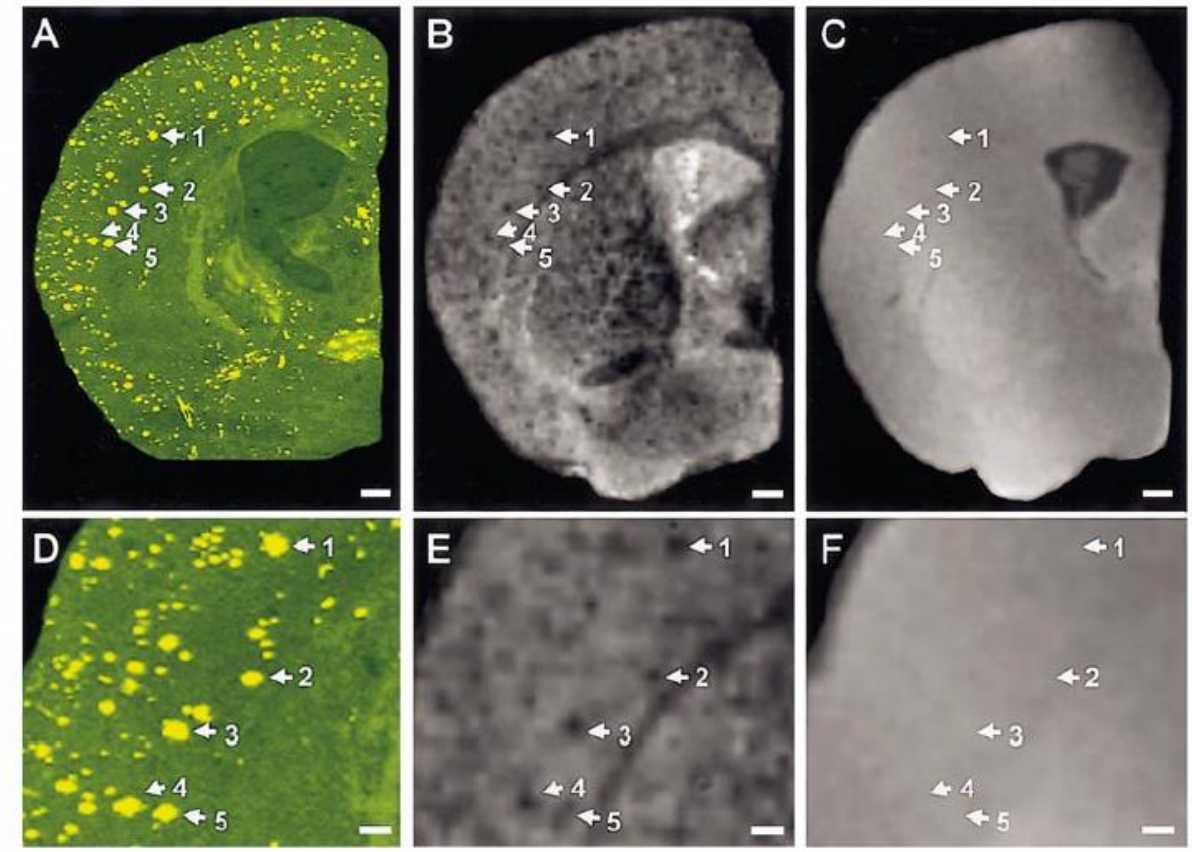


Figure 24 : Détection des plaques amyloïdes en *post mortem* dans le cerveau de souris APP/PS1 après injection d'Aβ_{40} couplé au Gd.

Les images IRM pondérées en T2* (B, E) et en T1 (C, F) ont été mises en registre avec les images histologiques correspondantes marquées par la Thioflavine-S (A, D). Des plaques amyloïdes marquées par la Thioflavine-S peuvent être observées sous forme de points hypointenses (en T2*) ou hyperintenses (en T1). La barre d'échelle équivaut à 250 µm (A-C) et 100 µm (D-F)[259].

Le Rouge Congo et la Thioflavine, colorants présentant une forte affinité pour la structure riche en feuillet β de l'Aβ fibrillaire, ont également été utilisés pour synthétiser des molécules vectrices. Higuchi et coll. ont utilisé un dérivé du Rouge Congo fluoré pour la détection des plaques amyloïdes en IRM du fluor. Ces résultats sont cependant controversés et la toxicité potentielle de ces molécules reste à explorer[264]. Plus récemment, Bort et coll. ont synthétisé plusieurs dérivés du PIB (analogue de la Thioflavine-T) couplés à différents chélates de Gd pour l'imagerie IRM des plaques amyloïdes. Malgré une bonne affinité de certains de ces composés pour l'Aβ et des propriétés relaxométriques intéressantes, leur faible taux de passage de la BHE rend difficile leur application en IRM *in vivo*. De façon intéressante, cette étude rend également compte de l'importance du chélate de Gd employé et de la molécule utilisée pour le lier à son vecteur[265].

Une troisième stratégie a été mise en œuvre par Matharu et coll. en 2015. Ce groupe a identifié des petits peptides, capables de lier l'Aβ fibrillaire avec une forte affinité et spécificité, par criblage de plusieurs peptides. L'affinité pour les formes oligomériques et fibrillaires d'$Aβ_{40}$ et d'$Aβ_{42}$ a été testée par Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) puis le peptide présentant la meilleure affinité (Kd = 15 nM) a été testé en *ex vivo* sur un modèle murin d'amyloïdose, la souris 5xFAD[266].

Une dernière stratégie est l'utilisation d'anticorps pour vectoriser les agents de contraste. Cependant, les anticorps classiques, du fait de leur taille importante, ne sont pas capables de traverser la BHE pour atteindre leur cible intracérébrale. Des dérivés d'anticorps ont donc été préférés. Par exemple, Poduslo et coll. ont utilisé le fragment variable (Fab_2) d'immunoglobulines G (IgG) dirigé contre l'Aβ couplé au Gd pour imager les plaques amyloïdes *ex vivo* chez la souris APP/PS1[267,268]. Le fait de ne conserver que la partie variable de l'anticorps, partie responsable de la reconnaissance d'un antigène spécifique, présente plusieurs avantages. Tout d'abord, un des principaux effets indésirables rencontré avec les anticorps thérapeutiques est le risque de réaction inflammatoire excessive et dangereuse pour le patient (ou l'animal de laboratoire). Le fait de supprimer le fragment Fc, principalement impliqué dans les fonctions effectrices des anticorps, réduit donc considérablement le risque de toxicité de la molécule. De plus, le fragment variable est trois fois plus petit qu'une IgG entière ce qui facilite son passage de la BHE. Cependant, ce passage reste extrêmement limité obligeant les auteurs à réaliser un couplage aux polyamines pour permettre la pénétration du complexe dans le parenchyme cérébral.

2.3.5.2.3.3 Passage de la BHE

Le principal défi dans le développement de molécules à visée cérébrale est le passage du sang vers le parenchyme cérébral, à travers la BHE. Cette barrière est un système de protection assurant une stabilité au milieu interne de l'encéphale et le protégeant des éléments extérieurs. Elle assure le passage sélectif de molécules du sang vers le parenchyme mais reste imperméable à la plupart des médicaments (environ 95% des molécules). Pour permettre aux agents de contraste étudiés d'atteindre leur cible intracérébrale, il a donc fallu développer des stratégies pour permettre leur passage de la BHE (Figure 25).

Depuis une quarantaine d'années, il est connu qu'une ouverture transitoire de la BHE peut être réalisée par injection intracarotidienne d'une solution hyperosmotique, telle qu'une solution de mannitol ou d'arabinose[269]. La pression osmotique étant supérieure dans le capillaire sanguin par rapport au milieu intracellulaire, il se produit une fuite d'eau de l'intérieur des cellules endothéliales

de la BHE vers le sang. Les cellules endothéliales rétrécissent ce qui induit une tension au niveau des jonctions serrées et leur ouverture. La cinétique d'ouverture de la BHE a été étudiée chez le rat, le macaque, le babouin et chez l'Homme par TEP à l'aide de traceurs tels que le [^{68}Ga]-EDTA ou le ^{82}Rb. Cette technique permet d'obtenir une ouverture réversible de la BHE pendant environ 10 minutes. Cependant, le manque de sécurité de cette méthode la rend difficilement applicable en clinique. Le principal risque est l'augmentation de la pression intracrânienne et la formation d'œdèmes intracérébraux. L'osmolarité du compartiment sanguin étant supérieure à celle du milieu intracérébral, le liquide passe du sang vers le parenchyme créant un œdème. Egalement, des micro-infarctus peuvent être occasionnés par la formation de cristaux de mannitol dans le sang. Cette stratégie a toutefois été utilisée chez l'Homme pour permettre le passage de molécules de chimiothérapie dans le cerveau. Plusieurs groupes ont utilisé cette méthode pour permettre le passage d'agents de contraste dans le cerveau de souris modèles de la MA[258,263,270].

Une autre approche est de modifier chimiquement les molécules pour augmenter leur passage de la BHE. La glycation des protéines est connue pour favoriser leur passage de la BHE[271]. Il a également été montré que le couplage aux polyamines permet d'augmenter le coefficient de partage de différents types de molécules (petites molécules chimiques, hormones, petits peptides, IgG)[272]. En effet, les polyamines apportent des charges positives supplémentaires à la molécule favorisant son passage par un mécanisme de transcytose induite par l'adsorption (Adsorptive-mediated transcytosis ou AMT). La transcytose est un mode de passage des molécules de haut PM à travers les membranes biologiques. Elle peut être initiée par l'interaction avec des récepteurs ou par adsorption. Dans le deuxième cas, le transport est initié par des interactions électrostatiques entre les charges positives de la molécule et les charges négatives présentes à la surface des cellules endothéliales de la BHE. En effet, à pH physiologique, la membrane luminale des cellules endothéliales présente une charge globale négative principalement due aux glycoaminoglycanes (notamment chondroïtine et héparane sulfate) du glycocalyx. La nature des vésicules impliquées dans le mécanisme d'AMT a peu été étudiée. La transcytose impliquerait soit des vésicules à clathrine, soit des cavéoles. En effet, les puits de clathrine présents au niveau de la surface luminale des cellules endothéliales sont chargés négativement et seraient donc capables d'interagir avec des molécules chargées positivement. Ce mode de transport dépend du cytosquelette et est énergie-dépendant[1].

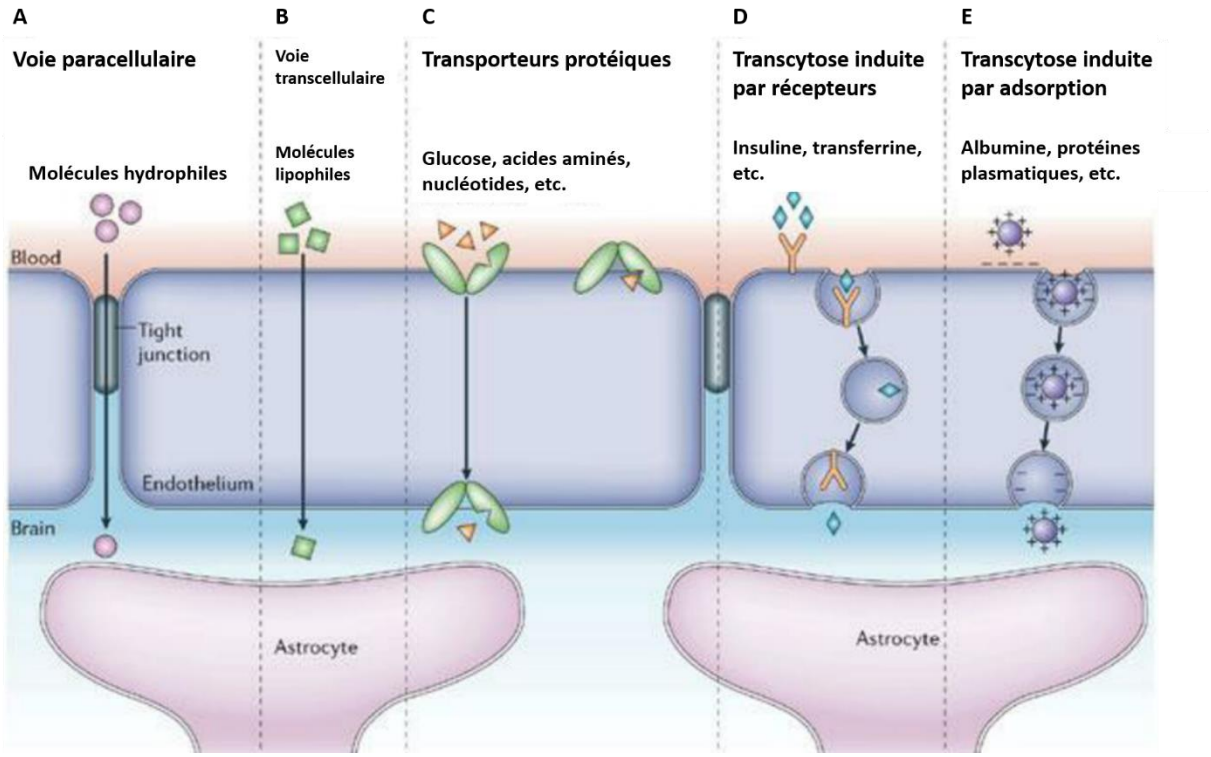


Figure 25 : Représentation schématique de la BHE et des différents mécanismes de passage de celle-ci

(A) Voie paracellulaire : les jonctions serrées entre les cellules endothéliales restreignent le passage des molécules hydrophiles et/ou de haut PM. (B) Voie transcellulaire : les petites molécules lipophiles peuvent traverser les membranes cellulaires de manière passive, dans le sens du gradient de concentration. (C) Transporteurs protéiques : transport dépendant de l'hydrolyse de l'ATP impliquant des transporteurs spécifiques (glucose, acides aminés, etc.). (D) Transcytose induite par un récepteur : la formation de la vésicule de transcytose est initiée par la liaison d'un ligand à son récepteur (transferrine, insuline, etc.). (E) Transcytose induite par l'adsorption : la formation de la vésicule de transcytose est initiée par des interactions électrostatiques entre certaines protéines cationiques et les charges négatives présentes à la surface des cellules endothéliales (albumine, etc.)[273].

Poduslo et coll. ont utilisé la cationisation pour permettre le passage de dérivés d'Aβ ou d'anticorps anti-Aβ couplés au Gd[259,267,268]. En effet l'Aβ est capable de traverser spontanément la BHE mais pas le Gd. Ce groupe a alors utilisé la capacité des polyamines à traverser la BHE pour permettre le passage du complexe. Ils ont utilisé la putrescine, polyamine endogène, couplée par liaison covalente au peptide Aβ. D'autres polyamines naturelles peuvent également être utilisées comme la spermine ou la spermidine. Cette modification a permis d'augmenter d'un facteur 2 le passage du complexe $Aβ_{40}$-Gd. Cette même stratégie a été mise en œuvre dans le cas d'un fragment d'IgG (Fab_2) anti-Aβ et a permis d'augmenter le passage de ce peptide 19 à 34 fois par rapport aux Fab_2 non couplés à la putrescine. Cette stratégie est cependant limitée par deux facteurs. Tout d'abord, le couplage ne doit

pas modifier l'affinité du vecteur pour sa cible. D'autre part, les polyamines présentent une toxicité à forte dose.

D'autres molécules cationiques peuvent être utilisées pour permettre le passage de composés d'intérêt dans le cerveau. Les peptides dérivés de la famille des molécules synB sont des peptides naturels antibactériens retrouvés chez la plupart des mammifères. Ces peptides ont une forte affinité pour les membranes cellulaires et sont capables de traverser la BHE par AMT du fait de leur structure cationique. Matharu et coll. ont alors couplé ces molécules avec des peptides de synthèse liant l'Aβ de façon à augmenter leur entrée dans le cerveau. Le passage de ce complexe dans le parenchyme s'est cependant révélé décevant. D'autres stratégies ont été testées par ce groupe tel que le couplage à une séquence dérivée de la pénétratine, séquence permettant l'entrée dans les cellules, ou le couplage à des résidus glycosylés. Cependant, les résultats obtenus étaient similaires à ceux observés avec le peptide synB[266].

Enfin, une dernière stratégie est d'encapsuler les molécules à vectoriser dans des nanoparticules. Ces vecteurs sont particulièrement intéressants puisque leur fonctionnalisation permet de cibler spécifiquement un organe ou un tissu. Dans le cas des maladies neurologiques, les nanoparticules peuvent permettre le passage de molécules d'intérêt dans le système nerveux central. Par exemple, il a été montré que des particules de poly(n-butyl cyanoacrylate) coatées avec du polysorbate étaient particulièrement efficaces pour faciliter le passage de la BHE de molécules d'intérêt. Ces nanoparticules ont été utilisées pour administrer un certain nombre de molécules dans le cerveau : peptides, doxorubicine, lopéramide, etc[274]. Dans l'imagerie de la MA, ces nanoparticules ont été utilisées par Koffie et coll. pour faire pénétrer divers fluorochromes et agents de contrastes dans le cerveau. Ils ont ainsi pu montrer que le passage du gadobutrol (Gadovist®) était multiplié par 500 chez la souris après encapsulation dans ces nanoparticules. L'augmentation du SNR observé après injection était cependant médiocre. Les auteurs ont expliqué ces résultats par le fait que la diffusion de l'agent de contraste hors de la nanoparticule était probablement trop lente[275]. Malgré cela, les nanotechnologies représentent un domaine en pleine expansion et particulièrement prometteur pour le développement de nouvelles modalités d'imagerie.

L'imagerie des lésions amyloïdes a donc connu des progrès considérables au cours des vingt dernières années. Un résumé de ces études est présenté dans le tableau 2.

Tableau 2 : Résumé des différents agents de contraste ciblés pour l'imagerie des plaques amyloïdes *in vivo*.

Vecteurs	Agent de contraste	Passage de la BHE	Référence
$A\beta_{40}$	Gd	Couplage polyamines (putrescine)	259
$A\beta_{40}$	Gd ou MION	Mannitol	258
Styrylbenzène (dérivé du Rouge Congo)	Fluorine (^{19}F)	Spontané	264,276
Fragment $(Fab)_2$ d'une IgG anti-$A\beta_{42}$	Gd	Couplage polyamines (putrescine)	267,268
Analogue de l'$A\beta_{30}$	Gd	Mannitol	263
Dérivé du curcumin	Fluorine (^{19}F)	Couplage curcumin	277
$A\beta_{42}$	USPIO	Mannitol	270
Rouge Congo	Gd	Couplage BSA	278
Nanoparticules coatées PBCA	Gd	Spontané	275
Peptides liant l'Aβ sélectionnés par ELISA	Gd	Couplage polyamines (pentamidine) Séquence hex-Darg Séquence bactérienne du vecteur synB Résidus glycosylés	266
Analogue de l'$A\beta_{30}$	Gd	Spontané	279
Nanoparticules coatées dicyano-(dimethylamino) naphthalène	SPIO	Spontané	280
Styrylbenzène (dérivé du Rouge Congo)	USPIO	Spontané	281
Peptide liant l'Aβ	USPIO	Couplage polyamines (putrescine) et PEG	282–284
Dérivé du PIB	^{17}O	Spontané	285

Un nombre important d'agents de contraste ciblant les plaques amyloïdes a donc été développé depuis une vingtaine d'années. Cependant, l'hypothèse de la cascade amyloïde est largement remise en cause actuellement. La DNF, deuxième lésion caractéristique de la MA, serait un biomarqueur alternatif pour l'imagerie de la MA. A notre connaissance, aucun agent de contraste IRM ciblant les DNF n'a encore été décrit dans la littérature.

La principale limite de toutes ces études reste le passage de la BHE, étape critique pour le développement de molécules à visée cérébrale. L'utilisation classique d'anticorps pour vectoriser spécifiquement des agents de contraste, n'est pas possible dans ce domaine. Cependant, depuis une vingtaine d'années, de nouveaux anticorps, retrouvés uniquement chez les animaux de la famille des camélidés, ont été découverts et connaissent un fort essor dans divers domaines. Notre groupe s'est intéressé à l'utilisation de ces molécules pour vectoriser des agents d'imagerie et plus particulièrement des agents de contraste pour l'imagerie IRM des lésions de la MA.

3 Les anticorps de camélidés

3.1 Rappel sur les anticorps conventionnels

Les anticorps conventionnels (immunoglobulines) sont composés de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères, identiques deux à deux, reliées par des ponts disulfures et des interactions principalement hydrophobes. Ces quatre chaînes forment alors un hétérotétramère de 150 kDa environ. Les chaînes légères sont constituées d'un domaine constant (CL) et d'un domaine variable (VL). Les chaînes lourdes sont constituées de trois domaines constants (CH1, CH2 et CH3) et d'un domaine variable (VH). Le couple VH-VL constitue le site de reconnaissance de l'antigène et est suffisant pour se lier à lui[286]. La région constante (Fc) est responsable des propriétés effectrices de l'anticorps notamment le recrutement de cellules immunitaires et l'activation du complément.

3.2 Les anticorps de camélidés

3.2.1 Généralités

Les camélidés présentent dans leur répertoire, en plus des anticorps conventionnels, des IgG particulières appelées Heavy Chain Antibodies (HCAb)[287]. La proportion d'HCAb dans le répertoire d'anticorps est variable selon les espèces. Ces anticorps représentent 50 à 80% des IgG totales chez le chameau, 50% chez le dromadaire, 50% chez l'alpaga et 25 à 45% chez le lama. Cette classe d'anticorps n'est retrouvée dans aucune autre espèce mammifère connue[288].

Ces anticorps sont dépourvus de chaînes légères et leurs chaînes lourdes comprennent un domaine CH1 de moins. De ce fait, ils présentent un PM bien inférieur à celui des IgG conventionnelles (environ 90 kDa pour les HCAb contre environ 150 kDa pour les IgG conventionnelles)[289]. Le site de liaison de l'antigène est alors uniquement constitué par le domaine VH relié au fragment Fc (CH2 et CH3) par un peptide charnière. Ce fragment est appelé VHH, nanobodies ou encore single-domaine antibody (Figure 26). Ce fragment d'anticorps peut être produit de façon isolée par la technique de l'ADN recombinant. Les raisons expliquant l'absence de chaînes légères et le raccourcissement des chaînes lourdes restent mal connues.

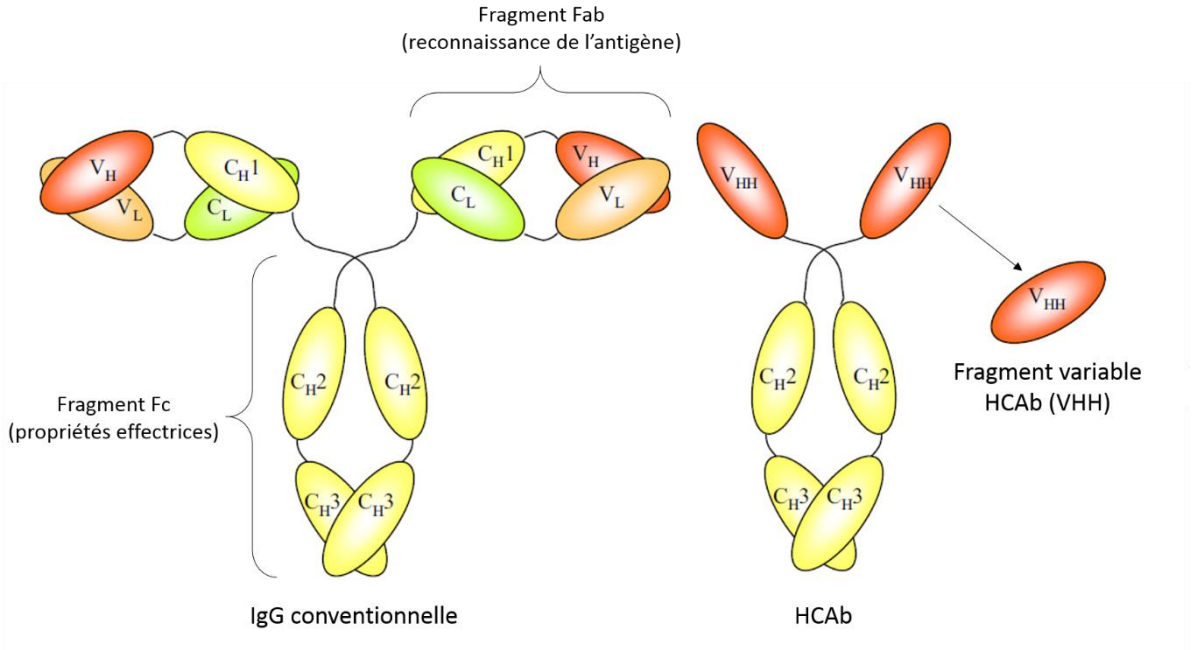


Figure 26 : Représentation schématique d'une IgG conventionnelle, d'une HCAb et d'un VHH recombinant.

Les domaines constants de la chaîne lourde sont représentés en jaune (CH1, CH2, CH3). Le domaine constant de la chaîne légère est représenté en vert (CL). Le domaine variable de la chaîne lourde est représenté en rouge (VH). Le domaine variable de la chaîne légère est représenté en orange (VL). Le fragment Fab des IgG conventionnelles et VHH des HCAb permet la reconnaissance de l'antigène. Ce dernier peut être produit de façon isolée[290].

3.2.2 Structure des VHH

La structure des VHH est proche de celle des VH conventionnels humains (famille VH3) avec 80% d'homologie de séquence et des structures tridimensionnelles superposables[291].

Comme le domaine VH conventionnel, le domaine VHH est composé de trois régions hypervariables (complementarity determining regions ou CDR) appelées CDR1, CDR2 et CDR3 et de quatre régions conservées (framework regions ou FR) appelées FR1, FR2, FR3 et FR4. La structure tertiaire des VHH est semblable à celle des VH humains. Elle est composée de neuf brins β organisés en deux feuillets β stabilisés par un pont disulfure entre FR1 et FR3 (Figure 27).

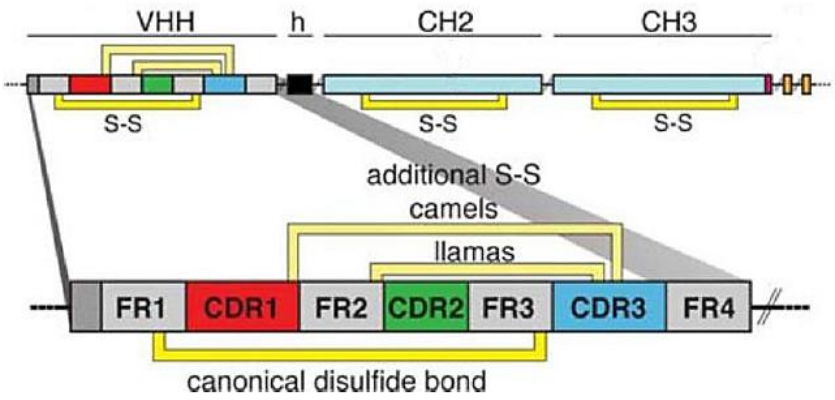


Figure 27 : Organisation de la séquence d'un VHH

Les régions FR et CDR sont représentées schématiquement. Un pont disulfure (canonical disulfide bond) est retrouvé dans toutes les espèces de camélidés. Un pont disulfure supplémentaire (additional S-S) est retrouvé dans certaines espèces[292].

Malgré des structures très similaires, quelques différences existent entre les VH humains et les VHH. Tout d'abord, dans les VH humains, le fragment FR2 est principalement constitué d'acides aminés hydrophobes très conservés au cours de l'évolution (Val47, Gly49, Leu50, Trp52). Ces acides aminés participent aux interactions hydrophobes permettant de relier la chaîne légère et la chaîne lourde. Dans les FR2 des camélidés, ces acides aminés sont substitués par des acides aminés hydrophiles. Ceci explique en partie leur meilleure hydrosolubilité et l'incapacité à lier une chaîne lourde (essentiellement par liaisons hydrophobes chez les autres mammifères)[289].

De plus, les régions CDR1 et CDR3 des VHH sont plus longues et plus flexibles. Certains VHH peuvent présenter des régions CDR3 jusqu'à 25 acides aminés plus longues que celles des VH conventionnels. Cela permettrait de compenser l'absence des régions CDR des régions VL (l'antigène est reconnu par trois CDR au lieu de six dans les anticorps conventionnels). De plus, le domaine de liaison de l'antigène adopte une structure tridimensionnelle convexe. Cette forme facilite le contact avec l'antigène et permet notamment au VHH d'atteindre des cibles difficilement atteintes par les anticorps classiques telles que des structures concaves comme une poche enzymatique[289].

3.2.3 Obtention des VHH

Les VHH sont généralement obtenus par clonage des gènes codant le domaine variable des HCAb à partir de lymphocytes B périphériques. Cela nécessite tout d'abord l'immunisation d'un camélidé avec l'antigène souhaité (généralement cinq à six injections hebdomadaires). De façon intéressante, il est possible d'injecter plusieurs antigènes à la fois. A partir d'un échantillon de sang, les lymphocytes B

sont purifiés. L'ARN total est ensuite obtenu à partir de ces lymphocytes B isolés. Cet ARN est converti en ADNc par RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) puis amplifié par PCR. L'ADNc codant les VHH est amplifié spécifiquement à l'aide des primers CH2FORTA4 et VHBACKA6 complémentaires des régions 3' et 5' des gènes codant les VHH. Les produits de PCR sont ensuite introduits dans un phagemide vecteur, codant un bactériophage, au niveau de l'extrémité 3' d'un des gènes codant les protéines de la capside virale. Après expansion bactérienne, une banque de phages exprimant à leur surface un clone de VHH est obtenue. L'utilisation de banques semi-synthétiques, synthétiques[293] ou provenant d'animaux naïfs[294] est également possible[295]. Ces banques sont intéressantes lorsque l'antigène d'intérêt présente une toxicité ou ne peut être obtenu en quantité suffisante pour l'immunisation. Ces banques doivent cependant être beaucoup plus larges (environ 10^9 clones) pour avoir une diversité suffisante permettant l'identification de VHH affins pour l'antigène d'intérêt. Dans le cas des banques obtenues à partir d'animaux naïfs, cela oblige à prélever des volumes de sang importants et provenant de plusieurs animaux.

Le VHH d'intérêt est ensuite sélectionné par criblage de cette banque de phage-VHH par la technique dite du « phage display » (Figure 28). L'antigène d'intérêt est immobilisé sur un support solide (surface plastique d'un tube, antigène biotinylé immobilisé sur des billes ou encore protéines exprimées à la surface de cellules)[292,296] et est incubé avec la banque de phage-VHH. Après incubation, le support est lavé de façon à éliminer les VHH non affins pour l'antigène. Les VHH d'intérêt sont élués, par digestion enzymatique ou modification du pH, puis réamplifiés en culture bactérienne. Après plusieurs cycles (généralement deux ou trois), le clone bactérien d'intérêt peut être sélectionné par ELISA et séquencé. D'autres techniques telles que le « yeast display » ou encore le « ribosome display » peuvent également être utilisées mais le « phage display » reste la méthode la plus courante[295,297].

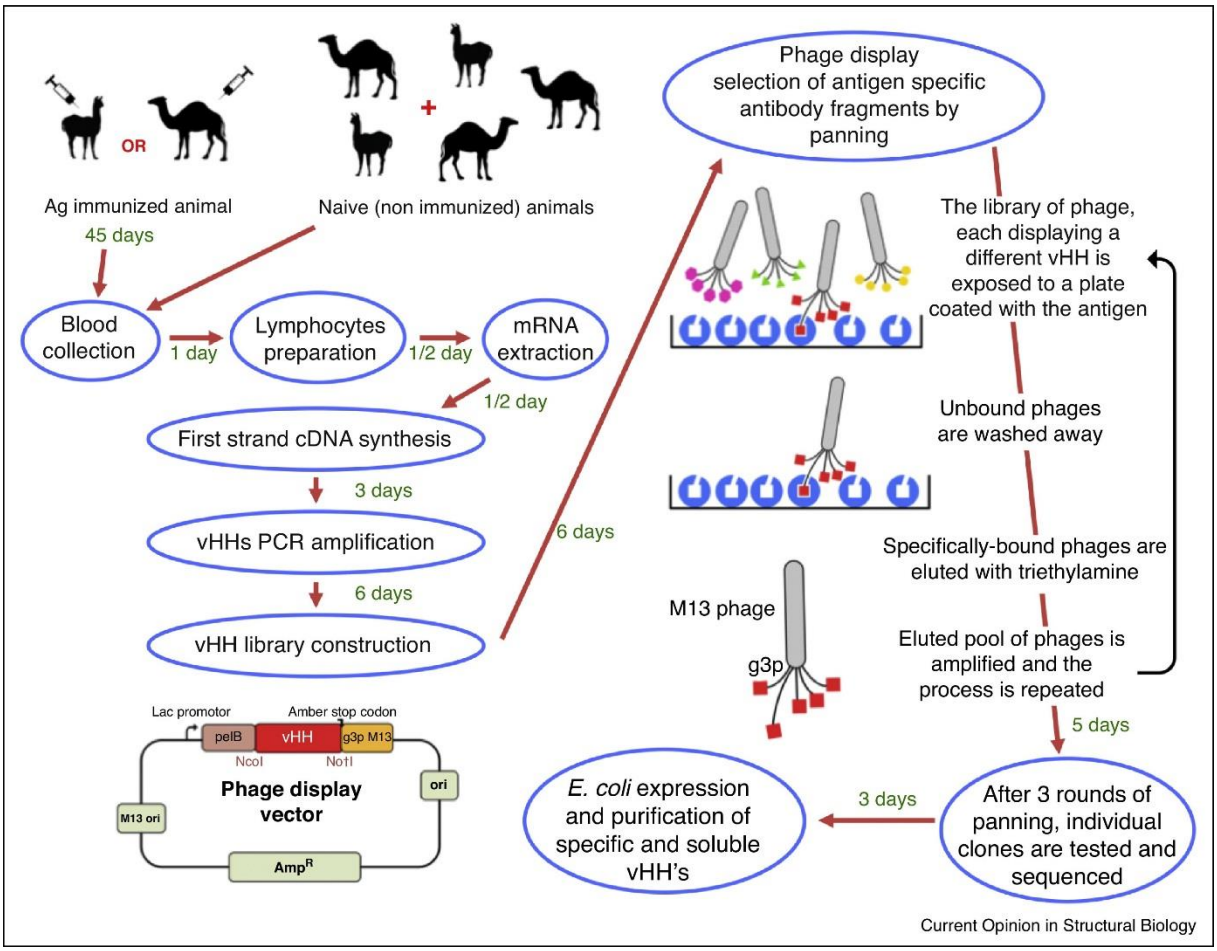


Figure 28 : Production des VHH.

Les VHH peuvent être sélectionnés à partir d'une banque issue d'un animal naïf ou immunisé contre l'antigène d'intérêt. Plusieurs méthodes de sélection peuvent être utilisées. Le phage display est la plus fréquente[297].

3.2.4 Intérêts des VHH par rapport aux anticorps conventionnels

Les VHH présentent un certain nombre de caractéristiques les différenciant des anticorps conventionnels et faisant de ces molécules d'excellents candidats pour le développement de biomarqueurs d'imagerie ciblés[298,299].

3.2.4.1 Haute affinité pour leur antigène sans réaction croisée

Les VHH présentent de façon générale une haute affinité et une haute spécificité pour leur antigène avec des constantes de dissociation de l'ordre du nanomolaire voire du picomolaire[295]. En effet, l'immunisation répétée de l'animal permet une maturation de l'affinité des VHH *in vivo*. De plus, comme développé précédemment, certaines différences structurelles, observées entre les VHH et les

VH des anticorps conventionnels, favorisent la reconnaissance de l'antigène (CDR1 et CDR3 des VHH plus « développées » que celles des anticorps conventionnels)[288].

3.2.4.2 Solubilité et stabilité

Les anticorps conventionnels posent fréquemment des problèmes d'agrégation ou d'adhésion aux surfaces, principalement du fait de l'existence de régions hydrophobes entre les différents domaines. Comme développé précédemment, dans les VHH, certains acides aminés hydrophobes très conservés dans les VH conventionnels, sont substitués par des acides aminés hydrophiles. Cela leur confère en général une bonne hydrosolubilité[291].

De plus, les VHH sont très stables face à la dénaturation thermique et chimique[300]. Ces molécules présentent en général une constante de dénaturation thermique (Temperature of mid-denaturation ou Tm) comprise entre 60°C et 80°C. Van der Linden et coll. ont montré que certains VHH conservent leur activité de liaison de l'antigène après incubation jusqu'à 90°C[301]. De façon intéressante, la dénaturation thermique de certains VHH est réversible. Après agrégation sous l'effet de la température, ces molécules sont capables de retrouver leur conformation initiale après quelques heures à température ambiante et sont alors fonctionnelles[302,303]. Egalement, il a été montré que les VHH sont stables après 24h d'incubation à 37°C dans du sérum de souris, ce qui suggère qu'ils sont stables *in vivo*[288].
Les VHH sont également résistants à la plupart des solvants organiques et des agents dénaturants comme l'urée, la guanidine ou encore l'isothiocyanate d'ammonium[301].

Enfin, une des principales limites à l'utilisation des anticorps thérapeutiques est le fait que leur administration ne peut se faire que par voie parentérale. Les VHH pourraient outrepasser cette limite puisque le groupe de Harmsen et coll. a développé un VHH résistant à la trypsine pouvant être utilisé par voie orale. Ce VHH, dirigé contre le fimbriae F4 d'*E. Coli*, conserve 41% de son activité de liaison après incubation *in vitro* dans du fluide gastrique et 90% de son activité de liaison après incubation dans du liquide jéjunal[304]. Bien que des manipulations génétiques relativement complexes soient nécessaires pour l'obtention de tels VHH, cette caractéristique est particulièrement intéressante pour le développement de VHH à visée clinique.

3.2.4.3 Pénétration dans les tissus et marquage rapide de leur cible

Du fait de leur faible PM (12 à 15 kDa) et de leur bonne hydrosolubilité, les VHH peuvent diffuser facilement dans la plupart des tissus. A l'inverse, les anticorps conventionnels ont un taux de diffusion limité du fait de leur PM important. Ils risquent alors de ne pas pénétrer dans la totalité des tissus notamment si la cible est située en profondeur (masse d'une tumeur solide par exemple)[305,306]. Par exemple, Perruchini et coll. ont montré qu'un VHH, dirigé contre la GFAP des astrocytes, était capable de diffuser sur une plus grande distance que des anticorps classiques, sur des tissus fixés de cortex humain (Figure 29)[307].

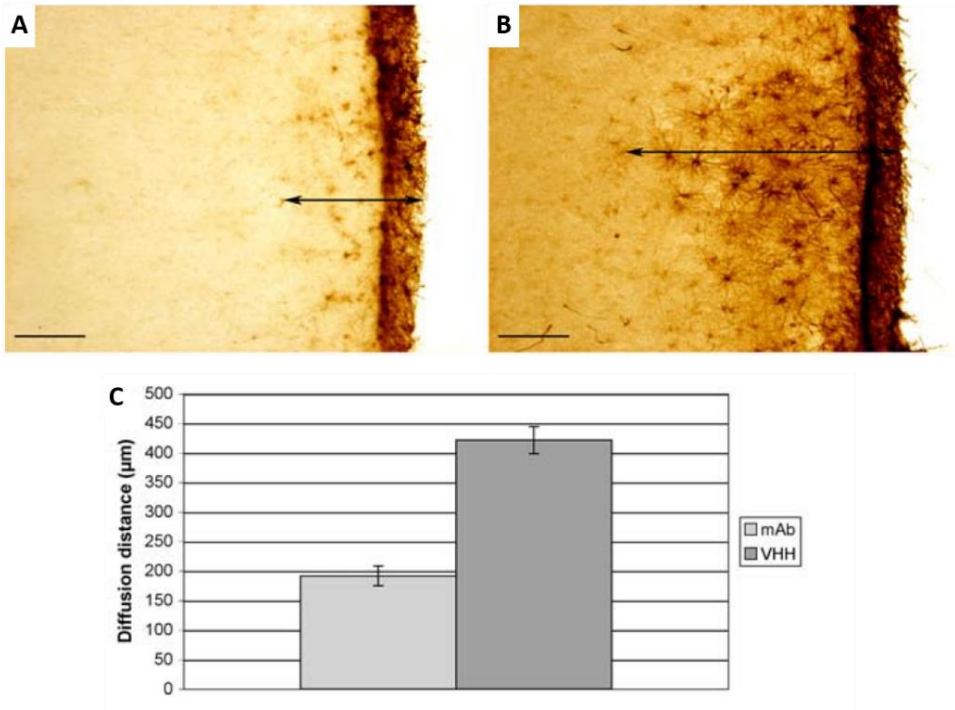


Figure 29 : Comparaison de la distance de diffusion d'un anticorps conventionnel (A) et d'un VHH (B) anti-GFAP dans une coupe de cortex frontal humain.

Les astrocytes sont marqués sur une plus grande distance (C) avec le VHH (B) qu'avec l'anticorps conventionnel (A) indiquant que le VHH a diffusé plus profondement dans le tissu[307].

Les anticorps conventionnels présentent une demi-vie plasmatique relativement longue (21 jours pour les IgG1). En imagerie, cela induit un bruit de fond plus ou moins important dans tout l'organisme après administration parentérale, réduisant donc le SNR. Du fait de leur taille réduite, les VHH sont principalement éliminés par le rein. Les VHH ont une demi-vie plasmatique courte (d'une dizaine de minutes à quelques heures) avec élimination rénale de la fraction non liée et accumulation rapide au niveau de leur cible. Le SNR est donc amélioré et le signal rapidement détectable après administration[299].

3.2.4.4 Faible immunogénicité

Une des difficultés majeures de l'utilisation des anticorps thérapeutiques est le risque de réaction immuno-allergique après administration. Les VHH sont faiblement immunogéniques du fait de leur forte homologie de séquence avec les VH humains (80% d'homologie), de leur faible taille et de leur demi-vie plasmatique courte. Il est également possible d'humaniser les VHH en remplaçant certains de leurs acides aminés pour diminuer encore leur immunogénicité potentielle. Enfin, l'absence de fragment Fc empêche l'activation d'un certain nombre de réponses immunitaires telles que l'activation du complément ou l'activation de cellules inflammatoires (notamment les macrophages). Ainsi, il n'est généralement pas constaté de réponse immunitaire après injection de VHH chez la souris ou chez l'Homme[288].

3.2.4.5 Passage de la BHE

Les anticorps conventionnels ont un PM trop important pour traverser la BHE. Les VHH, du fait de leur taille réduite, ont un meilleur potentiel pour franchir cette barrière. De plus, le passage des anticorps conventionnels est entravé par le fait qu'ils soient des ligands des récepteurs aux fragments Fc, présents à la surface des cellules endothéliales de la BHE et responsables de leur efflux du parenchyme cérébral vers le sang. Les VHH semblent donc être une alternative intéressante aux anticorps dans le cas de cibles intracérébrales.

En 2002, Muruganadam et coll. ont été les premiers à décrire un VHH capable de traverser spontanément la BHE *in vitro* et après injection IV chez la souris. Ce VHH, appelé FC5, était dirigé contre les cellules endothéliales cérébrales[294]. Ce même groupe a montré que FC5 était capable de traverser la BHE par liaison aux protéines glycosylées exprimées sur la face luminale des cellules endothéliales suivie d'une endocytose dépendante de la clathrine[308]. Le potentiel de transmigration de la BHE de ce VHH a ensuite été mis à profit pour vectoriser un opioïde (neuropeptide Y) dans le cadre d'un traitement de douleurs inflammatoires[309]. Les VHH ProAD12, ProAD13 ou encore PrioV3, dirigés respectivement contre l'$A\beta_{40}$, l'$A\beta_{42}$ et la protéine du Prion, ont également été décrits comme capables de traverser la BHE par transport actif dépendant de la clathrine[310].

Comme discuté précédemment, une autre stratégie, largement étudiée dans le cas des anticorps conventionnels, est l'utilisation des récepteurs naturellement présents à la surface des cellules endothéliales de la BHE. En effet, de nombreux récepteurs permettent le transport de molécules endogènes vers le cerveau par transcytose. Parmi eux, les récepteurs à la transferrine et à l'insuline

ont été les plus étudiés. Des anticorps dirigés contre ces récepteurs peuvent donc servir de transporteur pour amener des molécules d'intérêt dans le parenchyme cérébral[311]. Cette stratégie est parfaitement applicable aux VHH. Le groupe d'Emmerson et coll. a ainsi développé un VHH dirigé contre le récepteur polymérique aux IgG et permettant le passage de macromolécules par transcytose à travers un modèle cellulaire d'épithélium[312].

Enfin, la cationisation des IgG permet d'augmenter leur passage de la BHE via un mécanisme d'AMT[313,314]. Une hypothèse est donc que les VHH ayant un point isoélectrique (pI) basique, naturellement cationisés à pH physiologique, sont capables de traverser spontanément la BHE pour pénétrer dans le parenchyme cérébral. Cette hypothèse a été confirmée par deux études décrivant des VHH capables de traverser spontanément la BHE.

Le VHH ni3A, dirigé contre l'Aβ, est capable de traverser la BHE sur un modèle de BHE *in vitro*. Cette propriété semble dépendante de trois acides aminés, généralement absents de la structure des VHH, introduits en position N-terminale, lui conférant des charges positives supplémentaires. En effet, un autre VHH, ni8B, différent uniquement au niveau de ces trois acides aminés, voit son taux de transmigration diminuer drastiquement. Egalement, le VHH 3A2E, initialement incapable de traverser la BHE, voit son taux de passage augmenter quand il est fusionné avec la partie N-terminale de ni3A. Le mécanisme de passage de la BHE n'est pas complètement élucidé mais se produirait par transport actif[315].

Le VHH E9, dirigé contre la GFAP des astrocytes, présente un pI basique et est capable de traverser spontanément la BHE[316]. Ce VHH a été conjugué à la GFP et s'est montré capable de traverser la BHE *in vitro* et *in vivo* après injection intra-carotidienne chez la souris (Figure 30). L'influence de la taille et de la charge sur le passage de la BHE ont été étudiées *in vitro,* à l'aide deux VHH dérivés d'E9 : un dimère de même pI mais de PM double et un variant neutre de même PM. Le dimère, malgré un taux de passage réduit, était toujours capable de traverser la BHE contrairement au variant neutre. De plus, le passage du VHH E9 était inhibé par la présence de protamines sulfates hautement cationiques, connus pour inhiber le transport par AMT par saturation. Ces éléments sont en faveur d'un passage du VHH par un mécanisme d'AMT, dépendant du pI. Selon cette hypothèse, les VHH développés dans cette thèse ont un pI basique.

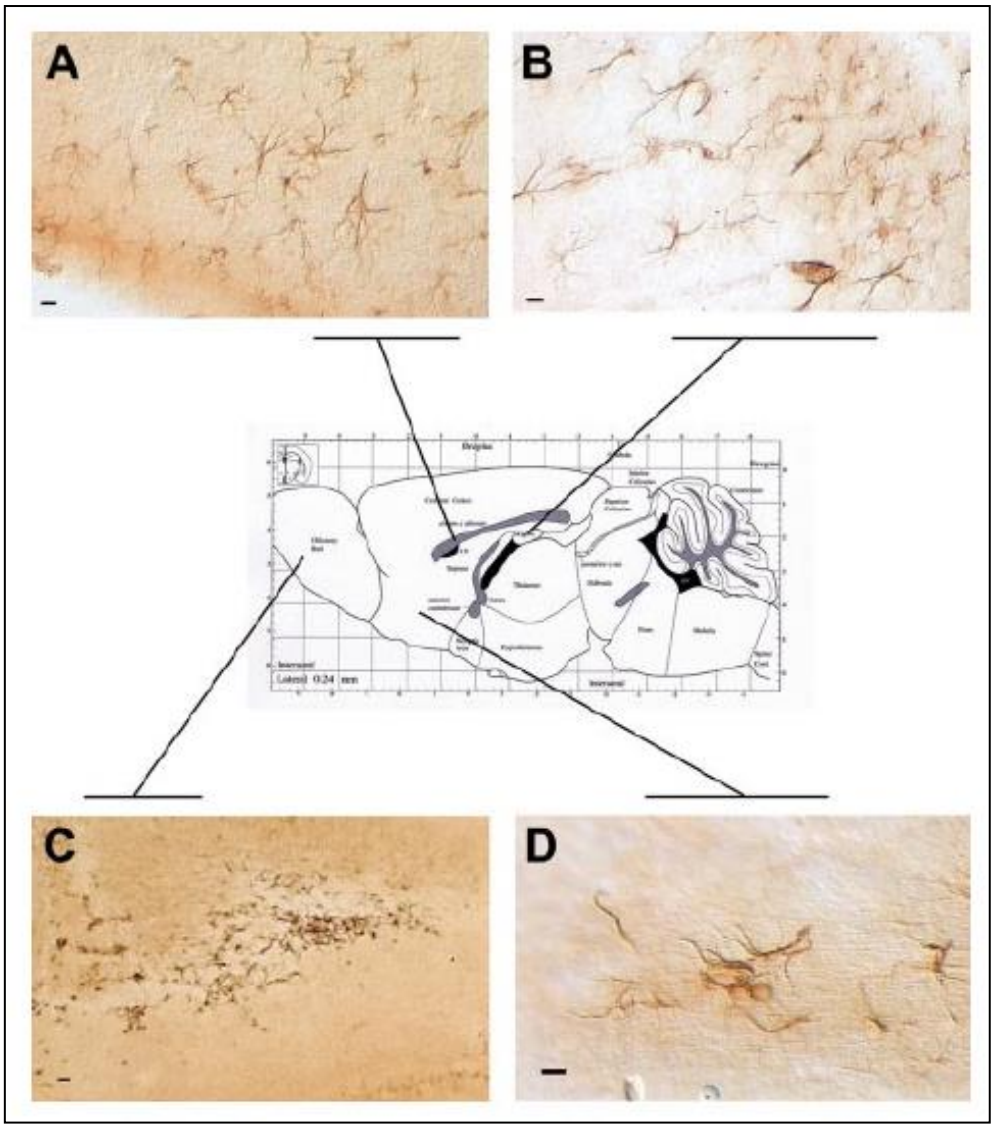


Figure 30 : Marquage des astrocytes par le VHH-E9 dirigé contre la GFAP, après injection intra-carotidienne chez la souris WT.

Le VHH E9 est retrouvé dans tout le cerveau : corps calleux (A), hippocampe (B), bulbes olfactifs (C) et cortex (D). Barre d'échelle = 10µm316.

3.2.5 VHH et maladies neurodégénératives

Comme décrit précédemment, le mépliement et l'agrégation de protéines sont à l'origine de nombreuses maladies neurodégénératives comme la MA (Aβ et Tau), la maladie de Parkinson (α-synucléine) ou les maladies à Prion comme la maladie de Creutzfeldt-Jakob. De nombreux VHH dirigés contre ces protéines pathologiques ont été développés pour l'imagerie, le traitement ou la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués. Nous ne traiterons ici que des VHH développés dans le contexte de la MA. Plusieurs VHH ciblant spécifiquement les différentes

conformations et espèces d'Aβ (monomères, oligomères et/ou fibrilles, $A\beta_{40}$ et/ou $A\beta_{42}$) ont été développés.

Les VHH B10[317] et KW1[318] sont dirigés contre les protofibrilles/fibrilles et les oligomères d'$A\beta_{40}$ respectivement. Ces VHH sont spécifiques de leurs cibles et ne reconnaissent pas d'autres stades d'agrégation de l'$A\beta_{40}$ ou les différentes formes d'$A\beta_{42}$. Ces molécules sont donc hautement spécifiques d'une conformation d'Aβ et peuvent être des outils intéressants pour l'étude de ses différents conformères. De plus, la liaison de ces VHH à leur cible respective inhibe la formation des fibrilles d'Aβ et leur agrégation, en bloquant leur maturation au stade de protofibrilles. Ces VHH permettraient également d'inhiber la liaison des oligomères à la surface des cellules et donc d'inhiber leur toxicité. KW1 a ainsi permis de rétablir la potentialisation à long terme (« long term potentiation » ou LTP) sur des coupes de cerveaux de souris après incubation en présence d'oligomères d'$A\beta_{40}$. Cependant, ces VHH ne permettent pas de dissoudre des agrégats d'$A\beta_{40}$ déjà formés[317,318].

Le VHH V31-1 reconnaît spécifiquement les monomères et les petits oligomères intracellulaires d'$A\beta_{42}$ *in vitro* ou sur des échantillons de tissus de patients atteints de la MA. Ce VHH s'est révélé capable d'inhiber *in vitro* la formation de fibrilles d'$A\beta_{42}$ permettant ainsi une diminution de la cytotoxicité après incubation sur cultures cellulaires[319].

PrioAD12 et PrioAD13 sont dirigés respectivement contre l'$A\beta_{40}$ et l'$A\beta_{42}$ et sont capables de marquer les plaques amyloïdes après incubation sur des tissus de patients atteints de la MA[310]. De façon intéressante, ce groupe a également développé un VHH dirigé contre la protéine du Prion (forme native et forme scrapie) appelé PrioV3. Ce VHH s'est révélé capable d'inhiber la réplication et l'accumulation de la protéine pathogène sur des cultures cellulaires (cellules ScG1) infectées par cette dernière. PrioV3 étant capable de lier la forme native comme la forme scrapie du Prion, le mécanisme d'action du VHH pourrait passer par un blocage de la conversion de la protéine native vers la conformation pathogène ou par une neutralisation de la protéine scrapie. Ce VHH s'est également révélé efficace pour bloquer l'accumulation de la protéine pathogène *in vivo* chez des souris inoculées avec des homogénats de cerveaux contaminés par cette dernière. Ces trois VHH présentent la particularité de pouvoir traverser les membranes cellulaires et la BHE *in vitro* et *in vivo* chez la souris. Le mécanisme impliqué semble être un transport actif par endocytose dépendant de la clathrine[310].

Enfin, le VHH ni3A reconnaît spécifiquement l'$A\beta_{42}$[315] et se lie préférentiellement à l'Aβ vasculaire après incubation sur des tissus de patients atteints de la MA. Ce VHH est capable de traverser la BHE sur un modèle de BHE *in vitro*.

3.2.6 Utilisation des VHH pour l'imagerie *in vivo*

L'imagerie moléculaire *in vivo* nécessite des traceurs marqués permettant de visualiser des molécules ou un processus physiopathologique. Un traceur idéal doit être stable *in vivo*, être capable de lier sa cible avec une forte affinité et spécificité, être rapidement éliminé de la circulation générale pour induire un bon SNR, diffuser facilement dans les tissus et être non toxique. Les VHH réunissent la plupart de ces caractéristiques. Les VHH ont donc été utilisés comme traceurs pour plusieurs modalités d'imagerie : TEP, SPECT (Single photon emission computed tomography) et imagerie optique.

La majorité des VHH développés aujourd'hui pour l'imagerie sont utilisés comme radiotraceurs pour l'imagerie TEP et SPECT, du fait de la forte sensibilité de ces techniques et de la possibilité de réaliser de l'imagerie quantitative. Ces techniques nécessitent le marquage du VHH avec un radioisotope tel que le ^{18}F (demi-vie de 110 minutes), le ^{68}Ga (60 minutes), le ^{64}Cu (12 heures) ou le ^{89}Zr (3,3 jours) pour la TEP ou la ^{99m}Tc pour la SPECT. L'utilisation de ces traceurs s'applique essentiellement au domaine de la cancérologie et de l'immunologie. En cancérologie, des VHH ciblant l'Epidermal growth factor receptor (EGFR), le Vascular endothelial growth factor (VEGF), les molécules de la classe 2 du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC-II), PD-L1, les récepteurs CD11b ou CD8, ont été développés[320–324]. Ces traceurs se sont révélés efficaces pour la détection des antigènes tumoraux et pour le suivi de la réponse inflammatoire. En clinique, le premier essai chez l'Homme utilisant des VHH radiomarqués a été mené par Ablynx en 2016, pour l'imagerie du cancer du sein métastasé. Ces VHH dirigés contre l'antigène HER2 se sont révélés efficaces pour l'imagerie des métastases HER2+ sans effets indésirables notables[324]. Cet examen s'inscrit dans une démarche de médecine personnalisée et pourrait permettre de sélectionner les patientes pouvant bénéficier d'un traitement anti-HER2. Ce VHH est actuellement entré en phase II. Le tableau 3 présente les différents VHH actuellement en essai clinique pour l'imagerie en cancérologie.

Tableau 3 : Résumé des différents VHH testés en clinique pour l'imagerie des cancers[325].

Antigène cible	Essai clinique	Développeur
HER2 (^{131}I-VHH)	Phase I	Camel-IDS NV, TBM program
HER2 (^{68}Ga-VHH)	Phase II pour imagerie TEP/SPECT	QVQ holding BV
VEGF/Ang2	Phase I	Boehringer Ingelheim
RANKL	Phase I	Ablynx
ADAMTS-5	Phase I	Merck
PD-L1 (^{99}Tc)	Phase I	Merck

3.2.7 Les VHH développés dans cette étude

Au cours de cette thèse, deux VHH dirigés respectivement contre le peptide $A\beta_{42}$ (VHH appelé R3VQ) et la protéine Tau hyperphosphorylée (VHH appelé TauA2) ont été développés. Ces VHH ont été sélectionnés en fonction de leur affinité pour leurs cibles mais également de leur pI basique. En effet, notre hypothèse est que les VHH de pI basique sont capables de traverser spontanément la BHE[316].

Concernant le VHH anti-Aβ, R3VQ, l'épitope reconnu est localisé au centre de la séquence de l'Aβ, entre les acides aminés 17-28. Ce VHH se lie à sa cible avec une forte affinité (Kd = 16 nM). Sa capacité à reconnaître sa cible a été vérifiée par ELISA et par IHC. R3VQ est capable de marquer les plaques amyloïdes et l'AAC sur des coupes de cerveaux de souris PS2/APP et APP/$PS1_{dE9}$, modèles d'amyloïdose, et sur des coupes de cerveaux humains issus de patients atteints de la MA (Figure 31).

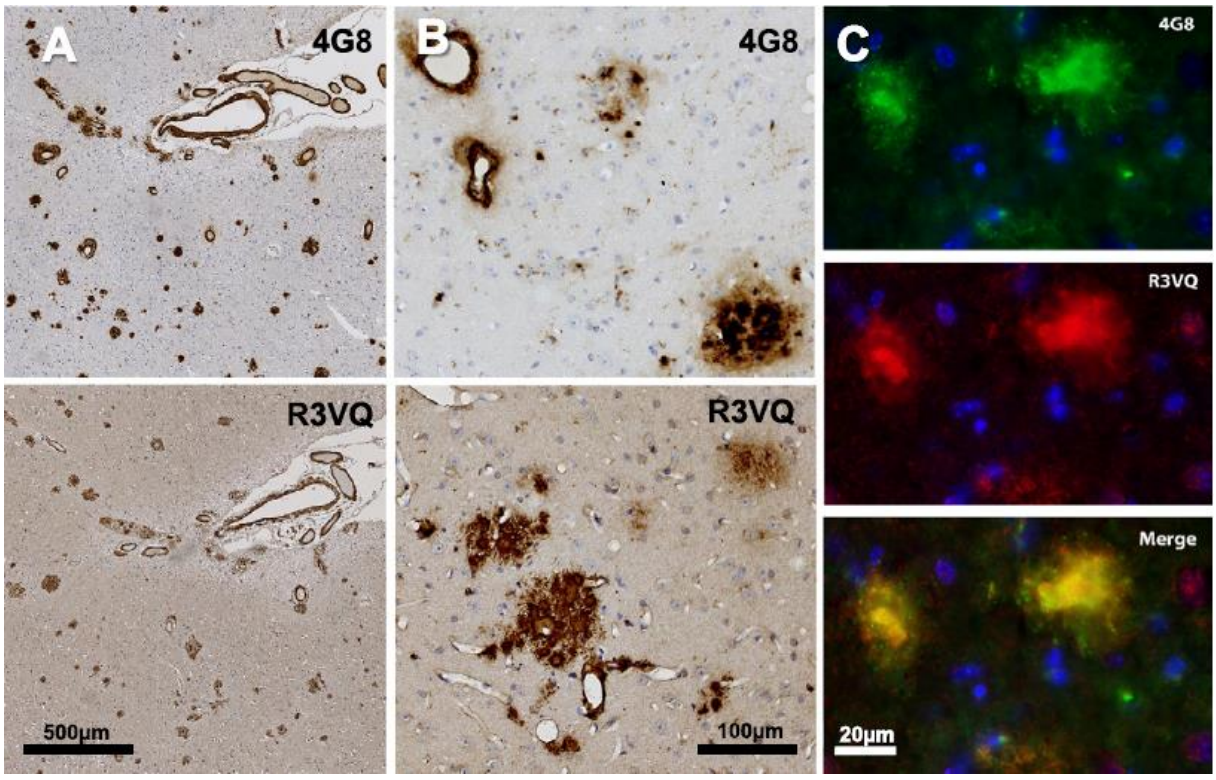


Figure 31 : Détection des VHH R3VQ par IHC après application directe sur des coupes de cerveaux de patients atteints de la MA (A) et de souris PS2/APP (B-C).

Le marquage des VHH R3VQ, obtenu avec l'anticorps dirigé contre leur tag 6-His (A-B, 2ème ligne), est comparé au marquage obtenu avec l'anticorps 4G8 (A-B, 1ère ligne), anticorps anti-Aβ de référence. Un marquage des plaques amyloïdes et de l'AAC a été observé sur les tissus humains et murins après incubation directe avec le VHH R3VQ. La spécificité du marquage a été montrée par un double marquage R3VQ et 4G8 en immunofluorescence (C)[326].

Concernant le VHH anti-Tau hyperphosphorylée, TauA2, l'épitope reconnu est localisé au niveau de la sérine 422 phosphorylée de la protéine Tau. Ce VHH ne reconnaît pas la protéine Tau sous forme non phosphorylée. TauA2 reconnaît sa cible avec une forte affinité (Kd = 17 nM). Sa capacité à reconnaître la protéine Tau hyperphosphorylée a été vérifiée par ELISA et par IHC. TauA2 est capable de marquer les DNF dans le soma des neurones ainsi que dans les neurites dystrophiques, sur des coupes de cerveaux de souris Tg4510, modèles de tauopathie et sur des coupes de cerveaux humains issus de patients atteints de la MA (Figure 32).

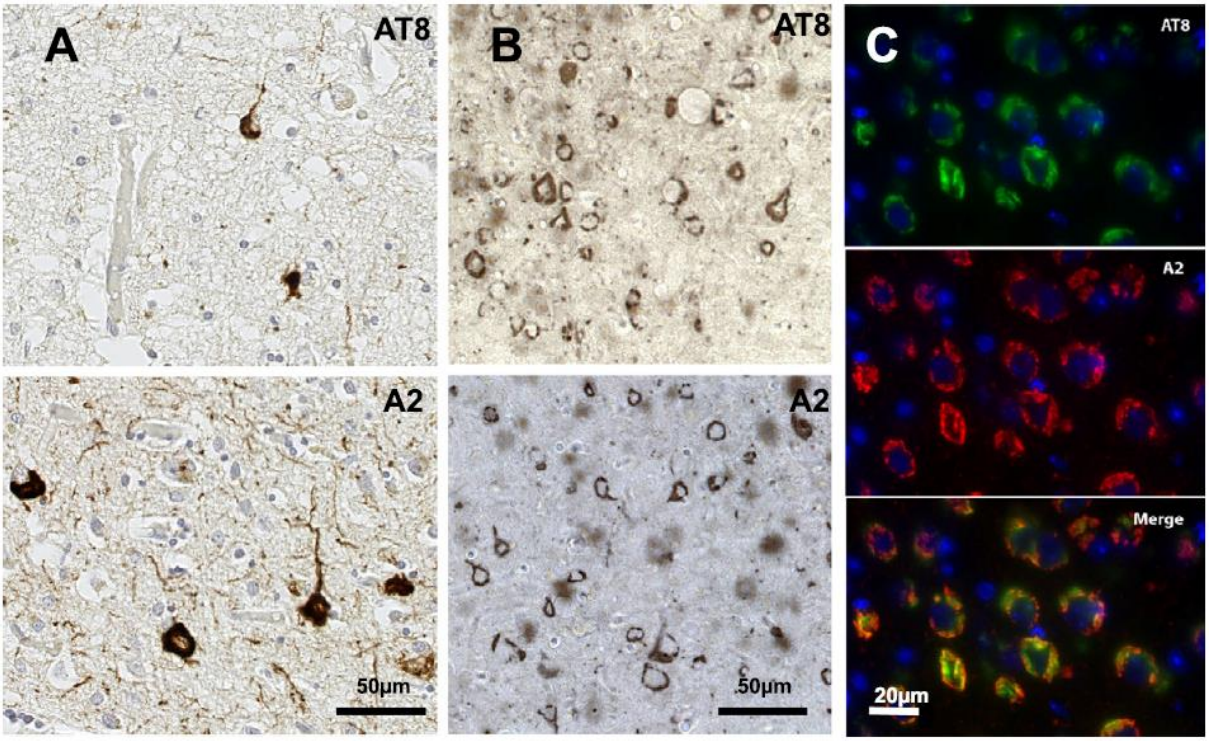


Figure 32 : Détection des VHH TauA2 par IHC après application directe sur des coupes de cerveaux de patients atteints de la MA (A) et de souris Tg4510 (B-C).

Le marquage des VHH TauA2, obtenu avec l'anticorps dirigé contre leur tag 6-His (A-B, 2ème ligne), est comparé au marquage obtenu avec l'anticorps AT8, anticorps anti-Tau, utilisé comme référence (A-B, 1ère ligne). Un marquage des DNF a été observé sur les tissus humains et murins après incubation directe avec le VHH Tau2. La spécificité du marquage a été montrée par un double marquage TauA2 et AT8 en immunofluorescence (C)[326].

Ces VHH ont été sélectionnés de façon à présenter un pI basique. Ils possèdent un pI de 8,3 pour R3VQ et 9,5 pour TauA2, leur conférant théoriquement la capacité de traverser la BHE. Pour démontrer la capacité de ces VHH à traverser spontanément la BHE, ces vecteurs ont été couplés à un fluorochrome AlexaFluor 488 (AF488) de façon à permettre leur détection *in vivo* par microscopie biphotonique après injection IV. Dans ces expériences, des souris PS2/APP pour le R3VQ et Tg4510

pour le TauA2, âgées de 24 mois et 8 mois respectivement, ont été utilisées. L'intégrité de la BHE de ces animaux a été vérifiée au préalable par IRM après injection IV de Dotarem®.

Concernant R3VQ, après injection IV, une extravasation massive du VHH fluorescent avec une diminution rapide de la fluorescence vasculaire a été observée dès la première minute post-injection et jusqu'à 20 minutes après. Cette observation suggère une demi-vie vasculaire courte du R3VQ, d'environ 10-20 minutes. Un marquage des plaques amyloïdes a pu être observé dès 30 minutes après injection IV. Un marquage vasculaire, reflétant la liaison de R3VQ à l'AAC, a également été observé. Ce marquage était présent jusqu'à 3,5 heures post-injection, suggérant une demi-vie cérébrale longue. Par la suite, la présence des VHH dans les tissus cérébraux de ces souris a également été montrée par IHC (Figure 33).

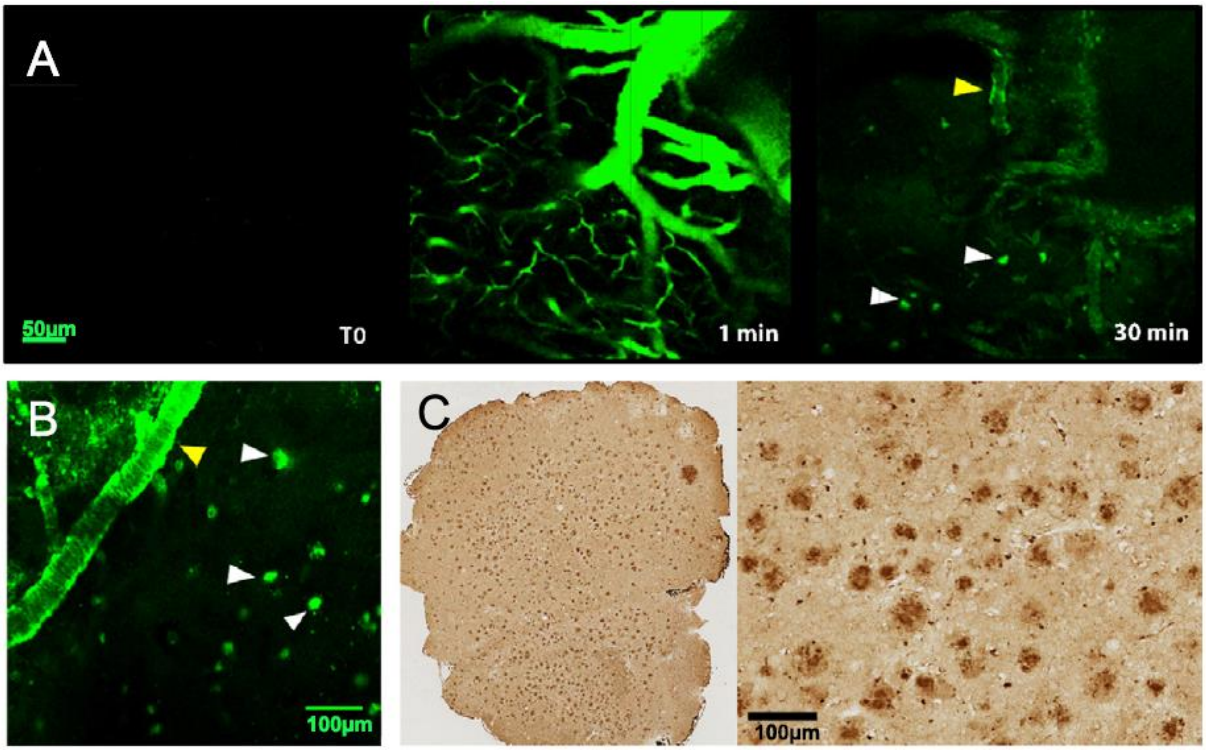


Figure 33 : Imagerie biphotonique *in vivo* après injection IV de VHH R3VQ-S-AF488 chez une souris PS2/APP.

(A) Aucun marquage n'a été observé avant injection (T0). Immédiatement après injection, une forte fluorescence vasculaire a été observée (1 min). 30 minutes post-injection, la fluorescence vasculaire était redevenue presque nulle et un marquage des plaques amyloïdes (flèches banches) et de l'AAC (flèche jaune) était observé. (B) Ce marquage a été observé au niveau des plaques amyloïdes (flèches blanches) et des vaisseaux sanguins (flèche jaune) jusqu'à 3,5 heures post-injection. (C) Après sacrifice, la présence des VHH dans les tissus cérébraux a été démontrée par IHC à l'aide de l'anticorps anti-6-His. Les VHH ont été retrouvés dans l'ensemble du cerveau de ces animaux, liés aux plaques amyloïdes et à l'AAC[326].

Concernant le TauA2, immédiatement après injection IV, une diminution rapide de la fluorescence vasculaire a été observée. Un marquage des DNF a pu être observé 2 heures post-injection. Ce marquage était présent jusqu'à 3 heures post-injection, suggérant une demi-vie cérébrale longue. Par la suite, la présence des VHH dans les tissus cérébraux de ces souris a également été montrée par IHC (Figure 34).

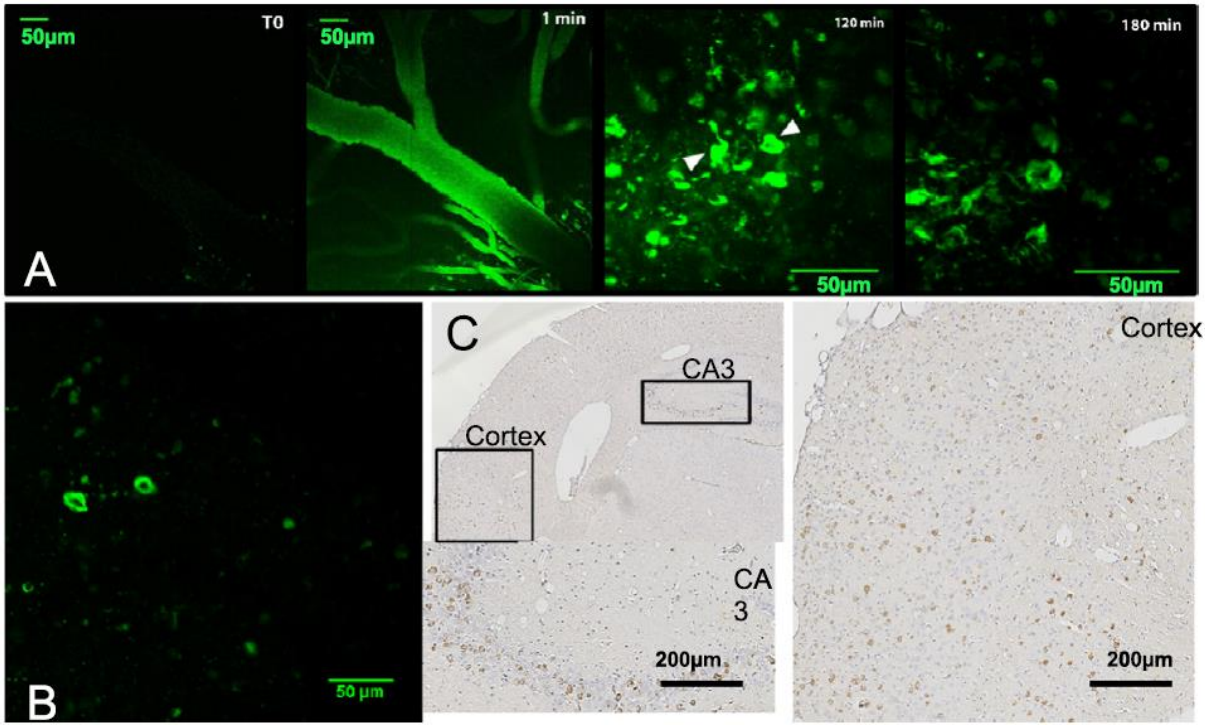


Figure 34 : Imagerie biphotonique *in vivo* après injection IV de VHH TauA2-S-AF488 chez une souris Tg4510.

(A) Un léger marquage par autofluorescence a été observé avant injection (T0). Immédiatement après injection, une forte fluorescence vasculaire a été observée (1 min). 120 minutes post-injection, la fluorescence vasculaire était redevenue presque nulle et un marquage des DNF (flèches blanches) était observé. L'intensité maximale de marquage a été obtenue 180 minutes post-injection. (B) Ce marquage était observé au niveau des DNF jusqu'à 4h post-injection. (C) Après sacrifice, la présence des VHH dans les tissus cérébraux a été démontrée par IHC à l'aide de l'anticorps anti-6-His. Les VHH ont été retrouvés dans l'ensemble du cortex et de l'hippocampe de ces animaux, liés aux DNF[326].

Actuellement, la pharmacocinétique des VHH n'est pas complètement élucidée. Les données de pharmacocinétique disponibles proviennent d'une étude menée sur le VHH R3VQ natif couplé à un radioisotope (iodine ^{125}I). Dans cette étude, le ^{125}I-R3VQ a été injecté par voie IV, à la dose unique de 10 mg/kg (soit 5 fois moins que dans les études de microscopie biphotonique), à des souris WT (n = 4 ; 19 mois) et à des souris PS2/APP, modèle d'amyloïdose (n = 17 ; 20 mois). Quelques minutes après

injection, plus de la moitié de la dose injectée était éliminée de la circulation générale, indiquant que la demi-vie vasculaire du I^{125}-R3VQ est inférieure à 5 minutes. Dans le sang, chez les souris WT et PS2/APP respectivement, 30,8 et 37,5 % de la dose injectée étaient détectés 5 minutes après injection. L'élimination du VHH était donc légèrement plus lente chez les souris PS2/APP par rapport aux souris WT. L'élimination du ^{125}I-R3VQ s'est révélée presque exclusivement rénale (tableau 4). Concernant le passage de la BHE, après injection IV, la quantité de ^{125}I-R3VQ détectée dans le cerveau des souris PS2/APP a augmenté graduellement, depuis l'injection et jusqu'à 2 heures après. La quantité maximale retrouvée dans le cerveau de ces souris correspondait à 0,50 ± 0,06 % de la dose injectée par gramme, 2 heures après injection. La radioactivité cérébrale a ensuite décru progressivement jusqu'à atteindre la valeur de 0,24 ± 0,03 %DI/g, 6 heures post-injection. Une quantité similaire de radioactivité était également retrouvée chez les souris WT 6 heures post-injection (tableau 4).

Tableau 4 : Quantité de ^{125}I-R3VQ retrouvée au niveau de différents organes, après injection IV chez des souris PS2/APP ou WT, en fonction du temps. Les résultats sont exprimés en % de la dose injectée/gramme.

	0,25H-PS2APP	1H-PS2APP	2H-PS2APP	4H-PS2APP	6H-PS2APP	6H -WT
Sang	7.81 ± 1.31	3.69 ± 0.33	3.29 ± 0.34	3.27 ± 0.30	2.46 ± 0.28	2.71 ± 0.17
Foie	1.48 ± 0.14	1.11 ± 0.24	0.92 ± 0.18	0.89 ± 0.08	0.66 ± 0.04	0.67 ± 0.05
Reins	104.38 ± 4.59	18.99 ± 2.49	10.13 ± 1.02	7.32 ± 1.33	4.50 ± 0.43	6.01 ± 0.26
Cerveau	0.12 ± 0.02	0.42 ± 0.02	**0.50 ± 0.06**	0.34 ± 0.04	**0.24 ± 0.03**	**0.26 ± 0.02**

En conclusion, les deux VHH présentés ici reconnaissent spécifiquement les deux lésions caractéristiques de la MA (plaques amyloïdes et DNF respectivement), dans des tissus murins de modèles de la MA comme dans des tissus humains. Théoriquement, leur pI basique leur confère la capacité de traverser spontanément la BHE. Leur capacité à traverser cette barrière a été montrée par des expériences de microscopie biphotonique et par IHC, à l'aide de VHH couplés à un fluorochrome AF488. Ces VHH se sont révélés capables de traverser spontanément la BHE, de diffuser dans le parenchyme cérébral et de marquer spécifiquement les lésions caractéristiques de la MA.

Enfin, le but de ce projet est de pouvoir détecter *in vivo*, par IRM, les lésions de la MA à l'aide d'agents de contraste vectorisés. Les VHH ont donc été couplés à des chélates de Gd pour permettre leur détection après injection systémique.

4 La voie intrathécale

4.1 Anatomie des méninges

La moelle épinière est logée dans le canal vertébral de la colonne vertébrale et est protégée par les méninges. Ces dernières sont trois membranes de tissus conjonctifs et se nomment, de l'extérieur vers l'intérieur, la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère. L'arachnoïde, méninge intermédiaire, est une membrane souple séparée de la pie-mère par l'espace sous-arachnoïdien rempli de LCS (Figure 35).

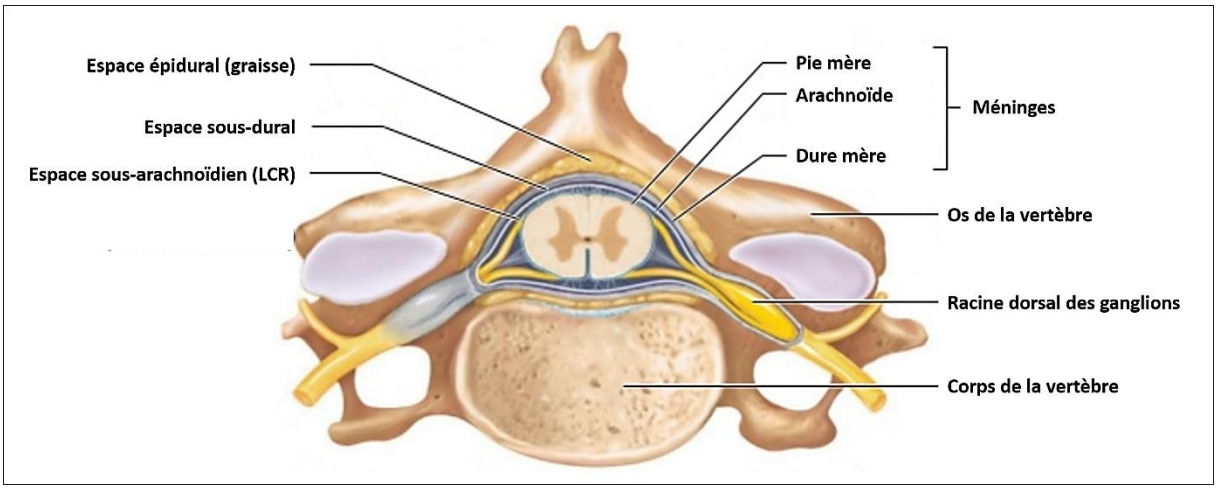


Figure 35 : Représentation des méninges au niveau de la moelle épinière.

Le LCS est contenu dans l'espace sous-arachnoïdien[327].

Le LCS protège l'encéphale et la moelle épinière des chocs mécaniques et autres traumatismes. Il contribue également au transport des éléments nutritifs et d'autres molécules entre diverses parties de l'encéphale. Le LCS circule autour du système nerveux central, dans l'espace sous-arachnoïdien, les citernes et les ventricules cérébraux. Les citernes sont des cavités formées par l'élargissement de l'espace sous-arachnoïdien, principalement autour du cervelet (*Cisterna Magna*), du tronc cérébral (*Cisterna Pontis et Interpeduncularis)* et à la base du cerveau (*Cisterna Suprasellar* et *Quadrigeminal*). La majorité du LCS est produite au niveau des plexus choroïdes, présents au niveau du toit du 4ème ventricule et de la jonction entre les ventricules latéraux et le 3ème ventricule. Les deux ventricules latéraux communiquent avec le 3ème ventricule par le foramen interventriculaire (trou de Monro). Ce dernier est relié au 4ème ventricule via l'aqueduc de Sylvius. Chez l'adulte, le volume total de LCS est d'environ 150 mL et est renouvelé environ toutes les 8 heures. Une fois produit, le LCS circule librement dans les ventricules. Il passe ensuite dans le canal central de la moelle épinière et dans l'espace sous-arachnoïdien par les ouvertures latérale et médiane du 4ème ventricule. Dans l'espace sous-

arachnoïdien, le LCS est en contact avec la surface externe de l'encéphale et de la moelle épinière. Il est ensuite drainé vers le sang au niveau des sinus de la dure-mère afin de maintenir un volume constant (Figure 36)[327].

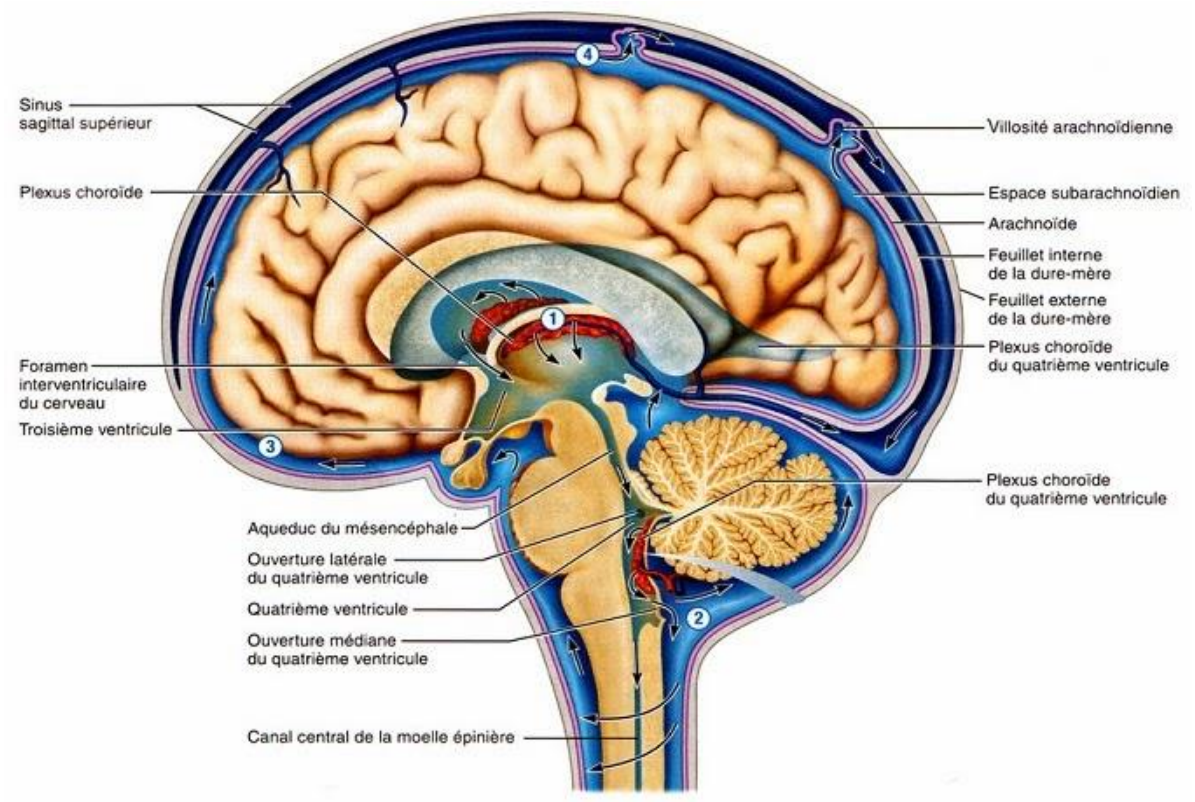


Figure 36 : Circulation du LCS chez l'Homme.

Le LCS est produit au niveau des plexus choroïdes des ventricules cérébraux (1). Le LCS passe dans le canal central de la moelle épinière par les ouvertures médiane et latérale du 4ème ventricule (2) et dans l'espace sous-arachnoïdien (3). Le LCS est absorbé par les sinus de la dure-mère par les villosités arachnoïdiennes (4)[327].

Récemment, ce modèle a été remis en cause par Iliff et Coll. qui ont montré l'existence d'un système glymphatique cérébral chez la souris et le rat[328]. Le LCS ne circule pas uniquement dans l'espace sous-arachnoïdien et les ventricules cérébraux. Une partie du LCS draine le parenchyme cérébral avant d'être réabsorbé. Ce système semble être impliqué dans la clairance des solutés du cerveau via des échanges entre le liquide interstitiel cérébral et le LCS. Le système glymphatique cérébral se compose de trois processus principaux. L'influx de LCS dans le parenchyme se produit le long des espaces périvasculaires des artérioles pénétrantes originaires de la pie-mère. Le LCS pénètre ensuite dans le parenchyme cérébral à travers les pieds astrocytaires de la BHE, entraînant avec lui les solutés de l'espace interstitiel. Cette voie trans-parenchymateuse est hautement dépendante du transport de l'eau et des canaux d'aquaporine-4 présents au niveau des pieds astrocytaires. Enfin, le LCS est drainé le long des espaces péri-veineux[329].

4.2 La voie intrathécale

4.2.1 Définition

Une injection intrathécale (IT) correspond à une injection dans l'espace sous-arachnoïdien directement dans le LCS. L'agent injecté pourra alors diffuser librement dans le LCS et atteindre l'encéphale. Cette voie permet donc de s'affranchir du passage de la BHE pour l'administration de molécules à visée cérébrale ou médullaire. De plus, cette voie d'administration locale permet de réduire et/ou contrôler d'éventuels effets indésirables systémiques tout en atteignant une forte dose locale au niveau de la cible de la molécule à délivrer.

4.2.2 Applications de la voie intrathécale

4.2.2.1 Administration de molécules thérapeutiques

La voie IT est principalement utilisée pour la rachianesthésie, anesthésie locale de la moitié inférieure du corps. Des anesthésiques locaux comme la bupivacaïne ou la ropivacaïne peuvent être utilisés en cas de chirurgie des membres inférieurs ou abdominale sous-ombilicale, par exemple. Des antalgiques comme la morphine, le zicotinide ou l'hydromorphone peuvent être utilisés en cas de douleurs chroniques sévères. L'implantation d'une pompe intrathécale permet une infusion continue de l'antalgique et contribue à améliorer la qualité de vie des patients[330]. Enfin, la plupart des agents de chimiothérapie ne traversent pas la BHE. Certains d'entre eux (cytarabine, méthotrexate et glucocorticoïdes) peuvent donc être administrés par voie IT pour le traitement de certaines leucémies aiguës lymphoblastiques, lymphomes ou encore méningites carcinomateuses[331]. En préclinique, plusieurs études ont utilisé cette voie pour permettre le passage cérébral de diverses molécules : enzymes, anticorps, facteur de croissance (nerve growth factor ou NGF), petits ARN interférents, etc[332].

4.2.2.2 Imagerie du système cérébro-spinal (cisternographie et myélographie)

Certains agents de contraste peuvent également être injectés par voie IT pour des applications en imagerie du système cérébro-spinal. La cisternographie (ou myélographie) est une technique radiologique ancienne, utilisant initialement les rayons X et des produits de contraste iodés, pour l'imagerie de la colonne vertébrale, de la base du crâne et des structures associées. Des radioisotopes et le TEP scanner ont également été utilisés. Cependant, la myélographie est aujourd'hui largement

supplantée par l'IRM qui permet de juger de la présence de pathologies médullaires sans l'utilisation de produit de contraste iodés. La myélographie est surtout utilisée en cas de contre-indications à l'IRM : claustrophobie, pacemaker ou clips sensibles aux champs magnétiques, etc.

Depuis une vingtaine d'années, l'utilisation de l'IRM avec injection IT d'agent de contraste à base de Gd s'est révélée utile pour l'imagerie de certains troubles du LCS et hydrocéphalies. La première étude humaine utilisant une injection IT de Gd a été menée chez deux patients atteints de méningites carcinomateuses. Aucun effet indésirable notable n'a alors été observé. De nombreuses autres études ont ensuite démontré la sécurité et l'utilité de cette technique dans diverses applications : détection et localisation des fuites de LCS (rhinorrhée et otorrhée), hypotension intracrânienne spontanée par fuite de LCS, détection de communication de kyste arachnoïdien avec le LCS, hydrocéphalie provoquée par une sténose aqueductale, imagerie des ventricules cérébraux pour la détection de tumeurs, sténose ou kyste ou encore ventriculostomie. La sensibilité de cette méthode est élevée. Par exemple, elle permet de détecter des fuites de LCS avec une sensibilité de 89% contre 67% pour la myélographie avec agents de contraste iodés et 55% avec radioisotopes[331]. Cependant, l'administration IT d'agents de contraste gadolinés n'est pas approuvée par la FDA à ce jour.

4.2.2.3 Etude du système glymphatique cérébral

Récemment, l'administration de traceurs dans le LCS a également été utilisée pour l'étude du système glymphatique cérébral. Ce système de circulation paravasculaire du LCS a récemment été décrit par Iliff et coll. Ces auteurs ont montré que, chez la souris, l'injection des traceurs fluorescents dans l'espace sous-arachnoïdien (au niveau de la *Cisterna Magna*) permettait la diffusion de ces molécules dans l'ensemble du parenchyme cérébral, dès 30 minutes post-injection. La diffusion des traceurs dans le parenchyme était alors attribuée au flux de LCS le long du système glymphatique cérébral. Des résultats similaires ont été obtenus chez le rat, par IRM *in vivo,* après injection d'un agent de contraste à base de Gd dans la *Cisterna Magna*[333].

Chez l'Homme, Eide et coll. ont été les premiers à suggérer l'existence d'un système glymphatique cérébral. Ces auteurs ont observé une diffusion rapide dans le parenchyme cérébral d'agents de contraste à base de Gd injectés en IT chez une patiente lors d'un bilan de rhinorrhée cérébrospinale. Ces résultats ont été confirmés par une étude menée par Ringstad et coll. en 2017 sur une cohorte de patients souffrant d'hydrocéphalie à pression normale et chez des sujets sains.

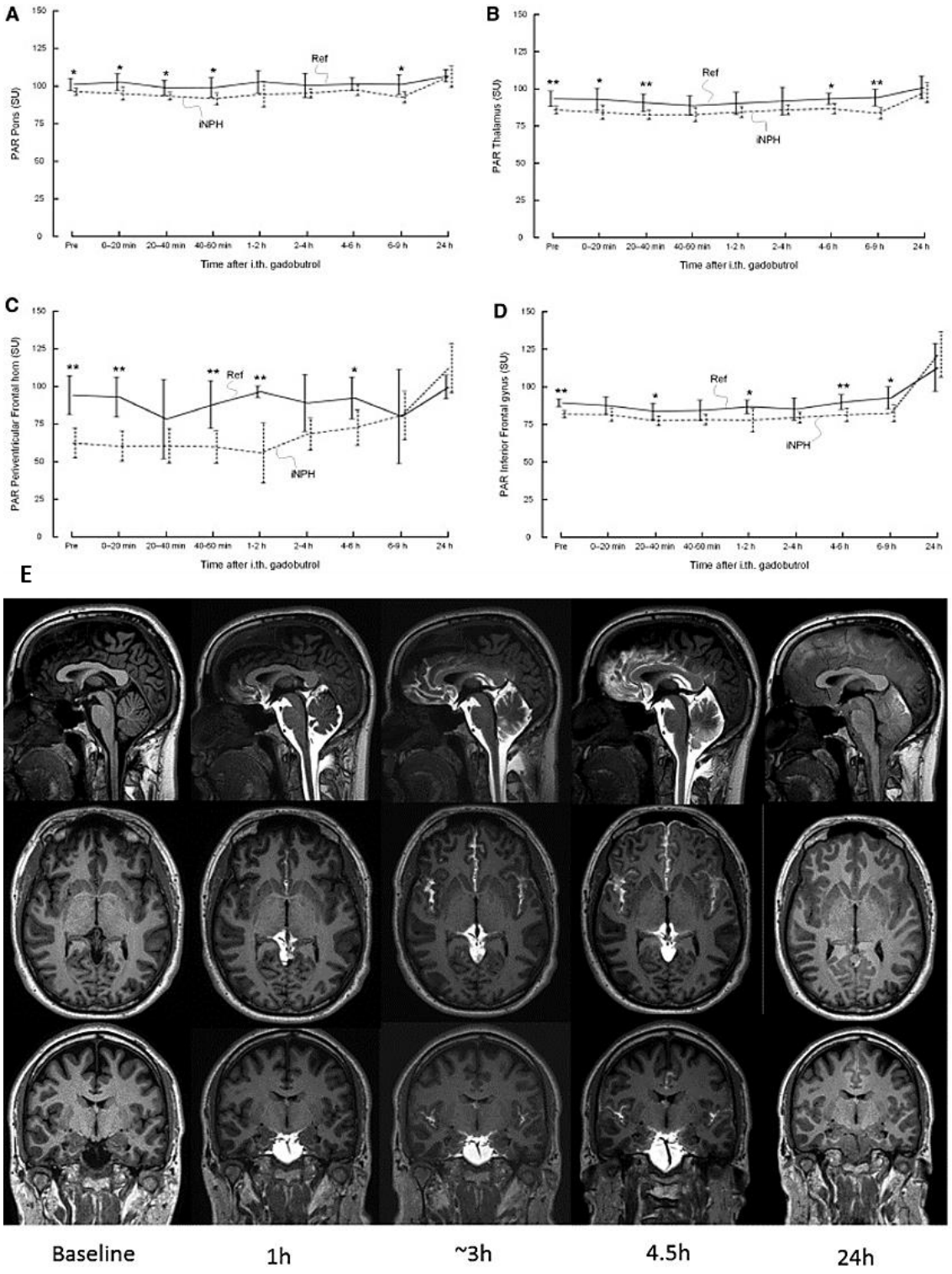


Figure 37 : Modifications de signal observées, en fonction du temps, dans le LCS et le parenchyme cérébral après injection IT de Gadobutrol chez un sujet sain.

Une augmentation du signal du LCS dans l'espace sous-arachnoïdien et intraventriculaire a été observée après injection IT de l'agent de contraste, jusqu'à 4,5 heures post-injection (E). Une augmentation du signal a également été observée dans le parenchyme cérébral dans plusieurs régions cérébrales telles que le pont (A), le thalamus (B), la substance blanche périventriculaire frontale (C) et le gyrus frontal inférieur (D)[334].

Au cours de cette étude, les patients ont reçu une injection IT de Gadovist® (0,5 mL à 1 mmol/mL de Gadobutrol) avant examen IRM. Le flux de LCS et la diffusion de l'agent de contraste dans le parenchyme cérébral ont été monitorés par IRM à l'aide de séquences pondérées en T1, acquises à différents temps post-injection. Ces auteurs ont ainsi pu montrer une diffusion de l'agent de contraste dans le LCS des citernes cérébrales et des ventricules cérébraux dès 20 minutes après l'injection. Puis, l'agent de contraste a diffusé dans l'espace subarachnoïdien, le long des artères leptoméningées, suivi d'une pénétration du Gd dans le parenchyme cérébral. Les modifications de signal observées étaient hautement dépendantes de la région cérébrale et une forte variabilité interindividuelle a été observée (Figure 37)[334].

Ces études montrent la possibilité d'obtenir une diffusion efficace d'un agent de contraste à base de Gd dans l'ensemble du parenchyme cérébral après injection IT. Cependant, à notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à l'utilisation d'agent de contraste pour l'amélioration de l'imagerie structurale de l'encéphale.

4.2.3 Toxicité

Les chélates de Gd sont classiquement administrés par voie veineuse. Comme vu précédemment, la toxicité potentielle des chélates de Gd est liée à un relargage du métal dans la circulation générale. La principale toxicité observée est alors une néphrotoxicité. Concernant l'administration IT de ces molécules, la tolérance et les doses limites ont pu être établies en préclinique dans plusieurs espèces animales (rat, chien, mouton et PNH) et pour différents agents de contraste (gadodiamide, gadobenate dimeglumine et Gd-DTPA). Lors de l'administration IT, la plupart des effets indésirables observés résultent de l'injection et non de l'agent de contraste en lui-même. Les effets les plus fréquemment observés sont une fibrose et des infiltrats de cellules immunitaires au niveau du site d'injection. La présence de tissus fibreux autour du cathéter et/ou rattaché à la dure-mère est retrouvée dans plus de 50% des cas lorsque l'injection est répétée ou dans le cas d'une implantation d'un cathéter dans l'espace sous-arachnoïdien. Cet effet indésirable est généralement peu grave sauf si la taille de la masse fibreuse devient trop importante. Elle peut alors comprimer la moelle épinière. Egalement, la présence de cellules inflammatoires (principalement des lymphocytes et des macrophages et moins fréquemment des neutrophiles ou éosinophiles) est très fréquemment observée (environ 40% des cas chez le PNH). Cet effet est également bénin. Rarement, une masse inflammatoire composée de cellules inflammatoires et de tissus conjonctifs (pyogranulome) peut se développer et induire une compression de la moelle épinière[335].

Concernant la toxicité propre des agents de contraste gadolinés par voie IT, ce sont principalement des effets neurotoxiques (convulsions, ataxie, tremblements) qui sont observés à forte dose. En clinique, peu d'effets indésirables sont généralement rapportés à l'exception de migraines. Certains cas de troubles neurologiques ou physiques graves ont été observés pour des doses importantes supérieures à 1 mmol (soit environ 12,5 µmol/kg) et jusqu'à 10 mmol (soit environ 125 µmol/kg)[330,336,337]. La plus faible dose toxique, rapportée dans la littérature à notre connaissance, a été décrite par Mendoza et coll. Ces auteurs ont rapporté un cas de neurotoxicité grave (migraine, aphasie, perte de conscience, convulsions) après administration de seulement 1 mL (1 mmol soit environ 12.5 µmol/kg) de Gadobutrol chez un patient de 53 ans présentant une suspicion de fistule de LCS. Cette dose est la dose maximale qui aura été utilisée dans cette thèse[338].

En conclusion, la voie intrathécale semble être une voie intéressante pour l'administration de molécules à visée cérébrale. L'influence de nombreux paramètres doit cependant être prise en compte. La principale limite de cette technique est son caractère invasif et une attention toute particulière doit être prêtée pour repérer d'éventuels signes de toxicité.

5 Les modèles de la maladie d'Alzheimer

L'utilisation de modèles animaux est actuellement nécessaire pour étudier la physiopathologie de la MA ainsi que pour l'évaluation de nouvelles thérapies et la validation de nouveaux biomarqueurs. Actuellement, il existe un nombre très important de modèles de la MA (141 modèles répertoriés) (alzforum.org). Ces animaux reproduisent certaines lésions neuropathologiques de la maladie (comme l'amyloïdose, l'AAC, la tauopathie et la neurodégénérescence) ainsi que ses symptômes (comme les déficits d'apprentissage et de mémoire). La recherche préclinique sur la MA repose principalement sur l'utilisation de modèles murins transgéniques (principalement souris mais également rat) surexprimant des gènes humains mutés, responsables de formes familiales de la maladie. Des modèles murins induits par l'injection de toxiques ou de vecteurs viraux ont également été développés. Enfin, il existe un certain nombre de modèles spontanés de la MA, notamment des PNH, plus proche de l'Homme que les rongeurs. Ces modèles développent la pathologie naturellement au cours de leur vieillissement et sont donc beaucoup plus proches de la pathologie humaine[339,340]. Nous ne développerons ici que les modèles utilisés au cours de cette thèse.

5.1 Généralités sur les modèles murins transgéniques

La construction de la plupart des modèles murins d'amyloïdose découle de l'hypothèse de la cascade amyloïde. Cependant, l'Aβ murin, contrairement à la protéine humaine, ne présente pas de tendances naturelles à l'agrégation. Ces modèles ont donc été construits en faisant exprimer des protéines humaines, mutées ou non, menant au développement des lésions pathologiques de la MA de façon plus ou moins rapide et sévère[339].

La plupart de ces modèles expriment un ou plusieurs gènes mutés responsables de formes familiales de la MA telles que des mutations de l'APP, de la PS1 ou de la PS2. Les modèles APP présentent une augmentation de la concentration en Aβ cérébral avec l'âge conduisant au développement de lésions amyloïdes. Les mutations de la PS1 et de la PS2 modifient l'activité de la γ-sécrétase et favorisent la production d'$A\beta_{42}$ au profit de l'$A\beta_{40}$. Le ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ semble également être un facteur déterminant de la sévérité de l'amyloïdose. En effet, l'$A\beta_{42}$ est plus hydrophobe que l'$A\beta_{40}$ et est donc plus susceptible de s'agréger. Cependant, les mutations des préséniline seules ne sont pas suffisantes pour induire la formation des dépôts amyloïdes. Le croisement avec une souche porteuse d'une mutation de l'APP, conduisant à une surexpression de l'Aβ, est nécessaire pour induire le développement de lésions amyloïdes[341,342]. Ces doubles mutants présentent une accumulation d'Aβ accélérée en comparaison à des modèles simples mutants sur l'APP. Ces modèles ne présentent généralement pas

de tauopathie ou de perte neuronale massive. Pour observer à la fois la pathologie de la protéine Tau et celle du peptide Aβ, il est nécessaire d'introduire un nouveau transgène. Ainsi, certains modèles présentent également des mutations du gène MAPT retrouvées dans des formes familiales de tauopathie.

Certains modèles transgéniques ont également été construits par surexpression des peptides Aβ ou Tau non mutés. Par exemple, le modèle HuAPP surexprime l'APP humaine non mutée et développe en conséquence une amyloïdose cérébrale en l'absence de tauopathie associée.

Ces modèles peuvent donc présenter une ou deux des principales signatures moléculaires de la maladie (amyloïdose et tauopathie). Une AAC est souvent observée dans les modèles d'amyloïdose[343]. Egalement, ces lésions sont généralement associées à de la neuroinflammation, des altérations synaptiques et des altérations comportementales pouvant s'apparenter aux symptômes observés chez les patients atteints de la MA.

Au cours de cette thèse nous avons utilisé des souris modèles d'amyloïdose pure (APP23, APP_{SwDI}, APP/PS1, $APP/PS1_{dE9}$), un modèle mixte d'amyloïdose et de tauopathie (3xTg) et un modèle de tauopathie pure (Tg4510).

5.2 Les modèles murins utilisés

5.2.1 Le modèle APP23

Le modèle APP23 surexprime le gène de l'APP humain porteur de la double mutation Swedish (KM670/671NL) sous le contrôle d'un promoteur neuronal Thy-1 murin. L'expression de l'APP humaine mutée est sept fois plus importante que celle de l'APP murine endogène conduisant à une augmentation des concentrations cérébrales en $Aβ_{40}$ et $Aβ_{42}$ avec l'âge avec un rapport $Aβ_{42}/Aβ_{40}$ inchangé par rapport aux souris contrôles[344].

Ce modèle développe de rares dépôts diffus et neuritiques dans le cortex et l'hippocampe, notamment le subiculum, dès l'âge de 6 mois. Les plaques neuritiques augmentent en taille et en nombre et s'étendent aux noyaux sous-corticaux (notamment le thalamus, le noyau caudé et le putamen) jusqu'à 24 mois. A cet âge, plus de 90% des plaques sont des plaques amyloïdes « classiques » avec présence d'un cœur amyloïde dense, compact et entouré d'une couronne de neurites dystrophiques.

Ce modèle est également connu pour développer une AAC importante. L'accumulation d'Aβ dans la paroi des vaisseaux du cortex, de l'hippocampe et du thalamus est observée dès apparition des premières plaques (6 mois). L'AAC s'intensifie et s'étend ensuite avec l'âge[345]. Ces plaques sont

entourées d'astrocytes réactifs et de microglies activées. Des déficits comportementaux sont observés dès l'âge de trois mois.

5.2.2 Le modèle APP_{SwDI}

Le modèle APP_{SwDI} surexprime le gène de l'APP humain porteur de trois mutations (Swedish (KM670/671NL), Dutch (E693Q), and Iowa (D694N) sous le contrôle d'un promoteur neuronal Thy-1.2. Une augmentation des concentrations en $A\beta_{40}$ et en $A\beta_{42}$ est observée dès 3 mois et augmente avec l'âge. Contrairement à la plupart des modèles APP, ces souris présentent une diminution du rapport $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ avec une expression de l'$A\beta_{40}$ dix fois supérieure à celle de l'$A\beta_{42}$[346].
Les mutations Dutch et Iowa sont des mutations liées à des formes familiales d'AAC (hémorragies cérébrales héréditaires). En conséquence, ces souris développent des dépôts fibrillaires d'Aβ dans la paroi des vaisseaux sanguins cérébraux, dès l'âge de 6 mois, principalement dans le subiculum et le thalamus. Des dépôts parenchymateux d'Aβ apparaissent à l'âge de 3 mois sous forme de plaques diffuses dans le subiculum, l'hippocampe et le cortex avant de s'étendre au thalamus à 6 mois et aux autres noyaux sous-corticaux à 12 mois[346]. Ces lésions sont similaires à celle retrouvées chez les patients porteurs des mutations Dutch et Iowa. Une neuroinflammation importante avec présence de nombreux astrocytes réactifs et microglies activées est observée à partir de 6 mois dans le subiculum et le thalamus et s'étend avec l'âge à l'ensemble du cortex[347]. Des déficits comportementaux notamment de la mémoire et de l'apprentissage sont observés dès 3 mois[348].

5.2.3 Le modèle $APP_{SL}/PS1_{M146L}$

Le modèle $APP_{SL}/PS1_{M146L}$ co-exprime le gène de l'APP humain porteur de la double mutation Swedish (KM670/671NL) et London (V717I) et le gène de la PS1 humain porteur de la mutation M146L. Ces deux gènes sont sous le contrôle du promoteur neuronal Thy-1.2. Une forte accumulation d'Aβ est rapidement détectée, dès l'âge de 2-4 mois, avec augmentation du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$. Comparé à des souris simples transgéniques APP, la présence du transgène PS1 induit une accumulation deux fois plus rapide d'Aβ. Des dépôts amyloïdes sont détectables dès 2,5 mois dans le subiculum et l'hippocampe, d'abord sous forme d'inclusions intraneuronales granulaires d'Aβ, puis sous forme de plaques amyloïdes. L'amyloïdose s'étend ensuite au cortex à l'âge de 6 mois et au reste du cerveau à 12 mois[349,350]. Ces dépôts sont majoritairement des plaques amyloïdes « classiques » avec présence d'un cœur amyloïde dense et compact entouré d'une couronne de neurites dystrophiques[351]. Ces plaques

sont entourées d'astrocytes réactifs et de microglies activées. Pour plus de clarté, ce modèle sera nommé « APP/PS1 » dans le reste de ce manuscrit.

5.2.4 Le modèle APP/PS1$_{dE9}$

Le modèle APP/PS1$_{dE9}$ co-exprime le gène de l'APP humain porteur de la mutation Swedish (KM670/671NL) et le gène de la PS1 humain porteur d'une délétion de l'exon 9. Ces deux gènes sont sous le contrôle du promoteur prion PrP. En conséquence, une augmentation des concentrations en $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$ ainsi qu'une augmentation du rapport $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ sont observées[342].

Ce modèle développe des plaques amyloïdes dès l'âge de 6 mois au niveau du cortex et de l'hippocampe. À 9 mois, l'amyloïdose est importante dans ces deux régions et s'étend aux noyaux sous-corticaux (notamment le thalamus) et au cervelet jusqu'à 12 mois. Une AAC peut alors être observée. Les dépôts d'Aβ observés dans ce modèle sont des plaques diffuses et des plaques neuritiques « classiques ». Une neuroinflammation, avec présence d'astrocytes réactifs et de microglies activées, est observée en périphérie des plaques dès l'âge de 6 mois et s'intensifie avec l'âge[342,352].

Chez l'Homme, la mutation dE9 est associée au développement de plaques amyloïdes en « laine de coton » ou « cotton wool » qui ne sont cependant pas retrouvées dans ce modèle[39]. Comme chez les patients, des altérations synaptiques et des déficits comportementaux sont observés dès 6 mois[353].

5.2.5 Le modèle PS2/APP

Le modèle PS2/APP co-exprime le gène de l'APP humain porteur de la mutation Swedish (KM670/671NL) et le gène de la PS2 humain porteur de la mutation Volga German (N141I). Ces deux gènes sont sous le contrôle du promoteur neuronal Thy-1.2 et du promoteur prion PrP respectivement. Une forte accumulation d'Aβ est détectée dès 5 mois, sans augmentation du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$. De rares dépôts amyloïdes sont présents à partir de 5 mois dans l'hippocampe et le cortex frontal puis dans le subiculum à 10 mois. L'amyloïdose s'intensifie avec l'âge et est présente dans tout le cortex et le thalamus à 12 mois. Ces dépôts sont majoritairement focaux et amyloïdes et entourés de neurites dystrophiques. Une AAC peut également être observée de façon sporadique au niveau des plus gros vaisseaux sanguins. Une neuroinflammation, avec présence d'astrocytes réactifs et de microglies activées, est observée en périphérie des plaques amyloïdes dès 9 mois. Des déficits comportementaux sont observés dès l'âge de 12 mois[354,355].

5.2.6 Le modèle 3xTg

Le modèle 3xTg co-exprime le gène de l'APP humain porteur de la mutation Swedish (KM670/671NL), le gène MAPT humain porteur de la mutation P301L et le gène de la PS1 murin porteur de la mutation M146V. Les gènes mutés APP et TauP301L sont sous le contrôle d'un promoteur neuronal Thy-1. Une accumulation d'Aβ avec augmentation du rapport $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ est détectée à partir de 12 mois[45]. Ce modèle présente l'avantage de développer une pathologie amyloïde et une pathologie Tau. Il est donc plus proche de la pathologie humaine. L'amyloïdose se développe avant la tauopathie.

Des inclusions intraneuronales d'Aβ sont détectables dès 3-4 mois dans le cortex et dès 6 mois dans la couche CA1 de l'hippocampe. Ces inclusions sont principalement constituées d'$A\beta_{42}$[356]. Les dépôts extracellulaires d'Aβ apparaissent dans le cortex frontal à partir de 6 mois et s'intensifient jusqu'à 12 mois. A cet âge, les dépôts extracellulaires sont également présents dans le reste du cortex et dans l'hippocampe. Une neuroinflammation, avec présence d'astrocytes réactifs et de microglies activées, est observée en périphérie de ces plaques dès 7 mois[357].

La pathologie Tau apparaît plus tardivement dans le cerveau de ces souris. Une accumulation de protéines Tau hyperphosphorylées est présente à partir de 12 mois dans la région CA1 de l'hippocampe et s'intensifie avec l'âge. Les DNF sont détectées à partir de 15 mois dans cette région et se propagent ensuite au reste de l'hippocampe et à l'ensemble du cortex cérébral.

Des déficits comportementaux notamment de la mémoire et de l'apprentissage sont observés à partir de 6 mois[356].

5.2.7 Le modèle Tg4510

Le modèle Tg4510 est un modèle de tauopathie inductible. Ces souris expriment le gène MAPT humain porteur de la mutation P301L sous le contrôle du promoteur CaMKII. Ce promoteur induit une expression du transgène restreinte au prosencéphale. Par ailleurs, l'expression du transgène peut être supprimée par un traitement à la doxicycline[358].

Ce modèle exprime treize fois plus la protéine Tau mutée que la protéine Tau murine endogène. L'expression de la protéine Tau mutée hyperphosphorylée est détectable dès l'âge de 2,5 mois dans le cortex et l'hippocampe. De rares pré-DNF sont détectées dans le cortex à partir de 2,5 mois. La tauopathie devient évidente dans le cortex à partir de 4 mois puis dans l'hippocampe à partir de 5 mois. Ces lésions augmentent en nombre avec l'âge et s'étendent ensuite aux régions sous-corticales. La tauopathie est associée à une perte neuronale importante débutant dans la CA1 de l'hippocampe à 5-6 mois et s'étendant au cortex à 8-9 mois menant à une atrophie globale du cerveau à 10 mois. Une

neuroinflammation, avec présence d'astrocytes réactifs et de microglies activées, est observée à partir de 2,5 mois[358–360]. Des déficits comportementaux notamment de la mémoire et de l'apprentissage sont observés à partir de 2-4 mois[358,360].

En conclusion, il existe aujourd'hui une immense diversité de modèles murins de la MA. Ces modèles développent des pathologies amyloïdes différentes, associées ou non à une AAC, avec ou sans tauopathie. Le métabolisme de l'Aβ est altéré de manière différente en fonction du transgène. Par exemple, la mutation Swedish est localisée au niveau du site de clivage de l'APP par la β-sécrétase. Elle induit une augmentation de la production des différentes isoformes d'Aβ dans des proportions similaires (ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ inchangé). Par ailleurs, les mutations V717I (London) et V717F sont localisées au niveau du site de clivage de l'APP par la γ-sécrétase, induisant une production préférentielle d'$A\beta_{42}$ au profit des autres isoformes d'Aβ (ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ augmenté)[361]. La typologie des dépôts amyloïdes développés est également hautement dépendante du promoteur utilisé ou encore du fond génétique. Par exemple, Andrä et coll. ont montré que, pour un même transgène (APP Swedish), l'utilisation de différents promoteurs induit des niveaux d'expression différents du transgène. La topographie des lésions est également dépendante du promoteur utilisé[362]. Aucun modèle ne permet donc actuellement de répliquer parfaitement la MA.

5.3 Les modèles primates de la MA

Les PNH présentent l'avantage d'avoir un système nerveux plus complexe et plus proche de celui de l'Homme que celui des rongeurs. Étant donné le fort degré de conservation génétique, anatomique et physiologique avec l'Homme, les PNH peuvent représenter les meilleurs modèles pour comprendre les processus biologiques humains. Au cours de cette thèse, nous avons utilisé des macaques cynomolgus (*Macaca fascicularis*). Cette espèce, ainsi que son proche parent, le macaque rhésus (*Macaca mulatta*), sont fréquemment utilisés en recherche biomédicale pour l'étude du vieillissement et de certaines maladies neurodégénératives.

Au vu des connaissances actuelles, aucune espèce de primate ne développe la MA à proprement parler. Certains PNH développent spontanément des lésions amyloïdes avec l'âge mais en l'absence de lésion Tau et de neurodégénérescence. L'APP est exprimée de manière ubiquitaire dans les neurones des macaques (rhésus et cynomolgus)[363]. Plusieurs études neuropathologiques ont montré la présence de plaques amyloïdes dans le cerveau des macaques à partir de l'âge de 25-30 ans[364–366]. Ces lésions sont souvent entourées d'une couronne de neurites dystrophiques, d'astrocytes réactifs et

de microglies activées. Chez le macaque rhésus, la quantité d'Aβ totale, présente dans le cortex occipital et temporal de singes âgés, atteint un niveau similaire à celle observée chez les patients atteints de la MA. Des analyses biochimiques ont également montré que ces dépôts sont majoritairement composés de l'isoforme $A\beta_{42}$ et dans une moindre mesure $A\beta_{40}$[367]. Chez les primates plus jeunes, des dépôts d'Aβ de nature diffuse peuvent être observés bien que la présence de ces lésions soit rare et variable d'un individu à un autre. Chez les macaques, une AAC est également fréquemment rapportée chez les animaux les plus âgés (plus de 20 ans). Une corrélation positive a pu être observée entre la charge amyloïde et la charge en AAC chez ces animaux[368]. La présence de protéines Tau hyperphosphorylées a également été observée chez le macaque rhésus et cynomolgus[369,370]. Cependant, aucune DNF à proprement parler n'a pu être observée à ce jour chez ces espèces. Une tauopathie, avec présence de DNF, peut fréquemment être observée chez le babouin, à partir de 25-30 ans[371].

La capacité de ces espèces à développer spontanément une amyloïdose parenchymateuse et/ou vasculaire en fait donc de bons modèles pour l'étude des processus physiopathologiques de la MA et pour tester de nouvelles thérapies anti-Aβ. Ainsi, plusieurs immunothérapies anti-Aβ ont été testées chez ces espèces. Cependant, les études sur les PNH présentent un certain nombre de contraintes limitant leur utilisation. Ces espèces nécessitent un dispositif d'hébergement complexe et coûteux, et des considérations éthiques significatives. La principale limite à l'utilisation des PNH pour l'étude du vieillissement normal et pathologique est leur durée de vie longue (jusqu'à 40 ans pour le macaque cynomolgus par exemple) ce qui nécessite donc des temps d'études très longs (jusqu'à 20 ans chez le macaque avant l'apparition des plaques amyloïdes).

Objectifs généraux

Les biomarqueurs connaissent un essor considérable depuis quelques années notamment dans le contexte des maladies neurodégénératives et plus particulièrement de la MA. Ces biomarqueurs sont des outils précieux pour l'aide au diagnostic précoce et pour le suivi de la pathologie. Egalement en préclinique, ils permettent une meilleure compréhension de la physiopathologie de la maladie et sont nécessaires pour le développement de candidats médicaments. Parmi ces biomarqueurs, l'avènement des techniques de neuroimagerie a permis d'étudier et de mieux caractériser les atteintes cérébrales de la MA. Actuellement, les plaques amyloïdes peuvent être visualisées chez l'Homme par TEP à l'aide de radiotraceurs plus ou moins spécifiques de l'Aβ. Bien que la TEP bénéficie d'une sensibilité de détection élevée, cette technique présente l'inconvénient d'exposer le patient à la radioactivité. De plus, le coût et la faible disponibilité des appareils de TEP freinent l'utilisation de cette technique en pratique clinique. L'IRM serait une alternative intéressante pour l'imagerie des lésions de la MA.

Les progrès techniques et le développement d'IRM à hauts champs magnétiques sont une opportunité considérable pour l'étude des atteintes cérébrales liées à la MA. En préclinique, le gain en résolution spatiale, permis par l'utilisation de tels appareils, rend possible l'étude fine et détaillée du cerveau des rongeurs et des PNH, principaux modèles pour l'étude de la MA. Il est ainsi possible de mieux caractériser les altérations structurelles observées dans plusieurs régions cérébrales clés (hippocampe, cortex) ou encore de visualiser directement les lésions microscopiques caractéristiques de la MA. En effet, depuis une vingtaine d'années, il est connu que certaines plaques amyloïdes peuvent être détectées spontanément par IRM en pondération T2*. Les mécanismes impliqués dans la détection des plaques amyloïdes sont controversés mais la présence de fer au cœur des plaques ainsi que la morphologie des dépôts seraient des éléments clés pour la détection de ces lésions. Ces techniques représentent une avancée majeure puisque l'amyloïdose ou les modifications structurelles du cerveau peuvent alors être suivies de façon longitudinale chez le même animal tout au long de sa vie. Cependant, l'augmentation de la résolution spatiale s'accompagne d'une diminution du SNR pouvant être défavorable à la qualité des images. L'utilisation d'agent de contraste serait une stratégie efficace pour améliorer le SNR et donc la qualité des images. Ainsi, au cours de cette thèse, deux stratégies, utilisant des IRM à haut champ magnétique et des agents de contraste à base de Gd ont été étudiées.

La première partie de cette thèse s'est concentrée sur la méthode du « Gd-staining ». Cette technique repose sur l'administration intracérébrale d'un agent de contraste à base de Gd, non vectorisé, le Dotarem®. Le Gd-staining est efficace pour la détection des plaques amyloïdes par IRM *in vivo* et *ex vivo* chez la souris modèle d'amyloïdose. La première partie de cette thèse s'est concentrée sur la compréhension des mécanismes impliqués dans la détection des plaques amyloïdes grâce à cette

technique : caractéristiques histopathologies des dépôts détectés, importance du modèle utilisé, spécificité de la détection et détectabilité des lésions fréquemment associées aux plaques amyloïdes. De plus, la capacité du Gd-staining à permettre l'imagerie des plaques amyloïdes humaines n'avait encore jamais été explorée. Dans cette étude, nous avons montré pour la première fois qu'il est possible d'imager les lésions Aβ humaines, en *post mortem*, par IRM après Gd-staining.

La deuxième partie de cette thèse s'est intéressée à l'aspect translationnel de cette technique. Pour cela, nous avons tenté d'implémenter la technique du Gd-staining dans un modèle plus proche de l'Homme, le primate non humain. Cependant, l'utilisation de la plupart des agents de contraste pour l'imagerie des plaques amyloïdes est limitée par la présence de la BHE. Nous avons donc testé une approche par injection intrathécale de Gd pour passer la BHE et permettre de délivrer l'agent de contraste dans le cerveau.

Enfin, la dernière partie de cette thèse s'est intéressée au développement d'agents de contraste vectorisés, ciblant spécifiquement les lésions de la MA. Dans la littérature, de nombreux exemples d'agents de contraste vectorisés ciblant les plaques amyloïdes peuvent être trouvés. Cependant, toutes ces molécules présentent une limite majeure qui est leur difficulté à traverser les membranes cellulaires et la BHE. De plus, aucun ligand Tau pour l'imagerie IRM n'est actuellement disponible. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à une classe particulière d'anticorps retrouvée uniquement chez les animaux de la famille des camélidés, les VHH. En effet, au vu des données de la littérature, certains VHH présenteraient la capacité de traverser spontanément la BHE. Notre groupe a développé deux VHH dirigés respectivement contre le peptide $A\beta_{42}$ (VHH appelé R3VQ) et la protéine Tau hyperphosphorylée (VHH appelé TauA2). Ces deux VHH ont ensuite été couplés à divers marqueurs (fluorochromes, agents de contraste IRM, radioisotopes, etc.) pour permettre leur détection via différentes modalités (microscopie biphotonique, IRM, TEP, etc.). Notre hypothèse est que les VHH de pI basique sont capables de franchir cette barrière par un mécanisme d'AMT. Les deux VHH étudiés ici ont un pI basique et sont donc théoriquement capables de traverser la BHE. Cette hypothèse est renforcée par les résultats obtenus précédemment lors d'expériences de microscopie biphotonique. Dans cette thèse, la capacité de ces deux VHH à traverser la BHE a été testée par immunohistochimie après injection systémique chez la souris. Le but de ce projet est de pouvoir détecter *in vivo*, par IRM, les lésions de la MA après injection systémique des VHH couplés à un agent de contraste à base de Gd. Différents chélates de Gd ont été testés afin de sélectionner les candidats présentant les propriétés relaxométriques les plus efficaces. Les VHH ainsi sélectionnés ont ensuite été testés *ex vivo* puis après injections systémiques dans différents modèles murins de la MA.

Résultats I : Etude comparative de la détection des plaques amyloïdes par Gd-staining dans cinq modèles murins d'amyloïdose et dans des tissus humains de patients atteints de la MA

1 Objectifs

Les modèles animaux de la MA sont essentiels pour la compréhension de sa physiopathologie et pour l'évaluation de nouvelles thérapies. Comme discuté précédemment, il existe une très grande diversité de modèles animaux de la MA. De nombreuses stratégies ont été mises en place pour créer des modèles reproduisant le plus fidèlement possible les caractéristiques de cette maladie. Parmi elles, les modèles murins transgéniques sont les plus largement utilisés. Ces modèles présentent certains aspects de la MA par l'introduction de mutations génétiques identifiées dans les formes familiales de la maladie. Les modèles murins d'amyloïdose développent des plaques amyloïdes similaires (mais pas identiques) à celles observées chez l'Homme par surproduction chronique de peptides Aβ, associée ou non à des altérations de son métabolisme. La typologie, la topographie et la cinétique de développement des lésions sont cependant très variables selon le modèle utilisé. Par exemple, les modèles présentant une double mutation sur le gène de l'APP et sur le gène d'une préséniline développent des lésions amyloïdes plus rapidement que les simples mutants APP. La présence d'autres lésions associées (AAC, neuroinflammation, tauopathie) est également dépendante du modèle. Les modèles murins d'amyloïdose développent classiquement des plaques amyloïdes fibrillaires (focales, neuritiques ou non). Cependant, plusieurs autres types de dépôts d'Aβ sont observés chez les patients atteints de la MA : dépôts diffus, intracellulaires, vasculaires, etc. Leurs implications dans la physiopathologie de la MA semblent être différentes[372]. L'étude de ces différents types de dépôts est donc intéressante pour une meilleure compréhension de cette maladie.

Jusqu'à présent, la plupart des études d'imagerie par IRM, visant à détecter les plaques amyloïdes en contraste spontané, se sont concentrées sur la détection des plaques amyloïdes focales. Un nombre limité d'études se sont intéressées à la comparaison de la détectabilité des différents types de dépôts amyloïdes en IRM[223,227,373]. Par exemple, Nabuurs et coll. ont montré que les plaques amyloïdes focales, mais pas diffuses, étaient détectables par IRM *post mortem* sur des échantillons de cortex de patients atteints de la MA. La typologie des dépôts amyloïdes semble donc être un élément déterminant pour sa détection par IRM. Ce groupe a également montré que certains vaisseaux sanguins angiopathes étaient détectables par rapport à des vaisseaux sanguins sains[374].

Jusqu'à présent, le Gd-staining a été utilisé pour détecter avec succès les plaques amyloïdes dans le cerveau des souris APP/PS1[236,240,241]. Ce modèle présente majoritairement des dépôts d'Aβ focaux. Cependant, la capacité du Gd-staining à détecter les autres types de dépôts d'Aβ n'a jamais été explorée et aucune étude n'a évalué l'importance de l'effet "modèle de souris" sur la capacité à détecter les plaques amyloïdes par IRM. Au cours de cette thèse, **nous avons étudié la capacité du Gd-staining à permettre la détection des différents types de dépôts d'Aβ**. Pour cela nous avons mené

une étude comparative à l'aide de cinq modèles murins d'amyloïdose (APP/PS1, APP/PS1$_{dE9}$, APP23, APP$_{SwDI}$ et 3xTg) sélectionnés selon la typologie majoritaire des dépôts d'Aβ exprimés. **Trois grandes catégories de dépôts d'Aβ ont été étudiées : les dépôts focaux, diffus et/ou intracellulaires**. Par souci de simplicité, le terme de dépôts focaux inclut les plaques amyloïdes focales, neuritiques ou non. **L'influence de la taille et du contenu en fer des dépôts sur leur détectabilité a été analysée.** Cette étude a donc permis une meilleure compréhension des paramètres essentiels à la détection des plaques amyloïdes par Gd-staining. En effet, bien que la proportion de plaques amyloïdes détectées après Gd-staining soit augmentée par rapport aux techniques d'imagerie basées sur le contraste spontané des plaques, une certaine proportion de plaques visibles par histologie reste non détectée en IRM après Gd-staining.

La **spécificité des modifications de signal observées**, après Gd-staining ou en contraste spontané, est également une question d'intérêt. En effet, des séquences en écho de gradient pondérées en T2*, très sensibles à la présence de fer, sont utilisées pour l'imagerie des plaques amyloïdes avec ou sans Gd-staining. Or, d'autres sources de fer cérébral (vaisseaux sanguins ou microhémorragies) peuvent être visualisées en pondération T2* et peuvent être confondues avec des plaques amyloïdes. Nous avons donc comparé l'aspect des plaques amyloïdes et de ces lésions après Gd-staining. La capacité à distinguer les vaisseaux sanguins angiopathes des vaisseaux sanguins sains a également été étudiée.

Enfin, le Gd-staining n'avait jamais été utilisé pour détecter des plaques amyloïdes humaines. Au cours de cette thèse, **nous avons exploré la capacité de cette technique à détecter les plaques amyloïdes humaines** sur des échantillons de cerveaux issus de patients atteints de la MA.

2 Matériels et méthodes

Tous les protocoles expérimentaux ont été approuvés par un comité d'éthique local indépendant et soumis au Ministère Français de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation. Les procédures expérimentales ont été conduites en stricte conformité avec les réglementations de l'Union Européenne (Directive 2010-63/UE) et française (Code rurale R 214-87-131) pour la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

2.1 Modèles murins d'amyloïdose

Cinq modèles transgéniques murins d'amyloïdose ont été utilisés (tableau 5). Ces modèles ont été sélectionnés de façon à pouvoir observer différentes typologies de dépôts d'Aβ. Nous avons ainsi utilisé des modèles présentant majoritairement des dépôts d'Aβ focaux (APP/PS1, APP/$PS1_{dE9}$ et APP23), diffus (APP_{SwDI}) ou intracellulaires (3xTg). Des souris C57/Bl6 ont été utilisées comme souris contrôles. L'âge des animaux a été choisi de façon à pouvoir observer une amyloïdose déjà établie dans le cerveau, en fonction des caractéristiques physiopathologiques de la souche publiées dans la littérature, et jusqu'au plus vieil animal disponible dans notre colonie. Les principales caractéristiques physiopathologiques de ces modèles ont été présentées en introduction de cette thèse et sont résumées dans le tableau 5.

Des souris APP/PS1 (APP_{SL}/$PS1_{M146L}$), co-exprimant le gène de l'APP humain porteur de la mutation Swedish (KM670/671NL) et le gène de la PS1 humaine porteur de la mutation M146L sous le contrôle d'un promoteur neuronal Thy-1.2 sur un fond génétique C57/Bl6J, ont été utilisées. Ce modèle exprime majoritairement des plaques amyloïdes focales présentes en quantité significative dans le cortex et l'hippocampe à environ 6 mois. Ces souris ont été imagées entre 6 et 20 mois pour l'imagerie des plaques amyloïdes en Gd-staining (n = 6). Une cohorte supplémentaire de 5 animaux, âgés de 18 mois, a été utilisée pour l'imagerie des microhémorragies. Ces souris ont été fournies par les laboratoires Sanofi® (Translational Science Unit, Molecular Histopathology and Bioimaging, Chilly-Mazarin, France).

Des souris APP/$PS1_{dE9}$, co-exprimant le gène de l'APP humain porteur de la mutation Swedish (KM670/671NL) et le gène de la PS1 humain porteur d'une délétion de l'exon 9, sous le contrôle d'un promoteur de la protéine prion de souris, sur un fond génétique C57/Bl6J, ont été utilisées. Ce modèle exprime des dépôts d'Aβ diffus et des plaques amyloïdes focales présentes en quantité significative dans le cortex et l'hippocampe aux alentours de 9 mois. Ces souris ont été imagées entre 9 et 31 mois

(n = 6). Les souris utilisées au cours de cette étude étaient issues d'une colonie élevée à MIRCen. Un génotypage de ces souris a été réalisé par PCR entre 4 et 6 semaines. L'ADN a été extrait à partir d'échantillons d'oreilles en utilisant le kit « Kappa protease » et amplifié par PCR. Les amorces APP-F AGGACTGACCACTCGACCAG ; APP-R CGGGGGTCTAGTTCTGCAT ont été utilisées de façon à amplifier le gène de l'APP muté. Un gel d'agarose à 3% a été utilisé pour faire migrer les produits de PCR et révéler ou non la présence du transgène.

Des souris APP23, exprimant le gène de l'APP humain porteur de la mutation Swedish (KM670/671NL) sous le contrôle d'un promoteur neuronal Thy-1.2 sur un fond génétique C57/Bl6J ont été utilisées. Ce modèle exprime majoritairement des plaques amyloïdes focales présentes en quantité significative dans le cortex et l'hippocampe entre 12 et 24 mois. Ces souris ont été imagées entre 9 et 20 mois (n = 4).

Des souris APP_{SwDI}, exprimant le gène de l'APP humain porteur des mutations Swedish (KM670/671NL), Dutch (E693Q), and Iowa (D694N), sous le contrôle d'un promoteur neuronal Thy-1, sur un fond génétique C57/Bl6J, ont été utilisées. Ce modèle exprime majoritairement des lésions amyloïdes au niveau des vaisseaux sanguins cérébraux. Chez les souris les plus âgées, des dépôts d'Aβ diffus sont présents en quantité significative, dans le cortex et l'hippocampe, aux alentours de 12 mois. Ces souris ont été imagées entre 13 et 28 mois (n = 6).

Des souris 3xTg, exprimant le gène de l'APP humain porteur de la mutation Swedish (KM670/671NL), le gène de la PS1 murin porteur de la mutation M146V et le gène MAPT humain porteur de la mutation tauP301L, sous le contrôle d'un promoteur neuronal Thy-1 sur un fond génétique mixte C57/Bl6 x 129S, ont été utilisées. Ce modèle exprime dans un premier temps des lésions Aβ intraneuronales présentes en quantités importantes aux alentours de 6 mois dans le cortex et l'hippocampe. Chez les souris les plus âgées, des dépôts d'Aβ diffus sont présents en quantité significative dans le cortex et l'hippocampe aux alentours de 12 mois. A cet âge, des plaques amyloïdes focales sont observées dans le subiculum. Ces souris ont été imagées entre 11 et 28 mois (n = 7).

Tableau 5 : Principales caractéristiques physiopathologiques des modèles utilisés dans cette étude.

Modèle	Transgène	Typologie majoritaire de dépôts d'Aβ	AAC	Composition des dépôts d'Aβ	Age apparition (mois)	Age plateau (mois)	Age des souris de l'étude (mois)	N
APP/PS1	APP KM670/671NL (Swedish) APP V717I (London) PSEN1 M146L	Dépôts focaux	Oui	$A\beta_{42} > A\beta_{40}$	2-4	12	6 à 20	N = 11
APP/PS1$_{dE9}$	APP KM670/671NL (Swedish) PSEN1delE9	Dépôts focaux	Oui	$A\beta_{42} > A\beta_{40}$	6	9	9 à 31	N = 6
APP23	APP KM670/671NL (Swedish)	Dépôts focaux	Oui	$A\beta_{42} = A\beta_{40}$	6	12 à 24	9 à 20	N = 4
APP$_{SwDI}$	APP KM670/671NL (Swedish) APP E693Q (Dutch) APP D694N (Iowa)	AAC Dépôts diffus	Oui	$A\beta_{40} > A\beta_{42}$	6 3	12	13 à 28	N = 6
3xTg	APP KM670/671NL (Swedish) PSEN1 M146V MAPT P301L	Dépôts intracellulaires Dépôts diffus	Non	$A\beta_{42} > A\beta_{40}$	3 à 4 6	12	11 à 28	N = 7

2.2 Echantillons de cerveaux de patients atteints de la MA

Des échantillons de cortex pariétal (substance grise et substance blanche adjacente) issus de patients atteints de la MA (n = 3) et d'un sujet âgé sain (n = 1) ont été utilisés. Ces échantillons ont été obtenus auprès de la banque de cerveau Gie-Neuro-CEB. Un consentement libre et éclairé a été signé par les patients ou leur tuteur en leur nom, en accord avec la loi de bioéthique française. La banque de cerveau GIE NeuroCEB est déclarée auprès du Ministère de l'Education Supérieure et de la Recherche et possède l'autorisation de distribuer ces échantillons (agrément AC-2013-1887).

2.3 Injections intracérébroventriculaires de Dotarem®

Les animaux ont été anesthésiés avec un mélange d'isoflurane (1-2%) et d'air (1L/min). Une anesthésie locale à l'aide de lidocaïne (7 mg/kg) injectée en sous-cutanée a également été réalisée au niveau du site d'incision. Après que leurs têtes aient été rasées, les souris ont été placées sur un cadre stéréotaxique, puis fixées par des barres d'oreilles et une barre de dents pour éviter tout mouvement. Un système de chauffage a été utilisé afin de maintenir la température corporelle des animaux à 37°C, tout au long de la procédure. Une incision médiane de la peau du crâne a été effectuée afin de relever les coordonnées du Bregma comme références antéro-postérieure et latérale. Le crâne a été perforé de manière bilatérale selon les coordonnées suivantes : antérieur-postérieur -0,2 mm et latéral -1 mm. Des seringues Blunt Hamilton ont été utilisées pour injecter du gadotérate de méglumine (Dotarem®, Guerbet, France) dans les ventricules latéraux à -2,25 mm de la surface du crâne et -1,75 mm de la dure-mère. Un volume de 1 µL a été injecté dans chaque ventricule à une vitesse de 0,1 µL/minute. A la fin de l'injection, un délai de 10 minutes a été laissé pour permettre à l'agent de contraste de diffuser avant que les canules ne soient délicatement retirées pour minimiser les remontées de liquide dues à la pression. Finalement, la peau a été suturée et désinfectée.

2.4 IRM *in vivo*

Les acquisitions IRM *in vivo* ont débuté 60 minutes après l'injection intracérébrale de Dotarem®. Pendant les acquisitions, la respiration de l'animal a été mesurée grâce à un coussin de pression et la température corporelle a été enregistrée grâce à une sonde rectale. Un système de chauffage a permis de maintenir la température corporelle des animaux à 37°C tout au long de la procédure.

Les examens IRM in vivo ont été effectués à l'aide un spectromètre 7T (Agilent, Palo Alto, CA, Etats-Unis) connecté à une console avec le logiciel Vnmrj 3.0. Le spectromètre était équipé avec un insert de

gradient pour rongeurs de 600 mT/m. Une antenne volumique (RapidBiomedical GmbH, Rimpar, Allemagne) et une antenne de surface (RapidBiomedical GmbH, Rimpar, Allemagne) ont été utilisées respectivement pour l'émission et la réception. La souris a été placée en barres d'oreilles et barre de dents, et maintenue sous anesthésie à l'isoflurane (0,8-1,5% en air) délivré par un masque. Une séquence en écho de gradient 3D avec destruction de l'aimantation transversale résiduelle pondérée en T2* (Fast low angle shot ou FLASH) a été utilisée avec une résolution de 29 x 29 x 117 μm^3 (champ de vue = 15 x 15 x 15 mm^3, matrice = 512 x 512 x 128, TR = 50 ms, TE = 25 ms, FA = 20°, N_{rep} = 2, BW = 25 kHz, temps d'acquisition = 1 h 49 min).

2.5 Sacrifice des animaux

Après les expériences IRM *in vivo*, les animaux ont été sacrifiés par surdosage de pentobarbital sodique (100 mg/kg). Puis, une perfusion intracardiaque de paraformaldehyde (PFA) à 4% (Sigma-Aldrich®) a été réalisée. Les cerveaux ont été prélevés, post-fixés dans du PFA 4% pendant 24h, rincés dans du PBS (Phosphate Buffered Saline) 0,1 M, puis conservés à 4°C jusqu'à utilisation.

2.6 IRM *ex vivo*

Les cerveaux des souris et les échantillons de cerveaux de patients atteints de la MA ont été incubés dans une solution de Dotarem® dilué à 2,5 mM dans du PBS pendant 48 heures. Cette méthode de marquage *ex vivo* a permis d'apporter des informations complémentaires sur l'apparence des plaques amyloïdes en IRM grâce à l'obtention d'images à plus haute résolution avec un rapport contraste/bruit augmenté.

Pour la réalisation des acquisitions IRM, les cerveaux ont été placés dans un tube en plastique rempli d'un fluide apotronique à base de perfluorocarbone (Fluorinert®, 3M™). Pour la détection des plaques amyloïdes, une séquence en écho de gradient 3D avec destruction de l'aimantation transversale résiduelle pondérée en T2* (FLASH) a été utilisée avec une résolution de 25 x 25 x 100 μm^3 (champ de vue = 12,8 x 12,8 x 12,8 mm ; matrice = 512 x 512 x 128 ; TR = 40 ms ; TE = 15 ms ; FA = 20° ; N_{rep} = 16 ; temps d'acquisition = 11h39min). Pour la détection des microhémorragies, une séquence en écho de gradient 3D a été utilisée avec une résolution de 50 x 50 x 50 μm^3 (champ de vue = 12,8 x 12,8 x 12,8 mm ; matrice = 256 x 256 x 256 ; TR = 40 ms ; TE = 15ms ; FA = 20° ; N_{rep} = 4 ; temps d'acquisition = 2h53min).

2.7 Histologie

Les cerveaux ont été cryo-protégés dans une solution de sucrose (15% pendant 24h puis 30% pendant 24 heures) et coupés en sections de 30 µm en plan transverse au microtome. Les coupes ont été conservées dans une solution de stockage (glycogène, glycérol, PB 1M, H_2O distillée) à -20°C avant utilisation.

Deux séries de coupes adjacentes ont été utilisées afin de marquer les dépôts d'Aβ (IHC anti-Aβ ou coloration au Rouge Congo) et les dépôts de fer (coloration Perls-DAB). Une double coloration au Rouge Congo et Perls-DAB a également été réalisée.

Pour l'IHC anti-Aβ, les coupes ont été rincées dans du PBS (0,1 M) 3 x 10 minutes puis incubées dans une solution de peroxyde d'hydrogène 30%, dilué au 1/100ème, pendant 20 minutes à température ambiante pour inhiber les peroxydases endogènes du tissu. Les coupes ont ensuite été prétraitées avec une solution de PBS et condensats d'oxyde d'éthylène 0,2% (Triton X-100™, Sigma®) et bloquées pendant 1 heure à température ambiante dans une solution de PBS + Triton 0,2% et NGS à 4,5%. Après ce prétraitement, les coupes ont été incubées avec un anticorps primaire anti-Aβ (anticorps BAM10 monoclonal A3981, dilution 1/1000ème, Sigma-Aldrich®) pendant 48 heures à 4°C. Les coupes ont été rincées et incubées avec un anticorps secondaire (IgG anti-souris biotinylée, BA-9200, dilution 1/1000ème, Vector Laboratories®) pendant une heure à température ambiante. Avant la révélation (VIP substrate kit for peroxidase, Vector Laboratories®), la réaction a été amplifiée pendant une heure avec un complexe avidine-biotine (ABC Vectastain kit, Vector® Labs).

Les plaques amyloïdes ont également été marquées par coloration au Rouge Congo. Les coupes ont été prétraitées pendant 30 minutes à température ambiante dans une solution de NaOH (1%) dans de l'éthanol 80% saturé en NaCl. Les coupes ont ensuite été immergées 30 minutes à température ambiante dans la même solution saturée avec du Rouge Congo.

Pour la coloration de Perls-DAB, les peroxydases endogènes ont été inactivées par immersion dans une solution de méthanol et peroxyde d'hydrogène. Les coupes ont été marquées avec 2% de ferrocyanide de potassium (P9387, Sigma-Aldrich®) et 2% d'acide chlorhydrique pendant 20 minutes. Le marquage du fer a finalement été intensifié en utilisant de la diaminobenzidine (DAB) (1 g/L), Tris (0.2 M) et du peroxyde d'hydrogène 30% pendant 20 minutes.

Pour la détection des microhémorragies, une coloration de Perls sans amplification à la DAB a été réalisée. Les coupes ont été incubées 30 minutes à 40 °C, dans une solution de ferrocyanide de potassium (10%) et d'acide chlorhydrique (20%) préparée extemporanément. Après trois rinçages à l'eau distillée, les coupes ont été colorées par une solution de sulfate d'aluminium à 0,1% (« nuclear fast red », Sigma Aldrich®).

2.8 Microscopie et quantification des immunomarquages

Toutes les coupes ont été numérisées à l'aide d'un scanner Axio scan Z.1 (Zeiss, Oberkochen, Allemagne) à grossissement x 20 (résolution latérale = 0,22 µm).

2.8.1 Mise en registre des images IRM et histologiques

Les images IRM ont été mises en registre manuellement avec les images histologiques, à l'aide du plugin « 3D/volume viewer » du logiciel imageJ. Ce plugin permet la rotation manuelle des images IRM dans les trois dimensions. Des repères anatomiques tels que les différentes couches de l'hippocampe, les faisceaux de substance blanche ou les vaisseaux sanguins ont été utilisés pour aligner les deux images.

2.8.2 Quantification à partir des images IRM et des immunomarquages

La charge amyloïde corticale a été mesurée sur l'ensemble des données IRM *in vivo* et *ex vivo* en utilisant une méthode similaire à celle décrite par Jack et coll en 2004[375]. Brièvement, un total de 32 régions d'intérêt par animal a été analysé pour les échantillons *in vivo* et *ex vivo* : 8 coupes équitablement réparties selon l'axe rostro-caudal ont été sélectionnées et 4 régions d'intérêt circulaires (diamètre d'environ 1 mm) ont été dessinées sur chacune des coupes (deux dans chaque hémisphère) (Figure 38). Les points hypointenses (correspondant à des plaques amyloïdes) ont été contournés manuellement, en excluant les éléments hypointenses présents sur plus de trois coupes adjacentes, ou ayant une forme de tube, suggérant la présence d'un vaisseau sanguin. Les aires des points hypointenses ont été mesurées dans chaque région d'intérêt. La charge amyloïde a été déterminée comme le ratio de l'aire totale des points hypointenses divisé par l'aire de la région d'intérêt. La charge amyloïde et la charge en fer ont été quantifiées de la même façon sur les images histologiques des coupes marquées par IHC anti-Aβ (anticorps BAM10 ou Rouge Congo) et par la coloration de Perls-DAB.

La taille des plaques amyloïdes a été déterminée par la mesure du diamètre de la plaque sur les coupes marquées par IHC anti-Aβ (anticorps BAM10) à l'aide du logiciel Zen Lite 2012 (Zeiss, Oberkochen, Allemagne). Le contour de la plaque a été dessiné manuellement et le diamètre estimé par la moyenne du plus grand et du plus petit axe de cet ellipsoïde.

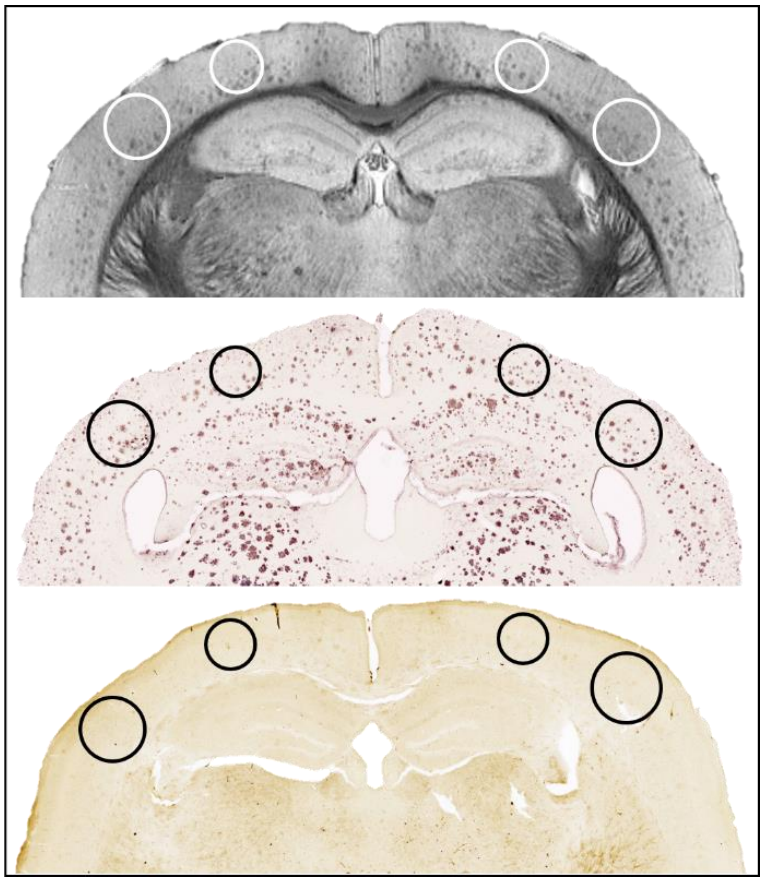


Figure 38 : Exemple de régions d'intérêt utilisées pour la quantification de la charge amyloïde et de la charge en fer.

La proportion de plaques amyloïdes, détectées par IRM et contenant du fer, a été mesurée après mise en registre des coupes histologiques doublement colorées au Rouge Congo et Perls-DAB avec les images IRM correspondantes. Seules les plaques amyloïdes corticales de diamètre supérieur à 36 µm (ce qui correspond au seuil de détection *in vivo*) ont été quantifiées. Au total, 369 plaques ont ainsi été mises en registre et catégorisées en quatre classes : les plaques détectées par IRM contenant du fer, les plaques détectées par IRM ne contenant pas de fer, les plaques non détectées par IRM contenant du fer, les plaques non détectées par IRM ne contenant pas de fer.

2.8.3 Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Graph Pad Prism. Les corrélations entre la charge amyloïde ou la charge en fer mesurées par histologie et la charge en points hypointenses mesurée par IRM ont été évaluées par le calcul du coefficient de corrélation de Pearson. La corrélation a été considérée comme significative pour une p-value ≤ 0,05.

3 Résultats

3.1 Hétérogénéité de la détection des plaques amyloïdes après Gd-staining en fonction du modèle

Des images IRM *in vivo* à haute résolution (29 x 29 x 117 µm^3) des cerveaux de cinq modèles murins transgéniques d'amyloïdose (APP/PS1, APP/PS1$_{dE9}$, APP23, APP$_{SwDI}$ et 3xTg) et de souris contrôles WT ont été réalisées après administration de Dotarem® dans les ventricules latéraux (500 mM ; 1 µl/ventricule). Après sacrifice, les cerveaux de ces souris ont été incubés pendant 48 heures dans une solution de Dotarem® (2,5 mM dilué dans du PBS) avant acquisition d'images IRM *ex vivo* à haute résolution (25 x 25 x 100 µm^3).

Comme décrit précédemment[236,240,241], Le SNR était fortement augmenté après injection de l'agent de contraste. Avant injection, aucun point hypointense n'a été observé, à l'exception de certains points hypointenses identifiés comme des vaisseaux sanguins, observés dans tout le cerveau, et de quelques points hypointenses observés dans le thalamus et le subiculum. De nombreux points hypointenses ont pu être observés après injection de l'agent de contraste (Figure 39).

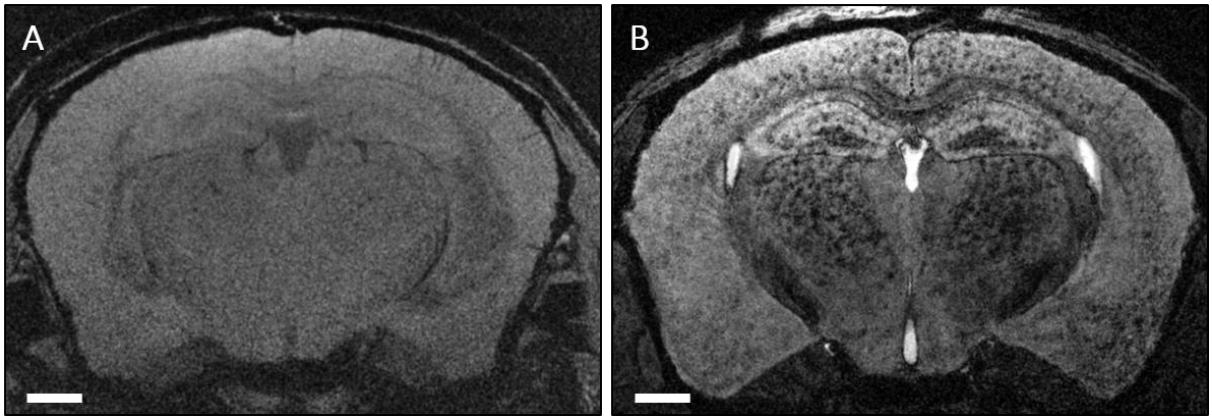


Figure 39 : Images IRM *in vivo* d'une souris APP/PS1 avant (A) et après (B) injection intracérébroventriculaire de Dotarem®.

Le SNR était fortement augmenté et de nombreux points hypointenses (plaques amyloïdes) étaient visibles après injection de l'agent de contraste. Barre d'échelle = 1 mm.

Après Gd-staining, une forte hétérogénéité de détection a pu être observée en fonction du modèle. De nombreux points hypointenses ont été détectés dans le cerveau des modèles APP/PS1, APP/PS1$_{dE9}$ et APP23 mais pas chez les modèles 3xTg (sauf dans le subiculum) ni APP$_{SwDI}$. Ces hypointensités étaient

alors présentes principalement dans tout le cortex, l'hippocampe, le thalamus et l'amygdale chez les souris APP/PS1, APP/PS1$_{dE9}$ et APP23. Ces points hypointenses n'ont pas été observés sur les images IRM des souris contrôles. La mise en registre des images IRM avec les images des coupes histologiques marquées par IHC anti-Aβ (anticorps BAM10) a permis d'identifier ces points hypointenses comme des dépôts d'Aβ (Figure 41). Les points hypointenses observés sur les images IRM avant injection correspondaient à des dépôts amyloïdes visibles spontanément.

L'âge des animaux a été choisi de façon à pouvoir observer une amyloïdose déjà établie dans le cerveau jusqu'au plus vieil animal disponible dans notre colonie. Comme montré précédemment[236], une augmentation de la densité en points hypointenses a été observée avec l'âge des souris (Figure 40).

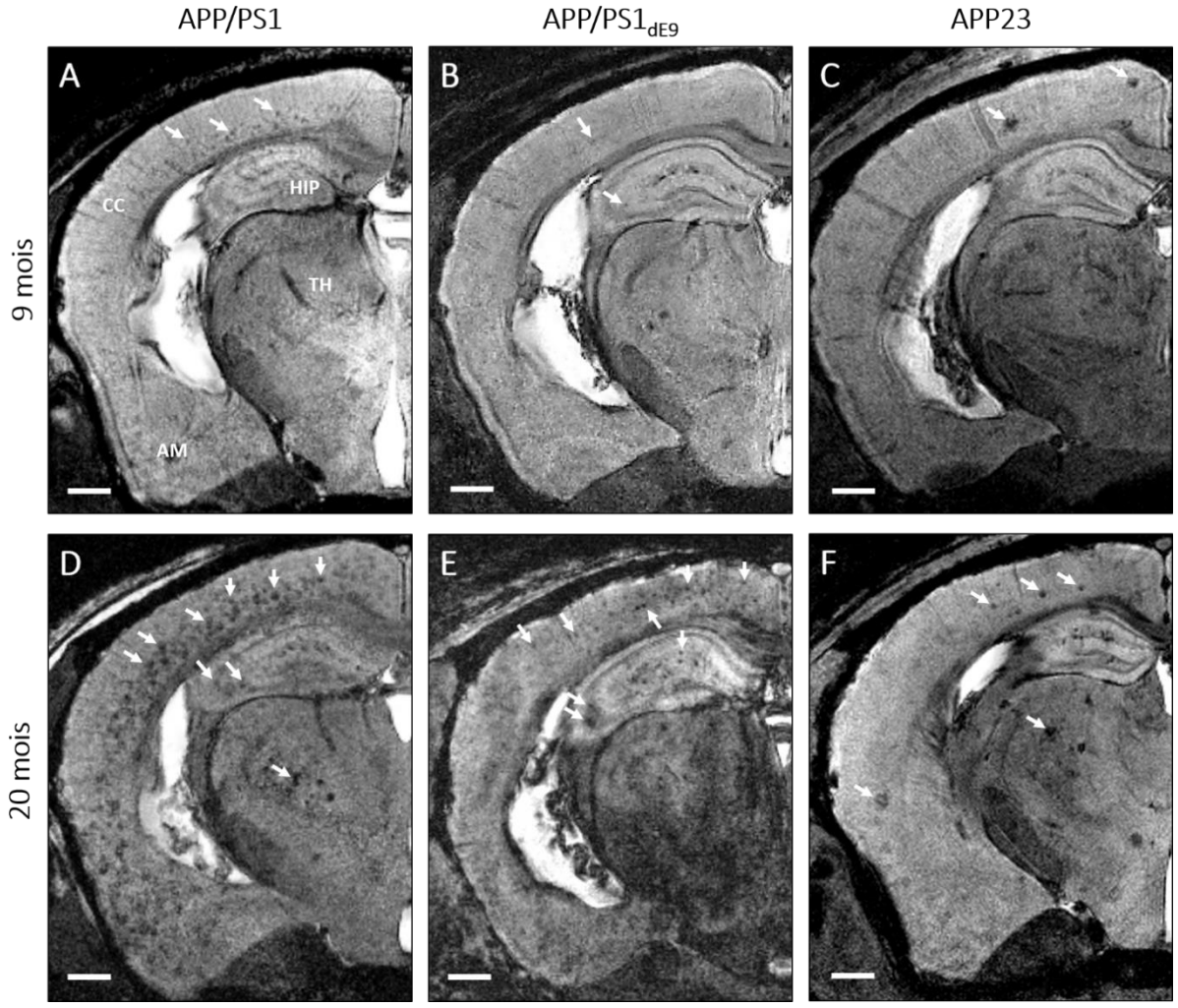


Figure 40 : Détection des plaques amyloïdes par IRM *in vivo* après Gd-staining dans le cerveau de souris APP/PS1, APP/PS1$_{dE9}$ et APP23 âgées de 9 mois (A-C) et 20 mois (D-F).

Les points hypointenses (flèches blanches) étaient principalement détectés dans le cortex (CC), l'hippocampe (HIP), le thalamus (TH) et l'amygdale (AM). La densité en points hypointenses augmentait avec l'âge. Barre d'échelle = 500 µm.

3.2 Corrélats histologiques

A la suite des acquisitions IRM *ex vivo*, les cerveaux ont été coupés en sections de 40 µm d'épaisseur et différents marquages immunohistochimiques ont été réalisés. L'étude de la charge amyloïde a été réalisée à l'aide de l'anticorps BAM10 qui reconnaît la partie C-terminale de la protéine Aβ. Cet anticorps permet de marquer tous les dépôts d'Aβ quel que soit leur typologie (focaux, diffus ou intracellulaires). Une coloration au Rouge Congo a également été réalisée. Ce colorant est spécifique des dépôts fibrillaires (focaux) d'Aβ. L'étude du fer a été réalisée par la coloration de Perls avec amplification à la DAB qui permet de marquer les ions ferriques. Une double coloration au Rouge Congo et Perls-DAB a également été réalisée pour étudier plus précisément le lien entre amyloïdose et fer.

Une forte hétérogénéité entre les modèles a été observée concernant la typologie, la taille et le contenu en fer des dépôts d'Aβ.

3.2.1 Les modèles à dépôts focaux (APP/PS1, APP/PS1$_{dE9}$ et APP23)

Les modèles APP/PS1, APP/PS1$_{dE9}$ et APP23 ont été sélectionnés car ils présentent majoritairement des plaques amyloïdes focales avec un cœur dense d'Aβ souvent associé à une couronne de neurites dystrophiques. La mise en registre des images IRM avec les images des coupes histologiques marquées par IHC anti-Aβ (anticorps BAM10) a montré que ces dépôts focaux étaient facilement visibles par IRM après Gd-staining (Figure 41). Cela confirme que les points hypointenses observés par IRM correspondent aux plaques amyloïdes détectées par IHC anti-Aβ.

La taille des plaques amyloïdes est un paramètre essentiel pour leur détection. Nos images IRM ont été acquises avec une résolution de 29 x 29 x 117 µm^3 *in vivo* et 25 x 25 x 100 µm^3 *ex vivo*. Considérant que deux pixels sont nécessaires pour permettre de visualiser une modification de contraste, la taille minimale détectable des dépôts est théoriquement de 58 µm *in vivo* et 50 µm *ex vivo*. En pratique, les plus petites plaques amyloïdes détectées par IRM *in vivo* mesuraient 36 µm, 37 µm et 46 µm de diamètre pour les modèles APP/PS1, APP/PS1$_{dE9}$ et APP23 respectivement. *Ex vivo*, les tailles minimales détectées étaient de 36 µm, 30 µm and 49 µm pour les modèles APP/PS1, APP/PS1$_{dE9}$ et APP23 respectivement.

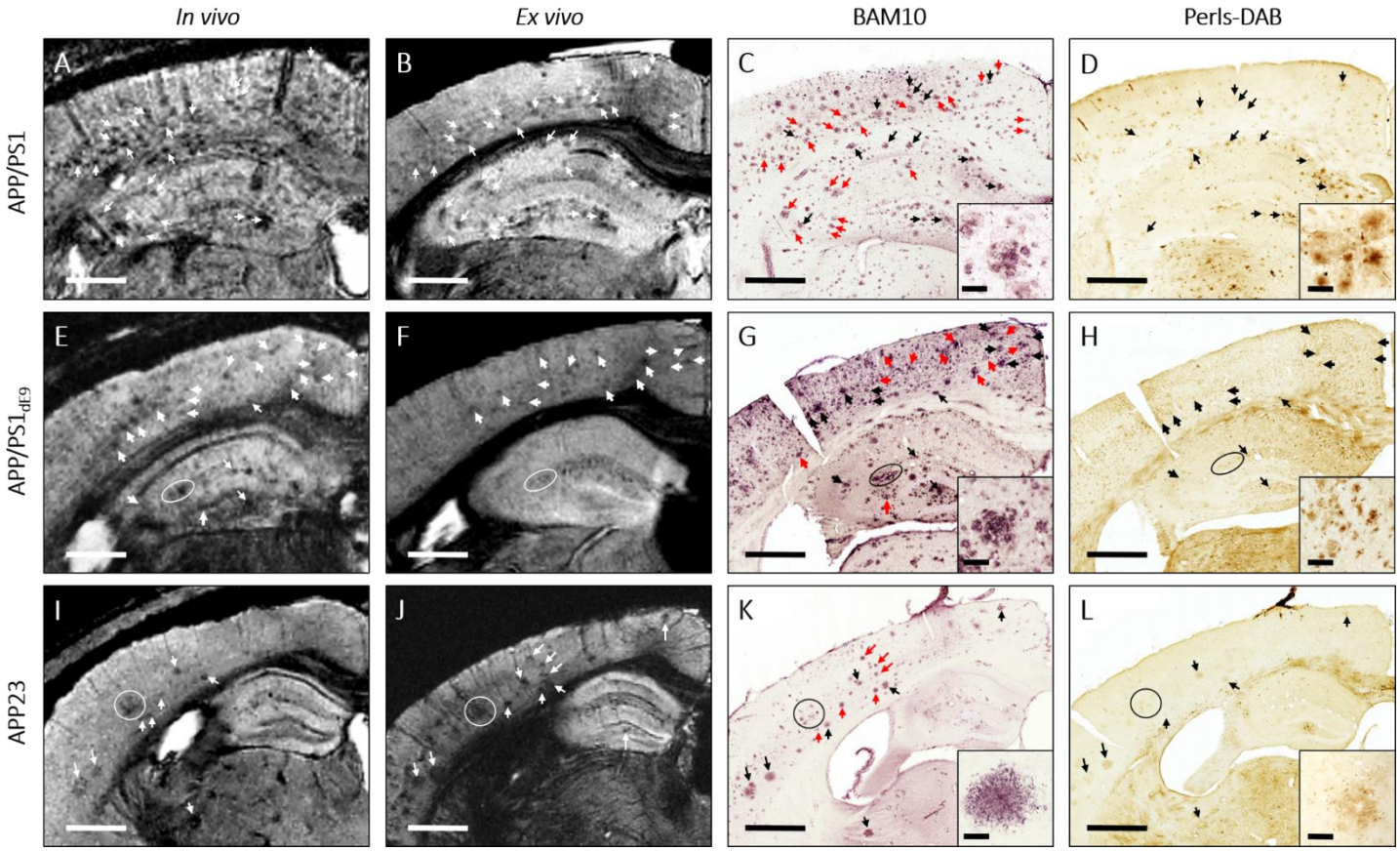


Figure 41 : Détection des plaques amyloïdes par IRM après Gd-staining *in vivo* (1ère colonne) et *ex vivo* (2ème colonne) dans les modèles APP/PS1 (A-D), APP/PS1$_{dE9}$ (E-H) et APP23 (I-L).

Les images IRM ont été mises en registre avec les marquages IHC anti-Aβ par l'anticorps BAM10 (3ème colonne) et du fer par la coloration de Perls-DAB (4ème colonne). Les inserts dans les colonnes 3 et 4 montrent l'aspect de dépôts amyloïdes typiques pour chaque modèle. De nombreux points hypointenses (flèches et cercles blancs) ont été observés *in vivo* et *ex vivo* dans le cerveau de ces trois modèles. Ces hypointensités ont pu être mises en registre avec les plaques amyloïdes marquées par IHC anti-Aβ (C, G, K ; flèches et cercles noirs et rouges). La coloration de Perls-DAB a montré la présence de dépôts focaux de fer co-localisant avec des plaques amyloïdes (flèches noires). Certaines plaques amyloïdes étaient dépourvues de fer (flèches rouges). Ces deux types de dépôts d'Aβ, contenant du fer ou non, ont pu être détectés par IRM après Gd-staining, indiquant que le fer ne semble pas obligatoire pour la détection des plaques amyloïdes. Barre d'échelle = 500 µm et 50 µm.

Une quantification de la taille des dépôts amyloïdes, observés sur les coupes marquées par IHC anti-Aβ (anticorps BAM10), a montré une hétérogénéité de distribution de la taille des plaques amyloïdes en fonction du modèle. La figure 42 présente la répartition des plaques amyloïdes en fonction de leur diamètre dans les modèles APP/PS1, APP/PS1$_{dE9}$ et APP23. La majorité des plaques amyloïdes présentes dans ces trois modèles mesuraient moins de 40 µm de diamètre. Chez les souris APP/PS1, APP/PS1$_{dE9}$ et APP23 respectivement, 78%, 84,5% et 82% des plaques marquées par BAM10 mesuraient moins de 40 µm. Le modèle APP23 est celui qui présentait la plus forte proportion de grosses plaques (1% de plaques de diamètre > 160 µm).

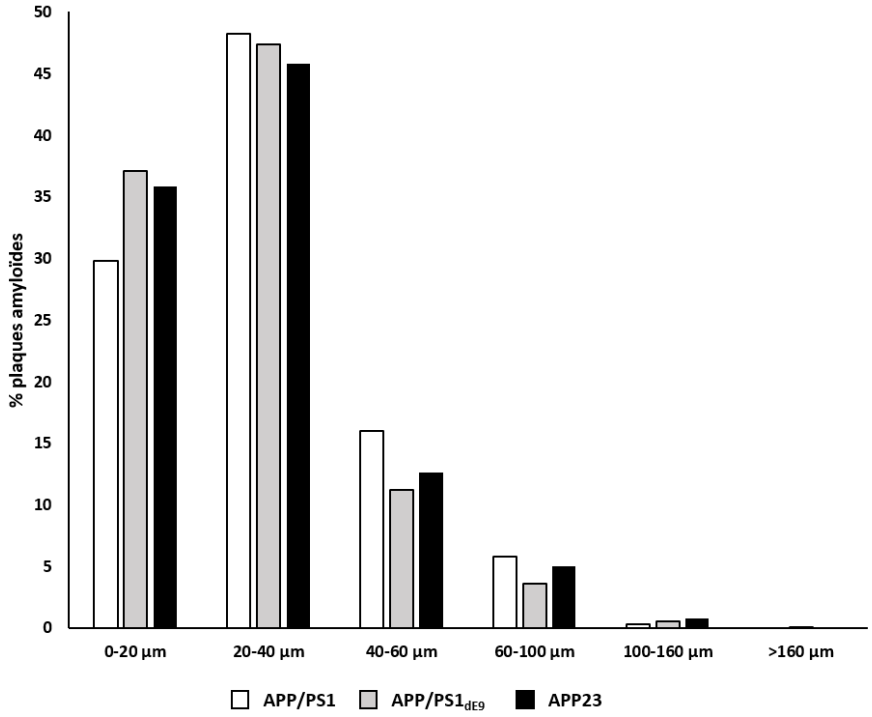


Figure 42 : Répartition de la proportion des plaques amyloïdes en fonction de leur diamètre dans le cerveau de souris APP/PS1 (blanc), APP/PS1$_{dE9}$ (gris) et APP23 (noir).

Un autre paramètre essentiel à la détection des plaques amyloïdes par IRM, en contraste spontané, semble être la présence de fer au cœur de la plaque. Pour étudier le lien entre présence de fer et détection par Gd-staining, une coloration du fer par la méthode de Perls-DAB a été réalisée sur les coupes adjacentes à celles utilisées pour l'IHC anti-Aβ. Ainsi, une partie des plaques amyloïdes observées sur les coupes marquées par l'anticorps BAM10 étaient également retrouvées sur les coupes utilisées pour la coloration de Perls-DAB. Ces coupes histologiques ont ensuite été mises en registre avec les images IRM *in vivo* et *ex vivo*.

Comme attendu, la coloration de Perl-DAB a montré un marquage important au niveau de régions cérébrales riches en fer : fibres de substance blanche, striatum et substance noire. La coloration de Perls-DAB a montré une accumulation focale de fer au cœur des dépôts amyloïdes focaux observés

dans les modèles APP/PS1 et APP/PS1$_{dE9}$, notamment au niveau des plaques amyloïdes du subiculum et du thalamus. La charge en fer des plaques amyloïdes était plus faible dans le modèle APP23 (Figure 41). Quelques vaisseaux sanguins étaient visibles bien que la perfusion intracardiaque des souris au PFA 4% ait permis d'éliminer la quasi-totalité du sang présent dans ces vaisseaux. Quelques microhémorragies ont aussi pu être observées.

La mise en registre des images IRM avec les images des coupes marquées par IHC anti-Aβ et Perls-DAB a permis de montrer que certaines plaques amyloïdes visibles par IRM contenaient une accumulation focale de fer en leur cœur (Figure 41, flèches noires). Cependant, une partie des plaques visibles en IRM ne contenaient pas ou peu de fer (Figure 41, flèches rouges). Cela semble indiquer que la présence de fer n'est pas obligatoire pour la détection des plaques amyloïdes par IRM après Gd-staining.

La mesure de la charge amyloïde détectée par histologie et de la charge en points hypointenses observée par IRM *in vivo* a montré une corrélation significative entre les deux (r^2 = 0,82 ; p < 0,01 ; Figure 43). La charge en fer, détectée par la coloration de Perls-DAB, a été mesurée de la même manière que la charge amyloïde et la charge en hypointensités détectées par IRM. La corrélation entre la charge en points hypointenses détectée par IRM et la charge en fer détectée par histologie s'est révélée non significative (r^2 = 0,35, p > 0,05, Figure 43). Cela semble confirmer que la présence de fer n'est pas obligatoire pour la détection des plaques amyloïdes par IRM après Gd-staining.

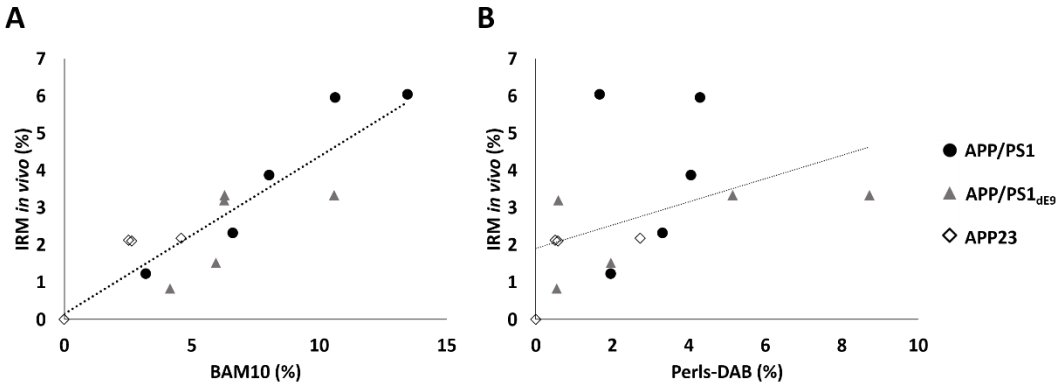


Figure 43 : Corrélation entre la charge amyloïde détectée par IRM *in vivo* après Gd-staining et la charge amyloïde détectées par IHC anti-Aβ à l'aide de l'anticorps BAM10 (A) ou la charge en fer par la coloration de Perls-DAB (B).

Une forte corrélation a été observée entre la charge amyloïde détectée par IRM et par IHC anti-Aβ (A, r^2 = 0,82 ; p < 0,01) mais pas avec la charge en fer (B, r^2 = 0,35 ; p > 0,05).

Les coupes histologiques utilisées mesuraient 40 µm d'épaisseur. Or la majorité des plaques amyloïdes détectées mesuraient moins de 40 µm de diamètre. L'utilisation de deux séries de coupes adjacentes pour l'IHC anti-Aβ et la coloration du fer a donc permis d'observer une partie des plaques sur les deux coupes mais certaines plaques, de diamètre inférieur à 40 µm, ont pu ne pas être retrouvées dans les deux séries adjacentes. Pour étudier de façon plus précise la relation entre plaques amyloïdes, fer et détection par IRM, une double coloration au Rouge Congo et Perls-DAB a été réalisée. La mise en registre de ces coupes histologiques avec les images IRM a de nouveau permis de montrer que certaines plaques amyloïdes visibles par IRM contenaient une forte accumulation de fer en leur cœur (Figure 44, flèches noires) mais que d'autres ne contenaient pas ou peu de fer (Figure 44, flèches rouges). De nouveau, cela confirme que la présence de fer n'est pas obligatoire pour la détection des plaques amyloïdes par IRM après Gd-staining.

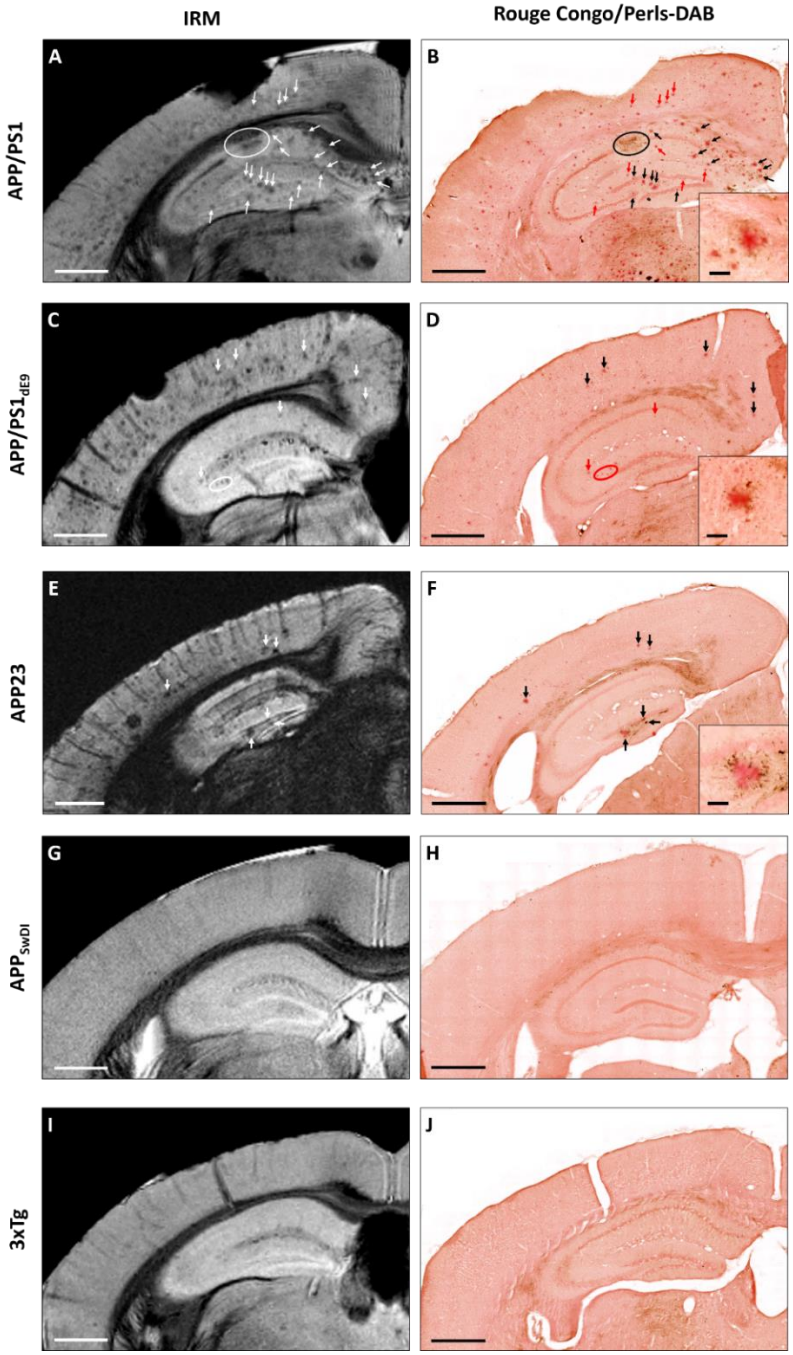


Figure 44 : Comparaison de la détection des plaques amyloïdes par IRM après Gd-staining (gauche) et par double coloration au Rouge Congo (marquage de l'Aβ fibrillaire) et Perls-DAB (marquage du fer) (droite).

Ces images ont été mises en registre chez des souris APP/PS1 (A, B), APP/PS1$_{dE9}$ (C, D), APP23 (E, F), APP$_{SwDI}$ (G, H) et 3xTg (I, J). Comme précédemment, des points hypointenses (flèches et cercle blancs) ont été observés dans le cerveau des souris APP/PS1 (A), APP/PS1$_{dE9}$ (C) et APP23 (E). Ces hypointensités ont pu être mises en registre avec les plaques amyloïdes détectées par coloration au Rouge Congo (B, D, F ; flèches noires et rouges). La coloration de Perl-DAB a montré des dépôts focaux de fer (flèches noires), chez les souris APP/PS1 (B), APP/PS1$_{dE9}$ (D) et APP23 (F), qui co-localisaient avec le marquage au Rouge Congo montrant que certaines plaques amyloïdes contiennent du fer. Certaines plaques amyloïdes, dépourvues de fer (flèches rouges), étaient également observées sur les coupes histologiques de ces souris et étaient également détectées après IRM après Gd-staining. Aucun dépôt amyloïde ni dépôt de fer n'a été observé chez les souris APP$_{SwDI}$ (G, H) et 3xTg (I, J). Barre d'échelle = 500 µm et 50 µm.

Pour évaluer la proportion de plaques amyloïdes visibles en IRM et contenant du fer, les plaques amyloïdes corticales de diamètre supérieur au seuil de détection (36 µm) ont été catégorisées en quatre classes :

- les plaques détectées par IRM contenant du fer (figure 45, noir)
- les plaques détectées par IRM ne contenant pas de fer (figure 45, rouge)
- les plaques non détectées par IRM contenant du fer (figure 45, gris)
- les plaques non détectées par IRM ne contenant pas de fer (figure 45, rose)

La répartition des plaques amyloïdes entre les quatre catégories s'est révélée peu variable entre les modèles. De plus, 76% des plaques amyloïdes corticales détectées par histologie l'étaient aussi par IRM après Gd-staining. Parmi elles, 67% contenaient du fer et 33% n'en contenaient pas. Enfin, 24% des plaques amyloïdes détectées par histologie ne l'étaient pas par IRM après Gd-staining. Parmi elles, 58% contenaient du fer et 42% n'en contenaient pas. Si l'on considère que seules les plaques amyloïdes contenant du fer sont détectables spontanément par IRM, le Gd-staining permettrait donc d'augmenter la détection de 25%.

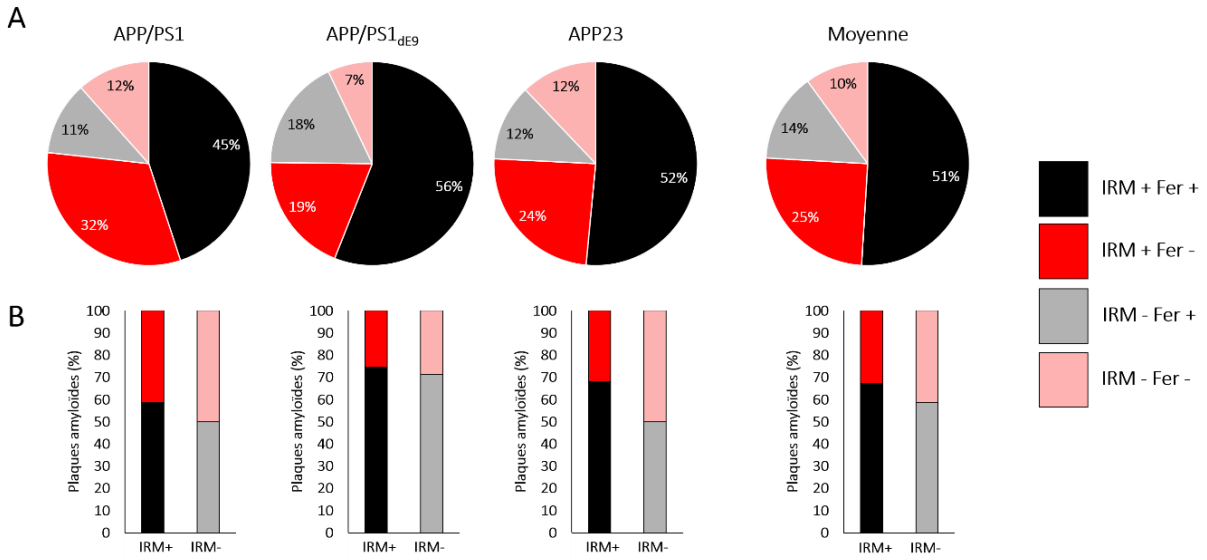


Figure 45 : Détectabilité des plaques amyloïdes par IRM après Gd-staining en fonction de leur contenu en fer chez les souris APP/PS1, APP/PS1$_{dE9}$ et APP23.

(A) Les plaques amyloïdes corticales (de diamètre supérieur au seuil de détection) ont été réparties en quatre catégories : les plaques détectées par IRM contenant du fer (IRM+ Fer+, noir), les plaques détectées par IRM ne contenant pas de fer (IRM+ Fer-, rouge), les plaques non détectées par IRM contenant du fer (IRM- Fer+, gris), les plaques non détectées par IRM ne contenant pas de fer (IRM- Fer-, rose). (B) Parmi les plaques amyloïdes détectées par IRM, 59%, 75% et 68% des plaques, présentes chez les souris APP/PS1, APP/PS1$_{dE9}$ et APP23 respectivement, contenaient du fer. Parmi les plaques amyloïdes non détectées par IRM, 50%, 71% et 50% des plaques, présentes chez les souris APP/PS1, APP/PS1$_{dE9}$ et APP23 respectivement, étaient dépourvues de fer.

3.2.2 Les modèles à dépôts diffus d'Aβ ($APPS_{SwDI}$)

Le modèle APP_{SwDI} a été sélectionné car il présente majoritairement des dépôts d'Aβ diffus. Aucune hypointensité (à l'exception de certaines identifiées comme des vaisseaux sanguins) n'a été observée sur les images IRM *in vivo* et *ex vivo* après Gd-staining. L'IHC anti-Aβ a montré la présence de larges dépôts d'Aβ non marqués par le Rouge Congo. La coloration de Perls-DAB n'a pas révélé d'accumulation de fer au niveau de ces dépôts (Figure 44 et Figure 46).
Les dépôts diffus d'Aβ ne semblent donc pas détectables par IRM après Gd-staining.

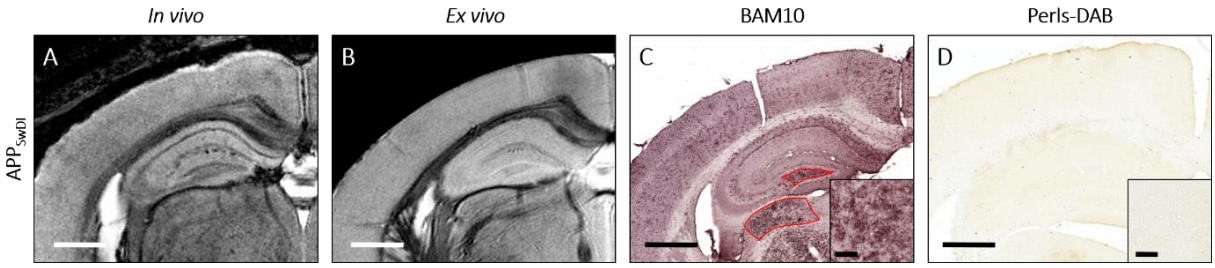


Figure 46 : Détection des dépôts d'Aβ diffus par IRM après Gd-staining *in vivo* (A) et *ex vivo* (B) dans le modèle APP_{SwDI}.

Les images IRM ont été mises en registre avec les marquages IHC anti-Aβ par l'anticorps BAM10 (C) et du fer par la coloration de Perls-DAB (D). L'IHC anti-Aβ et la coloration de Perls-DAB ont montré la présence de dépôts d'Aβ diffus, de grandes tailles (C, rouge) et dépourvus de fer (D). Ces dépôts n'ont pas été détectés par IRM après Gd-staining *in vivo* (A) et *ex vivo* (B). Barre d'échelle = 500 µm et 50 µm.

3.2.3 Les modèles à dépôts intracellulaires d'Aβ (3xTg)

Le modèle 3xTg a été sélectionné car il présente majoritairement des dépôts intracellulaires, principalement composés d'$Aβ_{42}$, dès 3-4 mois dans le cortex. Les dépôts extracellulaires d'Aβ apparaissent dans le cortex frontal à partir de 6 mois et atteignent un plateau aux alentours de 12 mois. Dans cette étude, l'IHC anti-Aβ a montré la présence de dépôts intracellulaires d'Aβ jusqu'à 17 mois chez ces souris. Ces agrégats intracellulaires étaient présents dans tout le cortex et l'hippocampe et mesuraient moins de 20 µm. La coloration de Perls-DAB n'a pas montré la présence de fer au niveau de ces lésions. Aucune hypointensité (à l'exception de certaines identifiées comme des vaisseaux sanguins) n'a été observée sur les images IRM *in vivo* et *ex vivo* après Gd-staining chez ces souris (Figure 47).

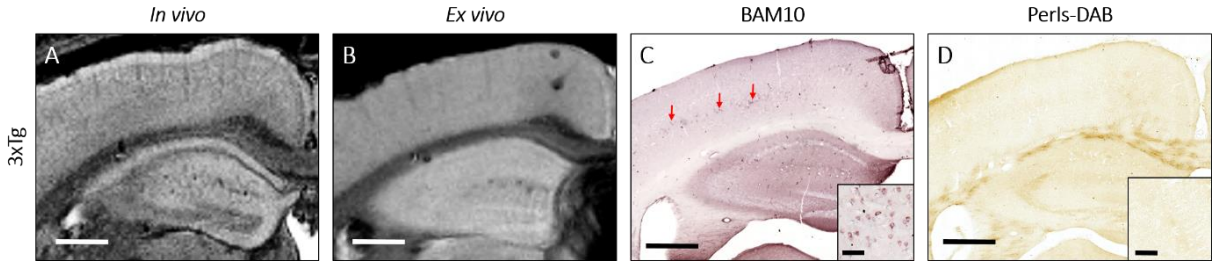


Figure 47: Détection des dépôts intracellulaires d'Aβ par IRM après Gd-staining *in vivo* (A) et *ex vivo* (B) dans le modèle 3xTg, âgé de moins de 17 mois.

Les images IRM ont été mises en registre avec les marquages IHC anti-Aβ par l'anticorps BAM10 (C) et du fer par la coloration de Perls-DAB (D). L'IHC anti-Aβ et la coloration de Perls-DAB ont montré la présence de dépôts d'Aβ intracellulaires (C, flèches rouges) et dépourvus de fer (D). Ces dépôts n'étaient pas détectés par IRM après Gd-staining *in vivo* (A) et *ex vivo* (B). Barre d'échelle = 500 µm et 50 µm.

Chez les souris 3xTg âgées de plus de 17 mois, l'IHC anti-Aβ a montré la présence de dépôts extracellulaires d'Aβ dans de nombreuses régions cérébrales : cortex, hippocampe avec de nombreuses plaques dans le subiculum, thalamus, amygdale, etc. Ces dépôts ont été identifiés comme diffus (non marqués par le Rouge Congo) à l'exception des plaques du subiculum qui étaient focales et amyloïdes (marquées par le Rouge Congo). De façon intéressante, ces plaques focales étaient le seul type de lésion détecté par IRM après Gd-staining (Figure 48). Cela semble indiquer que seuls les dépôts focaux sont détectables par IRM après Gd-staining. La coloration de Perls-DAB n'a pas montré la présence de fer au niveau des dépôts diffus mais une forte accumulation au niveau des plaques focales du subiculum.

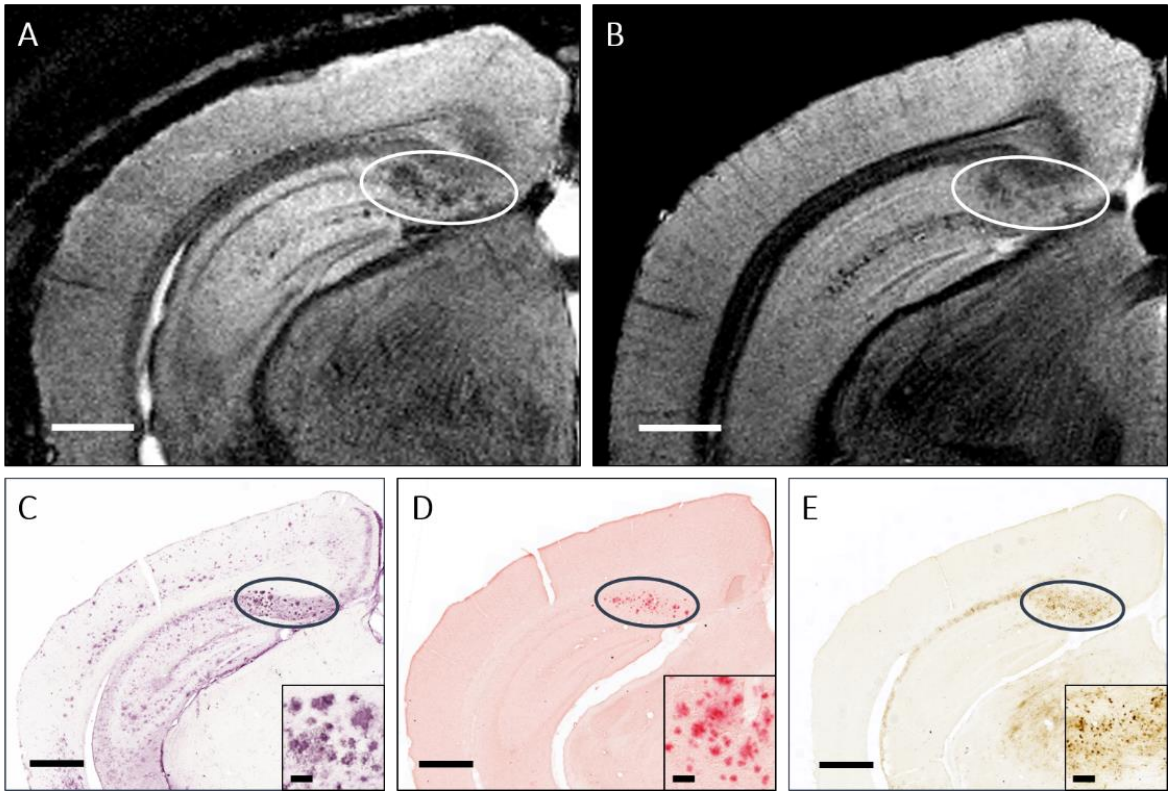


Figure 48 : Comparaison de la détection des différents types de dépôts d'Aβ par IRM après Gd-staining *in vivo* (A) et *ex vivo* (B) dans le modèle 3xTg, âgé de plus de 17 mois.

Les images IRM ont été mises en registre avec les marquages IHC anti-Aβ par l'anticorps BAM10 marquant tous les types de dépôts d'Aβ (C), la coloration au Rouge Congo marquant les dépôts d'Aβ fibrillaires (D) et la coloration de Perls-DAB marquant le fer (E). L'IHC anti-Aβ a montré la présence de nombreux dépôts d'Aβ dans tout le cortex et l'hippocampe. La coloration au Rouge Congo a montré que ces dépôts étaient de nature diffuse à l'exception des dépôts du subiculum qui présentaient une nature fibrillaire et focale (C-D, rond noir). La coloration de Perls-DAB a montré que les dépôts diffus d'Aβ étaient dépourvus de fer. A l'inverse, les dépôts amyloïdes du subiculum présentaient une forte quantité de fer (E, rond noir). Ces derniers étaient les seuls détectés par IRM après Gd-staining *in vivo* et *ex vivo* (A-B, ronds blancs). Barre d'échelle = 500 µm et 200 µm.

Chez les souris contrôles, aucune hypointensité (à l'exception de certaines identifiées comme des vaisseaux sanguins) n'a été observée sur les images IRM *in vivo* et *ex vivo* après Gd-staining. Aucune plaque amyloïde ou dépôt anormal de fer n'ont été observés par histologie chez ces souris (Figure 49).

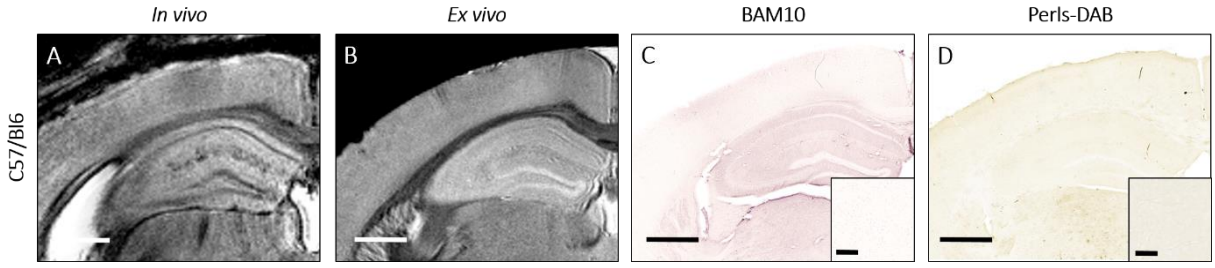


Figure 49 : Images IRM après Gd-staining *in vivo* (A) et *ex vivo* (B) et images histologiques (C-D) chez les souris WT.

Les images IRM ont été mises en registre avec les marquages IHC anti-Aβ par l'anticorps BAM10 (C) et du fer par la coloration de Perls-DAB (D). L'IHC anti-Aβ et la coloration de Perls-DAB n'ont montré aucun dépôt amyloïde ou dépôt anormal de fer. Aucun point hypointense n'a été détecté par IRM. Barre d'échelle = 500 µm et 50 µm.

3.3 Détection de l'angiopathie amyloïde cérébrale

L'Aβ peut également s'accumuler dans la paroi des vaisseaux sanguins cérébraux. Nabuurs et coll. ont montré précédemment que certains vaisseaux angiopathes de gros calibre (artères et artérioles) étaient détectables par IRM, sans utilisation d'agent de contraste. Cependant, aucune modification de contraste n'a été observée au niveau des capillaires et dans certains vaisseaux de gros calibre également angiopathes. Bien que l'origine de ces anomalies de contraste n'ait pas été élucidée, ces auteurs les attribuent à la présence d'Aβ mais également aux modifications morphologiques des vaisseaux induites par l'AAC[227]. Il est également important de noter que le sang, et plus particulièrement le fer de l'hémoglobine, présent dans les vaisseaux sanguins *in vivo*, apparaît en hypointense sur des images pondérées en T2*. L'aspect des vaisseaux sanguins peut alors être confondu avec celui des plaques amyloïdes. Sur nos images IRM, les vaisseaux sanguins ont été identifiés comme des éléments hypointenses présents sur plus de trois coupes adjacentes, ou ayant une forme allongée. *Ex vivo*, la perfusion intracardiaque, réalisée au moment du sacrifice des animaux, a théoriquement permis d'éliminer le sang présent dans les vaisseaux sanguins. Des résidus de sang ont pu malgré tout persister et induire des hypointensités sur des images pondérées en T2*.

Nous avons étudié la capacité du Gd-staining à permettre la détection de l'AAC. Les vaisseaux sanguins étaient visibles sous forme d'hypointensités de forme allongée *in vivo* et *ex vivo*, dans tous les modèles étudiés et chez les souris contrôles. *In vivo*, la présence de sang dans tous les vaisseaux n'a pas permis de distinguer les vaisseaux angiopathes des vaisseaux sains. *Ex vivo*, la mise en registre des images IRM et des images histologiques marquées par IHC anti-Aβ et par la coloration de Perls-DAB n'a pas permis de distinguer les vaisseaux angiopathes des vaisseaux sains. Tous les vaisseaux apparaissaient comme des structures linéaires hypointenses, indépendamment de la présence d'Aβ (Figure 50).

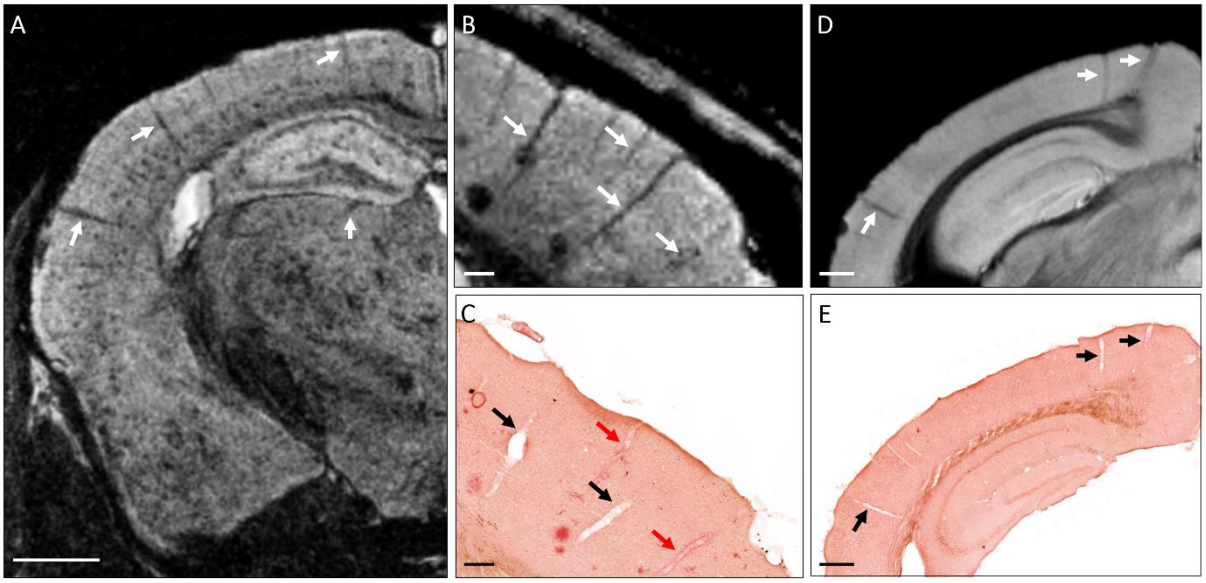


Figure 50 : Détectabilité de l'AAC par IRM après Gd-staining.

Des hypointensités, de forme linéaire ou ponctuelle, présentes sur plusieurs coupes adjacentes (flèches blanches), étaient visibles sur les images IRM après Gd-staining chez les souris transgéniques (A-C) et chez les souris contrôles WT (D-E). La mise en registre des images IRM et histologiques marquées par le Rouge Congo a montré que ces hypointensités (flèches blanches, B) correspondaient à des vaisseaux sanguins angiopathes (C, flèches rouges) ou non (C, flèches noires). Des hypointensités similaires ont été observées chez les souris contrôles (flèches blanches, D) et correspondaient également à des vaisseaux sanguins (flèches noires, E). Cela confirme que l'Aβ vasculaire n'est pas responsable de la nature hypointense des vaisseaux sanguins observés sur les images IRM après Gd-staining. Barre d'échelle = 500 µm.

3.4 Détection des microhémorragies

Des microhémorragies cérébrales sont fréquemment observées dans le cerveau des souris modèles d'amyloïdose et chez les patients atteints de la MA. En l'absence d'agent de contraste, elles apparaissent comme des lésions hypointenses, arrondies et homogènes sur des images pondérées en T2*. Elles peuvent donc être confondues avec des plaques amyloïdes.

Une cohorte de cinq souris APP/PS1, âgées de 18 mois, a été utilisée pour étudier l'aspect de ces lésions par IRM après Gd-staining. Comme décrit précédemment, des microhémorragies ont pu être observées par IRM avant Gd-staining. Ces lésions apparaissaient sous forme de rares points hypointenses présents dans l'ensemble du cerveau. Ces lésions restaient détectables après Gd-staining, en plus des points hypointenses correspondant aux plaques amyloïdes. La différenciation entre ces deux lésions s'est cependant révélée difficile bien que les microhémorragies présentaient généralement une taille supérieure à celle des plaques amyloïdes (Figure 51).

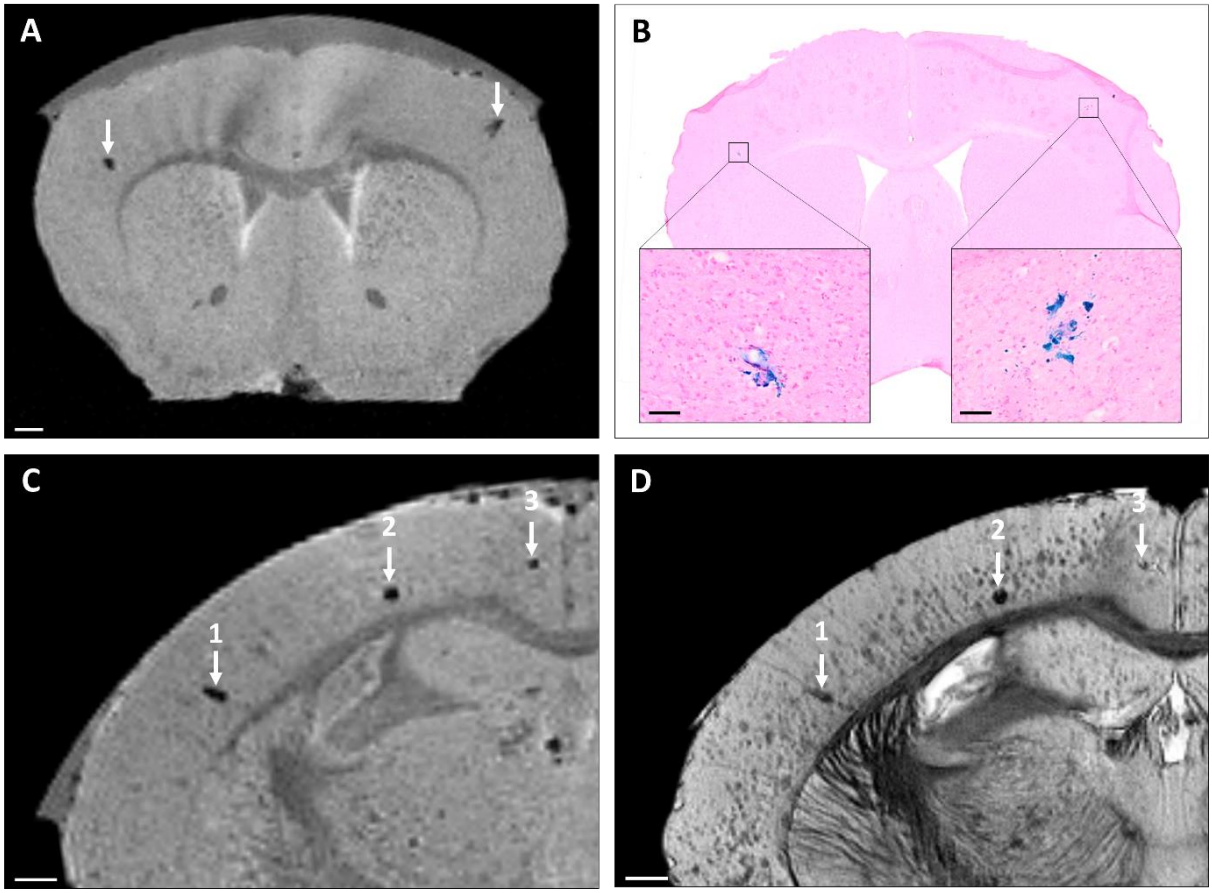


Figure 51 : Détectabilité des microhémorragies par IRM après Gd-staining

Des hypointensités focales, rondes et de grandes tailles ont été observées sur les images IRM avant Gd-staining (A, C, flèches blanches). La mise en registre des images IRM (A) et des images histologiques après coloration de Perls (B) a montré que ces hypointensités correspondaient à des microhémorragies. Les microhémorragies observées sur les images IRM avant Gd-staining (C, flèches blanches) ont également pu être observées sur les images IRM après Gd-staining (D, flèches blanches). Barre d'échelle = 500 µm et 100 µm.

3.5 Détection des plaques amyloïdes humaines par Gd-staining

Le Gd-staining n'avait encore jamais été utilisé pour détecter des plaques amyloïdes humaines. Nous avons donc étudié la capacité du Gd-staining à détecter les plaques amyloïdes humaines en *post mortem* sur des échantillons de cortex pariétal (substance grise et substance blanche adjacente) issus de patients atteints de la MA (n = 3) et d'un sujet âgé sain (n = 1). Comme pour les cerveaux de souris, ces échantillons ont été incubés pendant 48 heures dans une solution de Dotarem® (2,5 mM dilué dans du PBS) avant acquisition d'images IRM à haute résolution (25 x 25 x 100 μm^3). Puis, ces échantillons ont été coupés en sections de 40 µm d'épaisseur et différents marquages immunohistochimiques ont été réalisés (IHC anti-Aβ, coloration de Perls-DAB et double marquage Rouge Congo/Perls-DAB).

Après Gd-staining, de nombreux points hypointenses ont été observés dans la substance grise mais pas dans la substance blanche adjacente des échantillons étudiés. Ces points hypointenses n'ont pas été observés sur les images IRM du cerveau contrôle à l'exception de certains points identifiés comme des vaisseaux sanguins.

La mise en registre des images IRM avec les images des coupes histologiques marquées par IHC anti-Aβ (anticorps BAM10) a permis d'identifier certains de ces points hypointenses comme des dépôts amyloïdes (Figure 52). La mise en registre des images IRM avec la coloration de Perls-DAB a permis d'identifier les autres points hypointenses comme des vaisseaux sanguins. Il est important de noter que les vaisseaux sanguins étaient facilement visibles, sous forme de structures hypointenses, sur les images IRM pondérées en T2* de ces échantillons, du fait de la présence de sang coagulé (contrairement aux souris ayant reçu une perfusion intracardiaque de PFA au moment du sacrifice ce qui a permis d'éliminer le sang des vaisseaux sanguins). Sur les coupes histologiques, les plaques amyloïdes mesuraient entre 10 et 200 µm de diamètre avec la majorité des plaques de diamètre inférieur à 25 µm. Les plus petites plaques amyloïdes détectées par IRM après Gd-staining mesuraient 25 µm.
La coloration de Perls-DAB a montré la présence de fer dans la majorité des plaques amyloïdes observées par histologie. La présence de fer, au cœur des plaques amyloïdes détectée par IRM, était fréquemment observée (flèches noires, Figure 52). Cependant, comme chez la souris, certaines plaques amyloïdes dépourvues de fer étaient également détectées par IRM après Gd-staining (flèches rouges, Figure 52). Cela semble indiquer que, comme chez la souris, la présence de fer au cœur de la plaque n'est pas nécessaire pour sa détection par IRM après Gd-staining.

Un double marquage des coupes histologiques par le Rouge Congo et la coloration de Perls-DAB a mis en évidence deux types de dépôts de fer associés aux plaques amyloïdes : des dépôts ponctiformes présents principalement au cœur des plaques amyloïdes et des dépôts ramifiés et intracellulaires présents principalement en périphérie des plaques amyloïdes (Figure 53).

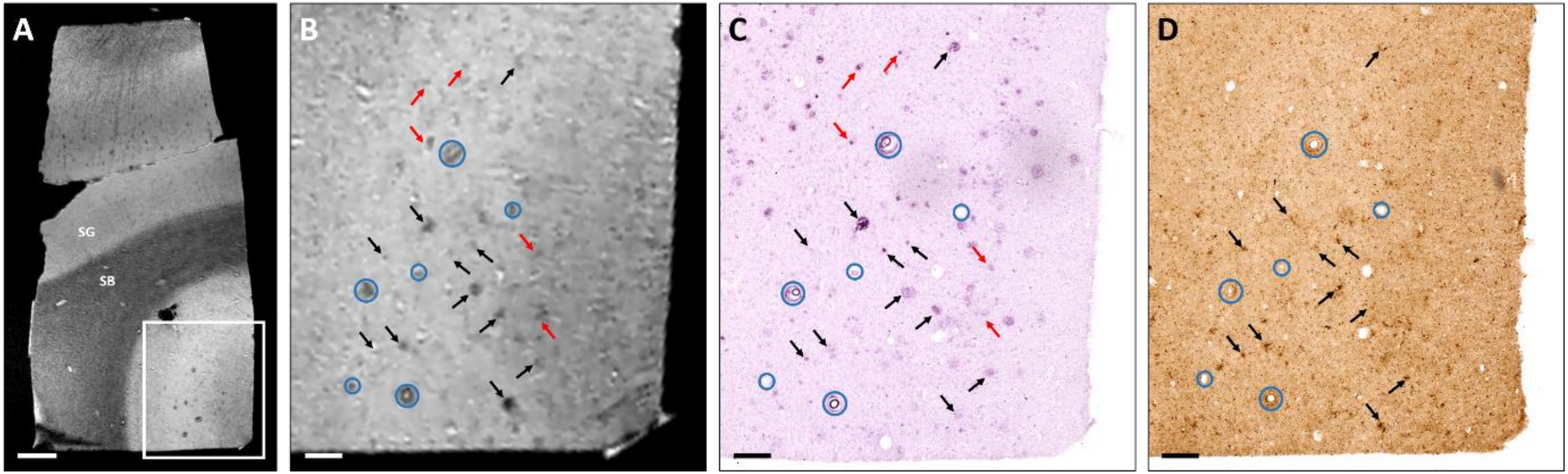


Figure 52 : Détection des plaques amyloïdes humaines par IRM après Gd-staining, dans des échantillons de cortex issus de patients atteints de la MA.

Les images IRM acquises en *post mortem* (A-B) ont été mises en registre avec les marquages IHC anti-Aβ par l'anticorps BAM10 (C) et du fer par la coloration de Perls-DAB (D). La substance grise (SG) et la substance blanche (SB) étaient facilement identifiables sur les images IRM après Gd-staining (A). De nombreux points hypointenses ont été observés dans la substance grise de ces échantillons (A-B, flèches noires et rouges). Ces hypointensités ont pu être mises en registre avec des plaques amyloïdes (B-C, flèches noires et rouges) ou des vaisseaux sanguins (B-C, cercles bleus) sur les coupes histologiques marquées par l'anticorps BAM10 (C). La coloration de Perls-DAB a montré la présence de fer dans la majorité des plaques amyloïdes présentes dans ces échantillons (D, flèches noires). Des plaques amyloïdes contenant du fer (flèches noires) ou non (flèches rouges) ont été détectées sur les images IRM après Gd-staining, indiquant que la présence de fer n'est pas nécessaire à leur détection. Barre d'échelle = 100 µm (A) et 200 µm (B-D)

.

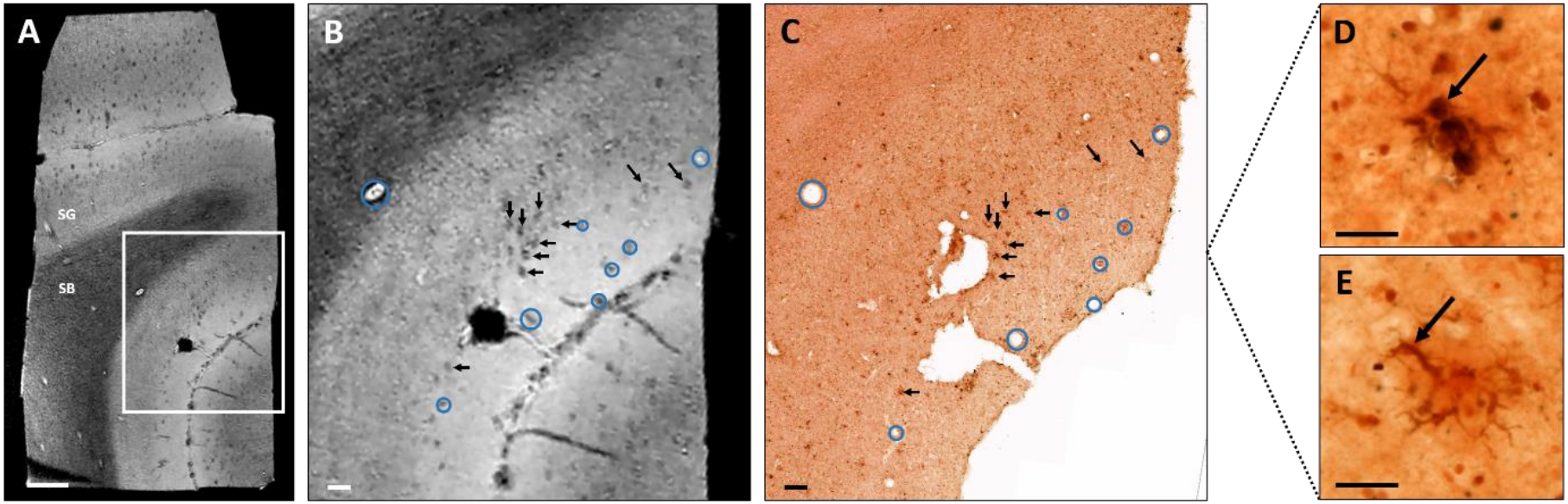


Figure 53 : Mise en registre des images IRM après Gd-staining (A-B) avec les coupes histologiques doublement marquées par coloration au Rouge Congo et Perls-DAB (C-E) dans des échantillons de cortex issus de patients atteints de la MA.

Les points hypointenses présents sur les images IRM (A-B) ont été identifiés comme des plaques amyloïdes contenant du fer (B-C, flèches noires) ou des vaisseaux sanguins (B-C, cercles bleus), détectés sur les coupes histologiques. Les plaques amyloïdes détectées ont montré deux types d'accumulation de fer : des dépôts arrondis au cœur des plaques amyloïdes (D) et des dépôts ramifiés et intracellulaires en périphérie des plaques amyloïdes (E). Barre d'échelle = 1000 µm (A), 200 µm (B-C) and 50 µm (D-E).

4 Discussion

4.1 Détectabilité des plaques amyloïdes par IRM après Gd-staining

La première partie de cette thèse s'est concentrée sur la compréhension des mécanismes impliqués dans la détection des plaques amyloïdes par IRM après Gd-staining. Pour cela, nous avons comparé la typologie et la détection des lésions Aβ observées chez cinq modèles murins d'amyloïdose et sur tissus humains issus de patients atteints de la MA. La capacité du Gd-staining à détecter les plaques amyloïdes s'est révélée hautement dépendante du modèle murin utilisé.

Le premier paramètre essentiel pour la détection des dépôts d'Aβ par Gd-staining est leur typologie. Parmi les modèles utilisés, les dépôts amyloïdes ont pu être détectés par IRM *in vivo* et *ex vivo* chez les souris APP/PS1, APP/PS1$_{dE9}$ et APP23. D'après les données de la littérature et notre étude histologique, les dépôts d'Aβ de ces souris étaient principalement des plaques amyloïdes focales. A l'inverse, les plaques diffuses, présentes en quantité importante dans le cerveau des souris APP$_{SwDI}$ et 3xTg (à l'exception des plaques amyloïdes du subiculum), n'ont pas été détectées par Gd-staining. Ces lésions diffuses étaient présentes en faible quantité dans nos échantillons de cortex humains où la majorité des dépôts d'Aβ étaient des plaques amyloïdes focales. Notre hypothèse est que le Gd-staining permet d'augmenter le contraste entre les plaques amyloïdes et le parenchyme car l'agent de contraste hydrophile diffuse librement dans le parenchyme cérébral mais pas dans les plaques hydrophobes. Ce mécanisme serait hautement dépendant de l'hydrophobicité et de la densité du dépôt et donc de la quantité et de la nature des peptides Aβ présents. Chez l'Homme et certains modèles murins d'amyloïdose (APP/PS1, APP/PS1$_{dE9}$ et 3xTg), les dépôts d'Aβ focaux et diffus sont tous les deux majoritairement composés d'Aβ$_{42}$ (isoforme la plus hydrophobe). Cependant, la quantité d'Aβ présente dans les dépôts focaux est plus importante que celle présente dans les dépôts diffus. Les dépôts focaux, plus hydrophobes et plus denses, seraient donc plus aptes à limiter la pénétration du Gd en leur cœur et présenteraient donc un meilleur contraste avec le parenchyme environnant.
Les dépôts diffus d'Aβ sont fréquemment retrouvés dans le cerveau des patients atteints de la MA mais également chez des personnes âgées en l'absence de troubles cognitifs. Cela suggère qu'ils sont faiblement toxiques[372]. Une autre hypothèse est que ces dépôts seraient des lésions « pré-amyloïdes » constituant le point de départ de l'amyloïdose dans le cerveau des patients. En effet, plusieurs auteurs rapportent que les dépôts d'Aβ observés aux stades les plus légers de la MA sont majoritairement diffus. Puis, aux stades modérés à sévère, les dépôts amyloïdes focaux deviennent majoritaires[376,377]. La nature exacte de ces lésions reste donc débattue. La présence de ces dépôts diffus explique en

partie la rétention non spécifique du PIB observée dans le cerveau de sujets sains[171]. En IRM, ces dépôts ne sont pas détectés spontanément chez la souris ou sur des tissus de patients atteints de la MA[374]. L'utilisation de l'imagerie TEP semble donc plus appropriée pour l'étude des dépôts diffus d'Aβ.

Le deuxième paramètre essentiel pour la détection des plaques amyloïdes par Gd-staining est la taille de ces lésions. Nos images ont été acquises avec une haute résolution spatiale ce qui a permis d'atteindre un seuil de détection très bas. La taille minimale des plaques détectables était de 36 µm et 30 µm de diamètre *in vivo* et *ex vivo* respectivement, soit 1,2 fois la taille du voxel. Le seuil de détection atteint sur les échantillons de patients atteints de la MA (25 µm de diamètre) est similaire à celui atteint chez les souris. Ce seuil de détection peut expliquer l'incapacité du Gd-staining à détecter les dépôts intracellulaires d'Aβ présents dans le cerveau des souris 3xTg les plus jeunes. En effet, ces dépôts intracellulaires ont un diamètre inférieur au seuil de détection.

Enfin, le dernier paramètre étudié pouvant influencer la détection des plaques amyloïdes était la présence de fer. Plusieurs études IRM, pour l'imagerie des plaques amyloïdes en contraste spontané, considèrent que la présence de fer au cœur de la plaque est un élément obligatoire pour sa détection[213,222]. Chez les souris WT et transgéniques, la concentration en fer cérébral est dépendante de l'âge avec une accumulation physiologique jusqu'à atteindre un plateau[228]. La détection des plaques amyloïdes par IRM est donc difficile chez les animaux jeunes ce qui peut compromettre les résultats d'études menées de manière longitudinale sur une longue période de la vie des animaux. Chez les souris transgéniques, la présence de fer au cœur des plaques amyloïdes est controversée et semble variable en fonction des régions cérébrales. La proportion de plaques détectées en contraste spontané est donc dépendante de l'âge, de la région cérébrale et du modèle utilisé. Dans cette étude, nous avons montré que la présence de fer au cœur de la plaque amyloïde n'est pas nécessaire pour sa détection par IRM après Gd-staining. En effet, 25% des plaques amyloïdes détectées chez la souris par IRM ne contenaient pas de fer. De même, bien que la plupart des plaques amyloïdes observées dans nos échantillons humains contenaient une forte concentration en fer, certaines lésions dépourvues de ce métal ont également pu être détectées par IRM après Gd-staining. Le Gd-staining permettrait donc de s'affranchir du paramètre « fer » qui est un élément dépendant de l'âge et de la région cérébrale mais pas de la charge amyloïde en elle-même. De plus, si l'on considère que seules les plaques amyloïdes contenant du fer sont détectables spontanément par IRM, le Gd-staining permettrait donc d'augmenter la détection de 25%. Cependant, un certain nombre de plaques amyloïdes focales et de taille supérieure au seuil de détection restent non détectées après Gd-staining. Nous ne pouvons pas exclure que cette absence de détection soit liée à des imperfections des mises en registre entre les images IRM et histologiques du fait de la déformation de ces dernières au cours des différents

traitements mis en place pour marquer les plaques amyloïdes. De plus, certaines plaques amyloïdes de taille proche de la taille du voxel peuvent ne pas être détectées du fait d'un effet de volume partiel.

4.2 Spécificité des modifications de signal observées

La spécificité des modifications de signal observées a également été étudiée. En effet, les autres sources de fer cérébral (microhémorragies, vaisseaux sanguins, etc.) présentent un aspect similaire à celui des plaques amyloïdes sur les images IRM pondérées en T2*. Le Gd-staining n'a pas permis de distinguer les plaques amyloïdes et les microhémorragies cérébrales. L'acquisition d'images avant Gd-staining reste le seul moyen d'identifier avec certitude les microhémorragies.

Egalement, la capacité du Gd-staining à détecter l'AAC a été étudiée. Cette technique n'a pas permis de distinguer les vaisseaux sanguins angiopathes des vaisseaux sanguin sains, *in vivo* chez la souris et *ex vivo* sur les tissus humains, du fait de la présence de sang dans tous les vaisseaux. *Ex vivo* chez la souris, le Gd-staining n'a pas non plus permis de détecter l'AAC. Une première explication serait la présence de traces de sang résiduelles dans ces vaisseaux malgré la perfusion intracardiaque réalisée au moment du sacrifice. Une autre explication serait la composition des dépôts vasculaires d'Aβ. En effet, ces derniers sont majoritairement composés de peptides $A\beta_{40}$. Cette isoforme est moins hydrophobe que l'$A\beta_{42}$ composant les dépôts parenchymateux. Les dépôts vasculaires d'Aβ pourraient donc ne pas présenter une nature suffisamment hydrophobe pour empêcher la pénétration de l'agent de contraste en leur sein.

4.3 Détection des plaques amyloïdes humaines par Gd-staining

Cette étude est la première à montrer que le Gd-staining peut être utilisé pour détecter les plaques amyloïdes présentes chez les patients atteints de la MA. Comme chez la souris, nous avons montré que les paramètres essentiels à la détection des plaques amyloïdes humaines étaient une nature focale et dense et une taille supérieure au seuil de détection. De plus, comme chez la souris, la présence de fer au cœur de la plaque ne semble pas être un élément obligatoire pour sa détection par IRM. Le faible nombre d'échantillons disponibles n'a cependant pas permis de déterminer la proportion exacte de plaques amyloïdes humaines, riches en fer ou non, détectées par IRM après Gd-staining.

Bien que le Gd-staining représente un outil intéressant en préclinique pour l'étude de la MA, un certain nombre de barrières techniques devront être franchies avant de pouvoir envisager le passage en clinique. En effet, une des principales limites de cette technique est la nécessité d'administrer l'agent de contraste par voie intracérébroventriculaire ou par voie IV après ouverture artificielle de la BHE.

Ces voies d'administration, très invasives, limitent la translation de cette technique vers une application en clinique, notamment à des fins de diagnostic ou de suivi de la pathologie. Des voies d'administration moins invasives devront être considérées pour envisager une translation du Gd-staining chez l'Homme. Parmi les méthodes disponibles, la voie intrathécale serait une alternative intéressante à l'injection intracérébroventriculaire.

En conclusion, l'utilisation des modèles murins de la MA est essentielle pour étudier sa physiopathologie ainsi que pour l'évaluation de nouvelles thérapies et la validation de nouveaux biomarqueurs. Ces modèles cherchent à reproduire le plus fidèlement possible les processus physiopathologiques se produisant dans le cerveau des patients. Cependant, aucun modèle ne permet aujourd'hui de reproduire complètement la MA. Notre étude met en lumière la grande diversité des modèles murins transgéniques utilisés pour l'étude de la MA. Les lésions développées par ces animaux étant hautement dépendantes du modèle, celui-ci doit être choisi spécifiquement en fonction de la question étudiée. Au cours de cette étude, nous avons montré que le Gd-staining permet de détecter facilement les plaques amyloïdes focales, indépendamment de la charge en fer et plus efficacement qu'en l'absence d'agent de contraste. Les modèles APP/PS1 et APP/PS1$_{dE9}$ semblent donc être des modèles de choix pour des études IRM visant à étudier ces lésions. Cependant, d'autres modalités d'imagerie devront être envisagées pour étudier les dépôts diffus, intracellulaires ou vasculaires d'Aβ. Enfin, cette étude est la première à montrer que la détection des plaques amyloïdes humaines est possible par IRM après Gd-staining avec une efficacité comparable à celle obtenue chez la souris.
L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'une publication dans Scientific Reports en 2017 (Publication en annexe).

Résultats II : Implémentation du Gd-staining chez le primate non-humain.

1 Objectifs

Le Gd-staining est donc un outil intéressant pour l'étude de la MA dans certains modèles murins d'amyloïdose. Cette technique est également prometteuse dans le cadre de l'IRM structurale à haut champ magnétique, pour améliorer le contraste tissulaire dans plusieurs régions cérébrales comme l'hippocampe, le cortex, le cervelet, etc. Le Gd-staining permet ainsi de visualiser en détail certaines sous-structures cérébrales (sous-régions de l'hippocampe, différentes couches corticales, etc.) chez les rongeurs[188,234,243]. Dans le contexte des maladies neurodégénératives et notamment de la MA, l'utilisation de techniques d'imagerie permettant de visualiser en détail l'hippocampe et le cortex sont particulièrement intéressantes pour étudier les différences de sensibilités observées entre leurs différentes sous-régions et mieux comprendre la physiopathologie de la maladie.

L'objectif de la deuxième partie de cette thèse était **d'implémenter le Gd-staining dans une espèce possédant un système nerveux plus complexe et plus proche de celui de l'Homme que celui des rongeurs, le PNH**. Dans ce but, nous avons utilisé des macaques cynomolgus, espèce couramment utilisée pour l'étude du vieillissement et des maladies neurodégénératives. La capacité de cette espèce à développer spontanément une amyloïdose parenchymateuse et/ou vasculaire fait d'elle un bon modèle pour l'étude des processus physiopathologiques de la MA. Cependant, le développement de lésions amyloïdes survient tardivement au cours de la vie de l'animal (> 25 ans chez le macaque cynomolgus). Au cours de cette étude, nous n'avons pas pu disposer d'animaux aussi âgés. Dans un premier temps, nous avons **testé la faisabilité du Gd-staining chez le PNH** et **exploré les éventuelles améliorations de contraste tissulaire induites par la présence de l'agent de contraste dans le parenchyme cérébral** de ces primates. Le Gd-staining pourrait alors être utilisé pour améliorer l'imagerie structurale par IRM à haut champ magnétique.

La principale limite du Gd-staining est le fait que les agents de contraste utilisés ne traversent pas la BHE. Chez la souris, des voies d'administration invasives sont utilisées (ICV ou IV après ouverture de la BHE par les ultrasons). Cependant, ces voies d'administration ne sont pas applicables en clinique au vu des applications envisagées. Chez l'Homme, la voie d'administration la plus utilisée, pour délivrer directement des molécules dans le système nerveux central, est la voie IT. En clinique, cette voie est principalement utilisée pour l'administration locale d'anesthésique ou dans le traitement de cas graves de douleurs chroniques ou de cancers. Cette voie d'administration est également utilisée pour l'administration d'agents de contraste à base de Gd pour l'imagerie de la colonne vertébrale, de la base du crâne et des structures associées (cisternographie ou myélographie). La tolérance et les doses limites ont pu être établies dans plusieurs espèces animales (rongeurs, chien, PNH, etc.). En clinique, bien que cette application ne soit pas encore approuvée par la FDA, plusieurs études ont permis de

montrer l'efficacité et la sécurité de l'administration IT de faibles doses d'agents de contraste à base de Gd pour l'évaluation de plusieurs troubles du LCS et du système cérébro-spinal. De plus, l'existence, récemment établie, d'un système glymphatique cérébral, rend possible la diffusion de l'agent de contraste depuis l'espace sous-arachnoïdien vers le parenchyme cérébral[378,379]. Cependant, à notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à l'utilisation d'agent de contraste pour l'amélioration de l'imagerie structurale de l'encéphale.

Dans cette étude, nous nous sommes donc intéressés aux **améliorations de contraste tissulaire cérébral que pourrait induire l'administration IT d'agent de contraste à base de Gd chez le PNH**. L'utilisation de la voie IT pour l'administration de molécules à visée cérébrale n'ayant encore jamais été expérimentée dans notre laboratoire, un certain nombre d'obstacles techniques ont dû être étudiés. En clinique pour la réalisation de myélographie, l'agent de contraste le plus fréquemment utilisé était le Gadopentétate de diméglumine (Magnevist®). Dans cette étude, nous avons préféré l'utilisation d'un agent de contraste macrocyclique, le Dotarem®. **Au vu des données disponibles dans la littérature, différentes doses de Dotarem® ont été testées.** En clinique, les images IRM sont acquises avant et après injection. Le délai post-injection est variable selon les études, de 1 heure à plus de 6 heures post-injection. Des séquences pondérées en T1 ou, plus rarement, en T2, sont utilisées.
Le flux descendant de LCS et son renouvèlement peuvent s'opposer au passage de molécules dans le pool de LCS cérébral. La position de l'animal (ou du patient) pourrait donc également influencer la progression de l'agent de contraste vers l'encéphale. **L'influence de la position du singe après injection IT du Dotarem® a donc été examinée.**
Enfin, la principale limite de cette technique est son caractère relativement invasif et une **attention toute particulière a été prêtée pour repérer d'éventuels signes de toxicité**.

2 Matériels et méthodes

Tous les protocoles expérimentaux ont été approuvés par un comité d'éthique local indépendant et soumis au Ministère Français de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation. Les procédures expérimentales ont été conduites en stricte conformité avec les réglementations de l'Union Européenne (Directive 2010-63/UE) et française (Code rurale R 214-87-131) pour la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

2.1 Animaux

Deux macaques cynomolgus mâles (*Macaca fascicularis*) âgés de 6-7 ans ont été utilisés. Les poids des animaux étaient de 8,6 ± 0,2 kg et 6,7 ± 0,1 kg respectivement. Un singe cynomolgus mâle supplémentaire a été utilisé pour les expériences de Gd-staining *ex vivo.*

2.2 Gd-staining *ex vivo*

Les expériences d'IRM *ex vivo* ont été réalisées par le Dr R. Aron-Badin et son équipe. Le sacrifice de l'animal et l'histologie ont été réalisés par Mme C. Jan. J'ai effectué les mises en registre entre les images IRM et histologiques.

Un macaque cynomolgus a été anesthésié par injection intramusculaire de kétamine (10 mg/kg) et xylazine (1 mg/kg) suivie d'une injection IV en surdosage de pentobarbital sodique (100 mg/kg) et d'une perfusion intracardiaque de NaCl 0,9%. Enfin, une perfusion intracardiaque avec un mélange de PFA à 4% (Sigma-Aldrich®) et gadotérate de méglumine (Dotarem®, Guerbet, France) a été réalisée pour permettre l'imprégnation des tissus cérébraux avec l'agent de contraste. La tête de l'animal a ensuite été prélevée pour l'imagerie IRM.
Un spectromètre 7T (Agilent, Palo Alto, CA, Etats-Unis) connecté à une console avec le logiciel Vnmrj 3.0 a été utilisé. Une antenne de surface a été utilisée pour l'émission et la réception (RAPID Biomedical GmbH, Rimpar, Allemagne). Une séquence en écho de gradient 3D pondérée en T1 (magnetization prepared rapid gradient-echo ou MP-RAGE) a été utilisée avec une haute résolution de 156 x 156 x 156 μm^3 (champ de vue = 80 x 80 x 80 mm^3 ; Matrice = 512 x 512 x 512 ; TR = 25 ms ; TE = 4 ms ; TI = 100 ms ; BW = 75 kHz)

Après examen IRM, le cerveau a été prélevé et cryo-protégé dans une solution de sucrose pendant deux semaines et coupé en sections de 40 µm en plan transverse au microtome. Les coupes ont ensuite été marquées par IHC à l'aide de l'anticorps primaire NeuN (dilution 1/5000ème, Millipore®), permettant de marquer spécifiquement les neurones.

Toutes les coupes ont été numérisées à l'aide d'un scanner Axio scan Z.1 (Zeiss, Oberkochen, Allemagne). Les images IRM ont été mises en registre manuellement avec les images histologiques, à l'aide du plugin « 3D/volume viewer » du logiciel imageJ. Ce plugin permet la rotation manuelle des images IRM dans les trois dimensions. Des repères anatomiques, tels que les différentes couches de l'hippocampe, les faisceaux de substance blanche ou les vaisseaux sanguins, ont été utilisés pour aligner les deux images.

2.3 Injection intrathécale de Dotarem®

Les injectons IT ont été réalisées par Mme M. Guillermier. Un délai minimum d'un mois a été respecté entre chaque injection. Les animaux ont été anesthésiés par une injection intramusculaire de kétamine (10 mg/kg) et xylazine (1 mg/kg) suivie d'une infusion IV lente de propofol 1% (Rapinovet, 0,05 à 0,25 mg/kg/min). L'animal a ensuite été placé en position assise et les poils de son dos ont été rasés de façon à dégager les vertèbres lombaires entre les crêtes iliaques. Une injection IT est généralement réalisée dans la région lombaire de la colonne vertébrale (ponction en L3-L4). La moelle épinière se terminant entre les vertèbres L1 et L2, il n'y donc pas de risque de l'atteindre au-delà. En conditions stériles, un cathéter avec un prolongateur relié à une seringue (IntraLong-Set avec une canule Sprotte® special cannula, Pajunk, Allemagne) a été implanté dans l'espace sous-arachnoïdien entre la 4ème et la 5ème vertèbre lombaire pour permettre le prélèvement de LCS et l'injection de l'agent de contraste. Ce dispositif permet successivement le prélèvement et l'injection de liquide sans nécessité de changement d'aiguille. Une fois introduit dans l'espace sous-arachnoïdien, la position du cathéter a été confirmée par la présence d'un retour de LCS à travers celui-ci. Puis, le cathéter a été remonté d'environ 20 cm le long de la colonne vertébrale pour permettre l'injection de l'agent de contraste le plus près possible de la base du crâne.

500 µL de LCS ont été prélevés et divisés en deux (①, Figure 54) : 250 µL ont été mélangés avec le volume approprié de Dotarem® en fonction de la dose testée et 250 µL ont été conservés à 4°C jusqu'à utilisation pour flusher le cathéter après injection de l'agent de contraste. Les doses testées ont été choisies en fonction des doses utilisées en clinique humaine pour l'imagerie de la moelle épinière (cisternographie ou myélographie). Classiquement, une dose de 0,25 mmol de Gd est utilisée (soit 3,125 µmol/kg pour un Homme de 80 kg) diluée dans 5 mL d'une solution de NaCl à 0,9% ou

directement diluée dans le LCS du patient précédemment prélevé. Les doses ont été ajustées pour tenir compte du volume de LCS (environ 15 mL chez un singe contre environ 150 mL chez l'Homme) et du poids des singes. Des doses de 3,125 µmol/kg (n = 1) ; 6,25 µmol/kg (n = 3) et 12,5 µmol/kg (n = 2) ont été testées. Le prélèvement et la réinjection du LCS prélevé permettent de s'affranchir d'une éventuelle toxicité liée à une surcharge volumique dans l'espace sous-arachnoïdien bien que certaines études suggèrent qu'un bolus de volume équivalent à 33% du volume total de LCS est bien toléré chez l'Homme[380]. Le mélange LCS/Dotarem® a ensuite été injecté dans l'espace sous-arachnoïdien en bolus sur environ 1 minute (②, Figure 54) puis le cathéter a été flushé à l'aide des 250 µL de LCS restant, préalablement réchauffés (③, Figure 54). Le singe a ensuite été placé ou non en position de Trendelenburg (décubitus dorsal, selon un angle de 30-45°, avec la tête plus basse que les pieds) pendant 15 minutes (④, Figure 54) avant l'examen IRM (⑤, Figure 54).

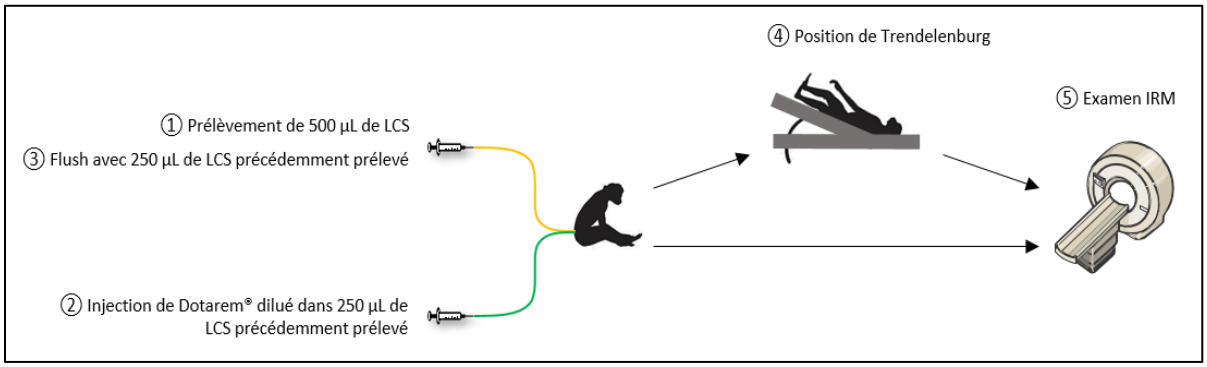


Figure 54 : Schéma décrivant le protocole d'injection IT utilisé.

2.4 IRM *in vivo*

Pour les examens IRM *in vivo*, l'anesthésie a été maintenue par infusion de propofol 1% (Rapinovet, 0,05 à 0,25 mg/kg/min). Les singes ont été placés sur un cadre stéréotaxique, puis fixés par des barres d'oreilles et une barre de dents pour éviter tout mouvement. Les rythmes cardiaque et respiratoire ont été surveillés tout au long de l'examen (SA Instruments Inc., Stony Brook, NY, Etats-Unis). La température corporelle a été maintenue à 37°C à l'aide d'un bloc chauffant.

Les examens IRM *in vivo* ont été effectués sur un spectromètre 7T (Agilent, Palo Alto, CA, Etats-Unis) connecté à une console avec le logiciel Vnmrj 3.0. Deux types d'antennes ont été utilisés : une antenne de surface a été utilisée pour l'émission et la réception (RAPID Biomedical GmbH, Rimpar, Allemagne) pour l'imagerie de la tête et une antenne de surface à deux boucles en quadrature a été utilisée pour l'émission et la réception pour l'imagerie de la moelle épinière. Pour l'imagerie de la tête, une séquence en écho de gradient 3D pondérée en T1 (MP-RAGE) a été utilisée avec une résolution de 450

x 450 x 2000 µm^3 (champ de vue = 115,2 x 115, 2x 128 mm^3 ; Matrice = 256 x 256 x 64 ; TR = 6 ms ; TE = 3 ms ; TI = 680 ms ; FA = 5°, BW = 78,125 kHz ; temps d'acquisition = 4 minutes 36 secondes). Ces images MP-RAGE ont été acquises toutes les 5 minutes jusqu'à 1h30-2 heures post-injection de façon à visualiser la dynamique de la diffusion de l'agent de contraste dans le LCS et le parenchyme cérébral. Pour obtenir une image anatomique du cerveau de l'animal, une séquence en écho de gradient multi-écho (MGE) pondérée en T2 avec une résolution de 225 x 225 x 1000 µm^3 a été utilisée (champ de vue = 115,2 x 115,2 mm ; 40 coupes ; épaisseur de coupe = 1 mm ; matrice = 512 x 512 ; TR = 5 s ; TE = 20 ms ; BW = 62,5 kHz ; temps d'acquisition = 16 minutes 40 secondes). Pour l'imagerie de la moelle épinière, une séquence en écho de gradient 3D pondérée en T1 (MP-RAGE) a été utilisée avec une résolution de 450 x 450 x 2000 µm^3 (champ de vue = 115,2 x 115, 2x mm^3 ; Matrice = 256 x 256 x 64 ; TR = 6 s ; TE = 3 ms ; TI = 680 ms ; FA = 5°, BW = 78,125 kHz ; temps d'acquisition = 4 minutes 36 secondes)

2.5 Quantification à partir des images IRM

L'analyse des images IRM a ensuite été effectuée à l'aide du logiciel ImageJ. La diffusion de l'agent de contraste dans le LCS a été suivie par la mesure de l'intensité du signal (IS) le long de la moelle épinière, dans la *Cisterna Pontis*, dans la *Cisterna Magna* et dans le 4ème ventricule. L'IS du parenchyme a été mesurée dans plusieurs régions cérébrales (cervelet, cortex occipital et hippocampe) et normalisée par l'IS du muscle temporal, pris comme région de référence. Une région cérébrale d'intérêt (ROI) a été considérée comme positive à la présence de l'agent de contraste lorsque celle-ci présentait une IS supérieure à l'IS mesurée dans le muscle temporal. Les résultats sont exprimés par le ratio des IS.

$$ratio\ IS = \frac{IS_{ROI}}{IS_{muscle\ temporal}}$$

3 Résultats

3.1 Gd-staining *ex vivo*

Dans un premier temps, les modifications de contraste tissulaire, induites par la présence de l'agent de contraste dans les tissus cérébraux, ont été explorées en *post mortem*, après imprégnation du cerveau par un mélange de PFA et de Dotarem® (technique dite de l' « active staining »)[231]. Après imprégnation par l'agent de contraste, le SNR était fortement augmenté dans l'ensemble du cerveau sur des images IRM pondérées en T1. Le contraste entre la substance grise et la substance blanche était fortement amélioré en comparaison à des images acquises en l'absence d'agent de contraste. Différentes sous-structures cérébrales ont alors pu être visualisées en détail (sous-régions de l'hippocampe, différentes couches corticales, etc.) (Figure 55).

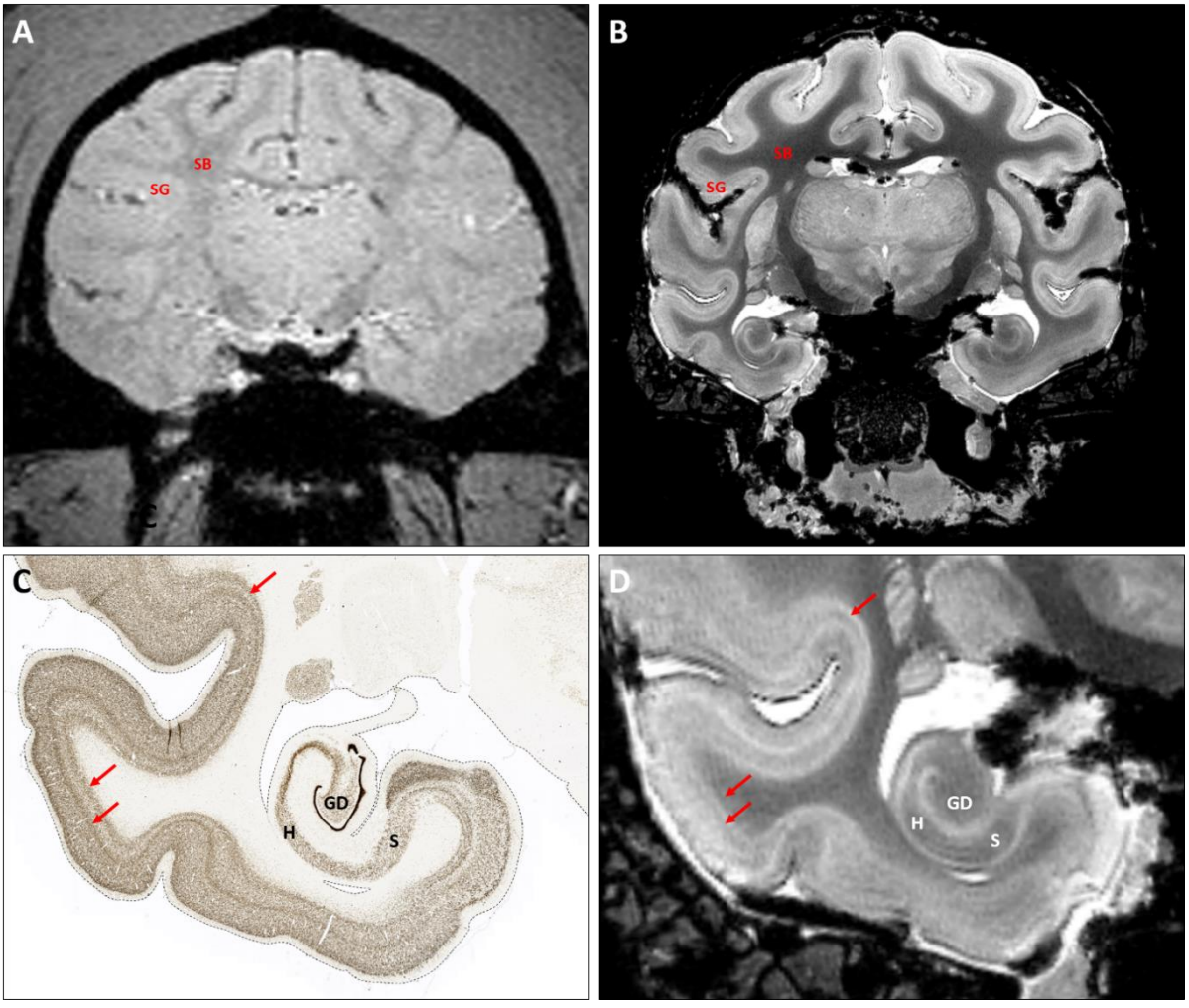


Figure 55 : Images IRM *post mortem* d'un cerveau de macaque cynomolgus après imprégnation à l'aide de Dotarem® par la technique de l' « active staining ».

Le SNR était fortement augmenté dans l'ensemble du cerveau après imprégnation (B) en comparaison à des images acquises en l'absence d'agent de contraste (A). Le contraste entre la substance grise (SG) et la substance blanche (SB) était fortement amélioré (B). Les images IRM (D) ont été mises en registre avec les images histologiques (C) après marquage des neurones par IHC (anticorps NeuN), au niveau de l'hippocampe. Les différentes parties de l'hippocampe étaient facilement identifiables sur les images IRM : gyrus denté (GD), hile (H) et subiculum (S). Les couches du cortex étaient également facilement identifiables (flèches rouges).

3.2 Gd-staining *in vivo*

Le Dotarem® a été injecté dans le LCS de deux singes à l'aide d'un cathéter implanté entre les vertèbres lombaires L4 et L5. Des images IRM avant et après injections de l'agent de contraste ont été acquises. Une antenne de moelle a permis de mesurer la distance de diffusion de l'agent de contraste le long de la moelle épinière. Les autres mesures ont été réalisées à l'aide des images acquises avec une antenne de tête. Une séquence MP-RAGE pondérée en T1 a été répétée toutes les 5 minutes pour suivre la progression de l'agent de contraste dans le LCS et le parenchyme cérébral. Une séquence MGE pondérée en T2 a été utilisée pour l'acquisition d'images anatomiques.

3.2.1 Etude de la dose

3.2.1.1 Etude sur fantôme

Dans le but de vérifier que la concentration en Dotarem® injectée était détectable à l'aide de nos séquences pondérées en T1 et en T2, une étude sur fantôme a été réalisée. La plus faible dose testée *in vivo* était de 3,125 µmol/kg ce qui correspond théoriquement à une concentration de 1,7 µmol/mL de Dotarem® dans le LCS après injection. Un fantôme, composé de huit solutions de Dotarem® de concentrations respectives 0 ; 0,1 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 20 µmol/mL, placées dans un gel d'agarose à 10%, a été utilisé. L'IS a été mesurée pour chaque concentration. Les variations d'intensité du signal mesurées ont été exprimées en fonction de l'intensité du signal du solvant utilisé pour diluer l'agent de contraste (ratio IS = IS_{ROI} / IS_{H20}). Sur les images pondérées en T1, l'IS était multipliée par 2,9 dès la concentration de 0,1 µmol/mL de Dotarem® et multipliée par 5 dès la concentration de 1 µmol/mL de Dotarem®. Sur les images pondérées en T2, l'IS était divisée par 1,7 dès la concentration de 1 µmol/mL et divisée par 2,5 dès la concentration de 10 µmol/mL de Dotarem® (Tableau 6). La quantité de Dotarem® injectée est donc théoriquement détectable à l'aide de nos séquences IRM pondérées en T1 et en T2.

Tableau 6 : Mesure du ratio IS sur fantôme pour différentes concentrations de Dotarem®

Dotarem® (µmol/mL)	Ratio IS	
	T1	T2
0,1	2,9	0,6
1	5	0,3
2,5	6	0,3
5	7,7	0,6
10	11	0,4
20	21,4	0,1

3.2.1.2 Etude *in vivo*

Plusieurs doses de Dotarem® ont été testées afin de déterminer la dose optimale à utiliser. La dose initiale testée a été choisie en fonction des doses utilisées en clinique humaine pour l'imagerie du système cérébro-spinal (cisternographie et myélographie). La plus faible dose utilisée était de 3,125 µmol/kg (n = 1). Les doses de 6,25 µmol/kg (n = 2) et 12,5 µmol/kg (n = 2) ont également été testées. La plus forte dose correspond à la dose maximale sans effet nocif rapportée dans la littérature.

A la plus faible dose (3,125 µmol/kg), le signal du LCS rachidien et cérébral était inchangé sur les images pondérées en T1 (Figure 56). Il est important de noter que pour des raisons techniques, à la dose de 3,125 µmol/kg, le singe n'a pas pu être placé en position de Trendelenburg. Les singes ont été placés en position de Trendelenburg pour toutes les autres expériences décrites dans ce paragraphe (doses de 6,25 µmol/kg et de 12,5 µmol/kg).

A la dose intermédiaire (6,25 µmol/kg), un signal hyperintense a pu être observé sur les images pondérées en T1, reflétant la présence de l'agent de contraste au niveau du LCS rachidien et de la *Cisterna Pontis*, dès 30 minutes post-injection (15 minutes de position de Trendelenburg et temps d'installation de l'animal dans l'aimant). Les images pondérées en T1 acquises avec l'antenne de moelle ont montré une distribution uniforme de l'agent de contraste sur environ 5 - 6 cm le long de la moelle épinière, depuis la base du crâne vers les vertèbres thoraciques. Cette dernière localisation correspondait approximativement au point d'injection souhaité bien que le cathéter n'ait pas pu être visualisé directement sur ces images.
L'utilisation de l'antenne de tête avec des images pondérées en T1, acquises séquentiellement toutes les cinq minutes, a permis de suivre la progression de l'agent de contraste. L'IS du LCS a été mesurée le long de la moelle épinière et dans plusieurs régions d'intérêts, puis normalisée par l'IS des muscles temporaux, région de référence. Dans le LCS rachidien, le ratio IS était multiplié par 1,97 par rapport au ratio IS avant injection, dès 75 minutes post-injection. Le signal hyperintense était également

présent dans la *Cisterna Pontis* et s'étendait autour du pont. Le ratio IS de la *Cisterna Pontis* était alors multiplié par 3,78 par rapport au ratio IS avant injection. Cependant, la diffusion de l'agent de contraste ne semblait pas avoir atteint la *Cisterna Magna* (Figure 56). Aucune augmentation de signal n'a été détectée dans le 4ème ventricule (Figure 56) ou dans le parenchyme cérébral, au niveau du cervelet, du cortex ou de l'hippocampe (Figure 58).

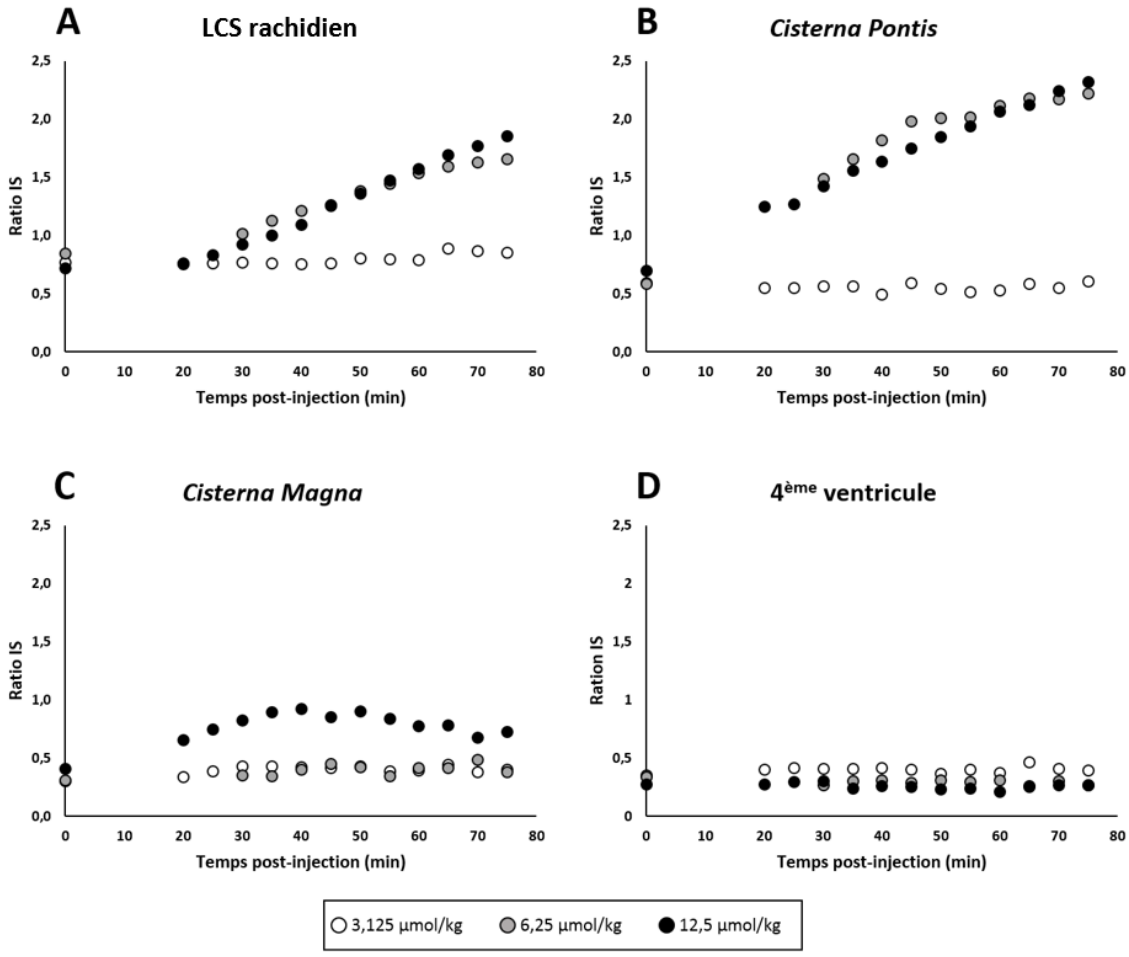


Figure 56 : Mesure du ratio IS dans le LCS rachidien (A), dans la *Cisterna Pontis* (B), dans la *Cisterna Magna* (C) et dans le 4ème ventricule (D) après injection IT de Dotarem® à la dose de 3,125 µmol/kg (points blancs), 6,25 µmol/kg (points gris) et 12,5 µmol/kg (points noirs) en fonction du temps, chez un macaque cynomolgus, sur des images pondérées en T1.

Aucune modification de signal n'a été observée à la dose de 3,125 µmol/kg. Un signal hyperintense a été observé dans le LCS rachidien et la *Cisterna Pontis* aux doses de 6,25 µmol/kg et 12,5 µmol/kg. Le Dotarem® semblait avoir atteint la *Cisterna Magna* uniquement à la plus forte dose. Aucune augmentation de signal n'a été détectée dans le 4ème ventricule quel que soit la dose.

A la dose la plus élevée (12,5 µmol/kg), une diffusion similaire de l'agent de contraste a été observée. Les images pondérées en T1 acquises avec l'antenne de moelle ont montré une distribution uniforme de l'agent de contraste, sur environ 5 - 6 cm le long de la moelle épinière, depuis la base du crâne vers les vertèbres thoraciques. Un signal hyperintense a également pu être observé au niveau du LCS rachidien et de la *Cisterna Pontis*, dès 30 minutes post-injection (Figure 56 et Figure 57). Dans le LCS rachidien, le ratio IS était multiplié par 2,57 par rapport au ratio IS avant injection, 75 minutes post-injection. Comme précédemment, le signal hyperintense était également présent dans la *Cisterna Pontis* avec un ratio IS multiplié par 3,33 par rapport au ratio IS avant injection. De plus, une légère augmentation de signal a été détectée au niveau de la C*isterna Magna* dès 30 minutes après injection. Le ratio IS était multiplié par 1,76 par rapport au ratio IS avant injection Cependant, la diffusion de l'agent de contraste ne semblait pas avoir atteint le 4ème ventricule (Figure 56).

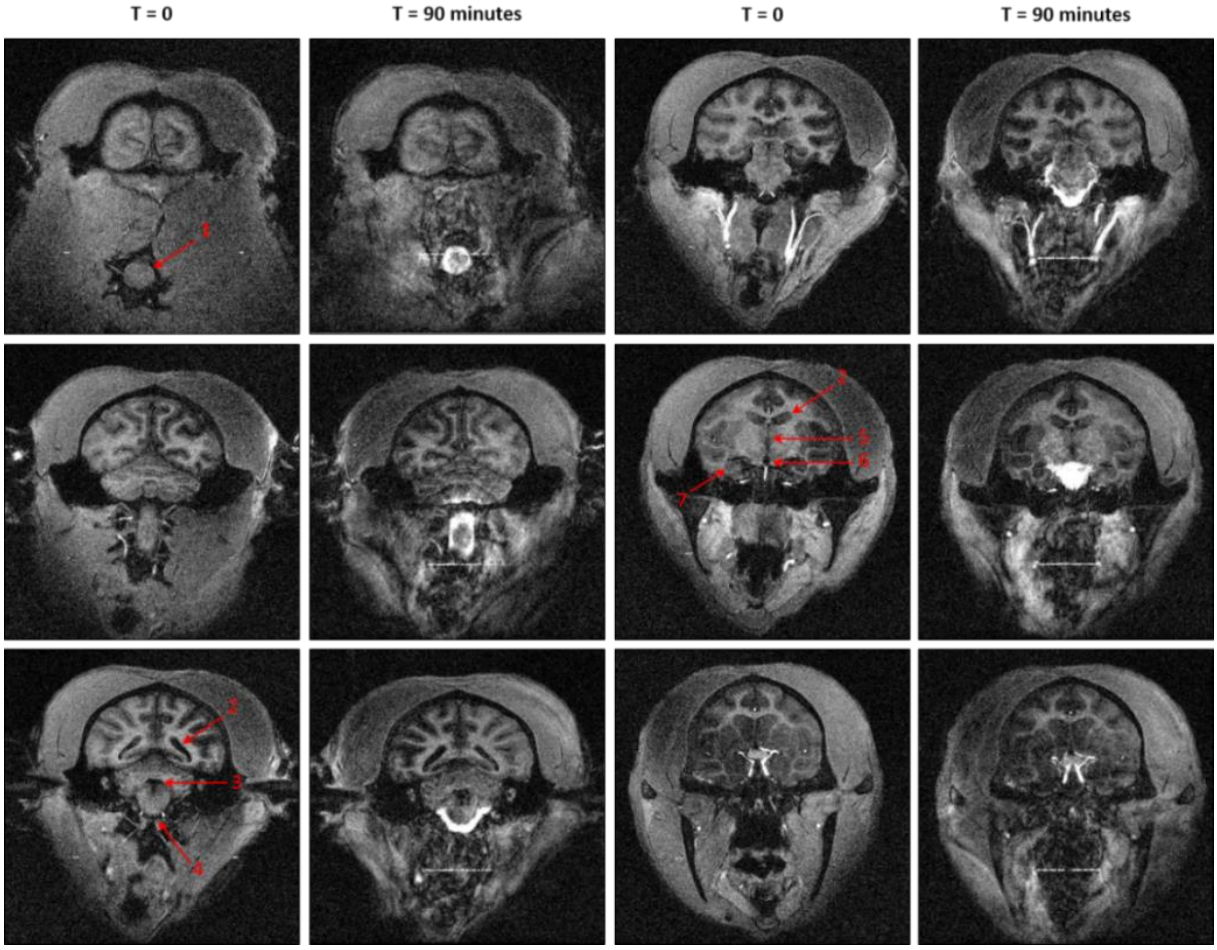


Figure 57 : Images IRM pondérées en T1 avant (T=0) et 90 minutes après injection IT de Dotarem® (T=90), à la dose de 12,5 µmol/kg, chez un macaque cynomolgus.

(1) moelle épinière (2) ventricule latéral (3) 4ème ventricule (4) *Cisterna Pontis* (5) 3ème ventricule (6) *Cisterna Interpeduncularis* (7) hippocampe.

La diffusion du Dotarem® dans le parenchyme cérébral a été évaluée par la mesure de l'IS dans trois régions : le cervelet, le cortex occipital et l'hippocampe. Bien que l'agent de contraste ait réussi à atteindre le pool de LCS cérébral, aucune modification de signal n'a pu être observée au niveau du parenchyme cérébral, quelle que soit la dose (Figure 58).

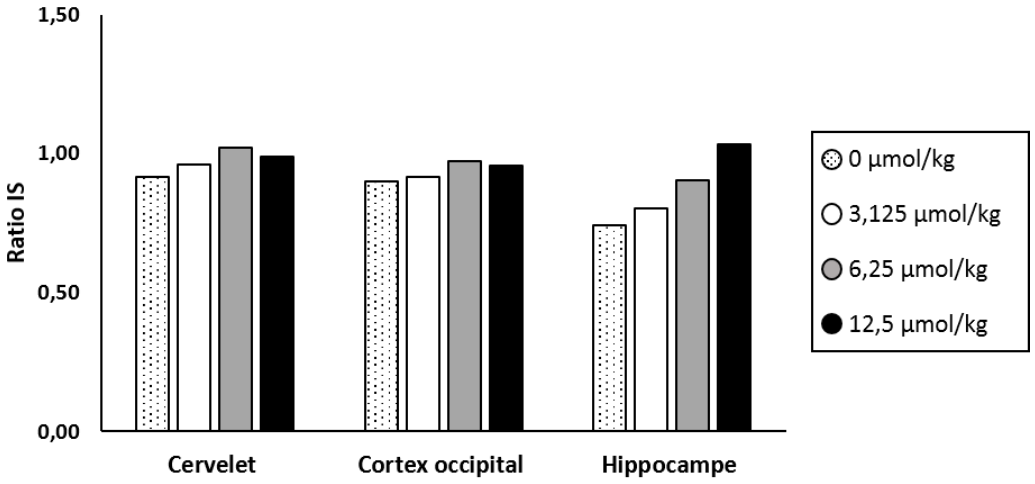


Figure 58 : Mesure du ratio IS dans différentes régions cérébrales avant (pointillés) et 90 minutes après injection IT de Dotarem® à la dose de 3,125 µmol/kg (blanc), 6,25 µmol/kg (gris) et 12,5 µmol/kg (noir), chez un macaque cynomolgus.

Aucune modification du signal n'a pu être observée dans le parenchyme cérébral au niveau du cervelet, du cortex ou de l'hippocampe.

3.2.2 Influence de la position

Le LCS est principalement produit au niveau des plexus choroïdes des ventricules cérébraux. Le LCS descend ensuite par le canal central avant de remplir les compartiments crâniens de l'espace sous-arachnoïdien. Le flux de LCS dans la colonne vertébrale est donc descendant depuis son point de production vers les vertèbres sacrées. Pour un liquide injecté au niveau lombaire, le flux descendant de LCS va empêcher sa remontée vers le crâne et seule une faible fraction de la dose administrée atteindra le pool de LCS crânien. Certains facteurs physiques comme la densité du liquide injecté ou la gravité peuvent permettre de favoriser le transfert de la substance injectée depuis son point d'injection jusqu'au crâne. Dans notre étude, la baricité de la solution ne pouvait pas être modifiée. Nous avons donc testé l'influence de la position sur le transfert de l'agent de contraste vers le LCS crânien. Pour cela, les singes ont été placés en position de Trendelenbourg (décubitus dorsal, corps incliné de 30-45° avec les membres inférieurs plus hauts que la tête) pour que la gravité permette la remontée du liquide injecté vers le crâne.

Sans ce positionnement, aucune hyperintensité n'a été observée au niveau des vertèbres cervicales et à la base du crâne. Après 15 minutes en position de Trendelenbourg, l'intensité du signal du LCS était augmentée depuis les premières vertèbres cervicales et jusqu'à la base du crâne. Ce signal hyperintense a également été observé au niveau de la *Cisterna Pontis* (Figure 59). La position semble donc essentielle pour favoriser le transfert de l'agent de contraste depuis le LCS spinal jusqu'au LCS crânien.

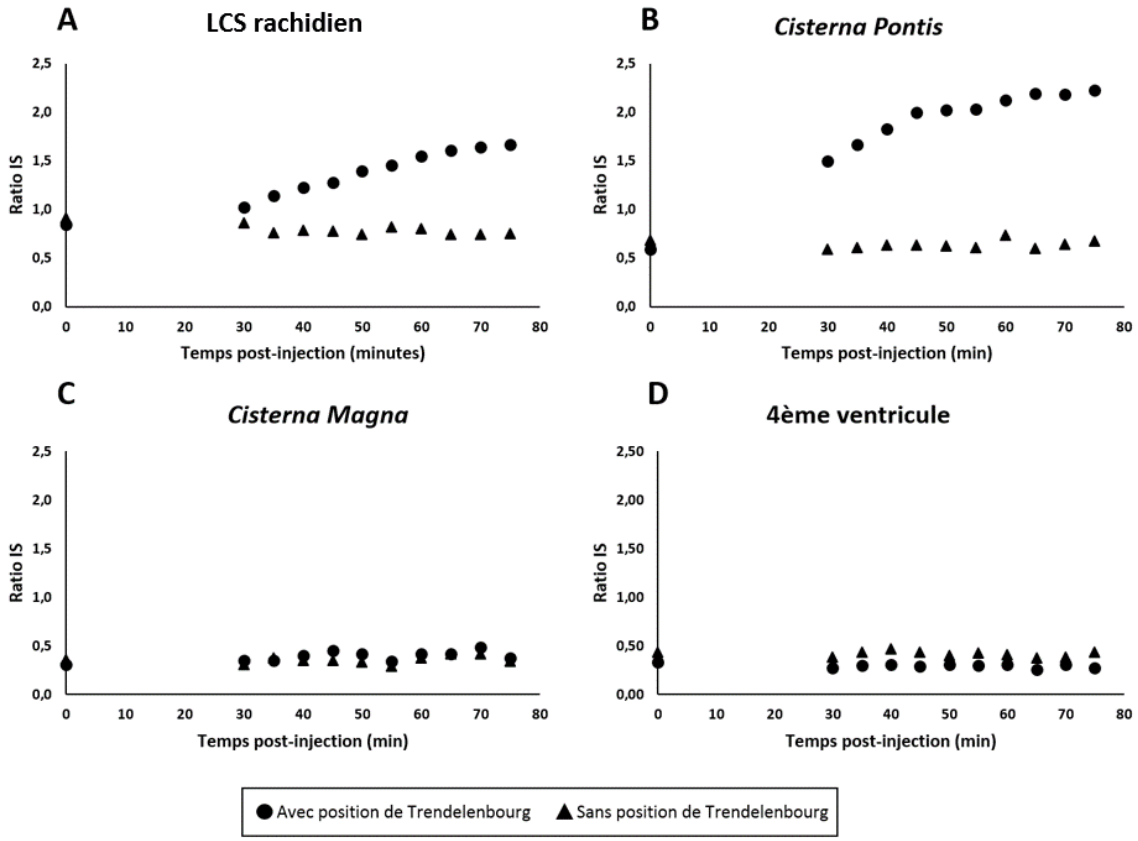


Figure 59 : Mesure du ratio IS en fonction du temps dans le LCS rachidien (A), dans la *Cisterna Pontis* (B), dans la *Cisterna Magna* (C) et dans le 4ème ventricule (D) après injection IT de Dotarem® (6,25 µmol/kg) avec (ronds) ou sans (triangles) mise en position de Trendelenbourg, chez un macaque cynomolgus.

Aucune modification de signal n'a été observée sans positionnement de Trendelenbourg. Après 15 minutes dans cette position, un signal hyperintense a été détecté dans le LCS rachidien et dans la *Cisterna Pontis*.

3.2.3 Sécurité

Du fait du caractère relativement invasif de l'injection IT, une attention toute particulière doit être portée à d'éventuels signes de toxicité. Les principaux signes de toxicité résultent principalement des effets mécaniques de l'injection IT et non des effets de l'agent de contraste en lui-même.

Au niveau du site d'injection, une fibrose avec infiltrats de cellules immunitaires est fréquemment observée en cas d'injections répétées. Dans notre étude, les singes ont reçu plusieurs injections de Dotarem®, séparées d'au moins un mois de récupération. Cependant, des signes de fibrose potentielle ont été détectés chez l'un des deux singes à la 5ème injection. En effet, une forte résistance s'était alors opposée à l'introduction de l'aiguille dans l'espace sous-arachnoïdien. Cependant, les singes n'ayant pas été sacrifiés à la fin de ces expériences, aucun examen histopathologique *post mortem* n'a encore permis de confirmer la présence de lésions au niveau de la moelle de cet animal.

Par ailleurs, aucun autre signe de toxicité (troubles neurologiques, troubles moteurs, perte de poids) n'a été observé au cours de cette étude.

4 Discussion et conclusion

L'objectif de la deuxième partie de cette thèse était d'implémenter la technique du Gd-staining chez le PNH, modèle possédant un système nerveux plus proche de celui de l'Homme que de celui des rongeurs. La principale limite à cette translation est la méthodologie à adopter pour permettre le passage de l'agent de contraste à travers la BHE. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de la voie IT. Cette technique présente l'intérêt d'être beaucoup moins invasive que les modes d'administration utilisés chez la souris (injection intracérébroventriculaire ou IV avec ouverture artificielle de la BHE). Elle est également rapide à mettre en place, reproductible et permet de préserver l'intégrité de la BHE. Le Dotarem®, agent de contraste macrocyclique, a été utilisé dans cette étude. Cet agent de contraste présente l'avantage d'être disponible en clinique et parfaitement caractérisé. De plus, sa structure macrocyclique lui confère une plus grande stabilité en comparaison à des chélates linéaires. L'utilisation de la voie IT pour l'administration de molécules à visée cérébrale n'ayant encore jamais été expérimentée dans notre laboratoire, un certain nombre d'obstacles techniques ont dû être étudiés.

4.1 Influence de la dose

Le premier paramètre à déterminer était la dose d'agent de contraste à injecter pour obtenir une concentration intracérébrale suffisante pour induire des modifications de contraste tissulaire. Les doses testées ont été choisies en fonction des doses d'agent de contraste utilisées en clinique pour la réalisation de cisternographie/myélographie et en fonction des données de sécurité rapportées dans la littérature. Après injection de l'agent de contraste dans l'espace sous-arachnoïdien, un signal hyperintense a été observé dans le LCS rachidien pour des doses de 6,25 µmol/kg et plus, soit environ deux fois la dose couramment utilisée chez l'Homme pour l'imagerie du système cérébro-spinal. Cet hypersignal semblait s'étendre depuis le point d'injection jusqu'à la *Cisterna Pontis*, baignant ainsi le tronc cérébral. Une légère augmentation du signal a pu être détectée au niveau de la *Cisterna Magna*, baignant le cervelet, à la dose maximale testée (correspondant environ à quatre fois la dose clinique usuelle). Cependant, la diffusion de l'agent de contraste semblait s'arrêter avant d'atteindre les ventricules cérébraux et aucune modification de signal n'a pu être détectée dans le parenchyme cérébral.

Ces résultats sont en opposition avec l'étude publiée en 2017 par Ringstad et coll. montrant la diffusion, dans le parenchyme cérébral, d'un agent de contraste à base de Gd après injection IT chez l'Homme[334]. Une première explication à ces différences de résultats pourrait être que notre étude n'a

été menée que sur un très faible nombre de singes. En effet, l'étude de Ringstad et coll. a été menée sur un nombre relativement important d'individus (15 patients souffrant d'hydrocéphalie à pression normale et 8 sujets sains). Les modifications de signal observées étaient hautement dépendantes de la région cérébrale et une forte variabilité inter-individuelle a été observée. Ainsi, seuls 2 sujets sains sur 8 (et 10 patients sur 15) présentaient des variations de signal dans le parenchyme supérieures ou égales à 10%. Dans notre étude, un nombre plus important d'animaux serait nécessaire pour observer des différences statistiques entre les individus. Dans cette étude, nous n'avons pas pu réaliser de tests statistiques à cause du très faible nombre de singes utilisés.

Une autre explication à cette absence de diffusion de l'agent de contraste serait que la dose administrée était trop faible pour permettre d'atteindre une concentration cérébrale suffisante. En effet, les doses administrées chez le PNH étaient beaucoup plus faibles que celles utilisées chez la souris. Chez la souris, 2 µL de Dotarem® sont administrés en intracérébral ce qui correspond environ à une dose de 2,5 µmol/g de cerveau[236,241]. Chez le singe, la plus forte dose administrée (12,5 µmol/kg) correspond à une dose d'environ 1 µmol/g de cerveau. Dans la littérature, cette dose semble être suffisante pour induire des modifications de contraste tissulaire chez la souris[234]. Cependant, la totalité de la dose administrée en IT n'atteignant pas le LCS cérébral, la dose effectivement retrouvée dans le cerveau après injection IT de Dotarem® sera inférieure à 1 µmol/g de cerveau. Une solution pour améliorer le passage de l'agent de contraste dans le cerveau serait donc d'augmenter la dose. Cependant, plusieurs études ont montré des signes de toxicité graves, notamment neurologiques, pour des doses d'environ 0,7-1,4 µmol/g de cerveau, chez l'Homme[330,337,338]. Il semble donc difficile d'utiliser des doses supérieures à la dose maximale utilisée dans cette étude. Une autre possibilité serait d'utiliser des agents de contraste présentant une meilleure relaxivité. La relaxivité des agents de contraste commerciaux étant relativement similaire, l'utilisation d'agents de contraste optimisés, présentant des propriétés relaxométriques améliorées, semble nécessaire. Les différents paramètres influençant la relaxivité des agents de contraste ont été discutés en « Introduction » de cette thèse.

4.2 Influence du flux de circulation du LCS et de la position

Le flux de circulation du LCS semble également jouer un rôle important dans le passage des molécules injectées dans le LCS rachidien vers le LCS cérébral. Le flux de LCS est principalement descendant depuis les plexus choroïdes. Le LCS descend ensuite vers l'espace sous-arachnoïdien rachidien par les ouvertures médiane et latérale du 4ème ventricule. Ces « carrefours » de circulation semblent correspondre aux points d'arrêt de la diffusion de l'agent de contraste observés dans cette étude

(Figure 60). Le flux descendant de LCS pourrait s'opposer à la remontée de l'agent de contraste dans le LCS cérébral. L'influence du flux descendant de LCS permet d'expliquer l'importance de la position de l'animal. En effet, le positionnement de l'animal en position de Trendelenbourg semble nécessaire pour permettre au liquide injecté de remonter vers le crâne, grâce à la gravité s'opposant au flux descendant de LCS.

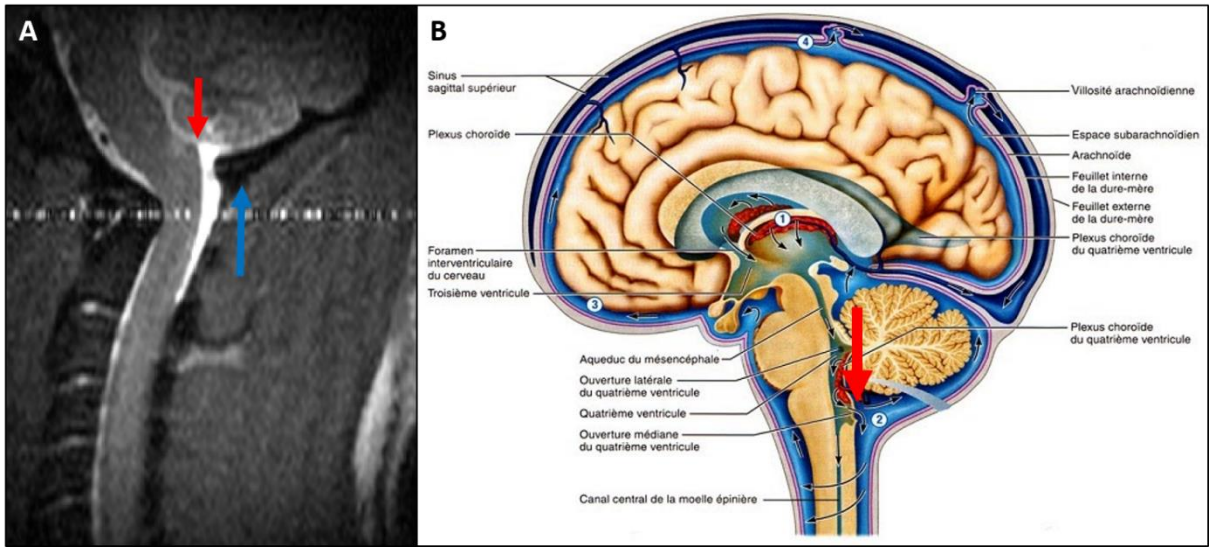


Figure 60 : Hypothèse sur l'influence du flux de LCS sur la diffusion du Dotarem® après injection IT.

(A) Images IRM acquises au niveau de la colonne vertébrale et de la base du crâne chez un macaque cynomolgus. La diffusion de l'agent de contraste est ascendante, depuis le point d'injection vers l'encéphale (flèche bleue). (B) Le flux de LCS est descendant, depuis les plexus choroïdes (①) vers l'espace sous-arachnoïdien rachidien par les ouvertures médiane et latérale du 4ème ventricule (②). La diffusion de l'agent de contraste semble s'être arrêtée au niveau de ce « carrefour circulatoire » (flèche rouge, A et B).

4.3 Influence du volume d'injection

Le volume d'injection jouerait un rôle essentiel pour la délivrance de molécules jusqu'au cerveau après injection par voie IT[380]. En préclinique, des volumes importants sont souvent utilisés pour l'administration IT de molécules à visée cérébrale (radioisotopes, enzymes, anticorps, facteur de croissance, etc.)[332,381–383]. En effet, la dure-mère est entourée par des os (vertèbres et crâne) et des cartilages, relativement rigides, sauf au niveau de la *Cisterna Magna* et des ouvertures intervertébrales. Ainsi, l'injection d'un volume de liquide supplémentaire dans cet espace restreint va « pousser » le LCS vers ces espaces plus souples pour supporter le surplus de volume. Si le volume administré est supérieur au volume de LCS présent entre le site d'injection et la citerne, celui-ci pourra atteindre la *Cisterna Magna* et baigner l'encéphale. Rieselbach et coll. ont montré qu'un surplus de

volume de 33% et de 42% du volume total de LCS est bien supporté chez le PNH et chez l'Homme respectivement[384]. Chez le macaque cynomolgus, des études de TEP réalisées par Papisov et coll. suggèrent que le volume nécessaire pour faire passer une substance d'un point d'injection situé en L1 jusqu'à la *Cisterna Magna* est un bolus 0,5-1 mL suivi d'un flush de 0,5 mL/kg ou 0,4 mL/kg au total. Avec ce protocole, 50% du volume injecté atteint la *Cisterna Magna* et donc le pool de LCS crânien.

Une étude préliminaire a été réalisée pour tester l'influence du volume d'injection. Pour cela, un protocole utilisant un volume d'injection important a été utilisé. Un volume important de LCS a été prélevé (1 mL) (①, Figure 61). Une dose de 12,5 µmol/kg de Dotarem® non dilué (soit environ 200µL selon le poids de l'animal) a ensuite été injectée dans l'espace sous-arachnoïdien (②, Figure 61). Puis, le LCS prélevé précédemment a été réchauffé et réinjecté (③, Figure 61). Ce flush, réalisé avec un volume important de LCS, est supposé « pousser » l'agent de contraste injecté vers le LCS cérébral. Enfin, le singe a été placé en position de Trendelenburg pendant 15 minutes (④, Figure 61) avant l'examen IRM (⑤, Figure 61).

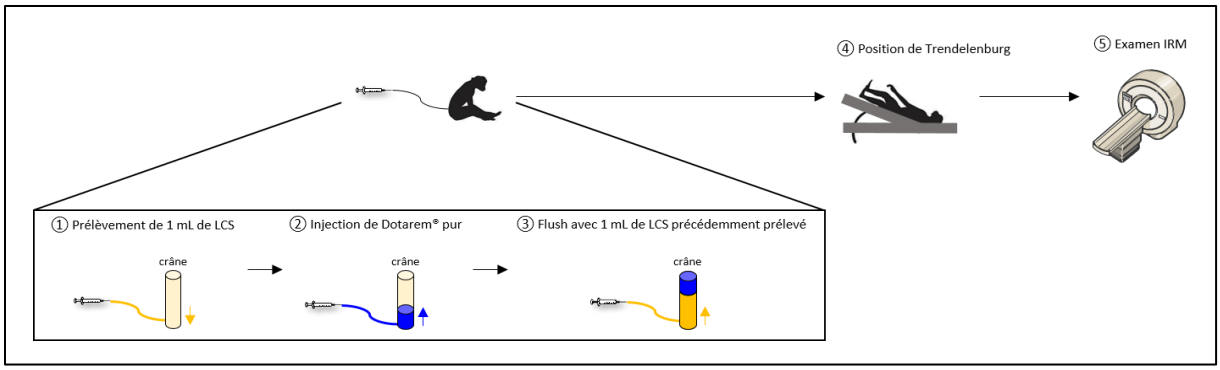


Figure 61 : schéma décrivant le protocole d'injection utilisant un volume d'injection important.

Une distribution de l'agent de contraste similaire à celle obtenue avec le protocole « classique » a été observée. Une augmentation de l'intensité du signal du LCS a été observée dans le LCS rachidien, la *Cisterna Pontis* et la *Cisterna Magna*, dès 20 minutes post-injection. De nouveau, aucune modification de signal n'a pu être détectée dans le 4ème ventricule ou le parenchyme cérébral (cervelet, cortex occipital et hippocampe). Cependant, pour la première fois, une augmentation du signal du LCS présent dans l'espace sous-arachnoïdien cérébral, au niveau du lobe occipital et temporal gauche (mais pas droit), a été observée dès 30 minutes et jusqu'à 120 minutes après injection (Figure 62). Ces hyperintensités ont disparu au-delà de 120 minutes post-injection ce qui suggère que l'agent de contraste a été éliminé du LCS cérébral. L'utilisation d'un volume d'injection important semble donc favoriser le passage de l'agent de contraste depuis le LCS rachidien vers le LCS cérébral. Cependant, l'élimination de l'agent de contraste semble trop rapide pour lui permettre de diffuser dans le

parenchyme cérébral. Ces résultats devront cependant être répliqués pour confirmer la nature des hyperintensités observées.

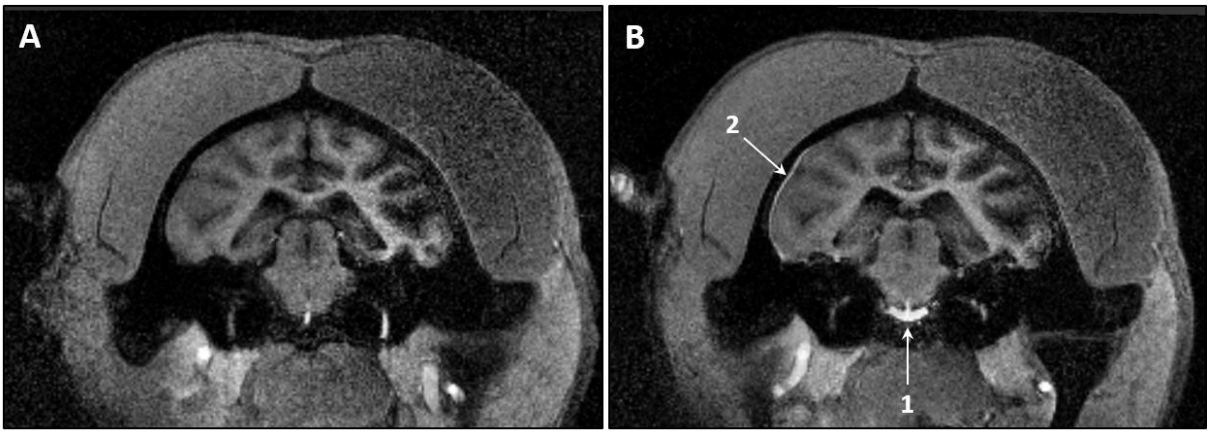


Figure 62 : Images IRM pondérées en T1 avant (A) et après (B) injection IT de Dotarem® avec utilisation d'un grand volume d'injection, chez un singe cynomolgus.

Un signal hyperintense a été observé dans la *Cisterna Pontis* (1) et dans l'espace sous-arachnoïdien cérébral, au niveau du lobe occipital et temporal gauche (2), après injection de Dotarem®.

4.4 Conclusions et perspectives

Malgré son potentiel prometteur, la voie IT ne semble donc pas adaptée à l'administration d'agents de contraste dans le parenchyme cérébral. En effet, le flux de circulation de LCS semble empêcher une diffusion suffisante de l'agent de contraste vers le LCS cérébral. De plus, cette technique est limitée par son caractère relativement invasif et une attention toute particulière doit être prêtée à d'éventuels signes de toxicité. Dans cette étude, aucun signe de toxicité particulière n'a été observé, à l'exception d'une potentielle fibrose au niveau du site d'injection observée chez un singe. Une étude *post mortem* permettrait de confirmer l'absence de modifications histopathologiques importantes au niveau de la colonne vertébrale. Cependant, les singes utilisés dans cette étude n'ont pas été sacrifiés.

Enfin, une alternative à la voie IT serait d'injecter l'agent de contraste directement dans la *Cisterna Magna*. Cela permettrait de s'affranchir de l'étape de diffusion depuis le site d'injection jusqu'au LCS cérébral. Du fait de sa localisation anatomique, il est possible d'accéder à la *Cisterna Magna* directement, sans perturber le système nerveux central. Plusieurs études ont montré que cette voie permet la diffusion d'agents de contraste à base de Gd dans le parenchyme cérébral, chez la souris et chez le PNH[385,386]. Par exemple, Goulay et coll. ont réalisé des injections intracisternales de Dotarem® chez des macaques cynomolgus et suivi la diffusion de l'agent de contraste dans le cerveau à l'aide d'acquisitions séquentielles d'images pondérées en T1. Ces auteurs ont pu observer une diffusion du

Dotarem® dans l'ensemble du parenchyme cérébral, à l'exception des régions les plus profondes. Cependant, ces auteurs s'intéressaient à l'étude du système glymphatique cérébral. Les améliorations de contraste potentielles induites par la présence de l'agent de contraste et ses éventuelles applications en imagerie structurale n'ont pas été explorées.

En conclusion, la voie intracisternale semble être une alternative prometteuse à l'utilisation de la voie IT pour l'administration de molécules à visée cérébrale notamment d'agents de contraste. Les améliorations de SNR et de contraste tissulaires obtenues grâce au Gd-staining seraient hautement bénéfiques pour l'amélioration de l'IRM structurale à haut champ magnétique comme le montrent nos données acquises en *post mortem* chez le macaque. Le développement de cette technique de neuroimagerie serait particulièrement intéressante dans le contexte des maladies neurodégénératives et notamment de la MA pour visualiser de façon fine et quantifier *in vivo* le volume de certaines régions cérébrales impliquées dans la physiopathologie de la MA.

Résultats III : Nouveaux agents de contraste vectorisés ciblant les lésions microscopiques de la MA : les anticorps de camélidés.

1 Objectifs

Les VHH sont des outils intéressants pour l'imagerie *in vivo* aussi bien en cancérologie, qu'en infectiologie et en neurologie. Leurs propriétés physico-chimiques particulières font d'eux des vecteurs intéressants pour diverses molécules (fluorochromes, agents de contraste, radioisotopes, etc.) permettant différentes modalités d'imagerie. Dans le contexte des maladies neurodégénératives, les VHH présentent également un potentiel important aussi bien thérapeutique que diagnostique. En effet, un des défis majeurs du développement de molécules à visée cérébrale est le passage de la BHE. Du fait de leurs caractéristiques uniques, les VHH semblent être d'excellents candidats pour le développement de telles molécules. Plusieurs exemples de VHH traversant spontanément la BHE existent dans la littérature[294,316,326]. Plus particulièrement, il a été montré que certains VHH de pI basique sont capables de traverser la BHE via un mécanisme de transcytose induite par l'adsorption. Ces molécules seraient donc des vecteurs de choix pour le développement d'agents de contraste vectorisés, dirigés spécifiquement contre les lésions neuropathologiques de la MA.

Au cours de cette thèse, deux VHH, de pI basique, dirigés respectivement contre le peptide $A\beta_{42}$ (R3VQ) et la protéine Tau hyperphosphorylée (TauA2) ont été étudiés. Ces molécules ont été modifiées de façon à pouvoir être couplées à différents marqueurs (fluorochromes, agents de contraste, radioisotopes, etc.) pour permettre leur détection via différentes modalités d'imagerie (microscopie biphotonique, IRM, TEP, etc.). La capacité de ces fragments d'anticorps à traverser la BHE a précédemment été démontrée à l'aide de VHH couplés à un fluorochrome AlexaFluor488 (R3VQ-S-AF448 et TauA2-S-AF488)[326]. Ces VHH ont permis de détecter les lésions de la MA par microscopie biphotonique après injection IV et imagerie *in vivo*. Cependant, le protocole de microscopie biphotonique impose une chirurgie crânienne exposant à un risque d'ouverture traumatique de la BHE. Bien que les VHH aient été détectés dans l'ensemble du cerveau et pas uniquement au niveau de la fenêtre de craniotomie, ils auraient pu pénétrer dans le parenchyme cérébral par extravasation simple et non du fait de leurs propriétés intrinsèques. Au cours de cette thèse, **la capacité des VHH à traverser spontanément la BHE a été testée après injection systémique sans aucune chirurgie crânienne**.

Enfin, le but de ce projet est de pouvoir détecter les lésions de la MA, par IRM *in vivo*, à l'aide d'agents de contraste vectorisés. Pour cela, les VHH ont été conjugués à un chélate de Gd. Différents complexes ont été synthétisés de façon à optimiser les propriétés relaxométriques du Gd. **La relaxométrie de ces différents complexes et des conjugués correspondants a été étudiée** de façon à sélectionner celui présentant les meilleures capacités de relaxation. **La capacité des VHH gadolinés à permettre la détection spécifique de leurs cibles par IRM a tout d'abord été testée *in vitro*** après incubation directe de cerveaux dans une solution de VHH. Ces expériences ont permis, dans un premier temps, de

s’affranchir des difficultés liées à l’imagerie *in vivo* (passage de la BHE, mouvements respiratoires, artefacts, etc.). Puis, pour évaluer la capacité des différents VHH à traverser la BHE pour permettre l’imagerie de leurs cibles intracérébrales, **les VHH gadolinés ont été injectés *in vivo* par voie IV avant examen IRM**. Ces acquisitions IRM ont dans un premier temps été effectuées en *post mortem* pour s’affranchir des difficultés liées à l’imagerie *in vivo*.

2 Matériel et méthodes

Ce projet pluridisciplinaire est réalisé grâce à une collaboration entre plusieurs équipes :

- La production et l'ingénierie des VHH est assurée par l'équipe du Dr P. Lafaye de l'Institut Pasteur.
- La partie chimie de ce projet (synthèse des différents complexes, couplage des complexes aux VHH et contrôle qualité) est assurée par le Dr S. Bay et son équipe à l'Institut Pasteur : Dr C. Ganneau, Dr M. Vandesquille et Mme H. Cahuzac.
- Les injections systémiques par voie rétro-orbitaire ont été réalisées avec l'aide de M. I. Youssef et du Dr. T. Li à l'Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière (ICM) sous la direction du Dr B. Delatour.
- Les acquisitions IRM ont été réalisées au CEA, sous la direction du Dr M. Dhenain. Une partie des acquisitions IRM *in vitro* ont été réalisées avec l'aide du Dr M. Vandesquille.

2.1 Obtention des VHH

Une description détaillée du mode d'obtention de ces VHH a été publiée précédemment par Li et coll.[326] et Vandesquilles et coll.[387] Nous ne décrirons donc que brièvement le mode d'obtention de ces molécules.

2.1.1 Immunisation des alpagas

Les VHH ont été obtenus par immunisation d'un alpaga avec l'antigène souhaité. Pour le VHH anti-Aβ (R3VQ), un alpaga a été immunisé avec un peptide Ab_{42} fibrillaire de synthèse (Bachem®). Pour le VHH anti-Tau hyperphosphorylée (TauA2), un autre alpaga a été immunisé avec un peptide de synthèse correspondant à la partie C-terminale mono-phosphorylée au niveau de la sérine 422 de la protéine Tau couplée à une séquence KLH (Eurogentech®).

2.1.2 Construction des banques de phage-VHH et sélection des VHH d'intérêt

Après trois immunisations, un prélèvement de sang a été effectué. L'ARN messager codant les HCAb a été obtenu à partir des lymphocytes B isolés. Il a ensuite été généré une banque de phage-VHH par RT-PCR puis PCR. Les phage-VHH ont été obtenus par transformation de bactéries *E. Coli* à l'aide d'un phagemide recombinant (pHEN1). Les VHH d'intérêt ont ensuite été sélectionnés par la technique du

phage display à l'aide de peptides $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ ou Tau hyperphosphorylées pour les VHH anti-Aβ et anti-Tau respectivement. Les colonies positives ont ensuite été testées en ELISA à l'aide de peptides $A\beta_{42}$ biotinylés ou Tau hyperphosphorylées.

2.1.3 Expression des VHH

La séquence codant pour les VHH (R3VQ et TauA2) a été introduite dans un vecteur d'expression pET23d (Novagen®) contenant la séquence codant un tag hexa-histidine (6-His). Après transformation et expansion bactérienne, les VHH exprimant un tag 6-His en partie N-terminale ont été isolés par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC ou immobilized-metal affinity chromatography). Ce tag 6-His servira également pour la détection des VHH par IHC. Une séquence de clivage par la thrombine a également été introduite en partie N-terminale de façon à pouvoir éliminer le tag 6-His si nécessaire. Les VHH natifs ont été modifiés en ajoutant un heptapeptide G_3SCSA en partie C-terminale. Cette séquence permet d'introduire une cystéine supplémentaire qui servira à la conjugaison d'un agent de contraste ou d'un fluorochrome. Ces composés seront appelés VHH-CSA (Figure 63).

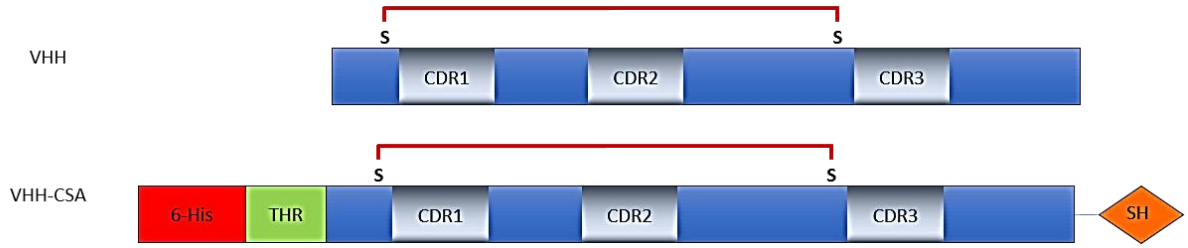


Figure 63 : Représentation schématique des composés VHH et VHH-CSA.

La séquence des VHH (bleu) comprend trois régions CDR (gris). CDR1 et CDR3 sont reliées par un pont disulfure. La séquence des VHH natifs a été modifiée pour introduire un tag 6-His (6-His en rouge) et un site de clivage par la thrombine (THR en vert) en partie N-terminale. Un heptapeptide G_3SCSA a également été ajouté en partie C-terminale pour introduire une cystéine supplémentaire portant une fonction SH (orange) qui servira à la conjugaison d'un agent de contraste ou d'un fluorochrome.

Les VHH-CSA (R3VQ-CSA et TauA2-CSA) ont ensuite été couplés à un agent de contraste à base de Gd. Les atomes de Gd ont été greffés au VHH via un chélateur, le maleimido-acide gadotérique (maléimido-DOTA), par addition thiol sur la cystéine introduite en partie C-terminale des VHH (Figure 64).
Le VHH R3VQ conjugué au Gd a été optimisé pour améliorer les propriétés relaxométriques du Gd. Quatre conjugués différents ont été synthétisés en faisant varier le nombre de chélates de Gd par complexe et sa structure. Deux complexes linéaires, possédant trois chélates (DOTA/Gd), et deux

complexes dendrimériques, possédant quatre chélates (DOTA/Gd), ont été produits. La molécule de liaison entre les chélates de Gd a également été modifiée par ajout (ou non) de glycines entre chaque motif DOTA/Gd (Figure 64). La formule développée de ces composés est présentée en Annexe de ce manuscrit.

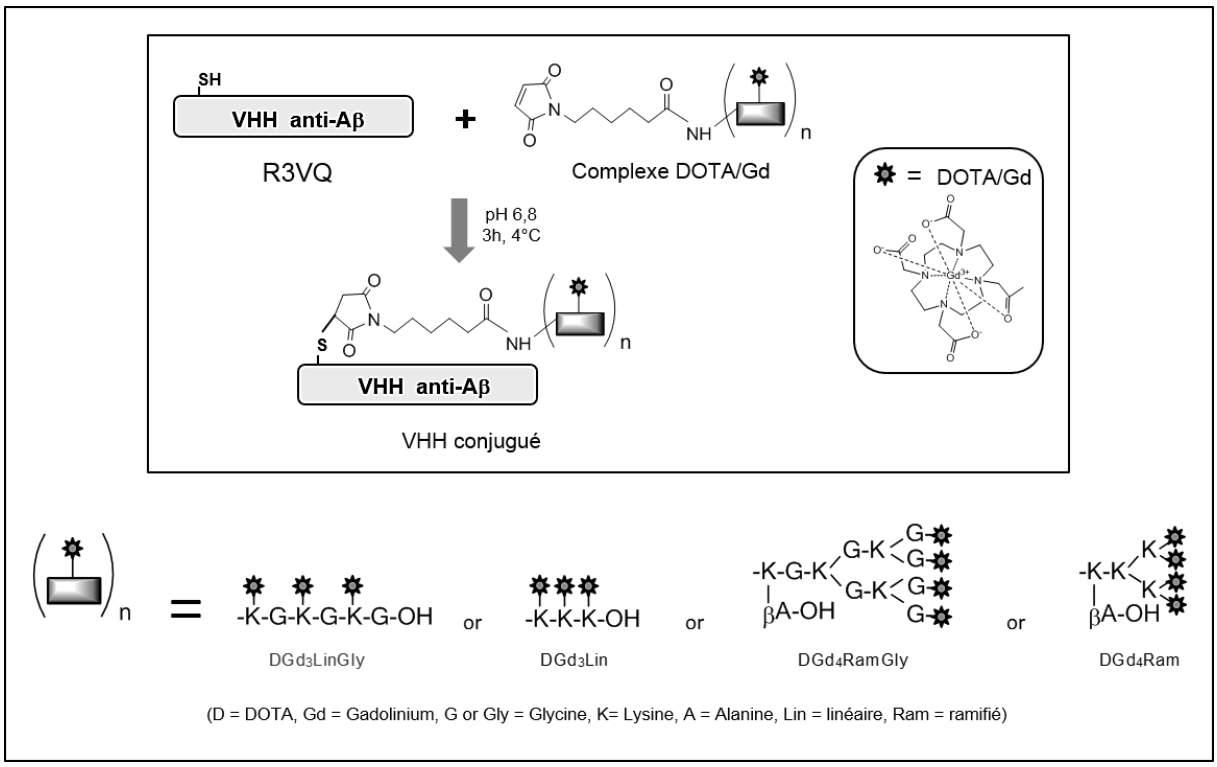


Figure 64 : Représentation schématique du couplage des VHH-CSA avec différents complexes maléimido-DOTA/Gd.

La cystéine supplémentaire introduite en partie C-terminal permet la liaison entre les deux molécules par réaction de thio-éthérification entre la fonction thiol de la cystéine et le maléimide. Différents complexes ont été utilisés. Ces molécules présentent une structure linéaire (Lin) ou ramifiée (Ram), trois ou quatre DOTA/Gd (D = DOTA ; Gd = Gadolinium) et la présence d'espaceurs glycine (Gly ou G = glycine ; A = Alanine ; K = Lysine).

2.2 Propriétés des VHH

La pureté des VHH a été contrôlée avant chaque expérimentation par chromatographie liquide en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse (Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry ou RP-HPLC/MS). L'absence d'agrégation, la présence des ponts disulfures et la présence du tag 6-His ont ainsi été vérifiées.

Les principales caractéristiques des VHH utilisés dans cette thèse sont résumées dans le tableau 7. La constante de dissociation des VHH a été déterminée par ELISA et le pI a été déterminé par focalisation

isoélectrique (isoelectrique focusing ou IEF). Le rayon hydrodynamique a été déterminé par diffusion dynamique de la lumière (dynamic light scattering ou DLS).

Tableau 7: Principales caractéristiques des VHH utilisés dans cette thèse

VHH	Epitope cible	Kd (nM)	PM (KDa)	PI	Rayon hydrodynamique (nm)
R3VQ	$A\beta_{42}$ et $A\beta_{40}$ (acides aminés 17-28)	16	15	8,3	2,24
TauA2	Partie C-terminale de la protéine Tau hyperphosphorylée incluant la Sérine 422	17	17	9,5	3,57

2.3 Modèles animaux utilisés

Tous les protocoles expérimentaux ont été approuvés par un comité d'éthique local indépendant et soumis au Ministère Français de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation. Les procédures expérimentales ont été conduites en stricte conformité avec les réglementations de l'Union Européenne (Directive 2010-63/UE) et française (Code rurale R 214-87-131) pour la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

2.3.1 Modèles transgéniques

Les principales caractéristiques physiopathologiques des modèles transgéniques utilisés ont été présentées en introduction de cette thèse et sont résumées dans le tableau 8.

Tableau 8 : Principales caractéristiques physiopathologiques des modèles transgéniques utilisés.

Modèle	Transgène	Lésions majoritaires	Composition	Apparition (mois)	Plateau (mois)
APP/PS1$_{dE9}$	APP KM670/671NL (Swedish) PSEN1delE9	Dépôts Aβ focaux AAC	$Aß_{42}$>$Aß_{40}$	6	9
PS2/APP	APP KM670/671NL (Swedish) PSEN2 N141I (Volga German)	Dépôts Aβ focaux AAC	$Aß_{42}$<$Aß_{40}$	5	12
Tg4510	MAPT P301L	DNF	pTau	2,5	> 9,5

2.3.2 Modèles de tauopathie par transfert de gène

Ces souris nous ont été fournies par le Dr K. Cambon et son équipe.

La principale difficulté concernant la détection des DNF est leur faible taille. La résolution spatiale atteinte en IRM ne permet pas de distinguer ces lésions de manière individuelle. Dans un premier temps, nous nous sommes affranchis de cette difficulté par l'utilisation d'un modèle de souris WT ayant reçu une injection intracérébrale des vecteurs viraux construits pour surproduire la protéine Tau et conduire à son agrégation. Ce modèle développe progressivement des agrégats de Tau au niveau du site d'injection (hippocampe dorsal) par surexpression de la protéine Tau mutée[388]. Ces agrégats de DNF au niveau de l'hippocampe forment un « patch » continu de lésions de taille suffisamment importante pour permettre sa visualisation en IRM. Deux types de vecteurs ont été utilisés. Le vecteur AAV2/9 ss-CBA-TauP301L codant pour la protéine Tau humaine mutée (mutation MAPT P301L) (n = 3) et le vecteur AAV2/9 ss-CBA-GFP codant pour une GFP chimérique non traduite, utilisé comme contrôle (n = 3). Ces deux transgènes sont sous le contrôle du promoteur neuronal CBA.

Les souris ont été anesthésiées avec un mélange de kétamine (Imalgène 1000 ; 100mg/kg) et xylazine (Rompun 2% ; 10mg/kg). Les souris ont été placées sur un cadre stéréotaxique, puis fixées par des barres d'oreilles et une barre de dents pour éviter tout mouvement. Un système de chauffage a été utilisé pour maintenir leur température corporelle à 37°C tout au long de la procédure. Une incision médiane de la peau du crâne a été effectuée afin de relever les coordonnées du Bregma comme références antérieur-postérieur et latérales. Le crâne a été perforé de manière bilatérale selon les coordonnées suivantes : antérieur-postérieur -2,4 mm et latéral +/-1,5 mm. Des seringues Blunt Hamilton ont été utilisées pour injecter les vecteurs viraux au niveau de l'hippocampe dorsal à -2,25 mm de la surface du crâne et -1,75 mm de la dure-mère. Un volume de 1 µL a été injecté dans chaque hippocampe à une vitesse de 0,2 µL/minute. Finalement, la peau a été suturée et désinfectée. Ces souris ont été examinées 1 mois post-injection.

2.4 Relaxométrie

Les mesures de relaxivités longitudinales et transversales (r1 et r2 respectivement) des différents composés ont été réalisées dans du PBS. Le Dotarem® a été utilisé comme contrôle positif. Le r1 et le r2 ont été calculés à partir de la régression linéaire du taux de relaxation longitudinale ou transversale ($\frac{1}{T_{1,obs}}$ ou $\frac{1}{T_{2,obs}}$ respectivement) en fonction de la concentration en Gd ([Gd]) dans différentes solutions

obtenues par dilutions successives d'une solution stock (de 0 à 1 mM de Gd pour les VHH et leurs complexes et de 0 à 5 mM de Gd pour le Dotarem®), selon les équations suivantes :

$$\frac{1}{T_{1,obs}} = \frac{1}{T_{1,PBS}} + r_1 . [Gd]$$
$$\frac{1}{T_{2,obs}} = \frac{1}{T_{2,PBS}} + r_2 . [Gd]$$

Un spectromètre 11,7T (Bruker, Allemagne) connecté à une console avec le logiciel Paravision 6.1 a été utilisé. Un gradient rongeur de 760 mT/m a été utilisé pour l'émission et une cryosonde a été utilisée pour la réception du signal. Une séquence en écho de spin rapide, permettant une mesure quantitative du T1 (Rapid Imaging with Refocused Echoes ou RARE), a été utilisée avec une résolution de 50 x 50 x 1000 µm^3 (champ de vue = 12,8 x 12,8 mm ; matrice = 256 x 256 ; 6 coupes ; épaisseur de coupe = 1 mm ; TR = 300, 500, 800, 1500, 3000, 5000 ms ; TE = 7 ms ; RARE factor = 2 ; N_{rep} = 1 ; BW = 85 kHz ; temps d'acquisition = 23 minutes). Une séquence en écho de spin multi-coupes multi-échos, permettant une mesure quantitative du T2, a été utilisée avec une résolution de 50 x 50 x 1000 µm^3 (champ de vue = 12,8 x 12,8 mm ; matrice = 256 x 256 ; 6 coupes ; épaisseur de coupe = 1 mm ; TR = 2500 ms ; 30 TE = 7,5 à 223 ms ; N_{rep} = 1 ; BW = 96 kHz ; temps d'acquisition = 23 minutes). Les cartes paramétriques des temps de relaxation T1 et T2 ont ensuite été générées à l'aide du logiciel TopSpin (Bruker, Allemagne).

2.5 Passage *in vivo* de la BHE

Pour évaluer la capacité des différents VHH à traverser la BHE pour atteindre leurs cibles intra-cérébrales, les VHH-CSA et leurs conjugués DOTA/Gd ont été injectés par voie IV puis détectés par IHC dans le cerveau de souris.

2.5.1 Injection intraveineuse des VHH

Les différents VHH ont été injectés par voie IV à des souris PS2/APP âgées de 12-14 mois pour les VHH R3VQ (R3VQ-CSA et R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$; n = 2 par conjugué) et à des souris Tg4510 âgées de 8-12 mois pour les VHH TauA2 (TauA2-CSA et TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$; n = 2 par conjugué). Des souris PS2/APP (n = 2) ou Tg4510 (n = 2) du même âge, injectées avec du PBS ont été utilisées comme contrôles.
Les conjugués R3VQ ont été injectés à la dose de 50 mg/kg. Les conjugués TauA2 ont été injectés à la dose de 10 mg/kg. Le choix des doses s'est fait en fonction des résultats obtenus précédemment en

microscopie biphotonique où ces doses permettaient d'obtenir une bonne détection des plaques amyloïdes et des DNF (voir Introduction). Les doses utilisées pour les dérivés du TauA2 sont inférieures à celles utilisées pour les dérivés du R3VQ du fait d'une plus faible solubilité de ce VHH. TauA2 présente un risque accru d'agrégation en cas de concentration trop importante en solution.
Avant injection, la solution de VHH a été concentrée par diafiltration dans un tube Vivaspin Turbo, 5 KDa, PES (Sartorius®) et filtrée à l'aide d'un filtre seringue. La concentration en protéine a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop 1000 (Thermo Scientific®) permettant de mesurer l'absorbance des protéines à 280 nm.

L'administration a été réalisée par voie IV par injection dans le sinus rétro-orbitaire. Cette voie, moins classique que via la veine caudale, a été choisie pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la localisation de la veine caudale peut s'avérer difficile notamment dans le cas des souris pigmentées. De plus, l'injection par le sinus rétro-orbitaire permet d'être sûr que la totalité de la dose a bien été administrée. En effet, en cas d'extravasation, le liquide ressort de l'orbite de l'animal ce qui permet de le détecter facilement. Par ailleurs, la pharmacocinétique des IgG est similaire (absorption, clairance et demi-vie) pour les deux voies d'administration. L'injection par le sinus rétro-orbitaire est donc une bonne alternative à l'injection via la veine caudale[389].
Les souris ont été anesthésiées avec une solution de kétamine 1% (Imalgène 1000 ; 100mg/kg) et xylazine 2% (Rompun ; 10mg/kg) dans du NaCl 0,9% à 10 mL/kg puis les VHH ont été injectés par voie IV via le sinus rétro-orbitaire. L'aiguille a été introduite délicatement dans le canthus de l'œil en évitant un contact direct avec l'orbite de l'animal. Les VHH ont été injectés puis l'aiguille a été délicatement retirée. Après l'injection, l'apparence des globes oculaires et l'état général des souris ont été contrôlés régulièrement pendant 4 heures avant euthanasie par une injection de pentobarbital sodique et perfusion intracardiaque avec une solution de PFA 4%. Le délai entre l'injection et le sacrifice a été choisi en fonction des résultats précédemment obtenus lors des expériences de microscopie biphotonique (voir Introduction). Les cerveaux ont ensuite été extraits et placés une nuit dans une solution de PFA 4% pour être post-fixés puis conservés dans une solution de PBS 0,1M à 4°C jusqu'à inclusion en paraffine.

2.5.2 Immunohistochimie sur coupes paraffines

2.5.2.1 Inclusion en paraffine et coupe des cerveaux

Les cerveaux ont été coupés en trois blocs. Ces derniers ont ensuite été inclus dans de la paraffine. Les blocs ont d'abord été déshydratés (dans des bains successifs d'éthanol puis de xylène) avant d'être

coulés dans un moule contenant de la paraffine fondue par chauffage. Après refroidissement, un bloc de paraffine dur, à l'intérieur duquel le bloc de cerveau est inclus, a été obtenu. Les blocs de paraffine ont ensuite été coupés avec un microtome à paraffine en coupes sériées de 4 µm d'épaisseur et recueillies sur des lames de verre.

2.5.2.2 Vérification de la fonctionnalité des VHH après application sur coupes histologiques

Les coupes ont été déparaffinées dans le xylène puis réhydratées dans des bains successifs d'éthanol de degré décroissant (100%, 90% et 70%) de 5 minutes chacun et finalement dans l'eau. Un démasquage des antigènes a été effectué par incubation dans l'acide formique pendant 5 minutes, suivi d'un rinçage à l'eau. Un blocage des peroxydases endogènes par incubation dans une solution d'eau, de méthanol 20% et de peroxyde d'hydrogène 3%, pendant 10 minutes, a été réalisé. Puis, il a été effectué un blocage des réactions non spécifiques dans une solution de TBS 0,1 M-tween 0,05% et BSA à 4% pendant 1 heure. Les coupes ont ensuite été incubées en présence de l'anticorps primaire 24 heures à 4°C. Les anticorps primaires utilisés étaient : le VHH testé (concentration de 2-5µg/mL), l'anticorps anti-Aβ 4G8 (dilution 1/10000ème, Covance®) ou l'anticorps anti-Tau hyperphosphorylée AT8 (dilution 1/200ème, Thermo Scientific®). Après trois lavages au TBS-tween, les coupes ont été incubées en présence d'un deuxième anticorps primaire pour détecter les VHH fixés sur le tissu. Plusieurs anticorps ont été utilisés : un anticorps anti-6-His monoclonal (dilution 1/200ème, Sigma®) pour le R3VQ et un sérum polyclonal de lapin anti-TauA2 (1 µg/mL, produit par l'équipe du Dr P. Lafaye de L'Institut Pasteur) pour le TauA2. En effet, de façon étonnante, l'anticorps anti-6-His ne reconnaît pas les dérivés du TauA2. Un sérum polyclonal, obtenu après immunisation d'un lapin avec le TauA2 natif, a donc été utilisé. Après trois lavages au TBS-tween, les coupes ont été incubées en présence d'un anticorps secondaire anti-lapin/souris biotinylé (étape non réalisée pour les anticorps 4G8 et AT8 qui étaient déjà biotinylés). Les coupes ont ensuite été mises en présence de la streptavidine couplée à la peroxydase (Kit Real Detection System Peroxydase/DAB+, Dako®) puis il a été réalisé une révélation chromogénique par incubation avec de la DAB. Une contre-coloration à l'hématoxyline de Harris a été réalisée. Enfin, les coupes ont été déshydratées dans des bains d'éthanol successifs de 5 minutes (70%, 90% et 100%) et clarifiées dans le xylène avant montage entre lame et lamelle à l'aide d'un milieu de montage (Eukitt®).

2.5.2.3 Détection directe des VHH

Un protocole identique à celui décrit dans le paragraphe précédent a été réalisé en omettant l'étape initiale d'incubation en présence du VHH. On peut ainsi détecter les VHH présents dans les tissus.

2.5.3 Intégrité de la BHE

L'intégrité de la BHE a été testée par injection IV d'IgG conventionnelles de référence. Une IgG de souris dirigée contre l'Aβ (4G8), couplée à un AlexaFluor488, a été injectée par voie IV, de la même manière que décrit précédemment, chez des souris PS2/APP du même âge. Une IgG de souris dirigée contre la protéine Tau hyperphosphorylée, couplée à un AlexaFluor488, a été injectée par voie IV, chez des souris Tg4510 du même âge. Les IgG ont ensuite été détectées dans le cerveau de ces souris par IHC sur coupes paraffine, 4 heures après injection, comme décrit dans la partie précédente.

2.6 IRM *in vitro*

Pour le R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$, des souris PS2/APP (n = 3) ont été sacrifiées par une injection de pentobarbital sodique et perfusées en intracardiaque avec une solution de PFA 4%. Les cerveaux ont ensuite été extraits et placés une nuit dans une solution de PFA 4% pour être post-fixés puis conservés dans du PBS jusqu'à utilisation. Pour le TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$, des souris Tg4510 (n = 5) ont été sacrifiées de la même manière. Deux souris Tg4510 supplémentaires ont été sacrifiées pour incubation des cerveaux en présence de R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$ (vérification de la spécificité du marquage observé). Des souris WT C57/Bl6 (n = 2) ont été utilisées comme contrôles. Ces cerveaux ont été incubés directement dans une solution de VHH (300 µL à 5 mg/mL pour R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$ ou 0,5 mg/mL pour TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$ dans un mélange PBS + Triton 0,2%) ou dans du PBS seul pendant 24h, suivi de six rinçages de 30 minutes.

Ces cerveaux ont ensuite été imagés à l'aide d'un spectromètre 11,7T (Bruker, Allemagne) connecté à une console avec le logiciel Paravision 6.1. Un gradient rongeur de 760 mT/m pour l'émission et une cryosonde pour la réception du signal ont été utilisés. Une séquence FLASH-3D pondérée en T2* a été utilisée avec une résolution de 25 x 25 x 25 μm^3 (champ de vue = 12,8 x 12,8 x 6,4 mm^3, matrice = 512 x 512 x 256, TR = 40 ms, TE = 15 ms, FA = 5°, N_{rep} = 4, BW = 37,5 kHz, temps d'acquisition = 1 heure 27 minutes). Une séquence FLASH-3D pondérée en T1 a également été utilisée avec une résolution de 33 x 33 x 33 μm^3 (champ de vue = 12,8 x 12,8 x 6,4 mm^3, matrice = 384 x 384 x 192, TR = 150 ms, TE = 4 ms, FA = 50°, N_{rep} = 1, BW = 50 kHz, temps d'acquisition = 1 heure 31 minutes).

2.7 IRM *ex vivo*

2.7.1 Injection intraveineuse des VHH

Avant injection, la solution de VHH a été concentrée par diafiltration dans un tube Vivaspin Turbo, 5 KDa, PES (Sartorius®) et filtrée à l'aide d'un filtre seringue. La concentration en protéine a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop 1000 (Thermo Scientific®) permettant de mesurer l'absorbance des protéines à 280 nm.

Les VHH ont ensuite été injectés en IV, via la veine caudale, à des souris. Pour le R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$, des souris PS2/APP (n = 3) ou $APP/PS1_{dE9}$ (n = 3), âgées de 18 mois, ont été utilisées. Pour le TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$, des souris, ayant reçu une injection de vecteur viral AAV2/9 ss-CBA-TauP301L codant pour la protéine Tau humaine mutée (n = 3) ou de vecteur viral AAV2/9 ss-CBA-GFP codant pour une GFP chimérique non traduite (n = 3), ont été utilisées. Les VHH ont été injectés à la dose de 50 mg/kg pour R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$ et à la dose de 10 mg/kg pour TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$ par voie IV. Deux heures après l'injection, les souris ont été sacrifiées par une injection de pentobarbital sodique et perfusées en intracardiaque avec une solution de PFA 4%. Les cerveaux ont ensuite été extraits et placés une nuit dans une solution de PFA 4% pour être post-fixés puis conservés dans une solution de PBS 0,1M à 4°C jusqu'à utilisation. La dose et le délai entre l'injection et le sacrifice ont été choisis en fonction des résultats des expériences de microscopie biphotonique et des informations de pharmacocinétique disponibles.

2.7.2 IRM *ex vivo*

Ces cerveaux ont ensuite été imagés à l'aide d'un spectromètre 11,7T (Bruker, Allemagne) connecté à une console avec le logiciel Paravision 6.1. Un gradient rongeur de 760 mT/m pour l'émission et une cryosonde pour la réception du signal ont été utilisés. Les séquences utilisées étaient les mêmes que pour l'imagerie *in vitro*.

2.7.3 Immunohistochimie

Après examen IRM, les cerveaux ont été divisés en deux hémisphères. Un hémisphère a été coupé en trois blocs et inclus en paraffine. Ces blocs ont ensuite été coupés avec un microtome à paraffine en coupes sériées de 4 µm d'épaisseur puis recueillies sur des lames de verre. L'autre hémisphère a été cryo-protégé dans une solution de sucrose (15% pendant 24h puis 30% pendant 24 heures) et coupé

en sections de 30 µm en plan transverse au microtome. Les coupes ont été conservées dans une solution de stockage (glycogène, glycérol, PB 1M, H_2O distillée) à -20°C avant utilisation.

2.8 Statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Graph Pad Prism. Le test de Mann-Whitney a été effectué pour comparer deux à deux des échantillons indépendants. La différence a été considérée comme significative pour p-value ≤ 0.05.

3 Résultats

3.1 Relaxométrie

L'efficacité d'un agent de contraste peut être caractérisée par sa relaxivité longitudinale et transversale (r1 et r2 respectivement). Le tableau 9 résume les caractéristiques des différents composés testés. Les relaxivités longitudinales (r1) et transversales (r2) des différents complexes DOTA/Gd et des VHH conjugués correspondants ont été mesurées et comparées à celles d'un agent de contraste de référence, le Dotarem®.

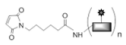
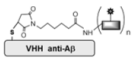
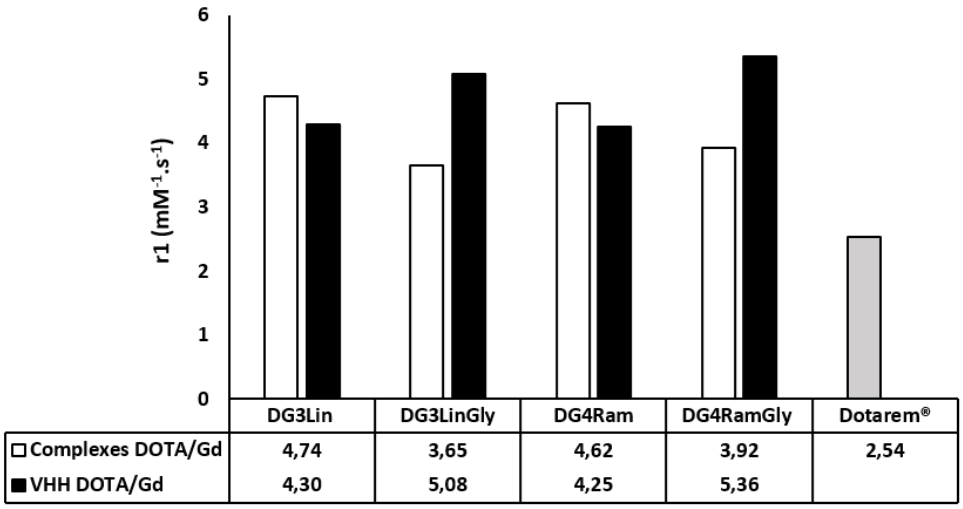
Agent de contraste		Nombre de Gd	Structure	Espaceurs Glycine	Poids moléculaire (Da)
Complexe DOTA/Gd 	Mal-[Lys(DOTA/Gd)]$_3$-Gly DGd$_3$Lin	3	Linéaire	Non	2275
	Mal-[Lys(DOTA/Gd)-Gly]$_3$ DGd$_3$LinGly			Oui	2389
	(DOTA/Gd)$_4$-(Lys)$_2$-Lys-Lys(Mal)-bAla DGd$_4$Ram	4	Dendrimère	Non	2957
	(DOTA/Gd-Gly)$_4$-(Lys-Gly)$_2$-Lys-Gly-Lys(Mal)-bAla DGd$_4$RamGly			Oui	3357
VHH-DOTA/Gd 	R3VQ-DGd$_3$Lin	3	Linéaire	Non	17999
	R3VQ-DGd$_3$LinGly			Oui	18113
	R3VQ-DGd$_4$Ram	4	Dendrimère	Non	18682
	R3VQ-DGd$_4$RamGly			Oui	19081

Tableau 9 : Caractéristiques des différents composés étudiés en relaxométrie.

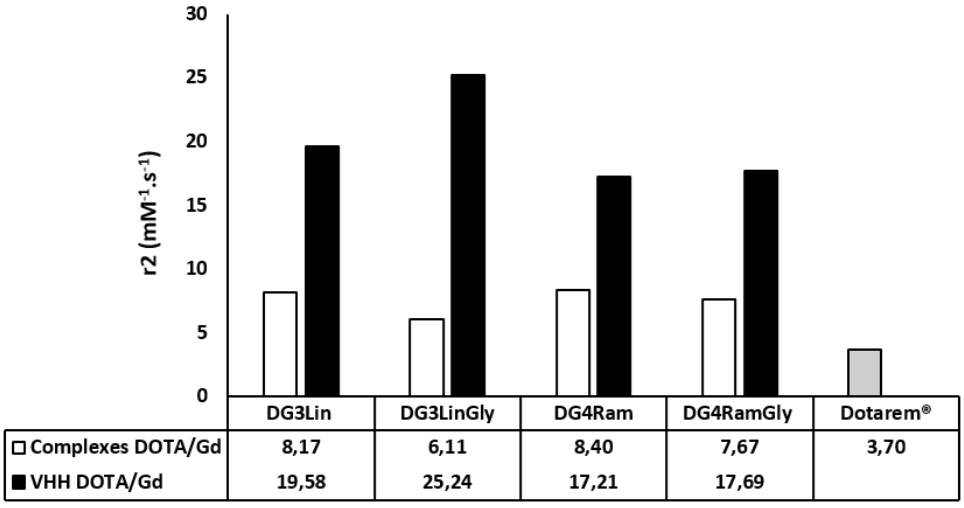
La relaxivité r1 était augmentée pour tous les composés par rapport au Dotarem®. Parmi les quatre complexes testés, le complexe DG$_3$Lin présentait la meilleure relaxivité r1. Celle-ci était multipliée par 1,9 par rapport à celle du Dotarem®. La relaxivité des complexes dépourvus de glycine était meilleure que celle des complexes possédant des espaceurs glycines. Concernant les conjugués VHH-DOTA/Gd, la conjugaison des complexes aux VHH a peu modifié leurs propriétés relaxométriques. La structure linéaire ou dendrimérique ne semblait pas non plus modifier la relaxivité. Les composés R3VQ-DG$_3$LinGly et R3VQ-S-DG$_4$RamGly présentaient les meilleures propriétés de relaxation avec un r1 multiplié par 2,0 et 2,1 respectivement par rapport au Dotarem®. De façon étonnante, la présence des espaceurs glycines semblait, dans ce cas, améliorer légèrement la relaxivité (Figure 65).



	DG3Lin	DG3LinGly	DG4Ram	DG4RamGly	Dotarem®
□ Complexes DOTA/Gd	4,74	3,65	4,62	3,92	2,54
■ VHH DOTA/Gd	4,30	5,08	4,25	5,36	

Figure 65 : Relaxivité longitudinale r1 des différents complexes et conjugués R3VQ en comparaison au Dotarem®.

La relaxivité r2 était fortement augmentée pour tous les composés (notamment pour les conjugués VHH DOTA/Gd) par rapport au Dotarem®. Les complexes DG_3Lin et DG_4Ram présentaient les meilleures r2. Celles-ci étaient multipliées par 2,2 et 2,3 respectivement par rapport à celle du Dotarem®. De nouveau, la relaxivité des complexes dépourvus de glycine était améliorée par rapport aux complexes possédant des espaceurs glycines. La structure linéaire ou dendrimérique ne semblait pas modifier la relaxivité. La conjugaison des complexes aux VHH a induit une forte augmentation de leur relaxivité r2. Le composé R3VQ-DG_3LinGly présentait les meilleures propriétés de relaxation avec un r2 multiplié par 6,9 par rapport au Dotarem®. De nouveau, la présence des espaceurs glycines semblait améliorer légèrement la relaxivité dans le cas des conjugués (Figure 66).



	DG3Lin	DG3LinGly	DG4Ram	DG4RamGly	Dotarem®
□ Complexes DOTA/Gd	8,17	6,11	8,40	7,67	3,70
■ VHH DOTA/Gd	19,58	25,24	17,21	17,69	

Figure 66 : Relaxivité transversale r2 des différents complexes et conjugués R3VQ en comparaison au Dotarem®.

Le VHH conjugué R3VQ-DG_3LinGly a été utilisé pour la suite de cette étude. Pour plus de simplicité, celui-ci sera noté R3VQ-$(DOTA/Gd)_3$.

3.2 Passage de la BHE

Notre hypothèse est que les VHH de pI basique peuvent traverser spontanément la BHE pour aller marquer spécifiquement leur cible intracérébrale. Pour valider cette hypothèse, les différents VHH ont été injectés par voie IV à des souris puis détectés dans leur cerveau par IHC.

3.2.1 R3VQ

3.2.1.1 Fonctionnalité des VHH injectés

Avant injections, la fonctionnalité des différents VHH testés (R3VQ-CSA et R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$) a été contrôlée par ELISA (par l'équipe du Dr P. Lafaye, Institut Pasteur) et par IHC.
Les VHH ont été appliqués directement sur des coupes de cerveau de souris PS2/APP puis détectés par IHC à l'aide d'un anticorps dirigé contre leur tag 6-His. Les VHH R3VQ-CSA et R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$ ont permis de détecter les plaques amyloïdes sur ces tissus et étaient donc fonctionnels (Figure 67). Sur les coupes incubées avec l'anticorps anti-6-His, un bruit de fond relativement important avec présence d'un marquage intracellulaire non spécifique a été observé. Ce bruit de fond est fréquemment observé avec les anticorps anti-6-His. Il est probablement lié au marquage non spécifique de protéines endogènes possédant des séquences 6-His (principalement des facteurs de transcription) et principalement localisées dans le noyau des cellules[390,391].

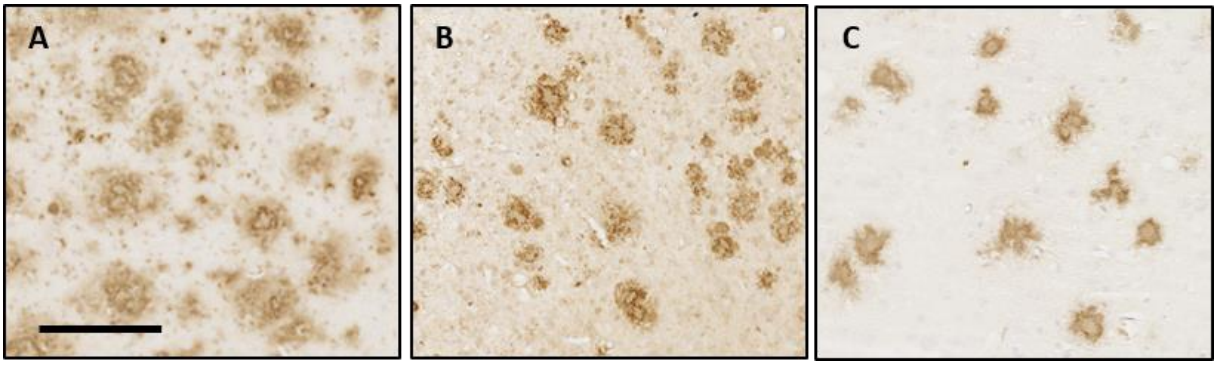


Figure 67 : Vérification de la fonctionnalité des différents conjugués R3VQ par IHC.

Marquage des plaques amyloïdes par IHC sur coupes paraffine, dans le cortex de souris PS2/APP, par 4G8, anticorps de référence anti-Aβ (A) et après application directe de R3VQ-CSA (B) et R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$ (C). Barre d'échelle = 100 µm.

3.2.1.2 Injection intraveineuse des VHH

Les VHH R3VQ-CSA et R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$ ont ensuite été injectés par voie IV chez des souris PS2/APP (n = 2 par conjugué) âgées de 12-14 mois, à la dose de 50 mg/kg. Lors des injections, aucune des souris n'a montré de signes de saignement ou d'extrusion de la solution de VHH. Les souris ont ensuite été sacrifiées 4 heures post-injection et les cerveaux ont été prélevés. Les VHH R3VQ-CSA et R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$ ont été détectés directement dans ces cerveaux par IHC à l'aide d'un anticorps dirigé contre leur tag 6-His. Le marquage alors obtenu a été comparé au marquage des plaques amyloïdes par un anticorps de référence anti-Aβ (4G8). La spécificité du marquage obtenu par IHC a également été vérifiée à l'aide de souris PS2/APP contrôles injectées avec du PBS (n = 2).

L'IHC anti-Aβ (4G8) a révélé la présence de plaques amyloïdes, dans tout le cerveau, pour toutes les souris PS2/APP. Un marquage des VHH a été observé au niveau des plaques amyloïdes, chez les souris injectées avec les VHH R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$. Ce marquage était présent dans tout le cerveau, quel que soit le niveau antéro-postérieur, notamment dans le cortex, l'hippocampe, le thalamus et l'amygdale. Les VHH semblaient se localiser en périphérie des plaques amyloïdes. Cependant, ce marquage était plus faible que celui obtenu avec l'anticorps 4G8. De façon étonnante, aucun marquage anti-6-His n'a été obtenu chez les souris injectées avec les VHH R3VQ-CSA. Enfin, aucun marquage anti-6-His n'a été observé chez les souris contrôles injectées avec du PBS (Figure 68).

D'après la littérature, la BHE des souris PS2/APP est intacte jusqu'à l'âge de 16 mois[103]. Nos expériences ayant été réalisées avec des souris de 12 mois, la BHE de celles-ci était supposée être fonctionnelle. L'intégrité de la BHE a été vérifiée par injection IV d'une IgG de référence, chez des souris PS2A/PP du même âge. Pour cela, le 4G8 couplé à un fluorochrome AlexaFluor 488 a été injecté à la dose de 50 mg/kg, puis détecté par IHC dans le cerveau des souris, 4 heures après injection. Un passage très faible, limité à la périphérie des plaques, a été détecté au niveau de zones précises du cerveau (cortex visuel, cortex pariétal postérieur et hippocampe). Ce marquage était cependant faible par rapport au marquage obtenu après injection IV de R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$.

En conclusion, les conjugués R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$ semblent capables de traverser la BHE et de diffuser correctement dans les tissus pour aller se lier spécifiquement aux plaques amyloïdes chez la souris. A l'inverse, le composé R3VQ-CSA semble dépourvu de la capacité de traverser la BHE.

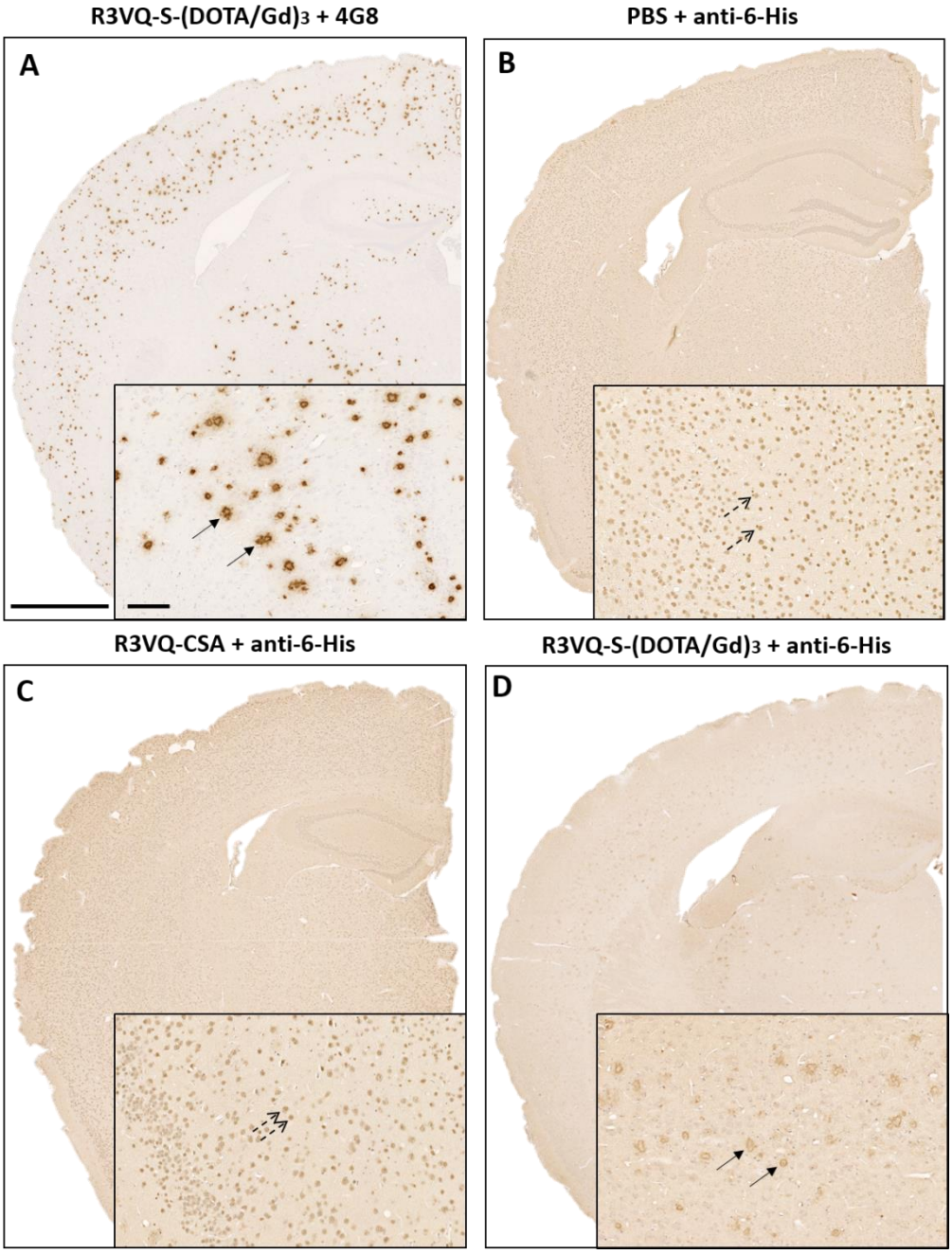


Figure 68 : Détection par IHC des différents conjugués R3VQ dans le cerveau de souris PS2/APP après injection IV.

Marquage des VHH par IHC anti-6-His sur coupes paraffine, dans le cerveau de souris PS2/APP, après injection IV de R3VQ-CSA (C), R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ (D) ou de PBS (B). Les marquages obtenus ont été comparés avec le marquage des plaques amyloïdes par l'anticorps 4G8 (A). Les VHH R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ semblaient être localisés au niveau des plaques amyloïdes (D, flèches noires pleines). Le marquage obtenu était plus faible que celui obtenu avec l'anticorps 4G8. Aucun marquage n'a été obtenu chez les souris PS2/APP injectées avec les VHH R3VQ-CSA à l'exception d'un marquage intracellulaire non spécifique, caractéristique des anticorps anti-6-His (C, flèches noires en pointillés). Aucun marquage n'a été obtenu chez les souris PS2/APP contrôles injectées avec du PBS à l'exception du même marquage intracellulaire (B, flèches noires en pointillés). Barre d'échelle = 1 mm et 100 µm pour les inserts.

3.2.2 TauA2

3.2.2.1 Fonctionnalité des VHH injectés

Avant injections, la fonctionnalité des différents VHH (TauA2-CSA et TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$) a été contrôlée par ELISA (par l'équipe de P. Lafaye, Institut Pasteur) et par IHC.

Les VHH ont été appliqués directement sur des coupes de cerveau de souris Tg4510 puis détectés par IHC à l'aide d'un sérum polyclonal anti-TauA2. Les VHH TauA2-CSA et TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$ ont permis de détecter les DNF sur ces tissus et étaient donc fonctionnels (Figure 69).

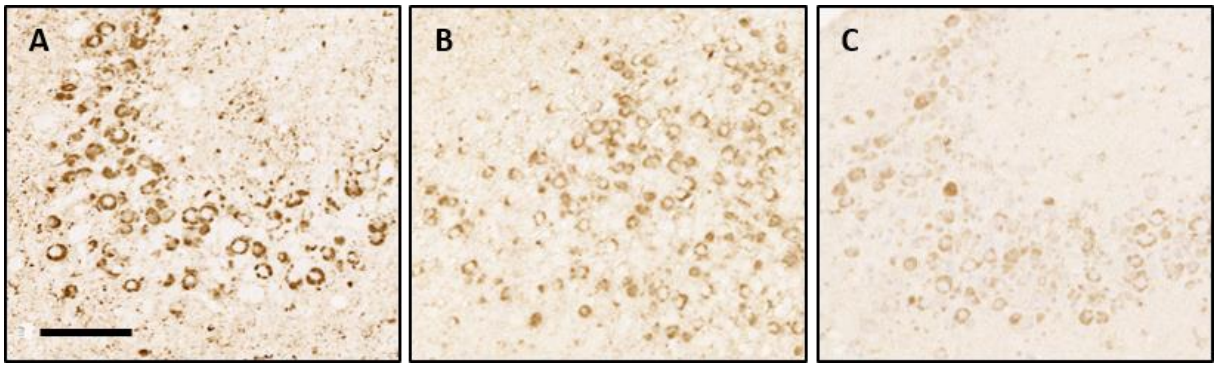


Figure 69 : Vérification de la fonctionnalité des différents conjugués TauA2 par IHC.

Marquage des DNF par IHC sur coupes paraffine, dans l'hippocampe de souris Tg4510 par AT8, anticorps de référence anti-Tau (A) et après application directe de TauA2-CSA (B) et TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$ (C). Barre d'échelle = 100 µm.

3.2.2.2 Injection intraveineuse des VHH

Comme pour R3VQ, les différents dérivés du VHH TauA2 (TauA2-CSA et TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$) ont été injectés par voie IV à des souris Tg4510 (n = 2 par conjugué), âgées de 8 à 12 mois, à la dose de 10 mg/kg. Lors des injections, aucune des souris n'a montré de signes de saignement ou d'extrusion de la solution de VHH. Les souris ont ensuite été sacrifiées 4 heures post-injection et les cerveaux ont été prélevés. Les VHH TauA2-CSA et TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$ ont été détectés directement dans ces cerveaux par IHC à l'aide d'un sérum polyclonal anti-TauA2. La spécificité du marquage obtenu par IHC a été vérifiée à l'aide de souris Tg4510 contrôles injectées avec du PBS (n = 2).

L'IHC anti-Tau (AT8) a montré la présence de DNF en très grande quantité dans tout le cerveau, notamment dans le cortex, l'hippocampe et l'amygdale, pour toutes les souris Tg4510. Un marquage

des VHH a été observé au niveau des DNF, chez les souris injectées avec les VHH TauA2-CSA et TauA2-S-(DOTA/Gd)$_3$. Cependant, le marquage obtenu avec le composé CSA était très faible par rapport au marquage obtenu avec AT8 ou TauA2-S-(DOTA/Gd)$_3$, tant en nombre de DNF détectées qu'en intensité. Aucun marquage n'a été détecté chez les souris contrôles injectées avec du PBS (Figure 70).

Dans la littérature, des altérations de la BHE ont été décrites dans ce modèle à partir de 9 mois[392]. L'intégrité de la BHE a été vérifiée par injection IV d'une IgG de référence, chez des souris Tg4510 du même âge. Une IgG dirigée contre la protéine Tau hyperphosphorylée a été injectée à la dose de 10 mg/kg, suivie de sa détection par IHC, 4 heures après injection. Aucune IgG n'a été détectée dans ces cerveaux. Cela semble indiquer que la BHE des souris Tg4510 âgées de 12 mois était fonctionnelle.

En conclusion, les conjugués TauA2-CSA et TauA2-S-(DOTA/Gd)$_3$ semblent capables de traverser spontanément la BHE chez la souris mais seule une très faible fraction de TauA2-CSA est retrouvée dans le cerveau après injection systémique.

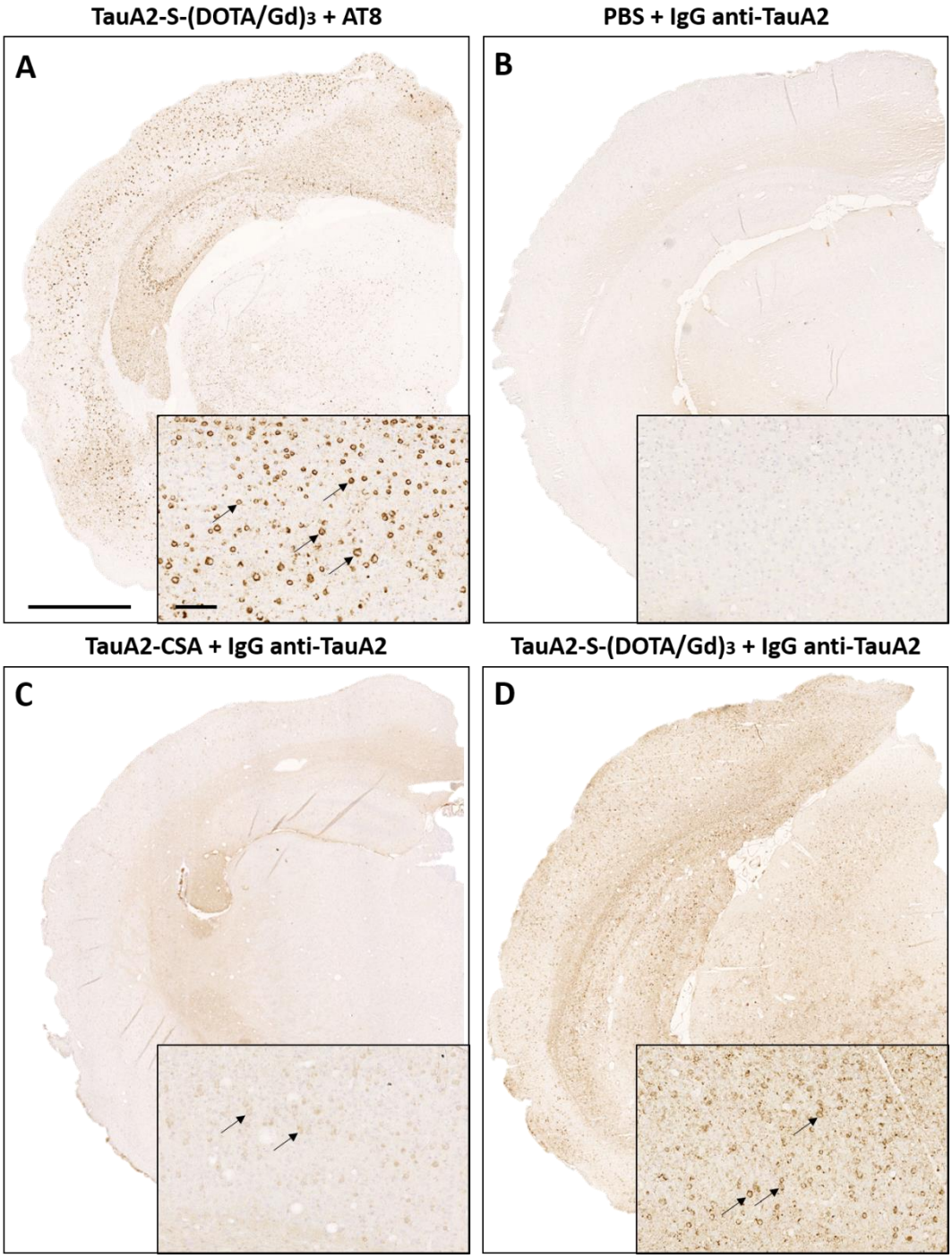


Figure 70 : Détection par IHC des différents conjugués TauA2 dans le cerveau de souris Tg4510 après injection IV.

Marquage des VHH par IHC sur coupe paraffine, dans le cerveau de souris Tg4510, après injection IV de TauA2-CSA (C), de TauA2-S-(DOTA/Gd)$_3$ (D) ou de PBS (B). Les marquages obtenus ont été comparés avec le marquage des DNF par l'anticorps AT8 (A). Les VHH TauA2-S-(DOTA/Gd)$_3$ semblaient être localisés au niveau des DNF (D, flèches noires). Le marquage obtenu était plus faible que celui obtenu avec AT8. Un marquage très faible des VHH a été obtenu chez les souris Tg4510 injectées avec TauA2-CSA (C, flèches noires). Aucun marquage n'a été observé chez les souris Tg4510 contrôles injectées avec du PBS (B). Barre d'échelle = 1 mm et 100 µm pour les inserts

3.3 IRM *in vitro*

La capacité des VHH conjugués au DOTA/Gd à permettre la détection spécifique de leur cible par IRM a tout d'abord été testée *in vitro* de façon à s'affranchir des difficultés liées à l'imagerie *in vivo* : passage de la BHE, mouvements respiratoires, artefacts, etc.

3.3.1 Détection des plaques amyloïdes par IRM *in vitro* à l'aide de R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$

Des cerveaux de souris PS2/APP (n = 3) ont été utilisés. Pour chaque cerveau, un hémisphère a été incubé dans une solution de R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ (300 µL à 5 mg/mL dans une solution de PBS + Triton 0,2%) pendant 24 heures, puis rincé avant l'acquisition des images IRM à haute résolution (25 x 25 x 25 µm^3). L'autre hémisphère a été incubé dans du PBS seul et constituait donc un contrôle négatif. Des cerveaux de souris WT, ne présentant pas d'amyloïdose, ont également été incubés dans une solution de R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ à la même concentration. Après acquisition des images IRM, ces cerveaux ont été marqués par IHC à l'aide de l'anticorps 4G8 dirigé contre l'Aβ et de l'anticorps anti-6-His.

Les images IRM pondérées en T2*, des hémisphères de PS2/APP incubés en présence de R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$, ont montré la présence de nombreux points hypointenses dans l'ensemble du cerveau, notamment dans le cortex, l'hippocampe, le thalamus et l'amygdale. Un faible nombre de points hypointenses ont également été observés dans les hémisphères PS2/APP incubés dans du PBS, probablement dus à des anomalies de contrastes spontanées induites par les plaques amyloïdes. Aucune hypointensité n'a été observée dans le cerveau des souris WT incubé en présence de R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ à l'exception de celles dues à la présence de vaisseaux sanguins (Figure 71). Aucune hyperintensité liée à la présence des VHH-(DOTA/Gd)$_3$ n'a été observée en pondération T1.

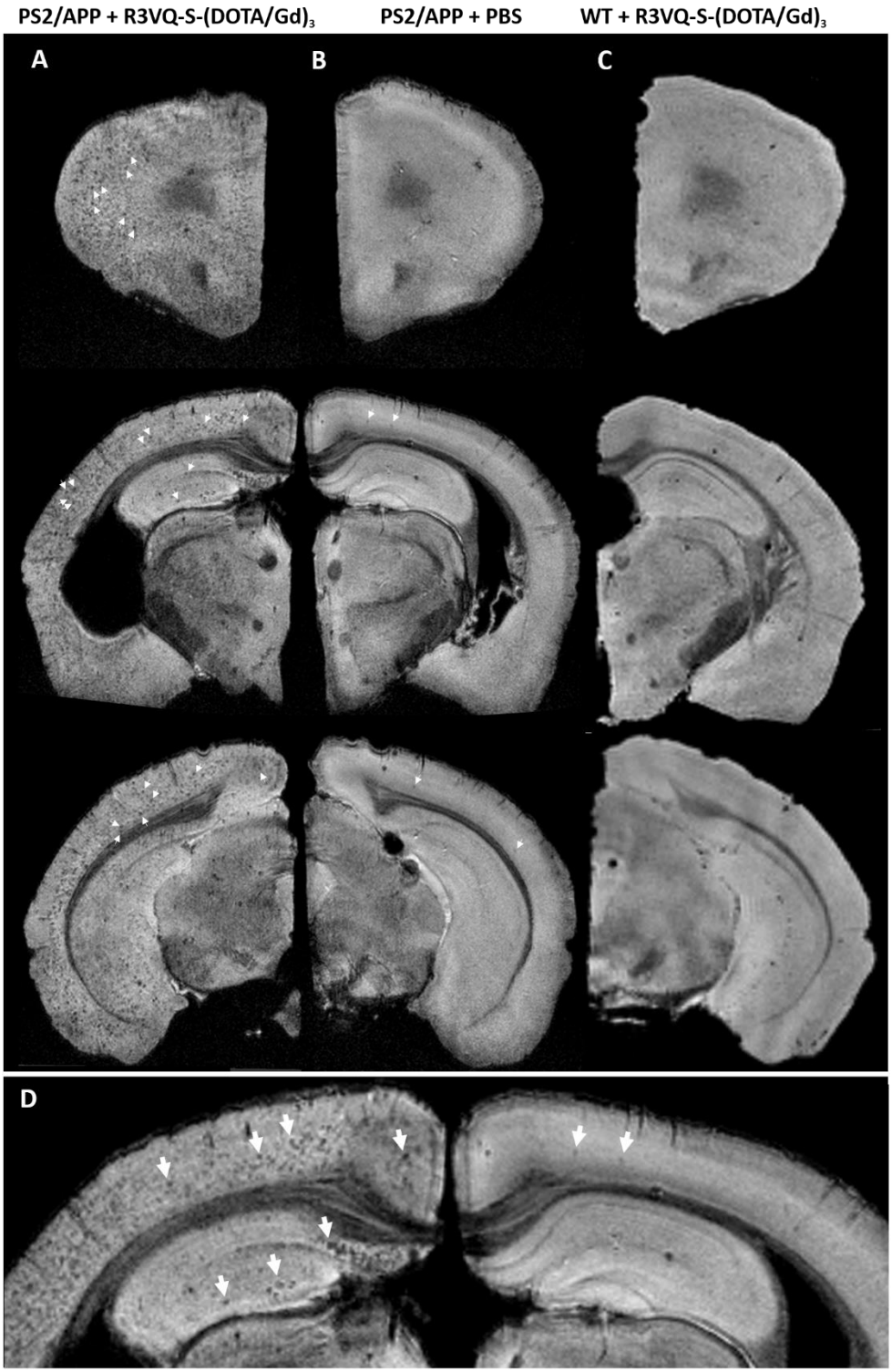


Figure 71 : Détection des plaques amyloïdes par IRM *in vitro* dans le cerveau de souris PS2/APP après incubation en présence des VHH R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$.

Un hémisphère a été incubé dans une solution de R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ (colonne A). L'autre hémisphère a été incubé dans du PBS (colonne B). De nombreux points hypointenses (flèches blanches) ont été observés dans l'hémisphère PS2/APP incubé dans l'agent de contraste (D, gauche). Un nombre beaucoup plus faible d'hypointensités était visible dans l'hémisphère PS2/APP incubé dans du PBS (D, droite). Aucune hypointensité n'a été observée dans le cerveau de souris WT, incubé en présence de R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ (colonne C).

Un comptage de ces hypointensités a révélé qu'elles étaient 7 fois plus nombreuses dans les hémisphères incubés avec R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ par rapport aux hémisphères incubés dans du PBS (50,97 ± 8,53 et 7,32 ± 0,11 plaques/mm^2 respectivement) (Figure 72). La charge amyloïde détectée dans les hémisphères incubés avec R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ était 3,2 fois plus importante par rapport aux hémisphères incubés dans du PBS (5,42 ± 1,51 et 1,67 ± 0,66) (Figure 72).

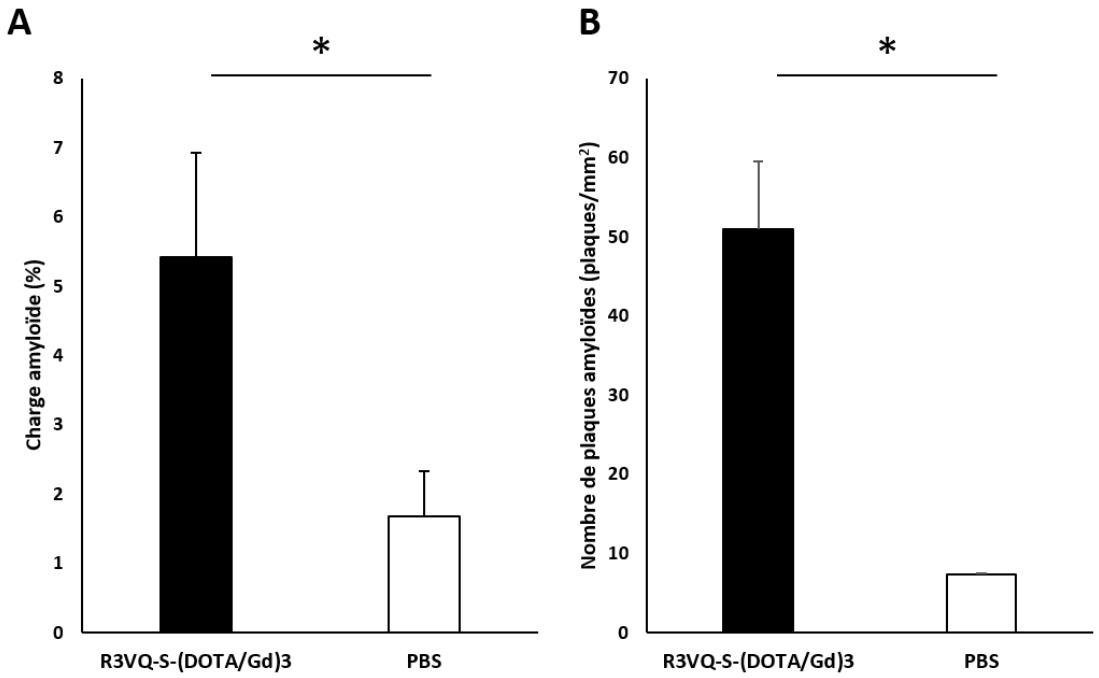


Figure 72 : Mesure de la charge amyloïde (A) et du nombre de plaques amyloïdes (B) détectées par IRM *in vitro* dans le cerveau de souris PS2/APP après incubation dans une solution de R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ (noir) ou dans du PBS (blanc).

La charge amyloïde et le nombre de plaques amyloïdes détectées étaient significativement supérieures après incubation en présence de R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ ($p < 0,05$).

L'IHC anti-Aβ (4G8) a montré la présence de plaques amyloïdes en quantité importante dans tout le cerveau des souris PS2/APP, notamment dans le cortex, l'hippocampe, le thalamus et l'amygdale. La détection directe des VHH par IHC anti-6-His a montré leur présence au niveau des plaques amyloïdes, dans les mêmes régions cérébrales. Cette répartition était similaire à celle des points hypointenses observés sur les images IRM correspondantes. La mise en registre des images IRM et des coupes histologiques marquées par IHC anti-Aβ a montré que les hypointensités observées par IRM correspondaient aux plaques amyloïdes détectées par IHC. Certaines plaques amyloïdes observées en IRM ont également pu être mises en registre avec le marquage anti-6-His. Ces éléments suggèrent que la présence des VHH R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ serait bien responsable de la visualisation des plaques

amyloïdes en IRM (Figure 73). Par ailleurs, les IHC anti-Aβ et anti-6-His des souris contrôles WT ont confirmé l'absence de lésions amyloïdes et de VHH dans le parenchyme cérébral.

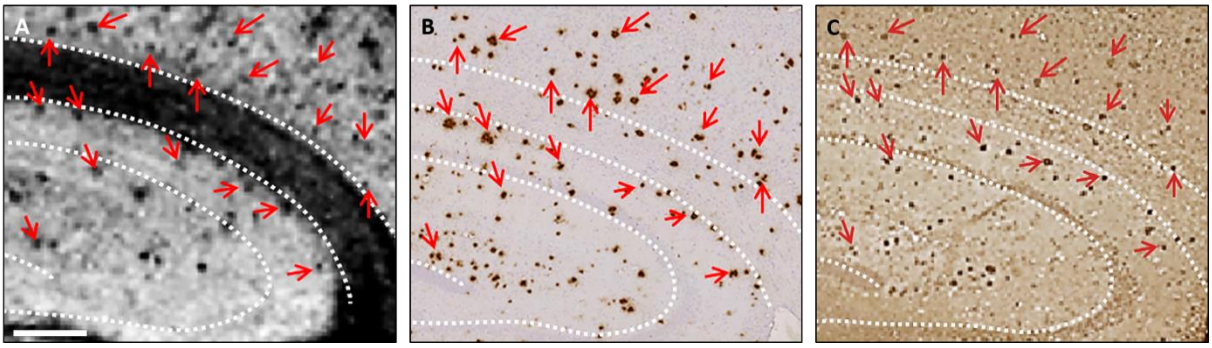


Figure 73 : Mise en registre des images IRM *in vitro* (A) et des coupes histologiques marquées par IHC anti-Aβ (4G8) (B) et anti-6-His (C), au niveau de l'hippocampe de souris PS2/APP, après incubation directe dans une solution de R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$[387].

Les points hypointenses observés en IRM (flèches rouges) co-localisaient avec les plaques amyloïdes (B) et les VHH (C) marqués par IHC. Barre d'échelle = 250 µm.

3.3.2 Détection des DNF par IRM *in vitro* à l'aide de TauA2-S-(DOTA/Gd)$_3$

Des cerveaux de souris Tg4510 (n = 5) ont été utilisés. Comme pour le VHH R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$, un hémisphère de chaque cerveau a été incubé dans une solution de TauA2-S-(DOTA/Gd)$_3$ (300 µL à 0,5 mg/mL dans du PBS + Triton 0,2%) pendant une nuit, puis rincé avant l'acquisition des images IRM à haute résolution (25 x 25 x 25 µm^3). L'autre hémisphère a été incubé dans du PBS seul et constituait un contrôle négatif. Des cerveaux de souris WT ont également été incubés dans une solution de TauA2-S-(DOTA/Gd)$_3$ à la même concentration. Après acquisition des images IRM, ces cerveaux ont été marqués par IHC à l'aide de l'anticorps AT8 dirigé contre la protéine Tau hyperphosphorylée et à l'aide du sérum polyclonal anti-TauA2.

Bien que les images IRM aient été acquises à haute résolution, les DNF sont de taille inférieure à 20 µm et ne sont donc pas détectables à la résolution utilisée. Des accumulations de lésions, de taille supérieure, seraient cependant détectables. Les images IRM pondérées en T2* ont montré la présence de plusieurs bandes hypointenses notamment dans le cortex, l'hippocampe et le subiculum des hémisphères Tg4510 incubés avec TauA2-S-(DOTA/Gd)$_3$. Ces hypointensités étaient absentes ou moins hypointenses dans les hémisphères Tg4510 contrôles incubés dans du PBS ou dans le cerveau des souris WT incubé avec TauA2-S-(DOTA/Gd)$_3$ (Figure 74). Aucune hyperintensité liée à la présence des VHH-(DOTA/Gd)$_3$ n'a été observée en pondération T1.

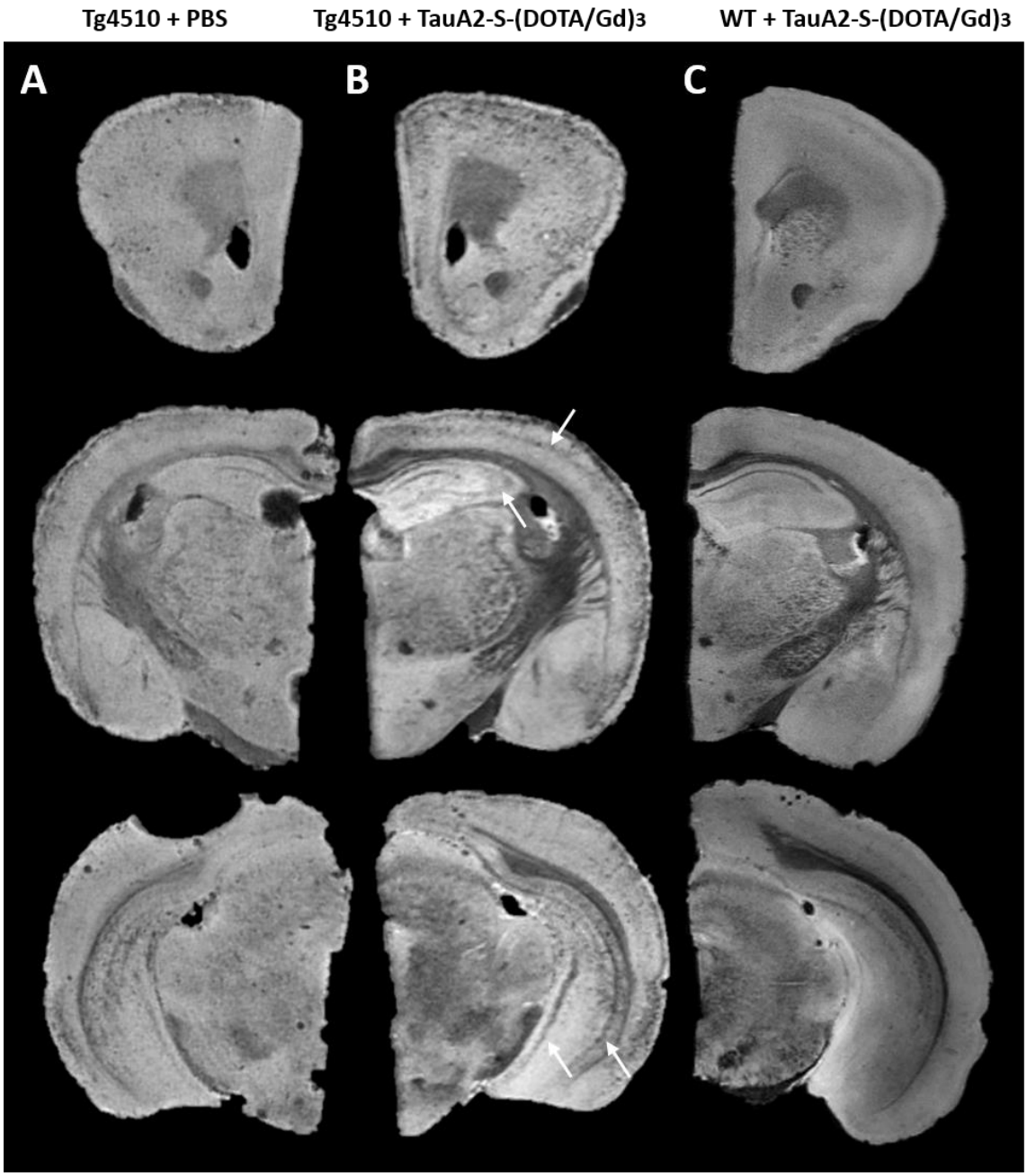


Figure 74 : Détection des DNF par IRM *in vitro*, dans le cerveau de souris Tg4510, après incubation avec TauA2-S-(DOTA/Gd)$_3$.

Un hémisphère a été incubé dans une solution de TauA2-S-(DOTA/Gd)$_3$ (colonne A). L'autre hémisphère a été incubé dans du PBS (colonne B). Plusieurs bandes hypointenses (B, flèches blanches) ont été observées dans l'hémisphère Tg4510 incubé avec l'agent de contraste et étaient absentes ou moins hypointenses dans l'hémisphère Tg4510 incubé dans du PBS (colonne A) ou dans l'hémisphère de souris WT incubé en présence de TauA2-S-(DOTA/Gd)$_3$ (colonne C).

L'IHC anti-Tau (AT8) a montré la présence de DNF en quantité importante dans l'ensemble du cerveau des souris Tg4510. Plus particulièrement, des bandes continues de lésions ont pu être observées dans

l'hippocampe, au niveau des couches de cellules pyramidales de la CA1 et de la CA3 et de la couche de cellules granulaires du GD. La détection directe des VHH par le sérum polyclonal anti-TauA2 a montré leur présence au niveau des DNF, dans les mêmes régions cérébrales. Cette répartition était similaire à celle des bandes hypointenses observées sur les images IRM correspondantes. Cependant, l'intensité du marquage anti-TauA2 obtenue était plus faible que celle du marquage AT8.

La mise en registre des images IRM et des coupes histologiques marquées par IHC anti-Tau (AT8) a montré que les bandes hypointenses observées par IRM correspondaient aux accumulations de DNF observées dans l'hippocampe par IHC. La mise en registre avec les coupes histologiques marquées par IHC anti-TauA2 a montré que les VHH étaient présents au niveau des bandes de lésions détectées par IRM (Figure 75). Par ailleurs, aucune DNF n'a été détectée dans le cerveau des souris WT.

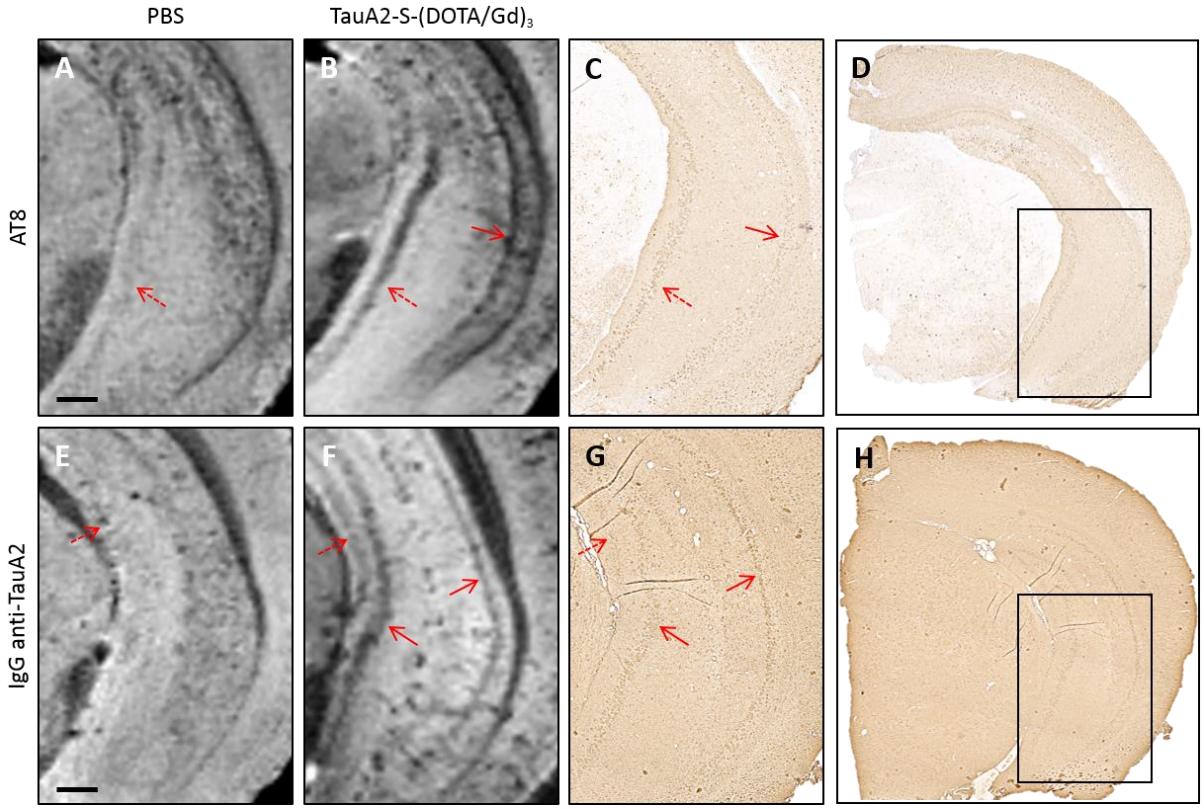


Figure 75 : Mise en registre des images IRM *in vitro* (A-B, E-F) et des coupes histologiques marquées par IHC anti-Tau (AT8) (C-D) ou anti-TauA2 (G-H), au niveau de l'hippocampe de souris Tg4510, après incubation directe dans une solution de TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$.

Des bandes hypointenses étaient visibles sur les images IRM pondérées en T2*, après incubation avec TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$ (flèches rouges, B, F). Ces hypointensités n'étaient pas observées (flèches pleines) ou étaient moins hypointenses (flèches pointillées) dans l'hémisphère incubé en PBS (A, E). Ces bandes hypointenses co-localisaient avec les DNF (flèches rouges, C) et les VHH (flèches rouges, G) marqués par IHC. Barre d'échelle = 250 µm.

Afin de vérifier la spécificité des changements de signal observés après incubation avec TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$, des cerveaux de souris Tg4510 (n = 2) ont été imagés dans les mêmes conditions, avant et après incubation en présence de R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$. Les souris Tg4510 ne présentant pas de dépôts d'Aβ, des VHH ciblant spécifiquement le peptide $Aβ_{42}$ ne devraient pas être retenus dans ces cerveaux. De façon étonnante, des bandes hypointenses, similaires à celle observées précédemment en présence de TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$, ont été observées, notamment dans l'hippocampe au niveau des couches de cellules pyramidales de la CA1 et de la CA3 (Figure 76). Cela semble indiquer que les hypointensités de signal, observées dans les cerveaux de souris Tg4510 incubés avec TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$, n'étaient pas spécifiques de la présence des VHH.

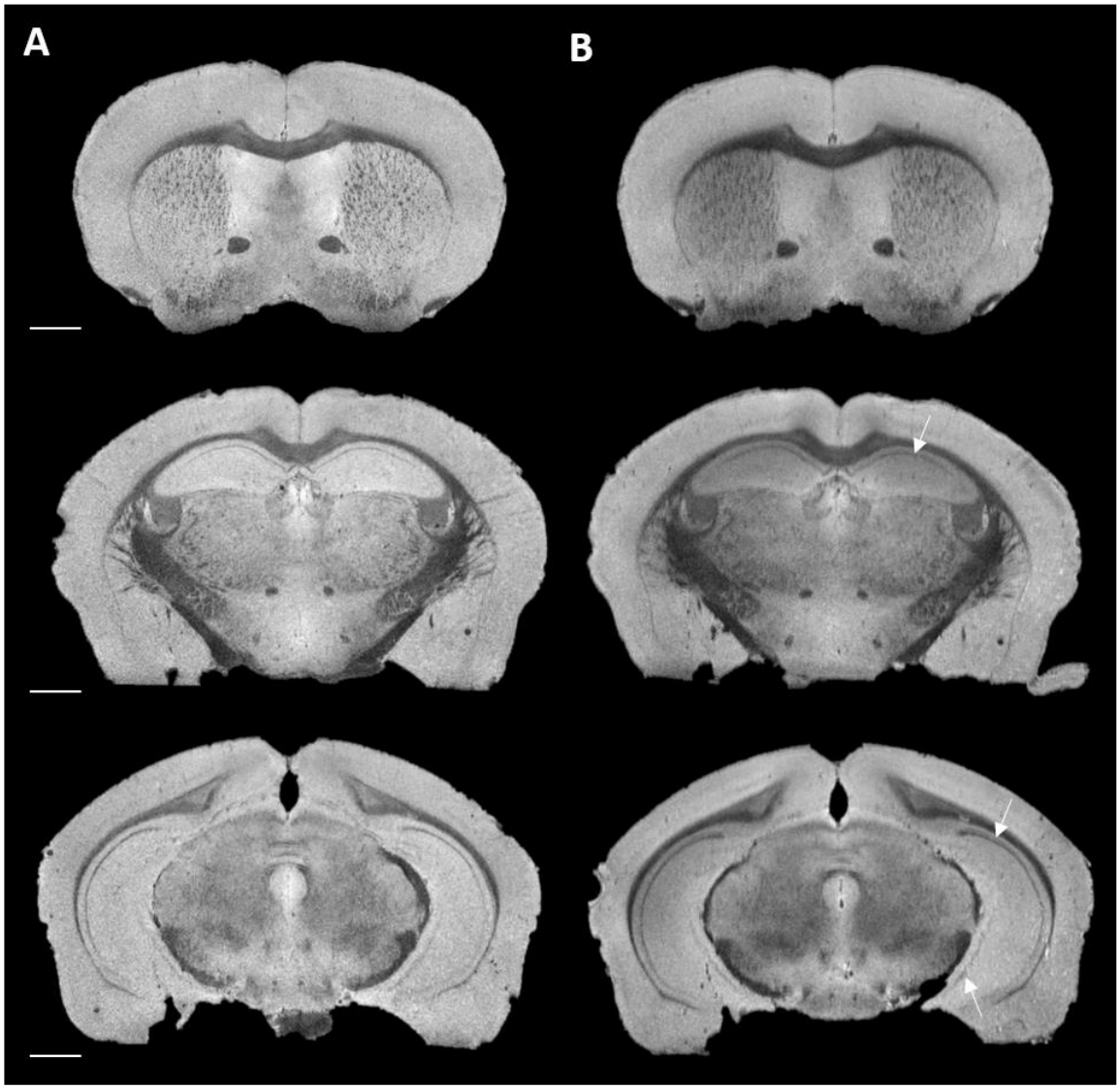


Figure 76 : Images IRM *in vitro* d'un cerveau de souris Tg4510 avant (A) et après (B) incubation avec R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$.

Les images IRM pondérées en T2* ont montré la présence de bandes hypointenses hippocampiques similaires à celles observées après incubation avec TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$ (flèches blanches). Barre d'échelle = 1 mm

3.4 IRM *ex vivo*

De façon à pouvoir évaluer la capacité des différents VHH à traverser la BHE pour permettre l'imagerie de leurs cibles intracérébrales, les VHH ont été injectés par voie IV, du vivant des souris, avant examen IRM *post mortem*. Dans un premier temps, les acquisitions IRM ont été effectuées en *post mortem* pour s'affranchir des difficultés liées à l'imagerie *in vivo* : mouvements respiratoires, temps d'acquisition, etc.

3.4.1 Détection des plaques amyloïdes *ex vivo* à l'aide de R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$

Les VHH R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ ont été injectés par voie IV à des souris PS2/APP (n = 3) et APP/PS1$_{dE9}$ (n = 3). Des souris PS2/APP (n= 3) et APP/PS1$_{dE9}$ (n = 3) injectées avec du PBS ont été utilisées comme contrôle négatif. Ces souris ont ensuite été sacrifiées et les cerveaux ont été prélevés. Ces derniers ont ensuite été imagés par IRM à haute résolution (25 x 25 x 25 µm^3).

Après injection IV de R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$, les images IRM pondérées en T2* ont montré la présence de quelques points hypointenses dans le cortex, l'hippocampe et le thalamus des souris PS2/APP et APP/PS1$_{dE9}$. Dans l'hippocampe, ces hypointensités étaient principalement localisées dans le subiculum. Des hypointensités, similaires en nombre et en répartition, ont également été observées dans le cerveau des souris contrôles. Ces hypointensités étaient probablement dues à des anomalies de contrastes spontanées induites par les plaques amyloïdes (Figure 77).
L'IHC 4G8 a montré la présence de plaques amyloïdes en quantité importante dans tout le cerveau des souris PS2/APP et APP/PS1$_{dE9}$, notamment dans le cortex, l'hippocampe (dont le subiculum), le thalamus et l'amygdale. La mise en registre des images IRM avec les coupes histologiques a montré que les hypointensités observées en IRM correspondent bien à des plaques amyloïdes (Figure 77). Enfin, aucune hyperintensité liée à la présence des VHH-(DOTA/Gd)$_3$ n'a été observée en pondération T1.

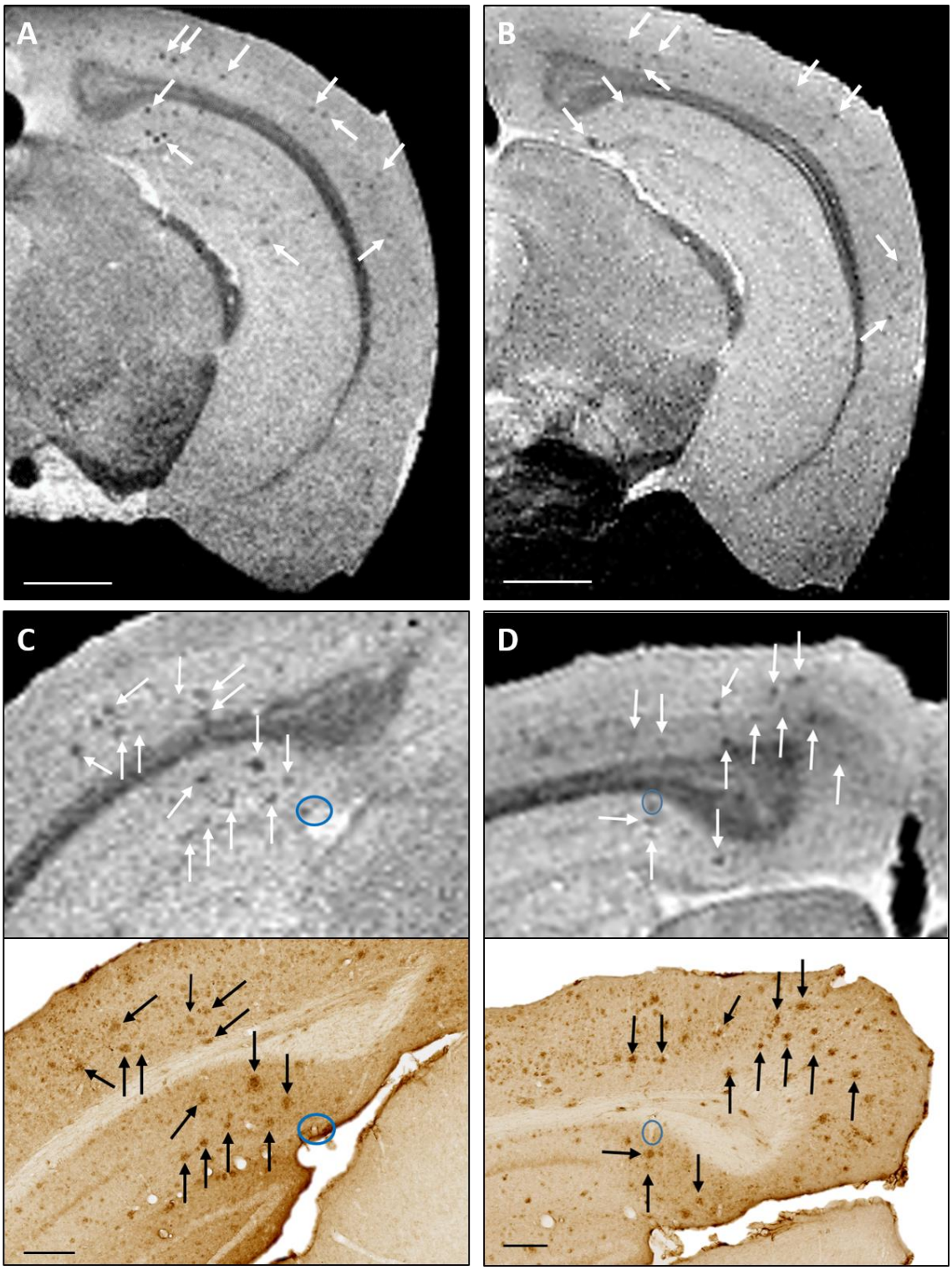


Figure 77 : Détection des plaques amyloïdes par IRM *post mortem*, après injection systémique des VHH R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ *in vivo*.

Des souris APP/PS1$_{dE9}$ ont reçu une injection IV de R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ (A, C) ou de PBS (B, D). Les images IRM pondérées en T2* des cerveaux de ces souris ont montré la présence de points hypointenses (flèches blanches) dans le cortex et l'hippocampe (notamment dans le subiculum) dans les deux cas. Ces hypointensités ont pu être mises en registre avec les plaques amyloïdes marquées par IHC anti-Aβ à l'aide de l'anticorps 4G8 (C-D, flèches noires). Barre d'échelle = 1 mm pour A et B, 200 µm pour C et D.

Un comptage de ces hypointensités a montré une densité en points hypointenses similaire dans le cerveau des souris injectées avec R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ et injectées avec du PBS (7,92 ± 2,12 et 6,52 ± 2,33 plaques/mm^2 respectivement) (Figure 78). La mesure de la charge en points hypointenses mesurée dans le cerveau de ces souris n'a pas permis de mettre en évidence une différence entre les souris injectées avec l'agent de contraste et les souris contrôles (Figure 78). Ces résultats suggèrent que les hypointensités observées chez les souris injectées avec R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ étaient liées à un contraste spontané des plaques amyloïdes et non à la présence des VHH.

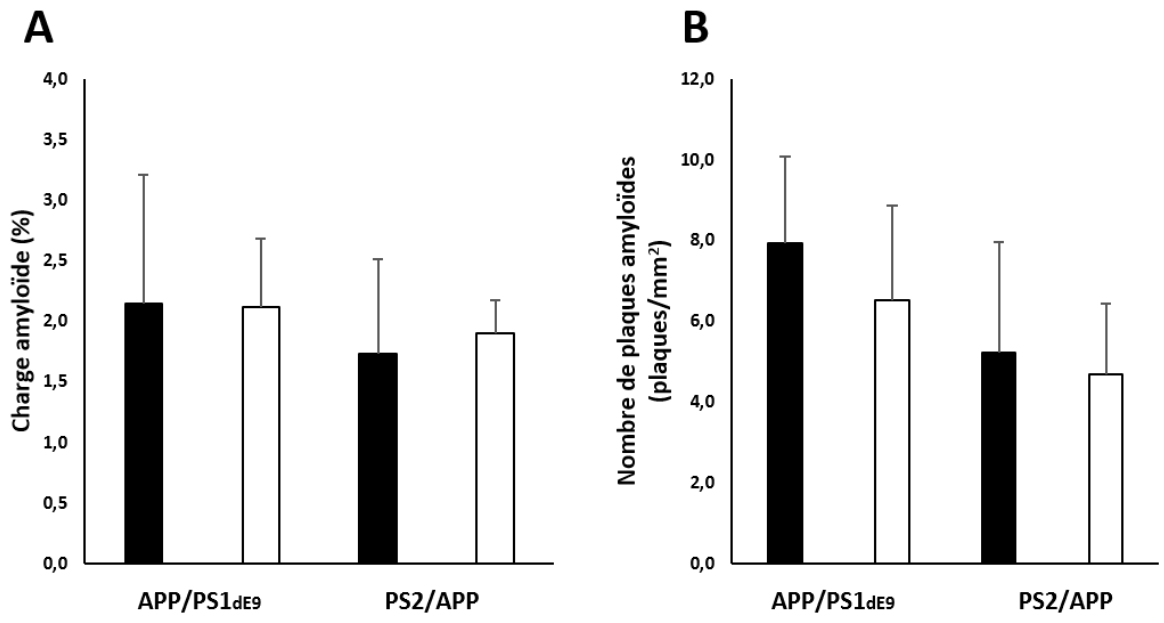


Figure 78 : Quantification de la charge amyloïde (A) et du nombre de plaques amyloïdes (B) détectés par IRM *post mortem*, chez des souris APP/PS1$_{dE9}$ ou PS2/APP, après injection systémique de R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ (noir) ou de PBS (blanc) *in vivo*.

Aucune différence significative en charge ou en nombre de plaques amyloïdes n'a été observée entre les souris injectées avec les VHH R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ (noir) ou du PBS (blanc) ($p > 0,05$).

3.4.2 Détection des DNF *ex vivo* à l'aide de TauA2-S-(DOTA/Gd)$_3$

Les VHH TauA2-S-(DOTA/Gd)$_3$ ont été injectés par voie IV à des souris ayant reçu une injection de vecteurs viraux AAV2/9 ss-CBA-TauP301L codant pour la protéine Tau humaine mutée (mutation MAPT P301L) (n = 3). Des souris injectées avec des vecteurs viraux AAV2/9 ss-CBA-GFP codant pour une GFP chimérique non traduite ont été utilisées comme contrôles (n = 3). Ces souris ont ensuite été sacrifiées et les cerveaux ont été prélevés. Ces cerveaux ont ensuite été imagés par IRM à haute résolution (25 x 25 x 25 µm^3).

Les souris injectées avec les vecteurs AAV2/9 ss-CBA-TauP301L développent des DNF de façon massive à proximité du site d'injection (hippocampe). Cependant, aucune modification de signal, en T1 et en T2*, n'a été observée dans le cerveau de ces souris, avant et après injection de TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$. Egalement, aucune modification de signal n'a été observée dans le cerveau de ces souris après incubation directe dans une solution de TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$.

La présence de DNF a été contrôlée par IHC à l'aide de l'anticorps AT8. Une grande quantité de DNF, formant une plage continue de lésions, était bien présente au niveau de l'hippocampe des souris injectées avec les vecteurs AAV2/9 ss-CBA-TauP301L (Figure 79). Aucune modification de signal ou lésion n'a été observée dans le cerveau des souris injectées avec les vecteurs contrôles.

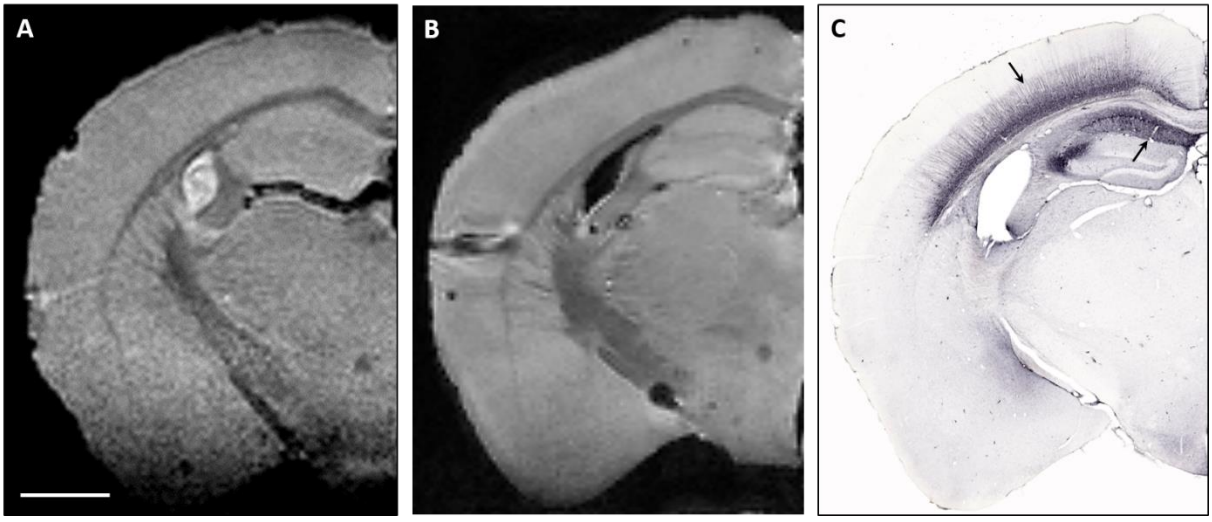


Figure 79 : Détection des DNF par IRM *post mortem*, après injection systémique des VHH TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$ *in vivo.*

Les images IRM pondérées en T2*(A) ont été mises en registre avec les coupes marquées par IHC anti-Tau hyperphosphorylée (AT8) (C) dans le cerveau de souris exprimant les vecteurs AAV2/9 ss-CBA-TauP301L, après injection IV de TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$. Des DNF ont été observées en nombre très important au niveau de l'hippocampe, site d'injection des vecteurs, et dans le cortex adjacent (C, flèches noires). Aucune hypointensité n'a été observée sur les images IRM pondérées en T2* après injection IV de TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$ (A). Aucune modification de signal n'a été observée dans le cerveau de ces souris après incubation directe dans une solution de TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$ (B). Barre d'échelle = 1mm.

3.5 Discussion et perspectives

Les travaux présentés dans cette thèse s'inscrivent dans le cadre d'un projet multicentrique et pluridisciplinaire portant sur l'étude de nouveaux agents pour l'imagerie de la MA. L'objectif de cette étude était de développer des agents de contraste vectorisés ciblant spécifiquement les lésions de la MA (plaques amyloïdes et DNF). Pour cela, deux fragments d'anticorps de camélidés, R3VQ et TauA2, capables de reconnaître avec une haute affinité l'$A\beta_{42}$ et la protéine Tau hyperphosphorylée respectivement, ont été développés. Ces VHH ont ensuite été couplés à un agent de contraste (DOTA/Gd) pour permettre leur détection par IRM. Leur affinité pour leur cible n'a pas été modifiée par la conjugaison à l'agent de contraste.

3.5.1 Relaxométrie

Le VHH R3VQ conjugué au (DOTA/Gd) a été optimisé pour améliorer les propriétés relaxométriques de l'agent de contraste. Différents complexes de Gd ont été synthétisés en faisant varier le nombre de Gd par complexe, sa structure (linéaire ou dendrimérique) et la structure de la molécule de liaison reliant les chélates de Gd au VHH (ajout de glycines supplémentaires).

Un des principaux paramètres utilisé pour augmenter la relaxivité d'un agent de contraste est son poids moléculaire. Augmenter le poids moléculaire ralentit le mouvement du complexe en solution ce qui induit une augmentation du temps de corrélation rotationnel τ_r et donc une amélioration de sa relaxivité. Le poids moléculaire des différents complexes était augmenté par l'ajout de la chaîne peptidique, linéaire ou dendrimérique, composée de lysines et de glycines. Ainsi, comme attendu, la relaxivité de tous les complexes était améliorée par rapport à celle du (DOTA/Gd) simple. Cependant, la conjugaison des différents complexes de Gd aux VHH, induisant une augmentation drastique du poids moléculaire, n'a induit une augmentation de leur relaxivité qu'en r2. La différence entre l'augmentation de r1 attendue et les résultats observés peut s'expliquer par la flexibilité interne de la macromolécule. De façon étonnante, la structure linéaire ou dendrimérique des complexes ne semblait pas influencer leur relaxivité. Les dendrimères présentent généralement une structure plus rigide, limitant les mouvements moléculaires, ce qui peut mener à une augmentation du temps de corrélation rotationnel τ_r. Ainsi, l'utilisation de molécules dendrimériques est généralement associée à une amélioration des propriétés relaxométriques. Dans cette étude, les relaxivités des composés dendrimériques n'étaient pas améliorées par rapport à celles des composés linéaires. Un paramètre pouvant être responsable de l'absence d'augmentation significative de la relaxivité des composés dendrimériques est la flexibilité du peptide de liaison. La structure de ce dernier a été modifiée ici par

l'ajout ou non de glycines supplémentaires entre les complexes (DOTA/Gd). La présence de cet acide aminé semblait diminuer légèrement la relaxivité des complexes. Cela pourrait indiquer que la présence des glycines augmente la flexibilité de la chaîne peptidique. A l'inverse, la présence des glycines dans les complexes conjugués aux VHH a légèrement amélioré leur relaxivité. Cela pourrait être expliqué par une amélioration de l'accessibilité des molécules d'eau au site de coordination du Gd. En effet, la liaison d'un chélate de Gd à une macromolécule peut limiter l'accessibilité des molécules d'eau au site de coordination du Gd par encombrement stérique. En conséquence, le taux d'échange des molécules d'eau est diminué. Dans notre cas, la présence de glycines supplémentaires, augmentant la distance entre les complexes (DOTA/Gd) et entre les complexes et le VHH, pourrait alors faciliter l'accès des molécules d'eau au site de coordination du Gd.

Enfin, la différence entre l'augmentation de relaxivité attendue et celle observée peut être expliquée par un temps τ_m non optimisé. Dans cette étude, des polymères (linéaires et dendrimériques) à base de lysine ont été utilisés. L'utilisation de cet acide aminé introduit une fonction amide dans le complexe DOTA. Or, la présence de cette fonction, apportant des charges positives à la molécule à pH physiologique, est généralement associée à un τ_m non optimal[246]. En effet, le τ_m est fortement dépendant de la charge du complexe. Les complexes dérivés du DOTA ayant une charge nette négative présentent un τ_m amélioré en comparaison aux dérivés neutres ou chargés positivement[246,393]. Par exemple, les dérivés du (DOTAM/Gd), dont les fonctions carboxylates ont été remplacées par des fonctions amides, sont chargés positivement à pH physiologique. La présence de ces charges positives induit une augmentation drastique du τ_m (de l'ordre de la µs)[394]. De nombreuses améliorations peuvent donc encore être apportées de façon à obtenir des agents de contraste présentant des propriétés relaxométriques optimales.

Il est également important de noter que les propriétés des agents de contraste paramagnétiques sont modifiées à haut champ magnétique. Ainsi, leur relaxivité longitudinale (r1) est diminuée alors que leurs effets T2* deviennent prédominants. Ceci peut expliquer l'absence de modification de signal en pondération T1 lors des expériences d'IRM *in vitro*. En effet, l'incubation directe des cerveaux dans une solution de VHH permettrait d'atteindre une forte concentration en agent de contraste au niveau de leur cible. Les effets T2* prédomineraient alors sur leurs effets T1. Les plaques amyloïdes induisant également des modifications de contraste en pondération T2*, l'utilisation d'agents de contraste T2 serait également intéressante pour améliorer leur détection. Par exemple, des agents de contraste à base d'oxydes de fer super-paramagnétiques tels que les SPIO ou les USPIO pourraient être couplés aux VHH à la place des chélates de Gd. Ces particules sont en cours de synthèse à l'Institut Pasteur et seront testées prochainement.

3.5.2 Détection des lésions microscopiques de la MA par imagerie optique à l'aide des VHH

Le principal défi dans le développement de molécules à visées neurologiques est le passage de la BHE. Une partie de nos travaux a permis de montrer qu'une fraction des VHH R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$, TauA2-CSA et TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$ sont détectables par IHC dans le cerveau de souris après injection systémique *in vivo*. Ces résultats semblent indiquer que les VHH sont capables de traverser la BHE chez la souris. Ces résultats viennent conforter ceux obtenus lors des expériences de microscopie biphotonique, menées à l'aide des VHH conjugués à un fluorochrome (R3VQ-S-AF448 et TauA2-S-AF488)[326]. En effet, ces VHH ont permis de détecter les lésions de la MA par microscopie biphotonique après injection IV et imagerie *in vivo*. Les VHH semblaient alors capables de traverser la BHE. Cependant le protocole de microscopie biphotonique impose une chirurgie crânienne pouvant induire une ouverture traumatique de la BHE. Bien que les VHH aient été détectés dans l'ensemble du cerveau et pas uniquement au niveau de la fenêtre de craniotomie, ils auraient pu pénétrer dans le parenchyme cérébral par extravasation simple et non, du fait de leurs propriétés intrinsèques. Au cours de cette thèse, les VHH ont été injectés par voie IV et détectés directement dans le cerveau des souris par IHC, sans aucune chirurgie crânienne. De façon étonnante, le VHH R3VQ-S-CSA ne semble pas pouvoir passer la BHE et le passage du TauA2-S-CSA était très limité. Une hypothèse pouvant expliquer ce résultat serait la dimérisation des VHH-CSA dans le sang. En effet, les groupements thiol des cystéines présentes en partie C-terminale sont libres et peuvent réagir entre eux pour former un thioéther. Le dimère ayant un PM deux fois supérieur au monomère, il ne serait plus capable de passer la BHE. Il serait intéressant de bloquer cette dimérisation potentielle par alkylation du groupement thiol avant injection.

Par ailleurs, le mécanisme exact par lequel les VHH traverseraient la BHE reste à explorer. Plusieurs VHH ont déjà été décrits dans la littérature comme étant capables de traverser la BHE[294,308]. Notre hypothèse est que les VHH de pI basique peuvent traverser spontanément la BHE. En effet, le premier VHH produit par l'équipe du Dr Lafaye, dirigé contre la GFAP astrocytaire, a été produit sous la forme de plusieurs variants. Sur un modèle de BHE *in vitro*, seuls les variants ayant un pI basique étaient capables de traverser la BHE. Le rôle des charges électriques semble donc essentiel dans ce mécanisme. Une hypothèse probable est que les VHH subissent un mécanisme d'AMT. En effet, dans ce mécanisme, les interactions électrostatiques entre les charges négatives présentes à la surface des cellules endothéliales de la BHE et les molécules chargées positivement aboutissent à un transport à travers le cytoplasme de ces cellules[313,395].

Il est important de noter que la perméabilité de la BHE augmente au cours du vieillissement normal et qu'elle peut être altérée dans plusieurs pathologies neurologiques comme la MA. Ce genre de troubles peut également survenir dans les modèles murins de MA. L'intégrité de la BHE a donc été contrôlée dans les modèles utilisés au cours de ces travaux. D'après la littérature, la BHE des souris PS2/APP est intacte jusqu'à l'âge de 16 mois[103]. Cependant, chez les souris de 12 mois utilisées dans cette thèse, une extravasation, faible mais présente, d'IgG contrôles (4G8-AF488) a été observée. Cela semble refléter une BHE perméable qui pourrait expliquer le passage des VHH dans le parenchyme cérébral. Le marquage anti-VHH était cependant plus intense que le marquage anti-IgG contrôles. Cela semble indiquer un passage des VHH plus important que celui des IgG conventionnelles. Nous ne pouvons cependant pas conclure que ce passage plus important était dû aux propriétés intrinsèques des VHH ou à un PM plus faible des VHH par rapport aux IgG qui faciliterait leur passage par voie paracellulaire si la BHE était perméable. Concernant les souris Tg4510, des altérations de la BHE ont été décrites dès 9 mois dans ce modèle[392]. Les souris utilisées dans cette étude n'ont cependant pas montré de signe d'ouverture de la BHE.

3.5.3 Détection des lésions microscopiques de la MA par IRM à l'aide des VHH

Enfin, le but de ce projet est de développer des agents de contraste ciblant spécifiquement les plaques amyloïdes et les DNF détectables *in vivo* par IRM. Dans un premier temps, les VHH-(DOTA/Gd)$_3$ ont été testés *in vitro* pour s'affranchir des difficultés liées à l'*in vivo*.

Le VHH R3VQ couplé au Gd a permis la visualisation des plaques amyloïdes par IRM après incubation directe de cerveaux de souris PS2/APP dans une solution de R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$. La mise en registre des images IRM et histologiques a confirmé que les points hypointenses observés en IRM étaient bien des plaques amyloïdes. Cependant, un certain nombre de plaques amyloïdes, visibles en histologie, n'étaient pas détectées par IRM. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce résultat. La première serait que les VHH ont peu diffusé dans le cerveau et que les hypointensités observées en IRM étaient dues à des anomalies de contrastes spontanées des plaques. Cela est peu probable car le nombre de points hypointenses observés dans les hémisphères contrôles était sept fois inférieur au nombre de points hypointenses observés après incubation dans une solution de VHH. Une autre hypothèse serait que les VHH présents dans les tissus ne sont pas tous détectés par IHC. En effet, les VHH sont détectés indirectement via leur tag 6-His. Un clivage du tag 6-His a fréquemment été observé, dans la solution de conservation (PBS + NaCl), avant injection *in vivo*. Cette coupure se produit au niveau du site de clivage par la thrombine, après quelques semaines de conservation à 4°C. Des VHH sans site de clivage par la thrombine permettraient d'éviter la perte du tag 6-His. Enfin, certaines

plaques amyloïdes de taille proche de la taille du voxel peuvent ne pas être détectées du fait d'un effet de volume partiel.

Concernant la détection des DNF, la principale difficulté est la faible taille de ces lésions. En effet, elles mesurent moins de 20 µm ce qui rend impossible leur détection individualisée, malgré la haute résolution spatiale permise par l'utilisation d'IRM à haut champ magnétique. *In vitro*, seules des accumulations de DNF, apparaissant alors sous forme de bandes hypointenses corticales et hippocampiques, ont pu être détectées. Cependant, certaines de ces bandes hypointenses ont également été visualisées dans les cerveaux contrôles. Cela semble indiquer que les hypointensités de signal, observées en présence de TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$, n'étaient pas spécifiques de la présence des VHH. En effet, les bandes hypointenses hippocampiques observées étaient localisées au niveau des couches de cellules pyramidales de la CA1 et de la CA3. Plusieurs études ont montré que ces couches cellulaires sont visibles par IRM à haut champ magnétique, sous forme de bandes hypointenses en pondération T2, même en l'absence d'agent de contraste[230,231]. Les hypointensités observées dans cette étude seraient donc liées au contraste intrinsèque de ces couches cellulaires denses. Malgré tout, certaines bandes hippocampiques apparaissaient comme plus hypointenses après incubation en présence des VHH. Les effets T2 des VHH-$(DOTA/Gd)_3$, présents au niveau des DNF, ont pu s'additionner aux effets T2 intrinsèques des couches de cellules pyramidales. Nous ne pouvons cependant pas affirmer que les hypointensités observées étaient spécifiques de la présence des VHH.

Par la suite, la capacité des VHH à permettre l'imagerie de leurs cibles intracérébrales après injection systémique *in vivo* a été testée. Nous n'avons pas observé de différence entre la charge amyloïde détectée chez les souris ayant reçu une injection IV de R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$ et chez les souris contrôles. Les plaques amyloïdes observées sur ces images résultaient probablement d'un contraste spontané lié à la présence de fer au cœur de ces lésions. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les plaques du subiculum, très riches en fer, étaient celles les plus visibles sur ces images. Concernant l'imagerie des DNF, aucune hypointensité n'a pu être observée après injection systémique de TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$.

Dans les deux cas, cette absence de détection peut s'expliquer par un taux de passage de la BHE trop faible pour obtenir une concentration cérébrale suffisante permettant la détection des VHH. D'après les données de pharmacocinétique disponibles, obtenues avec des VHH R3VQ couplés à un radioisotope ^{125}I, 0,5 % de la dose injectée est retrouvée dans le cerveau deux heures après injection. Ce taux de passage semble suffisant pour permettre la détection des VHH par IHC mais pas par IRM. Cela peut s'expliquer par une meilleure sensibilité de détection en IHC par rapport à l'IRM. En effet, une triple amplification du signal a été réalisée en IHC par l'utilisation de deux anticorps primaires (le VHH lui-même et l'anticorps anti-6-His ou le sérum anti-TauA2), d'un anticorps secondaire et de la

DAB. La sensibilité de détection atteinte en IHC était donc très supérieure à celle atteinte en IRM. Il est estimé que la détection d'agents de contraste à base de Gd (possédant une relaxivité équivalente aux agents de contraste commerciaux avec des IRM de champ magnétique clinique) nécessite une concentration cérébrale d'environ 1-10 µM[265]. La densité en cibles et la relaxivité de l'agent de contraste après liaison à sa cible peuvent influencer la concentration nécessaire à sa détection. Aime et coll. ont estimé que 4 ± 1,11 Gd^{3+} par cellule, soit une concentration locale de 2 µM, sont nécessaires à la détection de l'agent de contraste[396]. Egalement, Corot et coll. ont décrit un agent de contraste dirigé contre les plaques amyloïdes de haute relaxivité (r_1 = 25 $mM^{-1}.s^{-1}$) permettant la détection de sa cible *in vitro* pour une concentration locale de 0,92 µM[397]. D'après les données de pharmacocinétique disponibles, 0,5 % de la dose injectée est retrouvée dans le cerveau deux heures après injection. Si l'on considère que le volume cérébral d'une souris est d'environ 450 $µm^3$, la concentration cérébrale serait alors d'environ 1,3 µM pour le R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$, après injection IV à la dose utilisée dans cette étude. Il faut également noter que l'accumulation des VHH au niveau de leurs cibles conduirait à une augmentation de la concentration locale au niveau des plaques amyloïdes.

La dose utilisée pour le TauA2 était 5 fois inférieure à celle utilisée pour le R3VQ du fait de la plus faible hydrosolubilité de ce VHH. En effet, ce VHH présente une tendance à s'agréger à forte concentration, limitant la dose pouvant être injectée. Si l'on considère que les deux VHH ont une pharmacocinétique et un taux de passage de la BHE équivalent, la concentration cérébrale serait alors de 0,27 µM pour TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$, après injection IV à la dose utilisée dans cette étude. Les VHH R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$ mais pas TauA2-S-$(DOTA/Gd)_3$ permettraient donc théoriquement d'atteindre une concentration locale faible mais peut être suffisante pour permettre leur détection. Cependant, au vu des résultats obtenus lors des expériences d'IRM *ex vivo*, cette concentration cérébrale semble trop faible et nécessite d'être augmentée. De plus, les données de pharmacocinétique disponibles ont été obtenues avec des VHH R3VQ couplés à un radioisotope et pas avec les VHH-DOTA/Gd utilisés ici. La conjugaison des VHH au DOTA/Gd peut induire des modifications de leurs propriétés pharmacocinétiques et une diminution de leur taux de passage de la BHE. D'autres études de pharmacocinétique, menées sur les VHH-DOTA/Gd sont nécessaires pour vérifier que leur taux de passage est similaire à celui des VHH-^{125}I. Par ailleurs, il serait possible de réaliser des expériences avec injection IV des VHH et ouverture artificielle de la BHE par les ultrasons afin de vérifier si le taux de passage de la BHE est effectivement l'élément responsable de l'absence de détection par IRM.

Pour détecter les VHH par IRM, il faudrait donc, soit augmenter la sensibilité de détection de ces derniers par IRM (en améliorant les propriétés relaxométriques par exemple), soit augmenter leur taux de passage de la BHE. Dans la littérature, de nombreuses stratégies ont été décrites pour améliorer le passage cérébral de divers peptides. Plusieurs d'entre elles visent à augmenter la biodisponibilité des

peptides par augmentation de leur demi-vie plasmatique et/ou diminution de leur clairance plasmatique ou cérébrale. Ainsi, la glycosylation ou la PEGylation des VHH seraient des stratégies intéressantes. La glycosylation des protéines est une réaction qui permet la liaison d'un monosaccharide ou d'un glycane à une chaîne peptidique. La glycosylation s'est révélée efficace pour améliorer la biodistribution de nombreux peptides. Un des meilleurs exemples est la glycosylation des érythropoïétines utilisées en clinique dans le traitement de l'insuffisance rénale. La glycosylation permet d'augmenter la demi-vie plasmatique des peptides via deux mécanismes principaux. D'une part, elle aurait un effet protecteur de la protéine contre les protéases du plasma et diminuerait ainsi sa dégradation. En effet, les chaînes glycanes sont des structures volumineuses et flexibles qui créent une gêne stérique autour de la chaîne peptidique empêchant le contact entre cette dernière et les sites actifs des protéases. D'autre part, la filtration glomérulaire des peptides glycosylés est diminuée par l'augmentation du volume induite par les chaînes glycanes. Les VHH étant éliminés par voie rénale, diminuer leur taux de filtration glomérulaire serait une stratégie efficace pour augmenter leur demi-vie plasmatique. De plus, les résidus saccharidiques hydrophiles permettent d'augmenter la solubilité des protéines en solution. Ceci serait particulièrement intéressant pour le VHH TauA2 dont la faible solubilité limite la dose injectée. Enfin, la glycosylation des protéines est généralement efficace pour réduire leur pouvoir immunogène car les chaînes saccharidiques permettent de masquer les épitopes au système immunitaire.

La PEGylation désigne un procédé par lequel des chaînes d'un polymère, le polyéthylène glycol (PEG), sont greffées covalemment à des résidus aminés (lysine ou partie N-terminale) d'une protéine. Ce polymère présente une structure simple, est chimiquement inerte, non antigénique et parfaitement hydrosoluble. Comme pour la glycosylation, la présence des chaînes de PEG modifie les propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques de la protéine. Cette stratégie permet d'améliorer plusieurs paramètres critiques des protéines thérapeutiques tels qu'allonger la demi-vie plasmatique, améliorer la solubilité et la stabilité ainsi que diminuer l'immunogénicité.

En conclusion, de nombreux agents de contraste vectorisés ont été développés ces dernières années pour l'imagerie des plaques amyloïdes par IRM. Ces agents de contraste ne sont cependant pas capables de traverser la BHE. De plus, aucun ligand Tau pour l'imagerie IRM n'est actuellement disponible. Le développement d'agents de contraste ciblés, capables de traverser la BHE et non toxiques, représente donc une opportunité énorme pour l'imagerie cérébrale notamment de la MA. Dans cette étude, nous avons étudié la capacité de deux fragments d'anticorps couplés à un agent de contraste (DOTA/Gd) à permettre l'imagerie des lésions microscopiques de la MA par IRM. Les propriétés physico-chimiques de ces molécules font d'elles des candidats potentiels intéressants pour l'imagerie cérébrale de la MA via différentes modalités d'imagerie. Nous avons montré que ces

molécules permettent la détection de leur cible *in vivo* par microscopie biphotonique et *in vitro* par IHC et par IRM (pour les plaques amyloïdes). Cependant, plusieurs éléments devront être améliorés pour permettre la détection de ces agents de contraste par IRM *in vivo*. Enfin, comme nous l'avons vu, les VHH peuvent être conjugués à des molécules de nature variée pour permettre différentes modalités d'imagerie. Par exemple, l'utilisation de technique d'imagerie présentant une meilleure sensibilité de détection que l'IRM, telle que la TEP, permettrait de s'affranchir des difficultés de détection liées à un passage de la BHE restreint des VHH. Enfin, les VHH pourraient également servir de vecteurs pour le transport de molécules thérapeutiques dans le cerveau, dans le cas de la MA mais également dans d'autres pathologies, en développant des VHH spécifiques de celles-ci.

Conclusion générale

Actuellement, le rôle de la neuroimagerie dans le diagnostic de la MA dépasse le traditionnel rôle de diagnostic d'exclusion d'autres formes de démence. Les objectifs actuels sont de contribuer au diagnostic précoce de la MA en mettant en évidence *in vivo* les altérations structurelles et métaboliques associées à cette pathologie. Le diagnostic précoce, dès le stade pré-démentiel (MCI), permettrait d'instaurer le plus tôt possible, avant l'apparition de lésions irréversibles, de futurs traitements neuroprotecteurs. L'avènement des techniques de neuroimagerie a également un intérêt majeur en recherche préclinique pour l'étude de la physiopathologie de la maladie et le développement de nouvelles thérapeutiques.

Le développement d'IRM à haut champ magnétique est une avancée majeure pour l'étude de la MA. Actuellement, les techniques d'IRM utilisées en clinique permettent principalement de visualiser les conséquences tardives des processus pathologiques survenant dans le cerveau des patients notamment l'atrophie cérébrale. L'augmentation de la puissance du champ magnétique améliore la résolution des images et permet la détection de structures anatomiques extrêmement fines et une étude à la fois structurelle, fonctionnelle et métabolique du cerveau. En préclinique, cette amélioration de la résolution spatiale est indispensable pour l'imagerie du petit animal dont la taille du cerveau est extrêmement faible par rapport à l'Homme. Le gain en résolution spatiale peut être mis à profit pour imager directement les lésions Aβ et Tau, signatures neuropathologiques de la MA. Ainsi, de nombreux efforts ont été faits pour détecter les plaques amyloïdes par IRM à haut champ magnétique. Au cours de cette thèse, deux méthodes, utilisant différents agents de contraste à base de Gd, ont été étudiées pour la détection des plaques amyloïdes par IRM.

La première partie de cette thèse s'est intéressée au développement de la méthode du Gd-staining, chez la souris, modèle d'amyloïdose, et chez le PNH. Cette technique permet une amélioration importante de la détection des plaques amyloïdes en comparaison à l'imagerie sans agent de contraste.

L'étude chez la souris nous a permis de mieux comprendre les paramètres essentiels à la détection des plaques amyloïdes par Gd-staining. Au cours de cette étude, nous avons montré que le Gd-staining permet de détecter facilement les plaques amyloïdes focales, de grande taille, indépendamment de la charge en fer et plus efficacement qu'en l'absence d'agent de contraste. Au vu de ces résultats, seuls certains modèles devront être utilisés à l'avenir pour des études utilisant le Gd-staining. Egalement, ces informations permettront une meilleure interprétation des résultats obtenus dans de futures études utilisant cette technique. Par ailleurs, la capacité du Gd-staining à permettre l'imagerie des plaques amyloïdes humaines n'avait encore jamais été explorée. Notre étude est la première à montrer que la détection de ces lésions est possible par IRM après Gd-staining sur des tissus de patients atteints de la MA. Cette étude pose également la question de la comparabilité des résultats

obtenus dans les modèles animaux avec la pathologie clinique. Ici, les caractéristiques essentielles pour la détection des plaques amyloïdes étaient similaires chez la souris et sur tissus humains. Tous les types de dépôts d'Aβ humains ne sont cependant pas détectables par IRM après Gd-staining. Le choix du modèle et de la technique d'imagerie dépendra donc du type de dépôts que l'on souhaite étudier.
Par la suite, nous avons tenté d'implémenter le Gd-staining dans un modèle plus proche de l'Homme, le PNH. Les améliorations de SNR et de contraste tissulaire obtenues grâce au Gd-staining seraient hautement bénéfiques pour améliorer la qualité des images en IRM structurale comme le montrent nos données acquises en *post mortem*, après imprégnation d'un cerveau de macaque par l'agent de contraste. Cependant, bien que le Gd-staining représente un outil intéressant en préclinique pour l'étude de la MA, un certain nombre de barrières techniques devront être résolues avant de pouvoir envisager une translation en clinique. La principale limite est le fait que le Dotarem® ne traverse pas la BHE. Nous nous sommes donc intéressés à la voie IT pour administrer l'agent de contraste directement dans le LCS. Cette voie d'administration n'ayant encore jamais été utilisée dans notre laboratoire, un certain nombre d'obstacles techniques ont dû être étudiés. De façon étonnante, nous n'avons pas pu mettre en évidence de modification de contraste dans le parenchyme cérébral après injection IT d'agent de contraste. Le flux descendant de LCS semblait être le principal responsable de l'absence de diffusion de l'agent de contraste depuis le LCS rachidien vers le LCS cérébral. De futures expériences utilisant la voie intracisternale permettront d'outrepasser ce problème. Les améliorations de contraste potentielles induites par la présence de l'agent de contraste pourront être étudiées pour d'éventuelles applications en imagerie structurale.

La deuxième partie de cette thèse s'est intéressée au développement d'agents de contraste vectorisés, ciblant spécifiquement les lésions de la MA. Des fragments d'anticorps de camélidés, couplés à différents chélates de Gd, ont été utilisés. Du fait de leurs propriétés physico-chimiques particulières et de leur potentiel de transmigration de la BHE, ces molécules semblaient être des candidats très intéressants pour vectoriser des molécules à visée cérébrale. Dans cette étude, les propriétés relaxométriques de VHH conjugués au Gd ont été optimisées. Puis, nous avons montré que les VHH permettent l'imagerie des plaques amyloïdes, en *post mortem*, après incubation directe de tissus dans une solution de VHH. La translation vers l'imagerie *in vivo* s'est cependant révélée décevante. Malgré les résultats précédemment obtenus et les données de la littérature, le taux de passage de la BHE des VHH s'est révélé insuffisant pour permettre d'atteindre une concentration intracérébrale suffisante pour leur détection. De nombreuses améliorations devront être apportées aux VHH pour permettre leur utilisation *in vivo* pour l'imagerie des lésions de la MA. Ils pourraient alors être utilisés en préclinique pour quantifier la charge lésionnelle dans le cerveau des souris mais également au cours d'études longitudinales pour étudier la physiopathologie de la MA ou l'effet d'un traitement potentiel.

Productions scientifiques

1 Articles

Dudeffant C., Vandesquille M., Herbert K., Garin C.M., Alves S., Blanchard V., Comoy, E.E., Petit F., Dhenain M. Contrast-enhanced MR microscopy of amyloid plaques in five mouse models of Alzheimer's disease: comparison with amyloid plaques detection in human brains. Scientific Reports. 2017.

Vandesquille M., Li T.F., Po C., Ganneau C., Lenormand P., **Dudeffant C**., Czech C., Grueninger F., Duyckaerts C., Delatour B., Dhenain M., Lafaye P., Bay S. Chemically-defined camelid antibody bioconjugate for the magnetic resonance imaging of Alzheimer's disease. mAbs. 2017.

Li T.F., Vandesquille M., Koukouli F., **Dudeffant C.**, Youssef I., Lenormand P., Ganneau C., Maskos U., Czech C., Grueninger F., Duyckaerts C., Dhenain M., Bay S., Delatour B., Lafaye P. Camelid single-domain antibodies: A versatile tool for *in vivo* imaging of extracellular and intracellular brain targets. Journal of Controlled Release. 2016.

2 Communications orales

Dudeffant C., Vandesquille M., Herbert K., Alves S., Comoy E., Petit F., Dhenain M. Contrast-enhanced MR microscopy of amyloid plaques in five mouse models of Alzheimer's disease: comparison with amyloid plaques detection in human brains. Congrès de l'International Society for Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM). Paris 2018.

Dudeffant C., Vandesquille M., Herbert K., Alves S., Comoy E., Petit F., Dhenain M. Contrast-enhanced MR microscopy of amyloid plaques in five mouse models of Alzheimer's disease: comparison with amyloid plaques detection in human brains. Alzheimer's Association International Conference (AAIC). Londres 2017.

Dudeffant C., Vandesquille M., Herbert K., Alves S., Comoy E., Petit F., Dhenain M. Détection des plaques amyloïdes par IRM à haut champ magnétique et coloration par le Gadolinium : comparaison de six modèles murins d'amyloïdose et de cerveaux humains. Réunion Francophone sur la maladie d'Alzheimer et les syndromes apparentés Lyon 2016.

Dudeffant C., Vandesquille M., Li T., Ganneau C., Bay S., Lafaye P., Delatour B., Dhenain M. Imagerie des plaques amyloïdes et des dégénérescences neuro-fibrillaires par IRM grâce à des fragments variables d'anticorps de camélidés. Réunion Francophone sur la maladie d'Alzheimer et les syndromes apparentés Lyon 2016.

3 Communications par posters

Dudeffant C., Vandesquille M., Li T., Ganneau C., Cahuzac H., Youssef I., Bay S., Lafaye P., Delatour B., Dhenain M. Camelid single-domain antibodies spontaneously cross the blood brain barrier and specifically recognize intracerebral targets: a promising tool for the magnetic resonance imaging of Alzheimer's disease. Congrès de l'International Society for Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM). Paris 2018.

C. Dudeffant, T. Li, M. Vandesquille, F. Koukouli, J-P. Bourgeois, S. Celli, U. Maskos, C. Czech, F. Grueninger, C. Duyckaerts, B. Delatour, S. Bay, M. Dhenain, P. Lafaye. Camel single-domain antibodies spontaneously cross the blood brain barrier and specifically recognize intra-cerebral targets: a promising tool for *in vivo* brain imaging. Réunion annuelle de la Société Européenne des Interfaces Sang-Cerveau (SEISC), Paris 2016.

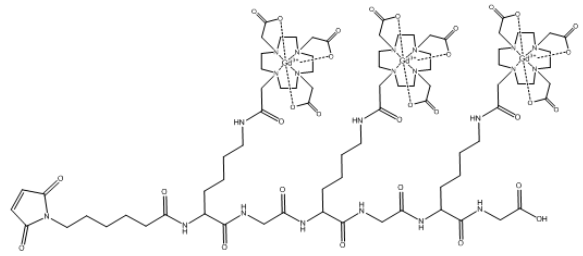
4 Distinctions

Travel fellowship laureate. Alzheimer's Association International Conference (AAIC). Londres 2017.

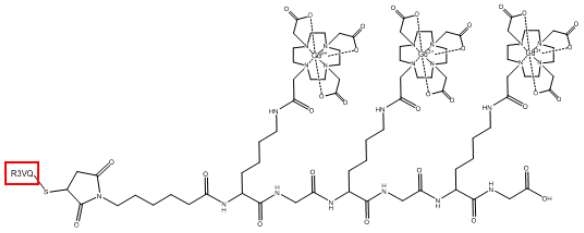
Annexes

Annexe 1 : Formules développées des complexes DOTA/Gd et de leurs conjugués VHH.

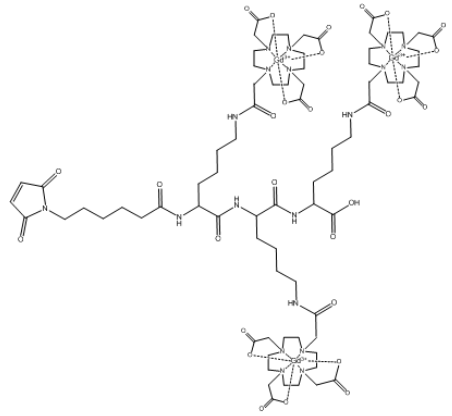
Complexe $DG_3LinGly$



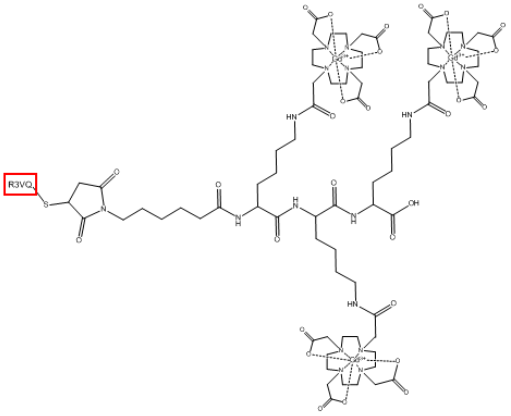
Conjugué $DG_3LinGly$



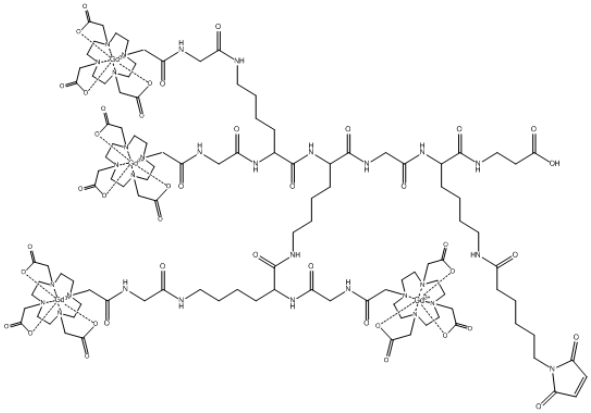
Complexe DG_3Lin



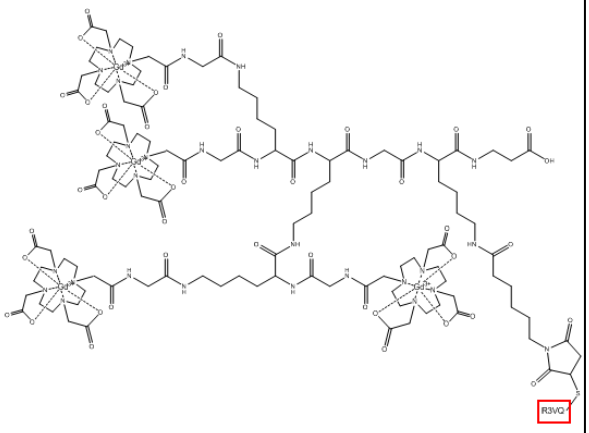
Conjugué DG_3Lin



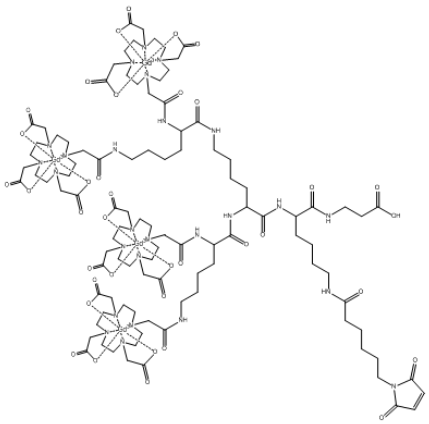
Complexe $DG_4RamGly$



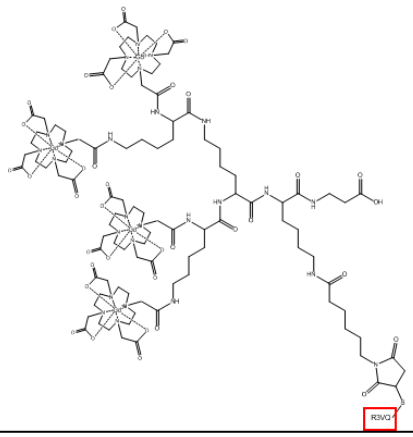
Conjugué $DG_4RamGly$



Complexe DG_4Ram



Conjugué DG_4Ram



Publications

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Contrast-enhanced MR microscopy of amyloid plaques in five mouse models of amyloidosis and in human Alzheimer's disease brains

Received: 6 March 2017
Accepted: 25 May 2017
Published online: 10 July 2017

Clémence Dudeffant[1,2], Matthias Vandesquille[1,2], Kelly Herbert[1,2], Clément M. Garin[1,2], Sandro Alves[3], Véronique Blanchard[4], Emmanuel E. Comoy[5], Fanny Petit[1,2] & Marc Dhenain[1,2]

Gadolinium (Gd)-stained MRI is based on Gd contrast agent (CA) administration into the brain parenchyma. The strong signal increase induced by Gd CA can be converted into resolution enhancement to record microscopic MR images. Moreover, inhomogeneous distribution of the Gd CA in the brain improves the contrast between different tissues and provides new contrasts in MR images. Gd-stained MRI detects amyloid plaques, one of the microscopic lesions of Alzheimer's disease (AD), in $APP_{SL}/PS1_{M146L}$ mice or in primates. Numerous transgenic mice with various plaque typologies have been developed to mimic cerebral amyloidosis and comparison of plaque detection between animal models and humans with new imaging methods is a recurrent concern. Here, we investigated detection of amyloid plaques by Gd-stained MRI in five mouse models of amyloidosis ($APP_{SL}/PS1_{M146L}$, APP/$PS1_{dE9}$, APP23, APP_{SwDI}, and 3xTg) presenting with compact, diffuse and intracellular plaques as well as in *post mortem* human-AD brains. The brains were then evaluated by histology to investigate the impact of size, compactness, and iron load of amyloid plaques on their detection by MRI. We show that Gd-stained MRI allows detection of compact amyloid plaques as small as 25 µm, independently of their iron load, in mice as well as in human-AD brains.

Amyloid plaques are one of the earliest hallmarks of Alzheimer's disease (AD), occurring up to 20 years before clinical diagnosis[1]. Even if their role in AD onset is still debated, they appear as an effective biomarker of its preclinical stages. Currently, the clinical detection of amyloid plaques is based on positron emission tomography (PET) imaging with three radioactive agents recently approved by the Food and Drug Administration (FDA)[2]. However, the low spatial resolution of PET does not allow the visualization of individual plaques, and in animals, PET studies have provided controversial results[3,4]. For example, some studies successfully detected amyloid progression in APP23[5] and 5xFAD[6] mice while others failed to detect signal changes related to amyloidosis[7,8]. Other imaging modalities, such as optical imaging[9] or two-photon imaging after craniotomy[10], have also been developed to detect amyloid plaques in animals. As with PET, optical imaging is too low-resolution to identify individual plaques. Two-photon imaging, however, can reveal individual amyloid plaques at very high resolution (1 µm)[10] though the field of view of the technique is limited and does not allow recording of images from the whole brain[11].

Continuous efforts are ongoing to implement amyloid plaque detection by high-resolution magnetic resonance imaging (MRI). MRI-based monitoring of amyloid plaques can be divided into three research fields. Some studies are based on the endogenous contrast of the plaques, in both mouse models of amyloidosis[12–15] and in

[1]Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay UMR 9199, Neurodegenerative Diseases Laboratory, F-92260, Fontenay-aux-Roses, France. [2]Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Direction de la Recherche Fondamentale (DRF), Molecular Imaging Research Center (MIRCen), F-92260, Fontenay-aux-Roses, France. [3]INSERM U986, Université Paris-Sud, 94276, Le Kremlin-Bicêtre, France. [4]Sanofi, Translational Science Unit, Molecular Histopathology and Bioimaging, Chilly-Mazarin, France. [5]Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Direction de la Recherche Fondamentale (DRF), Institut des Maladies Emergentes et des Therapies Innovantes (IMETI), SEPIA, 18 Route du Panorama, F-92265, Fontenay-aux-Roses, France. Clémence Dudeffant and Matthias Vandesquille contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.D. (email: Marc.Dhenain@cea.fr)

humans[16,17]. This approach is limited by a low sensitivity threshold and is strongly dependent on the iron load of the plaques which locally shortens relaxation times[18,19]. Also, the possibility to detect plaques by MRI in human tissues on the basis of their endogenous contrast is still disputed[18,20,21]. Thus, MR contrast agents seem to be required to facilitate amyloid plaque detection. The first option is to use MR contrast agents specifically targeting amyloid plaques, modulating their MR signal and so increasing their contrast with the brain parenchyma[22–25]. The second option uses non-targeted gadolinium (Gd) contrast agents such as gadoterate meglumine (Dotarem®, Guerbet, France) that is administered in cerebral ventricles after stereotaxic injection[26] or intravenously in association with a non-invasive and safe permeation of the blood-brain barrier using ultrasound[27]. With this method, called Gd-stained MRI, once the contrast agent has reached the brain, amyloid plaques appear as black spots since the hydrophilic Gd-contrast agent increases the signal of tissues surrounding the plaques but do not access their hydrophobic core[28]. As the volume of brain tissue is high compared to the volume of plaques, these agents induce a high signal increase in the brain. This can be converted into resolution enhancement to record high resolution images. Several *in vivo* studies in mice have shown that this method reveals amyloid plaques that otherwise cannot be detected by non-enhanced MRI[26,27]. Recently, it was used to characterize longitudinally the efficacy of an anti-amyloid immunotherapy[29]. Gd-stained MRI has also been used to detect amyloid plaques in primates[30] and to detect prion plaques in *post mortem* brain samples from Creutzfeldt-Jakob patients[31], but it has never been used to label amyloid plaques in human-AD brains.

Numerous models of amyloidosis with different plaque typologies are used for preclinical investigations. The choice of transgenic mouse model, as well as the stage of Aβ pathology, significantly contributes to the outcome of preclinical studies. Here, we investigated the extent to which Gd-stained MRI allows detection of different types of amyloid lesions including compact, diffuse and intracellular amyloid deposits in five mouse models of amyloidosis ($APP_{SL}/PS1_{M146L}$, $APP/PS1_{dE9}$, APP23, APP_{SwDI}, 3xTg). Vascular abnormalities often co-exist with amyloid plaques in mouse models of amyloidosis as in AD patients[32]. Aβ peptide may accumulate into the vessel wall of cerebral arteries leading to cerebral amyloid angiopathy (CAA) and microhemorrhages. We also examined the capacity of Gd-stained MRI to detect these lesions. Finally, we explored the capacity of Gd-stained MRI to detect amyloid plaques in *post mortem* human-AD brains. The brain samples were then evaluated by histology to assess the impact of size, compactness, and iron load of amyloid plaques on their detection by MRI. Amyloid plaques from $APP_{SL}/PS1_{M146L}$, $APP/PS1_{dE9}$ and human-AD brains had the most similar histological characteristics and could be detected by Gd-stained MRI. Also, we found that the key features associated to amyloid plaque detection by Gd-stained MRI are their size, compactness but not their iron load.

Results

Heterogeneity of amyloid plaque detection in mice. Gd-stained MRI was performed on five mouse models of amyloidosis ($APP_{SL}/PS1_{M146L}$, $APP/PS1_{dE9}$, APP23, APP_{SwDI} and 3xTg) and C57Bl/6 amyloid-free control animals. *In vivo* MRI was acquired at a resolution of $29 \times 29 \times 117\ \mu m^3$ after intracerebroventricular injection of gadoterate meglumine. *Ex vivo* MRI was recorded at a resolution of $25 \times 25 \times 100\ \mu m^3$ after incubation of the brains in a Gd solution. *In vivo* and *ex vivo* MRI without Gd-staining were also performed in $APP_{SL}/PS1_{M146L}$ mice. Following *ex vivo* MRI acquisitions, brains were processed by histology to label amyloid plaques or iron (Figs 1, 2).

As already reported[26], Gd-staining increased the signal-to-noise ratio in MR images (Suppl. Fig. S1). This protocol revealed several hypointense spots that could not be detected without contrast agent (Suppl. Fig. S1). These spots were mainly found in the cerebral cortex, hippocampus, thalamus and amygdala (Figs 1–3) on *in vivo* or *ex vivo* images of $APP_{SL}/PS1_{M146L}$ (Fig. 1A,B, Suppl. Fig. S1), $APP/PS1_{dE9}$ (Fig. 1E,F) and APP23 (Fig. 1I,J) mice. Figure 3 focuses on images of 35 and 80-week-old animals and shows the increased spot density with age. In the youngest animals, hypointense spots were mainly visible in $APP_{SL}/PS1_{M146L}$ mice (Fig. 3A) although discrete spots could be detected in the two other strains (Fig. 3B,C). In the oldest animals, the density of hypointense spots was highest in $APP_{SL}/PS1_{M146L}$ mice (Fig. 3D) although APP23 mice displayed the largest spots (Fig. 3F). Hypointense spots observed by MRI were identified as amyloid deposits by co-registering MR images with Aβ-stained histological sections (Figs 1, 2). $APP_{SL}/PS1_{M146L}$, $APP/PS1_{dE9}$ and APP23 exhibited mainly compact plaques with a dense β-amyloid core (Fig. 1, inserts in C, G, and K). Plaques from APP23 mice were the largest but were less numerous than those of the other two strains. The smallest plaques that could be detected by *in vivo* MRI measured 36 µm, 37 µm and 46 µm for the $APP_{SL}/PS1_{M146L}$, $APP/PS1_{dE9}$ and APP23 mice, respectively. On *ex vivo* images, the detection thresholds were 36 µm, 30 µm and 49 µm for the $APP_{SL}/PS1_{M146L}$, $APP/PS1_{dE9}$ and APP23 mice, respectively. Iron deposition was also evaluated for each mouse strain either by using Perls-DAB staining alone (Figs 1, 2) or a double staining based on Perls-DAB and Congo red (Fig. 4). $APP_{SL}/PS1_{M146L}$ and $APP/PS1_{dE9}$ mice displayed high focal iron accumulations while in APP23 mice iron staining was weak (Figs 1, 4). Registration between MR images and histological sections showed that, some amyloid plaques seen by MRI corresponded with iron deposits (Figs 1, 4, black arrows and circles), while some others could not easily be matched with iron-positive elements (Figs 1, 4, red arrows and circles). This suggests that iron is not mandatory for amyloid plaque detection after Gd-staining.

Correlative studies were performed to further evaluate relationships between the loads of hypointense spots detected by *in vivo* MRI, amyloid plaques and iron deposits in animals in which amyloid plaques could be detected *in vivo* ($APP_{SL}/PS1_{M146L}$, $APP/PS1_{dE9}$ and APP23). We found a significant correlation between the hypointense spots load and the amyloid load ($R^2 = 0.82$; $p < 0.01$, Fig. 5A), but no correlation between the hypointense spots load and the iron deposits load ($R^2 = 0.35$, $p > 0.05$, Fig. 5B). We then further evaluated the proportion of iron-positive plaques detected by Gd-stained MRI. Amyloid plaques bigger than the detection threshold (≥36 µm) were categorized into one of the following four categories: iron-positive plaques detected by MRI, iron-negative plaques detected by MRI, iron-positive plaques not detected by MRI and iron-negative plaques not detected by MRI (Fig. 6). Seventy-six percent of cortical amyloid plaques seen on histological sections

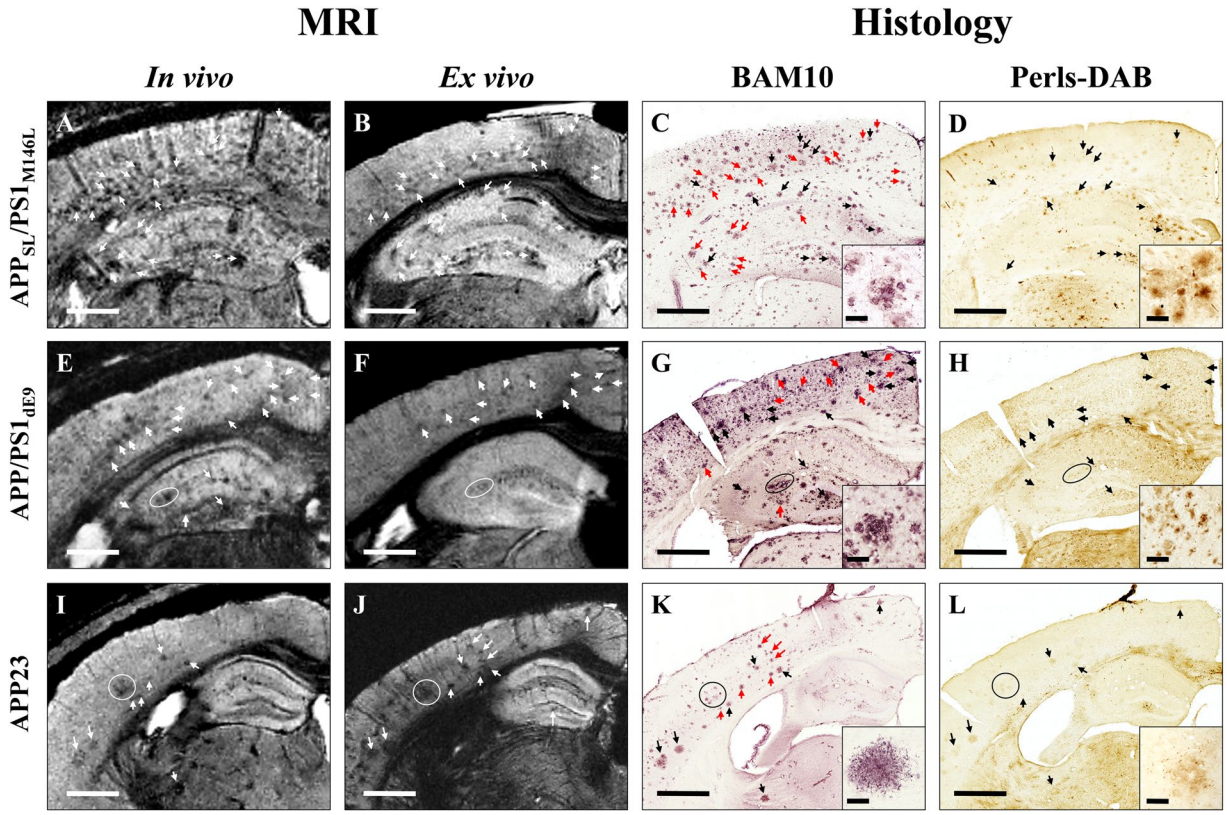


Figure 1. Comparison between detection of amyloid plaques by Gd-stained MRI and immunohistochemistry in APP$_{SL}$/PS1$_{M146L}$, APP/PS1$_{dE9}$, and APP23 mice. Gd-stained *in vivo* (column 1) *or ex vivo* (column 2) MR images were registered with β-amyloid (BAM10, column 3) and iron-stained (Perls-DAB, column 4) histological sections in APP$_{SL}$/PS1$_{M146L}$ (**A**–**D**), APP/PS1$_{dE9}$ (**E**–**H**) and APP23 (**I**–**L**) mice. Inserts in columns 3 and 4 display typical plaques for each strain. Hypointense spots (white arrows and circles) are visible in the *in vivo* and/or *ex vivo* MR images of APP$_{SL}$/PS1$_{M146L}$ (**A**,**B**), APP/PS1$_{dE9}$ (**E**,**F**) and APP23 (**I**,**J**) mice. They can be registered with amyloid plaques (black and red arrows and circles) on BAM10-stained sections (**C**,**G**,**K**). Iron staining reveals iron deposits that can be registered with hypointense spots and amyloid plaques in APP$_{SL}$/PS1$_{M146L}$ (**D**), APP/PS1$_{dE9}$ (**H**) and APP23 (**L**) mice. Some amyloid plaques containing iron (black arrows and circles) are visible on MR images. Some others are iron-free (red arrows) and are also detected by MRI indicating that iron is not necessary for MR detection. Scale bars: 500 µm for main images and 50 µm for inserts.

were detected by Gd-stained MRI (Fig. 6A). Among these, 67% were iron-positive and 33% were iron-negative (Fig. 6B). Few differences were observed between the APP$_{SL}$/PS1$_{M146L}$, APP/PS1$_{dE9}$ and APP23 mice (Fig. 6). 24% of amyloid plaques seen on histological sections were not detected by Gd-stained MRI (Fig. 6A). We cannot exclude that this lack of detection was related to an imperfect registration between MR images and histological sections because of their different thicknesses (117 and 40 µm, respectively) and because of partial volume effects. Among these 24% of amyloid plaques not detected by Gd-stained MRI, 58% were iron-positive and 42% were iron-negative (Fig. 6C).

In APP$_{SwDI}$ mice, hypointense spots were never detected either on *in vivo* or *ex vivo* images (Fig. 2A,B). On histological sections, these mice displayed large, diffuse and poorly circumscribed plaques (Fig. 2C, red shape, Fig. 4H) and did not display any obvious iron deposits at the level of the plaques (Figs 2D, 4H).

In 3xTg mice, hypointense spots were not detected in most brain regions (Fig. 2E,F). In 3xTg mice younger than 70 weeks, amyloid deposits were mainly intracellular and measured less than 20 µm (Fig. 2G, red arrows). These intracellular deposits were not detected by Gd-stained MRI. Perls-DAB staining did not show iron accumulation within these deposits (Figs 2H, 4J). In older animals, a strong extracellular amyloidosis was observed by histology in most of the brain areas, but only plaques of the subiculum were detected by Gd-stained MRI. These subicular plaques were congophilic and iron-positive while plaques from other brain regions, not detected by MRI, were diffuse and iron-negative (Suppl. Fig. S2).

Control animals did not display any hypointense spots on MR sections (Fig. 2I,J), amyloid plaques (Fig. 2K) or focal accumulations of iron (Fig. 2L) on histological sections.

Visualization of CAA and cerebral microhemorrhages by Gd-stained MRI. CAA and microhemorrhages are often detected in mouse models of amyloidosis. We thus evaluated whether they could be visualized by Gd-stained MRI. Blood vessels were associated with linear or punctuate hypointensities on *in vivo* and *ex vivo* Gd-stained MR images of the five studied models (Fig. 7A–C) but also of amyloid-free control animals

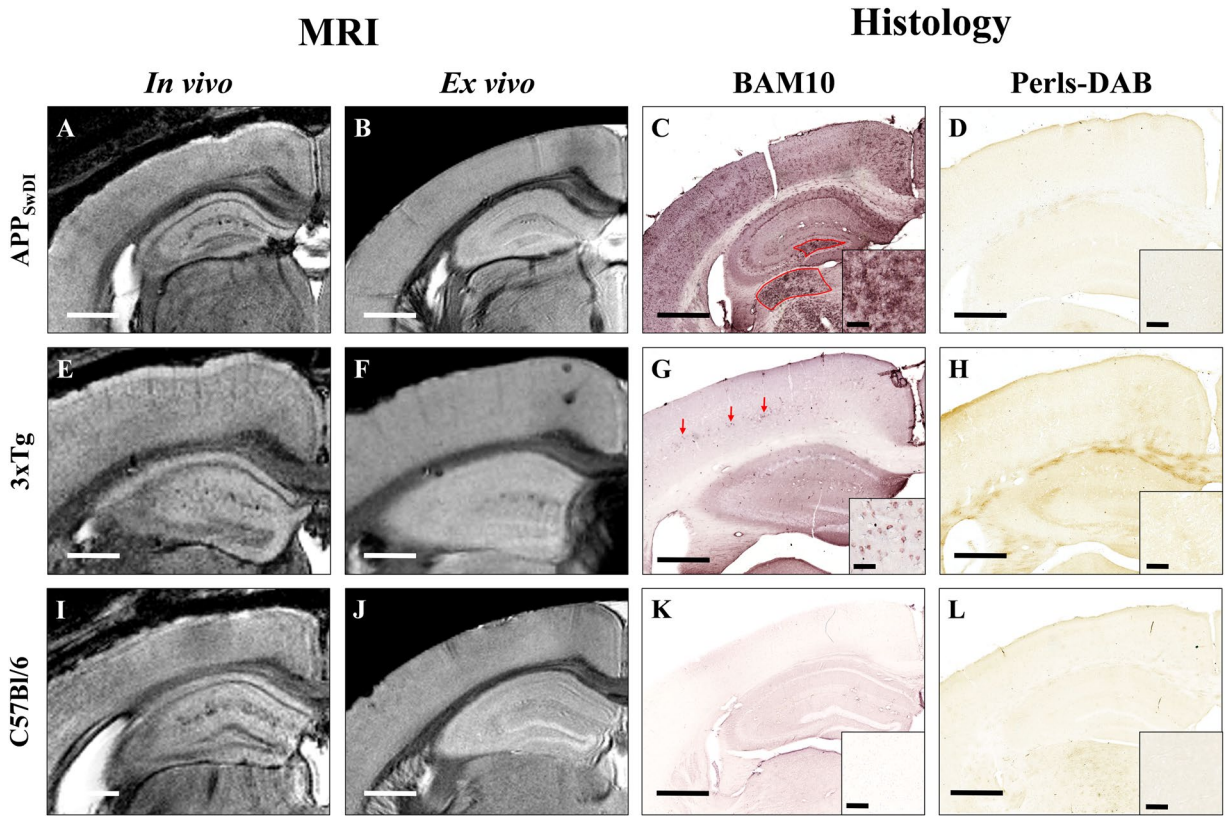


Figure 2. Comparison between detection of amyloid plaques by Gd-stained MRI and immunohistochemistry in APP_{SwDI}, 3xTg, and C57Bl/6 amyloid-free mice. Gd-stained *in vivo* (column 1) *or ex vivo* (column 2) MR images were registered with β-amyloid (BAM10, column 3) and iron-stained (Perls-DAB, column 4) histological sections in APP_{SwDI} (**A–D**), 3xTg (**E–H**) and C57Bl/6 amyloid-free (**I–L**) mice. Inserts in columns 3 and 4 display typical plaques for each strain. MR images of APP_{SwDI} mice do not present with hypointense spots (**A**,**B**). BAM10 and iron staining show large diffuse Aβ-positive lesions (**C**, red shape) devoid of iron deposits (**D**). 3xTg mice do not present with hypointense spots on MR images (**E**,**F**). BAM10 and iron staining show intracellular Aβ deposits (**G**, red arrows) devoid of iron (**H**). In C57Bl/6 amyloid-free mice, no hypointense spots on MR images (**I**,**J**) or amyloid plaques on BAM10 sections (**K**) are detected. Scale bars: 500 µm for main images and 50 µm for inserts.

(Fig. 7D,E). Registration between MR images and histological sections showed that the hypointense nature of blood vessels was not related to the presence of amyloid angiopathy (Fig. 7B,C).

To evaluate the appearance of microhemorrhages on Gd-stained MR images, we compared MRI recorded before and after Gd-staining. As previously reported[33–35], on non-stained MRI, microhemorrhages were visible as rare hypointense spots (Fig. 7F,G). After Gd-staining, microhemorrhages identified in pre-contrast images remained detected in addition to amyloid plaques. Differentiation between these two lesions could be made on the basis of their size and large microbleeds were the only ones that could easily be differentiated from plaques (Fig. 7H,I). Signal from smaller microbleeds was close to that of plaques (Fig. 7H,I).

Amyloid plaque detection in human-AD brains. Brain samples from three AD patients were imaged by *ex vivo* Gd-stained MRI. Hypointense spots were detected in the cortex but not in the white matter of these patients (Fig. 8A,B,E,F). Registration between MRI and histological sections showed that most of the hypointense spots seen on MR images corresponded to amyloid plaques (Fig. 8B,C,F,G, black and red arrows) or blood vessels (Fig. 8B,C,F,G, blue circles). Hypointense spots within blood vessels can be explained by the presence of blood within the vessels in non-perfused *post mortem* samples. On histological sections, amyloid plaques measured 10 to 200 µm with most plaques smaller than 25 µm. The smallest plaques that could be detected by MRI measured 25 µm.

Finally, Perls-DAB staining revealed iron deposition in most of the human plaques detected by MRI (Fig. 8B–D,F,G, black arrows). However, as in mice, some iron-free plaques were detected by MRI (Fig. 8B–D, red arrows). Double labelling of histological sections with Perls-DAB staining and Congo red revealed two types of iron deposits associated with plaques, *i.e.* some punctate accumulations in the entire plaques (Fig. 8H) and ramified intracellular accumulations surrounding the plaques (Fig. 8I).

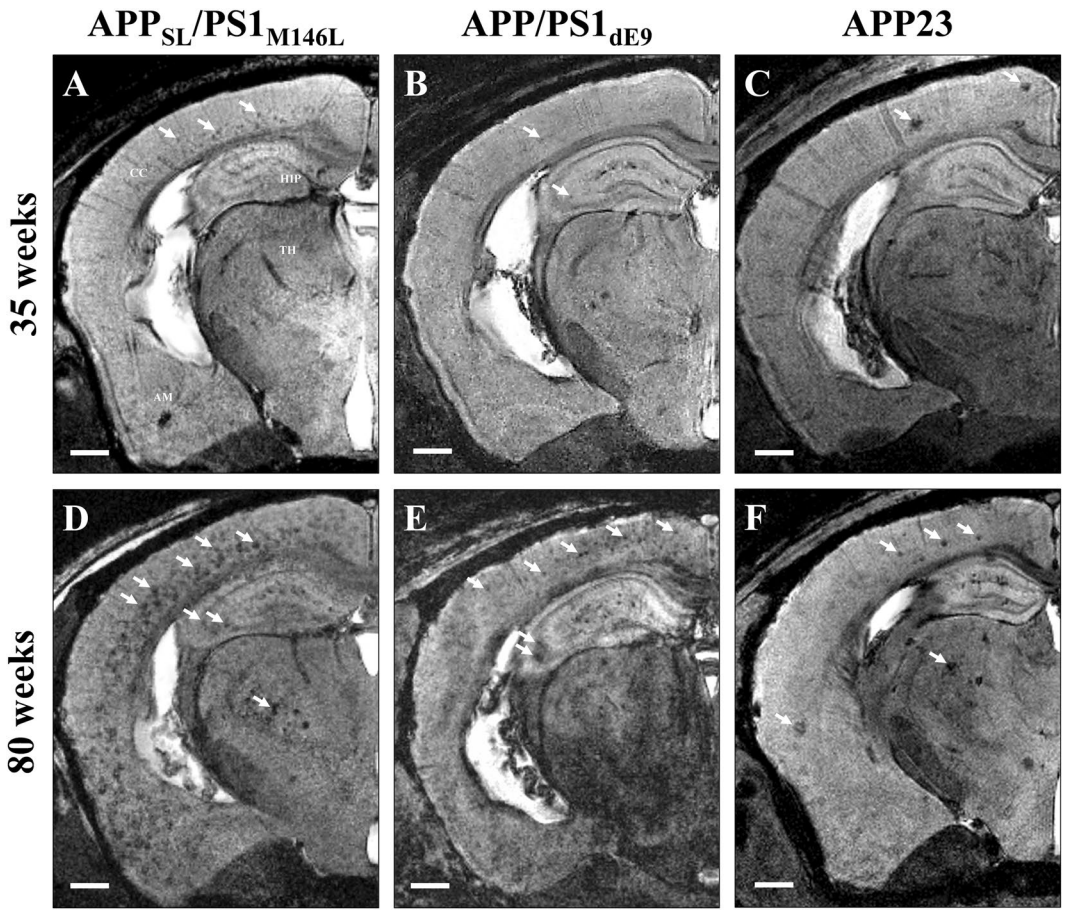


Figure 3. Hypointense spots on MRI sections of 35-week-old (**A–C**) and ~80-week-old (**D–F**) $APP_{SL}/PS1_{M146L}$, $APP/PS1_{dE9}$ and APP23 mice. Hypointense spots (white arrows) are detected in the brain of 35-week-old $APP_{SL}/PS1_{M146L}$ (**A**), $APPPS1_{dE9}$ (**B**), and APP23 (**C**) in the cerebral cortex (CC), hippocampus (HIP), thalamus (TH) and amygdala (AM). These spots increase in number and size in older animals (**D–F**). Scale bars: 500 µm.

Discussion

We compared amyloid lesions in five transgenic mouse models of amyloidosis as well as in human-AD brain samples and explored the ability of Gd-stained MRI to detect amyloid plaques in these brains. Detection of amyloid plaques by Gd-stained MRI was strikingly different among the various models used in this study and in humans. Amyloid plaques were detected *in vivo* and *ex vivo* in $APP_{SL}/PS1_{M146L}$, $APP/PS1_{dE9}$, APP23 and to a lesser extent in 3xTg mice but never in APP_{SwDI} mice. In human-AD brains, amyloid plaques could be detected by *post mortem* Gd-stained MRI.

Our histological evaluation showed that $APP_{SL}/PS1_{M146L}$, $APP/PS1_{dE9}$ and APP23 mice displayed mainly compact plaques. Similar lesions were the most frequently found in the human-AD brain samples studied. Striking differences were observed in the two other strains. Diffuse plaques were detected in APP_{SwDI} mice, whereas intracellular amyloid deposits were found in the 3xTg mice. Intracellular amyloid plaques have been observed in humans[36,37], but are not the most widely reported as they might occur in early stages of AD[38]. Regarding iron, we detected iron deposits in association with the amyloid plaques of $APP_{SL}/PS1_{M146L}$, $APP/PS1_{dE9}$, APP23, 3xTg mice and of humans. Different iron loads were found in the different models, which is consistent with data from other studies. Jack *et al*. reported strong iron deposits in the plaques of $APP_{S(i.e.\ Tg2576)}/PS1_{M146L}$ mice[39] while Meadowcroft *et al*. reported a very reduced iron load in the plaques of $APP_{S(i.e.\ Tg2576)}/PS1_{A246E}$ mice[18]. In humans, some studies reported a close relationship between amyloid plaques and iron depositions[18] while some others suggested high or low iron levels in amyloid plaques even within the same subject[40]. In fact, the relationship between amyloid plaques and iron depositions in humans is still not consensual[41]. Our study supports the presence of iron in some but not all amyloid plaques. Moreover, the shape of the iron deposits is highly variable with focal deposits in mice, while in humans we detected punctate iron accumulations in the entire plaques as well as ramified accumulations surrounding the plaques.

One of the main purposes of our study was to compare MRI and histological characteristics of amyloid plaques in different mouse strains to investigate the critical parameters required for Gd-stained detection of amyloid plaques. The size of amyloid plaques is an important factor that influences their MR detection. Amyloid plaque detection was more efficient in the strains having the largest plaques as observed in $APP_{SL}/PS1_{M146L}$, $APP/PS1_{dE9}$ or APP23 with detection thresholds of 36 and 30 µm for *in vivo* and *ex vivo* images, respectively, which corresponds approximately to 1.2 times the voxel size. This threshold can explain the poor detection achieved in the

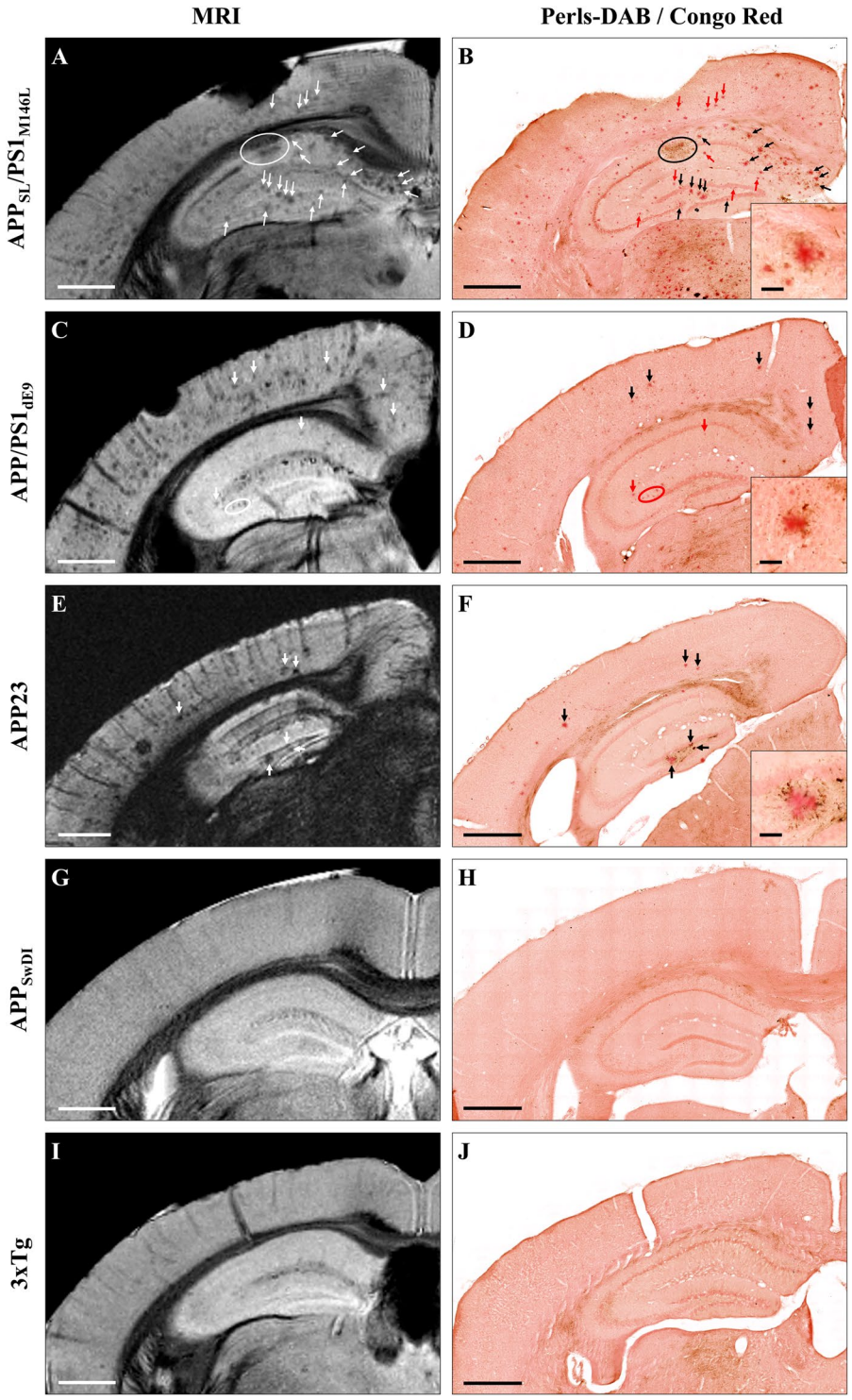


Figure 4. Comparison between detection of amyloid plaques by Gd-stained MRI and histological sections double-stained for amyloid and iron in five mouse strains. Gd-stained MR images (left) were registered with histological sections double-stained for β-amyloid (Congo red) and iron (Perls-DAB) (right) in APP$_{SL}$/PS1$_{M146L}$ (**A**,**B**), APP/PS1$_{dE9}$ (**C**,**D**), APP23 (**E**,**F**), APP$_{SwDI}$ (**G**,**H**) and 3xTg (**I**,**J**) mice. Hypointense spots (white arrows and circles) were visible in the MR images of APP$_{SL}$/PS1$_{M146L}$ (**A**), APP/PS1$_{dE9}$ (**C**) and APP23 (**E**) mice. They could be registered with congophilic amyloid plaques on histological sections (**B**,**D**,**F**, black and red arrows and circles). No congophilic plaques were detected in APP$_{SwDI}$ (**H**) and 3xTg (**J**) mice. Iron staining revealed iron deposits that co-localize with amyloid plaques (black arrows and circles) in APP$_{SL}$/PS1$_{M146L}$ (**B**), APP/PS1$_{dE9}$ (**D**) and APP23 (**F**) mice. Some other plaques were iron-free (red arrows and circles) and were also detectable by MRI indicating that iron is not necessary for their detection. No iron accumulation was observed in APP$_{SwDI}$ (**H**) and 3xTg (**J**) mice. Scale bars: 500 µm for main images and 50 µm for inserts.

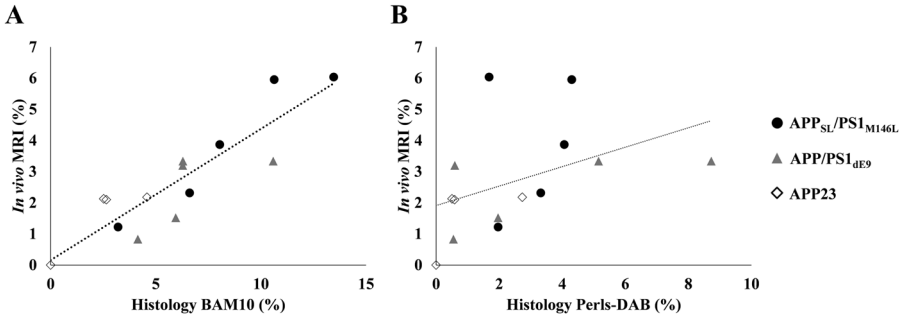


Figure 5. Relationships between amyloid load quantified from *in vivo* Gd-stained MR images, and from amyloid-stained histological sections (BAM10) (**A**) or from iron-stained histological sections (Perls-DAB) (**B**). Amyloid load measured from Gd-stained MRI showed a correlation with BAM10 staining ($R^2 = 0.82$; $p < 0.01$) but was not correlated with Perls-DAB staining ($R^2 = 0.35$; $p > 0.05$).

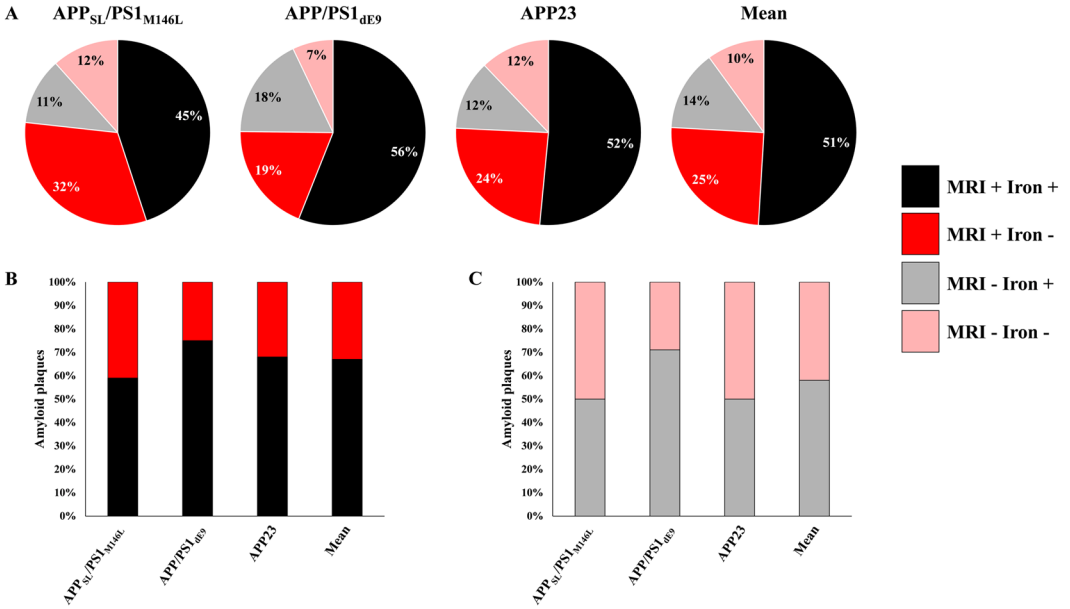


Figure 6. Detectability of amyloid plaques by Gd-stained MRI according to their iron content. Cortical amyloid plaques with a diameter ≥36 µm were categorized into one of the following four categories: iron-positive plaques detected by MRI (MRI + Iron +, black), iron-negative plaques detected by MRI (MRI + Iron −, red), iron-positive plaques not detected by MRI (MRI − Iron+, grey) and iron-negative plaques not detected by MRI (MRI − Iron −, pink) in APP$_{SL}$/PS1$_{M146L}$, APP/PS1$_{dE9}$ and APP23 mice (**A**). Among amyloid plaques detected by Gd-stained MRI, 59%, 75% and 68% contained iron in APP$_{SL}$/PS1$_{M146L}$, APP/PS1$_{dE9}$ and APP23 mice, respectively (**B**). Among amyloid plaques not detected by Gd-stained MRI, 50%, 71% and 50% contained iron in APP$_{SL}$/PS1$_{M146L}$, APP/PS1$_{dE9}$ and APP23 mice, respectively (**C**).

3xTg mice. In this strain, only the largest plaques could be detected, while most of the amyloid deposits that were intracellular and smaller than 20 µm were not seen by MRI. In human-AD brains, the minimum visible plaque size was similar to that in mice (*i.e.* 25 µm for human-AD and 30 µm for mice).

Our study also showed that the compactness of amyloid plaques seemingly impacts their detection by the Gd-staining procedure. Amyloid plaques were detected in models with compact plaques, but not in models with large diffuse Aβ deposits (*i.e.* APP$_{SwDI}$ or 3xTg mice). The mechanism of contrast enhancement is assumed to be due to the hydrophobic property of amyloid plaques that limits the penetration of the contrast agent within them. Because this hydrophobicity is related to the concentration of the amyloid peptide, diffuse deposits are probably less prone to be revealed by Gd-stained MRI than compact plaques. Interestingly, previous studies have shown that diffuse deposits are not detected by MRI without contrast agents in mice[42] or in human brains[43]. Thus, it seems that Gd-stained MRI does not improve the ability to detect diffuse plaques as compared to contrast-agent free MRI.

Finally, our study showed that iron accumulation is not necessary for plaque detection after Gd-staining. Indeed, in mice, 33% of the amyloid plaques detected with Gd-stained MRI contained little or no iron. Also, in human-AD brain samples, although most of the plaques detected by Gd-stained MRI contained iron deposits,

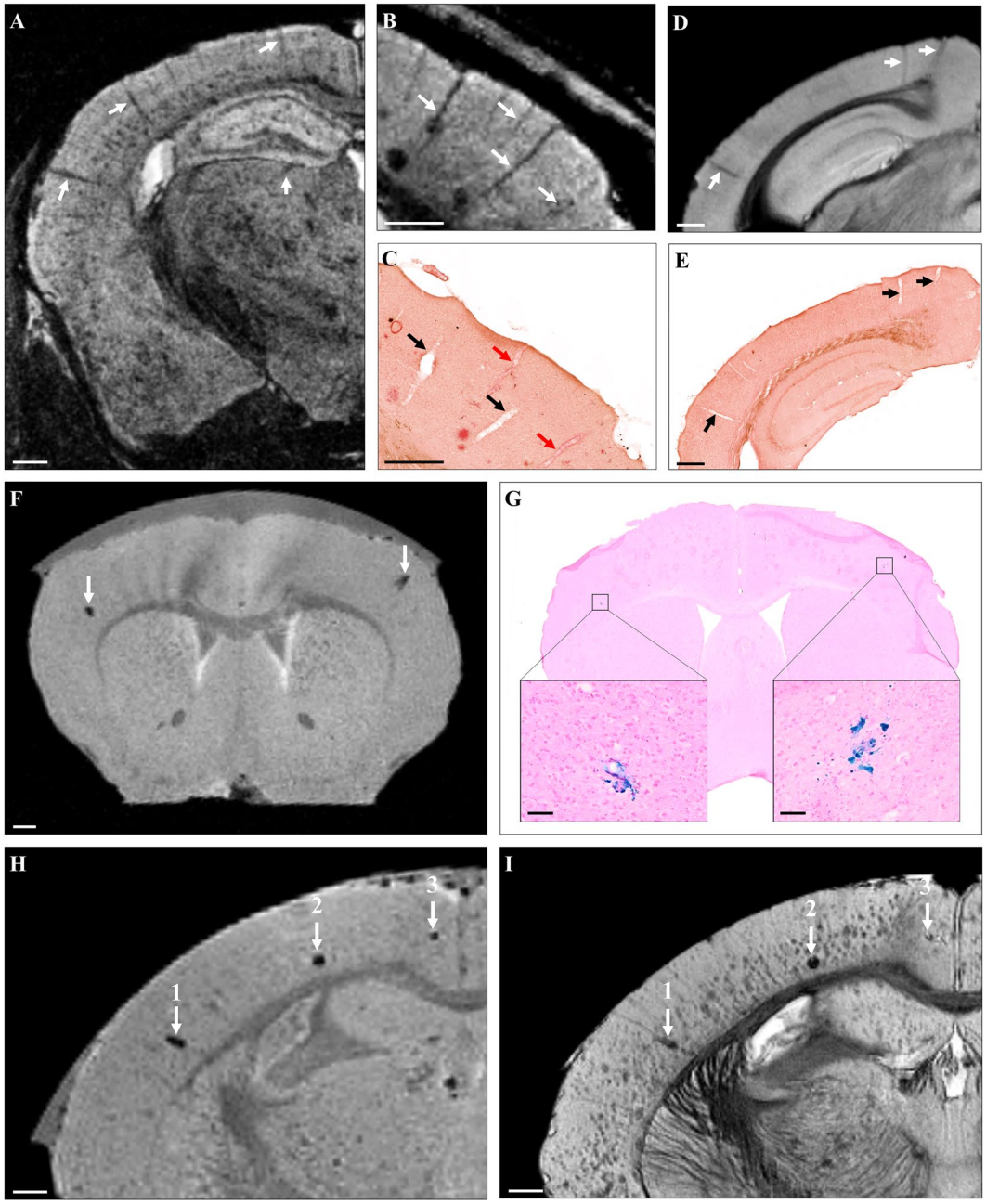


Figure 7. Visualization of CAA and cerebral microhemorrhages by Gd-stained MRI. Linear hypointense elements corresponding to blood vessels were detected on MR images of mouse models of amyloidosis (**A–C**, arrows). Registration between MR images (**B**) and histological sections (**C**) showed that some blood vessels seen on MRI were matched with CAA-positive vessels (red arrows) while some others were matched with CAA-negative vessels (black arrows). MR images of C57Bl/6 amyloid-free mice showed similar hypointensities (**D**, arrows) that were matched with blood vessels (**E**, arrows) confirming that CAA was not responsible of the hypointense nature of blood vessels by Gd-stained MRI. Sparse focal signal attenuations were observed on MR images before Gd-staining (**F**). They could be registered with microhemorrhages on Perls' stained histological sections (**G**, boxes). Microhemorrhages easily seen on MRI before Gd-staining (**H**, arrows) could be matched with some hypointense spots on Gd-stained MRI (I, arrows). Large microhemorrhages (1, 2) were easily distinguished from amyloid plaques on MR images but small microbleeds (3) and amyloid plaques were similar in appearance. Scale bars: 500 µm (**A–F**,**H**,**I**) and 100 µm (**G**).

some plaques devoid of iron were detected. In *ex vivo* experiments without contrast agents, previous studies reported that in some transgenic mice (*i.e.* $APP_{S(i.e.\ Tg2576)}/PS1_{A246E}$ mice and $APP_{S(i.e.\ Tg2576)}/PS1_{M146L}$), plaques that do not contain iron can be detected[18,42]. However, in most *in vivo* studies without contrast agent, iron is considered as critical for plaque detection[14,15,39]. Since iron accumulation in plaques is age-dependent and variable

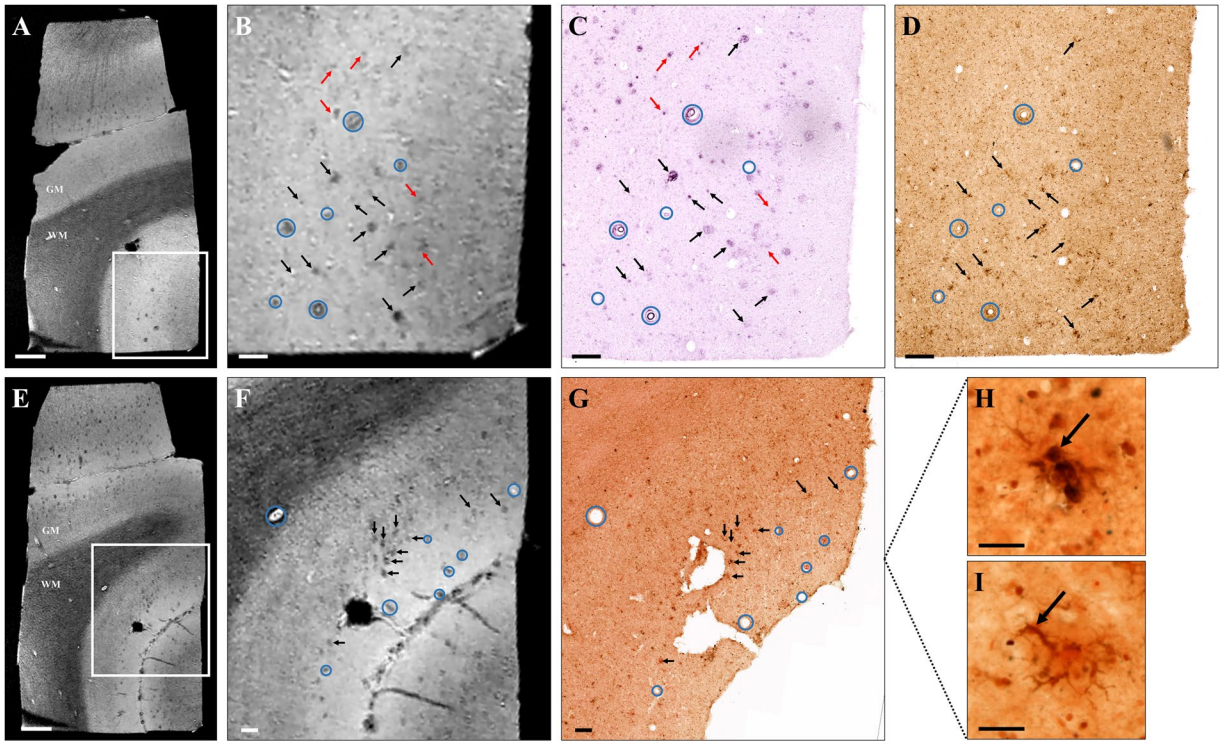


Figure 8. Amyloid plaque detection by Gd-stained MRI in human Alzheimer's disease brains. Gd-stained *post mortem* MR images (**A**,**B**,**E**,**F**) were registered with histological sections stained for β-amyloid (BAM10, **C**), iron (Perls-DAB, **D**) or double-stained for β-amyloid and iron (Congo red/Perls-DAB, **G**). Grey and white matter (GM and WM respectively) could easily be identified in Gd-stained MRI (**A**,**B**,**E**,**F**). Numerous hypointense spots were visible in the grey matter of AD patients (**A**,**B**,**E**,**F**). Slices were registered according to orientation and landmarks such as blood vessels (blue circles). Most of the hypointense spots (black and red arrows) seen on MR images (**A**,**B**,**E**,**F**) can be registered with β-amyloid lesions (black and red arrows) on BAM10 (**C**) and Congo-red/Perls-DAB (**G**) stained histological sections. Iron staining (Perls-DAB) revealed iron deposits that co-localize with amyloid plaques (**D**,**G**, black arrows) in most of the human plaques. Some other plaques were iron-free (**C**,**D**, red arrows) and were also detected by MRI indicating that iron is not necessary for detection. Perls-DAB-stained sections demonstrate two types of iron accumulation near amyloid plaques (**H**,**I**): punctate (**H**) or intracellular deposits (**I**). Scale bars: 1000 µm (**A**,**E**), 200 µm (**B–D**,**F**,**G**) and 50 µm (**H**,**I**).

according to brain region, one of the advantages of Gd-stained MRI is to allow plaque detection without depending on iron accumulation which is a covariate related to aging and not to plaque load.

We then examined the capacity of Gd-stained MRI to detect microhemorrhages and CAA. Microhemorrhages are often associated with aging and amyloid pathology in mice and in humans[32]. These lesions are hypointense on MR images[33–35], and could thus be misinterpreted as amyloid plaques on Gd-stained MR images. We showed that large microbleeds are distinguishable from amyloid plaques based on their superior size. Small microbleeds are the only lesions that could be confounded with amyloid plaques. Their number is however low compared to that of plaques, and exclusion of these lesions is always possible by recording T2* or susceptibility-weighted MR images before Gd-staining. Regarding CAA, we observed that blood vessels appeared as hypointense structures by *in vivo* MRI owing to the paramagnetic properties of blood, independently of the presence of CAA. On *post mortem* MR images, the hypointense nature of blood vessels could reflect the presence of Aβ peptide in the vessel wall but also a small amount of blood trapped in the vessels. Gd-stained MRI is thus not appropriate to detect amyloid angiopathy.

In this article, we also showed for the first time that Gd-stained MRI is able to detect amyloid plaques in human-AD brain tissues. Several significant technical barriers must be solved for this method to become suitable for use in living human subjects, including the ability to administer the contrast agent in the brain as well as resolution and imaging time considerations. The aim of this article is not to propose immediate solutions for these issues and we acknowledge that today the application of Gd-stained MRI as a routine method can be envisioned only in animal models. Gd-stained MRI can be repeated over the lifetime of animals and individual plaques can be followed-up longitudinally[26]. This method can thus be used to study amyloid biology or anti-amyloid therapies[29]. Here, we showed that among the models used in our study, $APP_{SL}/PS1_{M146L}$, $APP/PS1_{dE9}$ and APP23 are the models of choice to apply Gd-stained MRI and amyloid plaque detection in these models provides similar results to those obtained with human brain samples.

In conclusion, this study clearly highlights differences among amyloid plaques found in different mouse models of amyloidosis, and provides a better understanding of the origin of contrast induced by amyloid plaques in Gd-stained MRI. We also showed that Gd-stained MRI can be used to detect amyloid lesions in models with large

compact amyloid plaques such as $APP_{SL}/PS1_{M146L}$, $APP/PS1_{dE9}$ or APP23 mice independently of their iron load, and suggest that detection of amyloid plaques by Gd-stained MRI in $APP_{SL}/PS1_{M146L}$ and $APP/PS1_{dE9}$ is the most similar to that in human-AD brains.

Material and Methods

Animals. We selected male mice from five transgenic strains presenting with compact amyloid plaques ($APP_{SL}/PS1_{M146L}$ (n = 6), $APP/PS1_{dE9}$ (n = 6) and APP23 (n = 4)), diffuse amyloid plaques (APP_{SwDI} (n = 6)) and intracellular amyloid deposits (3xTg (n = 7)). C57Bl/6 amyloid-free mice (n = 2) were used as controls. *In vivo* and *ex vivo* Gd-stained MR images from brains of these animals were recorded to detect amyloid plaques. Two $APP_{SL}/PS1_{M146L}$ were also imaged *in vivo* and *ex vivo* before Gd-staining. Ages of the animals were selected to image the youngest animals with already well-established lesions (based on preliminary histological studies and on published pathophysiological characteristics of each strain) and the oldest animals available in our colony (approximately 100-week-old animals). A cohort of 75 week-old $APP_{SL}/PS1M_{146L}$ mice (n = 5) was further evaluated to study microhemorrhage detection. Their brains were studied before and after Gd-staining. An overview of the selected strains is presented below.

$APP_{SL}/PS1_{M146L}$ mice co-express human APP with Swedish double mutation (KM670/671NL) and London mutation (V717I) and human presenilin 1 (PS1) with M146L mutation under the control of a neuron-specific Thy1 promoter. This leads to a 3-fold higher expression of the human APP transgene than endogenous murine APP. These mice develop dense-cored amyloid plaques that reach a significant level in the neocortex and in the hippocampus at ~26 weeks[44]. These plaques have already been widely evaluated with Gd-stained MRI[26,27,29] and they can be detected in ~26-week-old animals[26]. These mice were imaged from 24 to 78 weeks (n = 6 and 5 for amyloid plaque and microhemorrhage detection, respectively).

$APP/PS1_{dE9}$ mice co-express human APP with the Swedish double mutation (KM670/671NL) and human PS1 deleted in exon 9 under the control of the mouse prion protein promoter. Significant amyloid plaque burden is seen in the hippocampus and cortex by 36 weeks[45] and increases with age[46]. These mice develop amyloid plaques with a dense core, surrounded by dystrophic neurites[45]. These mice were imaged from 35 to 126 weeks (n = 6).

APP23 mice express human APP with the Swedish double mutation (KM670/671NL) driven by the mouse Thy1.2 promoter allowing a neuron-specific expression of the transgene. This leads to a 7-fold higher expression of the human mutated APP than the endogenous murine APP[47]. APP23 mice develop a significant amyloidosis between 24 and 56 weeks[47,48]. Then, dense-cored amyloid plaques increase in size and number with age, mainly in the neocortex and the hippocampus[47]. These mice were imaged from 39 to 77 weeks (n = 4).

APP_{SwDI} mice express human APP containing three mutations: Swedish (KM670/671NL), Dutch (E693Q) and Iowa (D694N), under the control of the mouse Thy1 promoter. These mice display mainly diffuse amyloid plaques and a significant number of plaques is reached at 52 weeks[49]. These mice were imaged from 52 to 114 weeks (n = 6).

3xTg mice express three mutated transgenes ($APP_{KM670/671NL}$, $MAPT_{P301L}$, and $PSEN1_{M146V}$) to comparable levels in the same brain regions. Consequently, they display both amyloid and neurofibrillary tangle pathologies. Amyloidosis starts at 12 weeks in the neocortex and at 24 weeks in the hippocampus, before neurofibrillary tangle formation. At this age, amyloid is mainly intraneuronal. Extracellular amyloid deposits become readily evident at 52 weeks[50]. These mice were imaged from 44 to 112 weeks (n = 7).

C57Bl/6 are amyloid-free mice used as controls. These mice were imaged at 48 and 79 weeks (n = 2).

All animal experiments were conducted in accordance with the European Communities Council Directive (2010/63/UE). Animal care was in accordance with institutional guidelines and experimental procedures were approved by local ethics committees (authorization 12-062; ethics committee CETEA-CEA DSV IdF).

Human-AD brain samples. Human *post mortem* brain samples from the cerebral cortex and adjacent white matter of three AD patients were obtained from the Gie-Neuro-CEB brain bank. This brain bank is run by a consortium of patients associations including France Alzheimer, with the support of Fondation Plan Alzheimer and IHU A-ICM. All methods using human brains were carried out in accordance with French guidelines and regulations. The informed consent forms were signed by either the patients themselves or their next of kin in their name, in accordance with French bioethical laws. The Brain Bank GIE NeuroCEB has been declared at the Ministry of Higher Education and Research and has received approval to distribute samples (agreement AC-2013-1887).

Surgical procedure. Animals were anesthetized with a mixture of isoflurane (1–2%) and air (1 L/min). After their heads were shaved, the mice were placed on a stereotaxic frame using ear bars and a tooth bar to secure them. A heating pad maintained physiological temperature throughout the procedure. After a midline incision of the skin, the coordinates of the bregma were recorded for anterior-posterior (A/P) and lateral (L) references. The skull was bilaterally perforated with a Dremel at coordinates A/P −0.2 mm and L ± 1 mm, according to a stereotaxic atlas[51]. Blunt Hamilton syringes were used to inject gadoterate meglumine (DOTAREM®, Guerbet, Aulnay-sous-Bois, France) into the lateral ventricles at coordinate −1.75 mm relative to the surface of the dura mater. A total volume of 1 µL (0.5 mmol/mL) was injected into each side at a rate of 0.1 µL/minute. Upon completion of the injections, needles were not moved for 10 minutes to allow the diffusion of the contrast agent. Then, needles were slowly withdrawn to minimize any outflow from pressure release and the skin was then sutured back.

***In vivo* MRI experiments.** *In vivo* MRI was performed with a 7T spectrometer (Agilent, USA) interfaced with a console running VnmrJ 3.2. The spectrometer was equipped with a rodent gradient insert of 700 mT/m. A birdcage coil (RapidBiomed, GmbH, Germany) and a mouse brain surface coil (RapidBiomed, GmbH, Germany) were used for emission and reception, respectively. A high-resolution 3D-Gradient Echo sequence was

used to achieve a resolution of 29 × 29 × 117 μm^3 (matrix = 512 × 512 × 128, repetition time (TR) = 50 ms, echo time (TE) = 13 ms, flip angle = 20°, number of averages (Nex) = 2, bandwidth = 25 kHz, acquisition time = 1 h 49 min)[26]. All the MR images were recorded starting at 60 minutes after administration of the Gd contrast agent. During MRI experiments, animals were anesthetized with a mixture of isoflurane (0.75–1.5%) and carbogen (95% O_2–5% CO_2). Their breathing rate and their body temperature was monitored. Carbogen was used to reduce the signal coming from circulating blood[52].

All animals were sacrificed after *in vivo* MRI experiments using a high dose of sodium pentobarbital (100 mg/kg) and then fixed with a transcardiac perfusion of 4% paraformaldehyde (PFA). The brains were then removed, immersed in 4% PFA overnight at 4 °C, and preserved in PBS 0.1 M at 4 °C until *ex vivo* MRI experiments.

***Ex vivo* MRI experiments.** Brains were incubated in a Gd solution (DOTAREM® diluted to 2.5 mM in PBS) for 48 hours before MR experiments. Then, they were placed in a tight plastic tube filled with an aprotonic perfluorocarbon-based fluid (Fluorinert®, 3 M™) that provides a black background. A high-resolution 3D-Gradient Echo sequence was used to achieve a resolution of 25x25 × 100 μm^3 (matrix = 512 × 512 × 128, TR = 40 ms, TE = 15 ms, flip angle = 20°, Nex = 2, bandwidth = 25 kHz, acquisition time = 11 h 39 min).

To detect microhemorrhages, *ex vivo* MR images were recorded to achieve a resolution of 50.8 × 50.8 × 50.8 μm^3 (matrix = 256 × 256 × 512, TR = 40 ms, TE = 15 ms, flip angle = 20°, Nex = 8, acquisition time = 11 h 39 min).

Histology. Brains were cryoprotected in 30% PBS-sucrose solution for 72 hours, cut into 40 μm thick coronal sections on a freezing microtome and mounted on slides (Ultrafrost, Thermo-Fisher®). Sections were stained for β-amyloid deposits (BAM10 immunohistochemistry and Congo red staining) and for iron deposits (Perls-DAB staining).

For BAM10 immunohistochemistry, sections were first rinsed in PBS 0.1 M and then in 30% hydrogen peroxide (H_2O_2). Then, they were pretreated with 0.2% octylphenol ethylene oxide condensate (Triton X-100™, Sigma-Aldrich®). After this pretreatment, they were incubated with an anti-amyloid primary antibody (monoclonal BAM10, dilution 1:1000, Sigma®) for 48 hours and then with a secondary antibody (biotinylated IgG anti-mouse, BA-9200, dilution 1:1000, Vector® Laboratories, Burlingame, USA) for 1 hour. Before revelation (VIP substrate kit for peroxidase, Vector® Labs), the reaction was amplified for 1 hour with a biotin-avidin complex (ABC Vectastain kit, Vector® Labs)[53]. For Congo red staining, sections were pretreated with 1% NaOH in 80% EthOH saturated with NaCl for 30 min. Then, they were again immersed in the same solution saturated with Congo red for 30 min. For Perls' staining, endogenous peroxidases were first inactivated by immersion in a methanol/H_2O_2 solution. Then, sections were stained with 2% potassium ferrocyanide (P9387, Sigma-Aldrich®) and 2% hydrogen chloride for 20 min. Iron staining was finally intensified using DAB (1 g/l), Tris (0.2 M) and 30% H_2O_2 for 20 min[54].

Microhemorrhage detection was evaluated on 20 μm thick-sections. The sections were stained by incubation, for 30 minutes at 40 °C, in a freshly prepared Perl's reagent: potassium ferrocyanide (10%) in hydrochloric acid (20%). After 3 washings in distilled water, they were counterstained for 5 minutes in a filtered nuclear fast red solution (Vector, H-3403, Burlingame, USA).

Correlation between *in vivo* MRI, *ex vivo* MRI and histology. MR images were manually registered to histological sections using the "3D/Volume viewer" plugin from ImageJ[55]. This plugin enables manual rotation of the 3D MR volume in any direction. We identified typical landmarks such as layers of the hippocampus, blood vessels or amyloid plaques on histological sections. The 3D MR images were then manually rotated until we could identify these landmarks in the MR images. The minimum plaque size resolvable by *in vivo* or *ex vivo* MRI was established by measuring plaque diameters on the registered BAM10 stained sections employing ZEN lite 2012 analysis software (Zeiss, Oberkochen, Germany). Freehand boundaries were drawn around the plaques and their diameter estimated from the average length of the major and minor axes from the resulting ellipsoid[18].

The properties of the plaques detected by MRI were determined after registration between MRI and histological sections double-stained for Aβ and iron in $APP_{SL}/PS1_{M146L}$, $APP/PS1_{dE9}$, and APP23 mice. Only cortical amyloid plaques with a diameter ≥36 μm (which corresponds to the minimum plaque size resolvable *in vivo*) were considered. A total number of 369 amyloid plaques detected on histological sections were classified into four categories. 1. Iron-positive plaques detected by MRI, 2. Iron-negative plaques detected by MRI, 3. Iron-positive plaques not detected by MRI, 4. Iron-negative plaques not detected by MRI.

Amyloid load quantification from MR and histological sections. Amyloid load was quantified from *in vivo* MR images and histological sections of $APP_{SL}/PS1_{M146L}$ (n = 5), $APP/PS1_{dE9}$ (n = 5), and APP23 (n = 4) mice. For MR images, cortical amyloid load was calculated by using a method similar to that reported by Jack *et al.*[39]. A total of 32 regions of interest (ROIs) per animal were analyzed for *in vivo* and *ex vivo* samples: 8 slices equally spaced along the rostro-caudal axis with 4 circular ROIs (diameter ~900 μm) drawn in the cortex on each of these slices (2 in each hemisphere). Hypointense spots were manually counted in each ROI, excluding hypointense elements that could be tracked over more than 2 adjacent slices, or that had a tube-like shape, suggesting that they were blood vessels. The area of each hypointense spot was measured in each ROI. Plaque load was determined as the ratio of the total area of hypointense spots over the area of the ROI.

For histological sections, amyloid and iron load were quantified by the same method used for quantification of amyloid load on MR images after digitization of amyloid and iron-stained sections with a Zeiss Axio Scan.Z1 (Oberkochen, Germany) whole slide imaging microscope at a lateral resolution of 0.5 μm.

References

1. Jack, C. R. *et al*. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurol.* **12**, 207–216 (2013).
2. Morris, E. *et al*. Diagnostic accuracy of (18)F amyloid PET tracers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **43**, 374–385 (2016).
3. Maeda, J. *et al*. Longitudinal, quantitative assessment of amyloid, neuroinflammation, and anti-amyloid treatment in a living mouse model of Alzheimer's disease enabled by positron emission tomography. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **27**, 10957–10968 (2007).
4. Klunk, W. E. *et al*. Binding of the positron emission tomography tracer Pittsburgh compound-B reflects the amount of amyloid-beta in Alzheimer's disease brain but not in transgenic mouse brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **25**, 10598–10606 (2005).
5. Snellman, A. *et al*. Longitudinal amyloid imaging in mouse brain with 11C-PIB: comparison of APP23, Tg2576, and APPswe-PS1dE9 mouse models of Alzheimer disease. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **54**, 1434–1441 (2013).
6. Rojas, S. *et al*. *In vivo* evaluation of amyloid deposition and brain glucose metabolism of 5XFAD mice using positron emission tomography. *Neurobiol. Aging* **34**, 1790–1798 (2013).
7. Kuntner, C. *et al*. Limitations of small animal PET imaging with [18F]FDDNP and FDG for quantitative studies in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging* **11**, 236–240 (2009).
8. Poisnel, G. *et al*. PET imaging with [18F]AV-45 in an APP/PS1-21 murine model of amyloid plaque deposition. *Neurobiol. Aging* **33**, 2561–2571 (2012).
9. Hintersteiner, M. *et al*. *In vivo* detection of amyloid-beta deposits by near-infrared imaging using an oxazine-derivative probe. *Nat. Biotechnol.* **23**, 577–583 (2005).
10. Dong, J., Revilla-Sanchez, R., Moss, S. & Haydon, P. G. Multiphoton *in vivo* imaging of amyloid in animal models of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* **59**, 268–275 (2010).
11. Delatour, B., Epelbaum, S., Petiet, A. & Dhenain, M. *In vivo* imaging biomarkers in mouse models of Alzheimer's disease: are we lost in translation or breaking through? *Int. J. Alzheimers Dis.* **2010** (2010).
12. Jack, C. R. *et al*. *In vivo* visualization of Alzheimer's amyloid plaques by magnetic resonance imaging in transgenic mice without a contrast agent. *Magn. Reson. Med.* **52**, 1263–1271 (2004).
13. Borthakur, A. *et al*. *In vivo* measurement of plaque burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* **24**, 1011–1017 (2006).
14. Chamberlain, R. *et al*. Comparison of amyloid plaque contrast generated by T2-weighted, T2*-weighted, and susceptibility-weighted imaging methods in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Magn. Reson. Med.* **61**, 1158–1164 (2009).
15. Dhenain, M. *et al*. Characterization of *in vivo* MRI detectable thalamic amyloid plaques from APP/PS1 mice. *Neurobiol. Aging* **30**, 41–53 (2009).
16. Benveniste, H., Einstein, G., Kim, K. R., Hulette, C. & Johnson, G. A. Detection of neuritic plaques in Alzheimer's disease by magnetic resonance microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 14079–14084 (1999).
17. Nakada, T., Matsuzawa, H., Igarashi, H., Fujii, Y. & Kwee, I. L. *In vivo* visualization of senile-plaque-like pathology in Alzheimer's disease patients by MR microscopy on a 7T system. *J. Neuroimaging Off. J. Am. Soc. Neuroimaging* **18**, 125–129 (2008).
18. Meadowcroft, M. D., Connor, J. R., Smith, M. B. & Yang, Q. X. MRI and histological analysis of beta-amyloid plaques in both human Alzheimer's disease and APP/PS1 transgenic mice. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* **29**, 997–1007 (2009).
19. Falangola, M. F., Lee, S.-P., Nixon, R. A., Duff, K. & Helpern, J. A. Histological co-localization of iron in Abeta plaques of PS/APP transgenic mice. *Neurochem. Res.* **30**, 201–205 (2005).
20. Dhenain, M., Privat, N., Duyckaerts, C. & Jacobs, R. E. Senile plaques do not induce susceptibility effects in T2*-weighted MR microscopic images. *NMR Biomed.* **15**, 197–203 (2002).
21. Zeineh, M. M. *et al*. Activated iron-containing microglia in the human hippocampus identified by magnetic resonance imaging in Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging* **36**, 2483–2500 (2015).
22. Poduslo, J. F. *et al*. Molecular targeting of Alzheimer's amyloid plaques for contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Neurobiol. Dis.* **11**, 315–329 (2002).
23. Higuchi, M. *et al*. 19F and 1H MRI detection of amyloid beta plaques *in vivo*. *Nat. Neurosci.* **8**, 527–533 (2005).
24. Sigurdsson, E. M. *et al*. A non-toxic ligand for voxel-based MRI analysis of plaques in AD transgenic mice. *Neurobiol. Aging* **29**, 836–847 (2008).
25. Wadghiri, Y. Z. *et al*. Detection of amyloid plaques targeted by bifunctional USPIO in Alzheimer's disease transgenic mice using magnetic resonance microimaging. *PloS One* **8**, e57097 (2013).
26. Petiet, A. *et al*. Gadolinium-staining reveals amyloid plaques in the brain of Alzheimer's transgenic mice. *Neurobiol. Aging* **33**, 1533–1544 (2012).
27. Santin, M. D., Debeir, T., Bridal, S. L., Rooney, T. & Dhenain, M. Fast *in vivo* imaging of amyloid plaques using μ-MRI Gd-staining combined with ultrasound-induced blood-brain barrier opening. *NeuroImage* **79**, 288–294 (2013).
28. Dhenain, M., Delatour, B., Walczak, C. & Volk, A. Passive staining: a novel *ex vivo* MRI protocol to detect amyloid deposits in mouse models of Alzheimer's disease. *Magn. Reson. Med.* **55**, 687–693 (2006).
29. Santin, M. D. *et al*. *In vivo* detection of amyloid plaques by Gadolinium-stained MRI can be used to demonstrate the efficacy of an anti-amyloid immunotherapy. *Front. Aging Neurosci.* **8**, 55 (2016).
30. Bertrand, A. *et al*. Micro-MRI study of cerebral aging: *ex vivo* detection of hippocampal subfield reorganization, microhemorrhages and amyloid plaques in mouse lemur primates. *PloS One* **8**, e56593 (2013).
31. Hyare, H., So, P.-W., Brandner, S., Collinge, J. & Parkes, H. G. MRI detection of prion protein plaques in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* **84**, 1498–1499 (2015).
32. Love, S. & Miners, J. S. Cerebrovascular disease in ageing and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **131**, 645–658 (2016).
33. Barakos, J. *et al*. MR Imaging Features of Amyloid-Related Imaging Abnormalities. *Am. J. Neuroradiol* **34**, 1958–1965 (2013).
34. Beckmann, N., Gerard, C., Abramowski, D., Cannet, C. & Staufenbiel, M. Noninvasive magnetic resonance imaging detection of cerebral amyloid angiopathy-related microvascular alterations using superparamagnetic iron oxide particles in APP transgenic mouse models of Alzheimer's disease: application to passive Abeta immunotherapy. *J. Neurosci.* **31**, 1023–1031 (2011).
35. Luo, F. *et al*. Magnetic resonance imaging detection and time course of cerebral microhemorrhages during passive immunotherapy in living amyloid precursor protein transgenic mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **335**, 580–588 (2010).
36. Gyure, K. A., Durham, R., Stewart, W. F., Smialek, J. E. & Troncoso, J. C. Intraneuronal abeta-amyloid precedes development of amyloid plaques in Down syndrome. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **125**, 489–492 (2001).
37. Gouras, G. K. *et al*. Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am. J. Pathol.* **156**, 15–20 (2000).
38. LaFerla, F. M., Green, K. N. & Oddo, S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 499–509 (2007).
39. Jack, C. R. *et al*. *In vivo* magnetic resonance microimaging of individual amyloid plaques in Alzheimer's transgenic mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **25**, 10041–10048 (2005).
40. Nabuurs, R. J. A. *et al*. High-field MRI of single histological slices using an inductively coupled, self-resonant microcoil: application to *ex vivo* samples of patients with Alzheimer's disease. *NMR Biomed.* **24**, 351–357 (2011).
41. Schrag, M., Mueller, C., Oyoyo, U., Smith, M. A. & Kirsch, W. M. Iron, zinc and copper in the Alzheimer's disease brain: a quantitative meta-analysis. Some insight on the influence of citation bias on scientific opinion. *Prog. Neurobiol.* **94**, 296–306 (2011).
42. Wengenack, T. M. *et al*. Regional differences in MRI detection of amyloid plaques in AD transgenic mouse brain. *NeuroImage* **54**, 113–122 (2011).

43. Nabuurs, R. J. A. *et al*. MR microscopy of human amyloid-β deposits: characterization of parenchymal amyloid, diffuse plaques, and vascular amyloid. *J. Alzheimers Dis. JAD* **34**, 1037–1049 (2013).
44. Blanchard, V. *et al*. Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with Abeta deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp. Neurol.* **184**, 247–263 (2003).
45. Jankowsky, J. L. *et al*. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide *in vivo*: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum. Mol. Genet* **13**, 159–170 (2004).
46. Garcia-Alloza, M. *et al*. Characterization of amyloid deposition in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol. Dis.* **24**, 516–524 (2006).
47. Sturchler-Pierrat, C. *et al*. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 13287–13292 (1997).
48. Calhoun, M. E. *et al*. Neuron loss in APP transgenic mice. *Nature* **395**, 755–756 (1998).
49. Davis, J. *et al*. Early-onset and robust cerebral microvascular accumulation of amyloid beta-protein in transgenic mice expressing low levels of a vasculotropic Dutch/Iowa mutant form of amyloid beta-protein precursor. *J. Biol. Chem.* **279**, 20296–20306 (2004).
50. Oddo, S. *et al*. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* **39**, 409–421 (2003).
51. Paxinos, G. & Franklin, K. B. G. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. (Academic Press, 2001).
52. Thomas, C. D. *et al*. Morphological and carbogen-based functional MRI of a chemically induced liver tumor model in mice. *Magn. Reson. Med.* **50**, 522–530 (2003).
53. Berghorn, K. A., Bonnett, J. H. & Hoffman, G. E. cFos immunoreactivity is enhanced with biotin amplification. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc* **42**, 1635–1642 (1994).
54. El Tannir El Tayara, N. *et al*. Age-related evolution of amyloid burden, iron load, and MR relaxation times in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* **22**, 199–208 (2006).
55. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).

Acknowledgements

We thank Mathieu Santin for the MR recording of $APP_{SL}/PS1_{M146L}$ mice and Nachiket Nadkarni for English editing. We thank Medicen (Pôle de compétitivité Ile-de-France, TransAl program), Banque Publique d'Investissement (Romane program) and the France-Alzheimer Association funded this work. We thank the Brain Donation Program of the Brain Bank "GIE NeuroCEB" run by a consortium of Patients Associations: ARSEP (association for research on multiple sclerosis), CSC (cerebellar ataxias), France Alzheimer and France Parkinson, with the support of Fondation Plan Alzheimer and IHU A-ICM for providing the brain samples used in this study.

Author Contributions

C.D., M.V., M.D. designed the study. M.D. coordinated the study. C.D., M.V., K.H., S.A., C.G., V.B., F.P. performed the MRI and histological studies. C.D., M.V., and M.D. wrote the manuscript. C.D., M.V., E.C., and M.D. revised the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-05285-1

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2017

MABS
2017, VOL. 9, NO. 6, 1016–1027
https://doi.org/10.1080/19420862.2017.1342914

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

REPORT

Check for updates

Chemically-defined camelid antibody bioconjugate for the magnetic resonance imaging of Alzheimer's disease

Matthias Vandesquille[a,b,d,*], Tengfei Li[c,e,f,*], Chrystelle Po[a,b,d,#], Christelle Ganneau[a,b], Pascal Lenormand[c], Clémence Dudeffant[e], Christian Czech[g], Fiona Grueninger[g], Charles Duyckaerts[e], Benoît Delatour[e], Marc Dhenain[d,**], Pierre Lafaye[c,**], and Sylvie Bay[a,b]

[a]Institut Pasteur, Unité de Chimie des Biomolécules, Département Biologie Structurale et Chimie, Paris, France; [b]CNRS UMR 3523, 75724, France; [c]Institut Pasteur, CITECH, Plateforme d'Ingénierie des Anticorps, 75724, Paris, France; [d]French Alternative Energies and Atomic Energy Commission, Institute of Biomedical Imaging, Molecular Imaging Research Center, Fontenay-aux-Roses, France; [e]Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06 UMR S 1127, and Inserm, U 1127, and CNRS UMR 7225, and ICM, 75013, Paris, France; [f]Université Paris Diderot-Paris 7, Paris, France; [g]F. Hoffmann-La Roche AG, Pharmaceutical Research and Early Development, NORD DTA, Roche Innovation Center Basel, Basel, Switzerland

ABSTRACT

Today, molecular imaging of neurodegenerative diseases is mainly based on small molecule probes. Alternatively, antibodies are versatile tools that may be developed as new imaging agents. Indeed, they can be readily obtained to specifically target any antigen of interest and their scaffold can be functionalized. One of the critical issues involved in translating antibody-based probes to the clinic is the design and synthesis of perfectly-defined conjugates. Camelid single-domain antibody-fragments (VHHs) are very small and stable antibodies that are able to diffuse in tissues and potentially cross the blood brain barrier (BBB). Here, we selected a VHH (R3VQ) specifically targeting one of the main lesions of Alzheimer's disease (AD), namely the amyloid-beta (Aß) deposits. It was used as a scaffold for the design of imaging probes for magnetic resonance imaging (MRI) and labeled with the contrastophore gadolinium using either a random or site-specific approach. In contrast to the random strategy, the site-specific conjugation to a single reduced cysteine in the *C*-terminal part of the R3VQ generates a well-defined bioconjugate in a high yield process. This new imaging probe is able to cross the BBB and label Aß deposits after intravenous injection. Also, it displays improved r1 and r2 relaxivities, up to 30 times higher than a widely used clinical contrast agent, and it allows MRI detection of amyloid deposits in *post mortem* brain tissue of a mouse model of AD. The ability to produce chemically-defined VHH conjugates that cross the BBB opens the way for future development of tailored imaging probes targeting intracerebral antigens.

Abbreviations: Aß, amyloid-beta; AD, Alzheimer's disease; BBB, blood-brain barrier; CDR, complementarity determining region; DOTA, 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-*N*,*N*,*N*,*N*-tetraacetic acid; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; Gd, gadolinium; IC_{50}, median inhibition concentration; IHC, immunohistochemistry; M_r, relative molecular mass; MRI, magnetic resonance imaging; MS, mass spectrometry; NHS, *N*-hydroxysuccinimide; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SEC, size-exclusion chromatography; TCEP, tris(2-carboxyethyl)phosphine; VHH, variable domain of camelid heavy-chain antibodies

ARTICLE HISTORY
Received 14 February 2017
Revised 2 June 2017
Accepted 12 June 2017

KEYWORDS
Alzheimer's disease diagnosis; amyloid deposits; chemically-defined imaging probe; magnetic resonance imaging; single-domain antibody; site-specific conjugation

Introduction

Molecular imaging based on the design of specific probes is a key method for diagnosis of human diseases. Antibodies are versatile tools for developing future generation of molecular imaging agents. Specific antibodies can be readily obtained to target a wide range of antigens and they can be labeled with various imaging agents, mostly through the primary amines of lysines or the thiol functions of cysteines.[1] However, as these functions are distributed throughout the antibody structure, their derivatization can lead to modification of the antibody properties, notably the antigen recognition by steric hindrance of the complementary-determining regions (CDRs). Moreover, this random conjugation is poorly reproducible and generates non-homogeneous batches of conjugates, thus severely limiting potential clinical development. The generation of well-defined bioconjugates is emerging as a critical issue in molecular imaging research.

To this end, several elegant strategies based on site-specific coupling have been designed to obtain conjugates with preserved biological activity.[2-7] These methods typically introduce far from the binding site a functional group that specifically reacts with the reagent of interest. For example, the use of non-native amino acids with ketones or azides allows strict control over the site and the stoichiometry of the reaction.[8,9] Although

CONTACT Sylvie Bay sylvie.bay@pasteur.fr Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux - 75724 Paris Cedex 15, France.
Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.
*These authors equally contributed to this work.
**These authors equally contributed to this work.
#Present address: ICube - Institut de Physique Biologique - Faculté de Médecine, 4 rue Kirschleger, 67085 Strasbourg Cedex, France.
© 2017 Taylor & Francis Group, LLC

successful, these methods suffer from several limitations in terms of feasibility, scalability, and efficacy. Another common and straightforward strategy consists of introducing a cysteine that can react with various thiol-specific coupling reagents. Along this line, cysteines have been successfully derivatized after being inserted within the sequence[10] or at the *C*-terminal region of different types of antibodies.[11-17] This technique allows the stoichiometric ligation of the reagent on a single site, assuming that no other reduced cysteine is available, and leads to conjugates with unmodified (or nearly unmodified) properties compared to the original antibody.[10-12]

One class of promising antibodies for *in vivo* imaging is camelid single-domain antibody-fragments (VHHs),[18,19] also called nanobodies. VHHs offer numerous advantages for molecular imaging diagnosis. They are very stable, highly specific for the target antigen, and they bind epitopes not recognized by conventional antibodies.[20-22] Their small size (hydrodynamic radius of 2-2.5 nm for a molecular weight around 15 KDa) enables them to diffuse in tissue more efficiently than conventional antibodies.[23,24] VHHs have a limited immunogenicity[25] due to their short half-life and to their high homology with human VH sequences.[26] Moreover they can be easily humanized for clinical studies without loss of their properties.[27] Recent studies have demonstrated that some VHHs are able to cross the blood-brain barrier (BBB).[28-31] Because they lack the Fc fragment, they cannot be exported outside the brain via the FcγR mediated efflux system present at the BBB.[32] Thus, VHHs represent promising scaffolds for the development of imaging nanoprobes, particularly for intracerebral biomarkers.

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of neurodegenerative disease. In the last decade, several molecular imaging probes targeting the two main neuropathological hallmarks of this disease, amyloid deposits and neurofibrillary tangles, have been engineered.[33-37] These agents are based on small radioactive molecules developed for positron emission tomography (PET).[38,39] As an alternative to PET, several magnetic resonance imaging (MRI) contrast agents have been developed for amyloid deposits detection.[40-44] However, these compounds do not penetrate in the brain spontaneously and require the use of invasive techniques (*e.g.*, BBB transient opening using hyperosmotic agents or ultrasound-associated microbubble injections) to reach their target.

Hence, our objective was to obtain a VHH antibody-based probe that crosses the BBB and can be used for MRI of amyloid deposits. One of the key issues for the development of such an agent is the synthesis of chemically-defined conjugates that can provide in a perfectly reproducible manner compounds that may be translated to the clinic. In this context, we selected a VHH antibody (R3VQ) specifically targeting amyloid deposits and we designed gadolinium (Gd)-VHH conjugate MRI probes using either random or site-specific approach (ligation through lysine or cysteine residues, respectively). In contrast to the random coupling, the site-specific thio-addition to a reduced cysteine of R3VQ resulted in a chemically-defined imaging agent. This bioconjugate crossed the BBB and reached its intracerebral target after intravenous injection in mice. Finally, it had high MR relaxivities and was able to efficiently detect amyloid deposits by *in vitro* MRI in mice. Overall, our results describe the synthesis of a high quality VHH-based contrast agent that is functionally intact and crosses the BBB, thus opening future developments of tailored imaging probes targeting intracerebral antigens.

Results

Selection, design and production of anti-amyloid-beta VHHs

To design an imaging agent for the diagnosis of AD by MRI, the first step was to obtain a probe specifically targeting amyloid deposits and containing site(s) for ligation to an MRI contrast agent.

After immunization with a fibrillar synthetic amyloid-beta (Aß)42 peptide, a specific VHH called R3VQ was selected by phage display (Fig. S1A). Soluble R3VQ was then expressed in *E. coli* with a *C*-terminal 6-Histidine tag to allow its purification and immunodetection (Fig. S1B).[45] This VHH, referred as R3VQ-NH_2 **1**, was shown to recognize amyloid deposits by immunohistochemistry (IHC) on brain slices from a mouse model of AD (PS2APP[46]) (Fig. S2). This construct was used for the random conjugation approach involving the formation of amide bond between the primary amines (-NH_2) contained in the sequence (four lysine ε-amines and one *N*-terminal α-amine; all located out of the CDRs) with a *N*-hydroxysuccinimide (NHS) ester compound.

A further R3VQ construct was prepared for the site-specific conjugation. Because this reaction involved a thio-addition with a maleimide reagent, it was necessary to generate R3VQ with a sterically accessible cysteine residue. We thus designed R3VQ-SH **3** containing the original sequence (presence of two canonical cysteines embedded in the sequence near the CDRs) with an additional cysteine residue in the *C*-terminal part. A thrombin cleavage site was introduced between the VHH sequence and the *N*-terminal tag to allow its removal if necessary for further *in vivo* developments (Fig. S1C).

After purification, the two VHHs **1** and **3** (16-20 mg/L of culture) were analyzed by quantitative amino acid analysis (AAA), sodium dodecyl sulfate-PAGE (SDS-PAGE) (Fig. S3), and mass spectrometry (MS) (Fig. 1A and B). These methods confirmed the identity and high level of purity of the two constructs.

Chemical conjugation of anti-Aß VHHs to the contrast agent

Two different strategies were then implemented to link the VHHs with 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-*N*,*N*,*N*,*N*-tetraacetic acid (DOTA)/Gd: the random and the site-specific approaches based on the derivatization of R3VQ-NH_2 **1** (Scheme 1A), and R3VQ-SH **3** (Scheme 1B), respectively.

Random conjugation

This approach involved the conjugation of the DOTA-NHS ester on the primary amines of R3VQ-NH_2 **1**, followed by the chelation of Gd with the DOTA (Scheme 1A). First, a buffer exchange was required after the affinity chromatography to remove the imidazole contained in the elution buffer of **1**, as it will otherwise promote the hydrolysis of the active ester.[1,47]

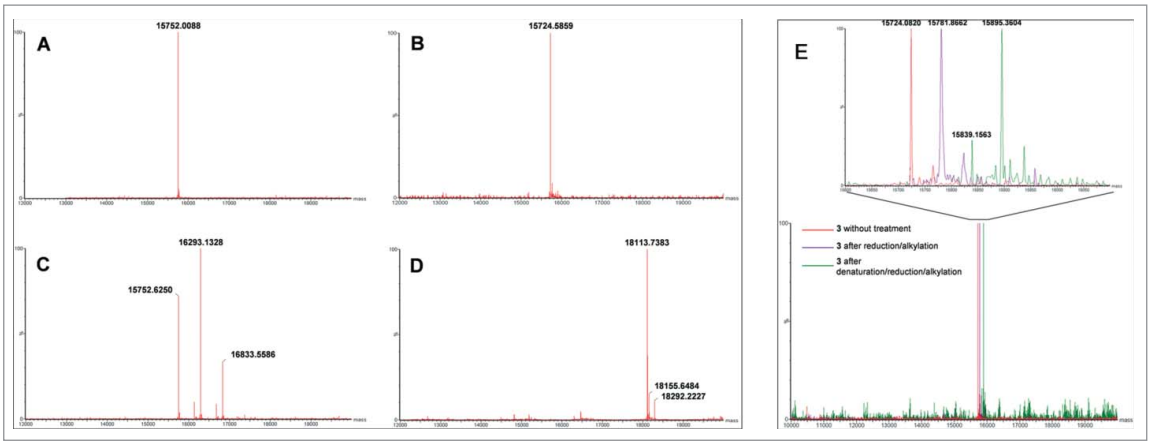
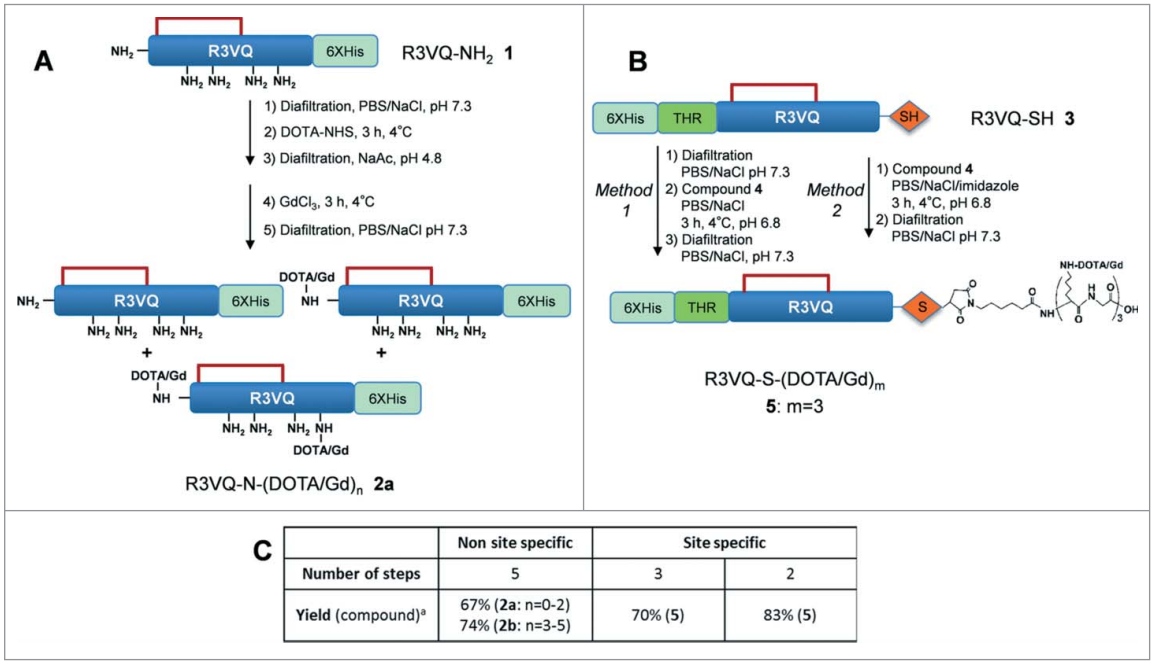


Figure 1. MS analyses of compounds involved in random (A, C) and site-specific approaches (B, D). Analyses (deconvoluted spectra) of starting VHHs **1** (expected M_r = 15,752.3949) (A) and **3** (expected M_r = 15,724.2820) (B), and their respective DOTA/Gd conjugates **2a** (expected M_r = 16,293.0421 $(DOTA/Gd)_1$, 16,833.6735 $(DOTA/Gd)_2$) (C) and **5** (expected M_r = 18,113.0720) (D) showed the polydisperse mixture obtained with **2a** as opposed to the well-defined conjugate **5**. MS analyses of R3VQ-SH **3** showing the presence of a single reduced cysteine and of a stable disulfide bond (E). Analyses (deconvoluted spectra) were realized on **3** without treatment (expected M_r = 15,724.2820), after reduction/alkylation (expected M_r = 15,781.3339 with 1 alkylated cysteine), and after denaturation/reduction/alkylation experiments (expected M_r = 15,895.4378 with 3 alkylated cysteines). The magnified overlay (top) showed the shifts due to alkylation of the thiol functions depending on conditions.

The conjugation was then performed with two conditions leading to different degrees of derivatization. The first condition was implemented with the reaction of 4 fold-molar excess of DOTA-NHS per reactive amino group and led to a polydisperse mixture with 0-2 DOTA per protein. Forced conditions, with higher excess of DOTA-NHS added portionwise, resulted in a mixture with 3-5 DOTA per protein. Following buffer exchange, the chelation of the Gd was performed at pH 5. After removal of the excess Gd reagent and buffer exchange, two mixtures of R3VQ-N-$(DOTA/Gd)_n$ were obtained with different levels of conjugation. The average number of DOTA/Gd (n) was between 0 and 2 (**2a**, Fig. 1C) or 3 and 5 (**2b**, Fig. S4) as determined by MS analyses (respective yield 67% and 74%). Interestingly for **2b**, the heterogeneity was observed at both DOTA and Gd levels since complete chelation could not be achieved despite extra addition of Gd reagent and extended reaction time.

Site-specific conjugation

This approach involved the conjugation of a maleimide-$(DOTA/Gd)_3$ **4** to the extra cysteine of R3VQ-SH **3** (Scheme 1B). The Gd trimer was chosen to optimize the



C

	Non site specific	Site specific	
Number of steps	5	3	2
Yield (compound)[a]	67% (**2a**: n=0-2) 74% (**2b**: n=3-5)	70% (**5**)	83% (**5**)

Scheme 1. Overview of random (A) and site-specific (B) chemical conjugation[a]. [a]Reagents and conditions: (a) Diafiltration, PBS/NaCl, pH 7.3; (b) DOTA-NHS, 3 h, 4 °C; (c). Diafiltration, NaAc, pH 5; (d) $GdCl_3$, 3 h, 4 °C; (e) Compound **4**, PBS/NaCl, 3 h, 4 °C, pH 6.8. The site-specific conjugation (B) was performed with (method 1) or without (method 2) initial buffer exchange. Synthesis of compound **4** is described in Scheme 2. Table C summarizes the number of steps and the overall yield of each approach (include all the synthetic process from the starting protein in the affinity column elution buffer). n = average amount of DOTA/Gd per VHH (randomly distributed on different sites). m = exact amount of DOTA/Gd per VHH (located on a single site).

relaxometric parameters, essential for the detection sensitivity. The synthesis of **4** was accomplished on solid-phase using Fmoc chemistry, DOTA lysine building blocks and (1H-9-azabenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU) / diisopropylethylamine (DIEA) as the coupling reagent (Scheme 2). Glycine residues were introduced as spacers between each DOTA motif. After cleavage from the resin, the DOTA-peptide intermediate was chelated with Gd at pH 5. The purification on reverse phase afforded **4** with an overall yield of 64%, a purity greater than 95% (Fig. S5A), and the expected molecular weight together with the typical isotopic distribution (Fig. S5B).

For the thio-addition with the maleimide compound **4**, it was essential to check the redox state of the two canonical cysteines as well as of the extra cysteine of the VHH sequence. To this end, MS analyses were performed on R3VQ-SH **3** after reduction/alkylation experiments, with or without denaturation (Fig. 1E). The alkylation of **3** in the presence of iodoacetamide after reduction by tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) led to a shift of 57 Da of the observed M_r, meaning that only one cysteine was alkylated. Notably, mild reduction conditions allowed to reduce the intermolecular dimer of R3VQ-SH **3** (progressively formed upon storage), and to recover the single reduced cysteine, while keeping the disulfide bridge intact (see Fig. S6 for HPLC, size-exclusion chromatography (SEC) and MS analyses). By contrast, strong denaturation with RAPIGEST at 55 °C before reduction allowed disruption of the internal disulfide bond and led to alkylation of the three cysteines by iodoacetamide in the same conditions, as showed by a shift of 171 Da of the major MS peak. The minor di-alkylated derivative was also observed (+114 Da). Interestingly, complete alkylation could not be achieved either with longer reaction time or stronger denaturation conditions, in agreement with previous data showing the high stability of VHHs.[48,49]

Altogether, these results confirmed the high stability of the internal disulfide bond and the accessibility of a unique reduced cysteine for site-specific conjugation after a mild reduction.

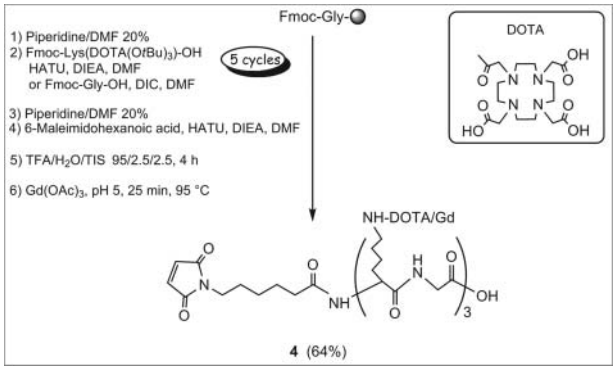
Conjugation of compound **4** with R3VQ-SH **3** was first realized after a buffer exchange in phosphate-buffered saline (PBS)/NaCl resulting in the conjugate **5** with a yield of 70%. Side-reaction between maleimide groups and imidazole (contained in the initial buffer) was expected as previously reported by several groups showing the histidine side-chain alkylation.[50,51] Nonetheless, further investigation revealed that **4** could be directly conjugated to **3** in the affinity column elution buffer, with limited excess of the maleimide reagent and despite a large molar excess of imidazole. After a final diafiltration to remove the imidazole and excess reagent, the chemically-defined conjugate R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$ **5** was obtained with a yield of 83% and a high quality, as demonstrated by MS (Fig. 1D), SDS-PAGE (Fig. S3), RP-HPLC (Fig. S6A) and SEC (Fig. S6B) analyses.

Functional characterization of the conjugates

Binding to the target in vitro *and* in vivo

To assess the functional properties of the compounds, IHC was performed on brain tissue sections from PS2APP mice that have extensive Aß deposition[46] and wild-type amyloid-free mice. Similar immunostaining of amyloid plaques was always detected by an anti-His-tag secondary antibody when brain sections from PS2APP mice were incubated with different R3VQ-based compounds (Fig. 2 and S2). As control experiments, anti-His-tag immunostaining was evaluated on brain sections from PS2APP mice that were not incubated with R3VQ-based compounds. A slight non-specific labeling of some cells could be detected, but definitely not associated with any amyloid plaques (Fig. S7A). Brain sections from PS2APP mice were similarly evaluated after incubation with a non-relevant VHH targeting pTau epitopes,[45] a major constituent of neurofibrillary tangles that are absent in these mice. No staining was observed, whether the irrelevant VHH was conjugated or not (Fig. S7B and C). Finally, brain tissues from wild-type amyloid-free mice were incubated with **5** (Fig. S7D) or with a non-relevant VHH targeting pTau epitopes (Fig. S7E and F). Anti-His-tag immunostaining also did not show any specific staining. These results confirmed the ability of R3VQ compounds to specifically recognize Aß deposits in the brain of PS2APP mice.

To evaluate the binding properties of the VHHs and their conjugates in more detail, we investigated their ability to bind Aß40 peptide by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Table 1). Aß40 was preferred to Aß42 because 1) both peptides are similarly recognized by R3VQ[45] and 2) the higher propensity of Aß42 to aggregate led to inconsistent results.[22,52]



Scheme 2. Synthesis of maleimide-$(DOTA/Gd)_3$ 4[a]. [a]Reagents and conditions: (a) piperidine/DMF 20%; (b) Fmoc-Lys(DOTA(O*t*Bu)$_3$)-OH, HATU, DIEA, DMF or Fmoc-Gly-OH, DIC, DMF; (c) 6-Maleimidohexanoic acid, HATU, DIEA, DMF; (d) TFA/H_2O/TIS, 95/2.5/2.5, 4 h; (e) $Gd(OAc)_3$, pH 5, 25 min, 95 °C.

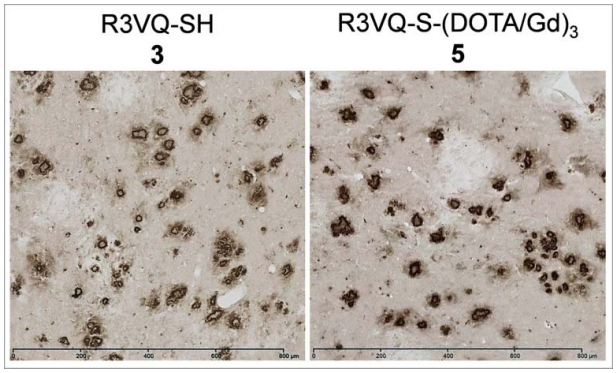


Figure 2. Immunostaining of amyloid deposits by R3VQ-SH **3** (left) and R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$ **5** (right) on brain tissue from mouse model of amyloidosis, showing the preserved properties of the site-specific conjugate (see Figure S7 for IHC controls).

Table 1. ELISA evaluation of antigen binding properties against Aß40 for R3VQ-NH_2 **1**, R3VQ-SH **3** and their respective conjugates **2a**, **2b**, and **5**, highlighting the intact antigen recognition for the site-specific conjugate.

Compound	IC_{50} (nM)[a]
1	16
2a	24
2b	50
3	18
5	19

[a]IC_{50} values were determined by measuring the amount of soluble Aß40 peptide able to give 50% inhibition of VHH binding to immobilized Aß40.

Comparison of the median inhibition concentration (IC_{50}) of the two VHHs **1** and **3** showed no significant difference (16 *vs* 18 nM, respectively) indicating that the addition of a cysteine did not affect the affinity of the VHH. By contrast, the corresponding conjugates showed a marked difference. The random conjugation induced an increase of the IC_{50} related to the number of DOTA/Gd linked to the VHH (24 nM for **2a** and 50 nM for **2b**), whereas the site-specific method left the IC_{50} value unaffected (19 nM for **5**).

Considering the drawbacks of the random approach, further investigation was focused on the well-defined compound **5**. We assessed the capacity of **5** to cross the BBB *in vivo*, a prerequisite to reach its intracerebral target (*i.e.*, amyloid deposits) and to allow future *in vivo* imaging assays. PS2APP mice were injected in the tail vein with PBS or **5**. Mice were sacrificed after 4 hours, and IHC were realized with an anti-His-tag secondary antibody. By contrast to the mice injected with PBS, a specific labeling of amyloid deposits was detected in those injected with the conjugate **5** (Fig. 3). Also, comparison of anti-His-tag immunostaining of PS2APP brain tissue obtained after intravenous administration of **5** or after direct incubation of an entire brain hemisphere with **5** showed similar detection of amyloid deposits in both conditions (Fig. S8). These results demonstrated the ability of the R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$ **5** to cross the BBB, to diffuse in the brain parenchyma and to target Aß lesions after *in vivo* injection.

MR relaxometric parameters of R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$ 5

The main determinants of the contrast in an MR image are the proton relaxation times T1 and T2. MR contrast agents modulate these relaxation parameters to improve the contrast on the images, and contrast agents are characterized by their relaxometric parameters r1 and r2, which refer to the amount of increase in 1/T1 and 1/T2, respectively, per millimolar of agent.[53] We thus determined the T1-relaxivity (*i.e.*, r1) and T2-relaxivity (*i.e.*, r2) of the reagent **4** and the conjugate **5** at 1.4, 7 and 11.7 Tesla, and compared the results to those obtained with a widely used clinical contrast agent (*i.e.*, DOTA/Gd, DOTAREM). Results are presented in Fig. 4 (for detailed results see Fig. S9).

The r1 and r2 relaxivities of **4** were 1.6 to 2.7 times higher than those of DOTA/Gd in H_2O. Analysis of the r1 and r2 relaxivities of the final conjugate **5** showed values 3.7 to 4.6 times higher than relaxivities of **4**, and 6.8 to 10.1 times higher than those of DOTA/Gd.

MRI visualization of amyloid deposits following in vitro *incubation with R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$ 5*

Finally, we investigated the efficiency of the imaging agent **5** to detect amyloid deposits by MRI. Cerebral hemispheres of wild-type (amyloid-free) mice were incubated with **5** and hemispheres from PS2APP were incubated with **5** or PBS overnight. Then, hemispheres were rinsed for 48 hours and imaged with a 25 μm isotropic resolution (field of view: 12.8 × 12.8 × 6.4 mm^3) on an 11.7 Tesla spectrometer (Fig. 5A, left frames). The density of hypointense spots detected on MR images was increased sevenfold in PS2APP hemispheres incubated with **5** compared to PS2APP hemispheres incubated in PBS (50.97 ± 8.53 *vs* 7.32 ± 0.11 spots/mm^2), and by 33 times compared with hemispheres from wild-type mice incubated with **5** (50.97 ± 8.53 *vs* 1.53 ± 0.04 spots/mm^2) (Fig. 6). Following MRI, brain tissues were processed by IHC with the reference anti-amyloid antibody 4G8 and an anti-His-tag antibody. The presence of amyloid deposits in PS2APP brains was indeed confirmed whereas no deposits were observed in wild-type mice (Fig. 5A, middle frames). To validate the specificity of

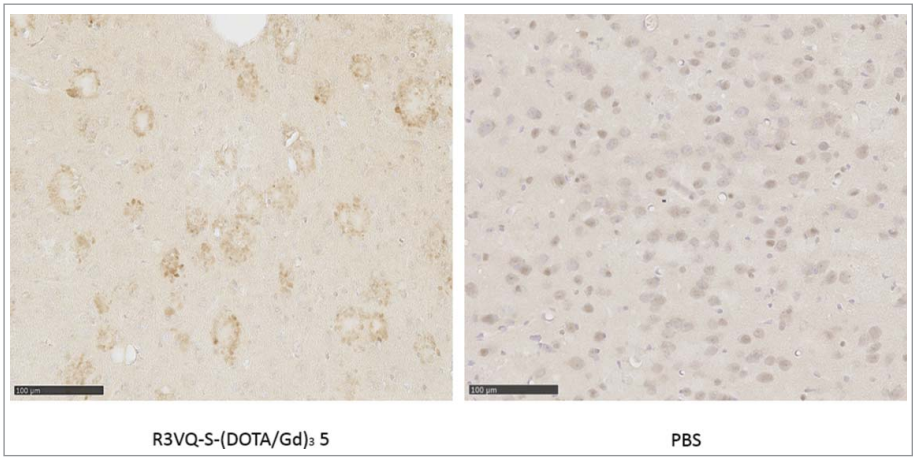


Figure 3. Immunostaining of amyloid plaques after intravenous injection of R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$ **5**, highlighting its ability to cross the BBB *in vivo*. PS2APP mice (15 month-old) were injected in the tail vein with compound **5** at 50 mg/kg (left panel, n = 3) or with PBS (right panel, n = 2), and sacrificed after 4 hours. IHC were realized with an anti-His-tag antibody. Whereas only unspecific background was observed in mice brains injected with PBS, a specific labeling of amyloid deposits was detected in those injected with **5** thus confirming the ability of the conjugate to cross the BBB after *in vivo* injection.

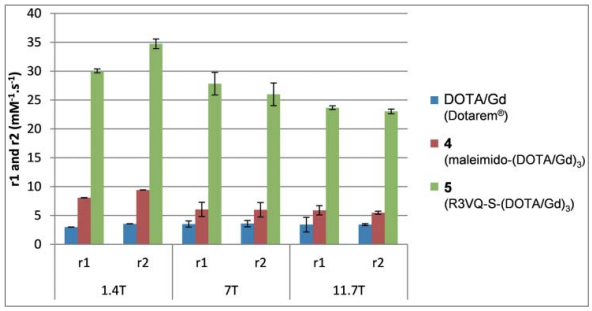


Figure 4. MR relaxometric parameters at three different magnetic fields. Measures of r1 and r2 (normalized per mM of Gd) showed the high relaxivities of the contrast agent R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ **5** that reach values until 10 times higher than those of the reference contrast agent DOTAREM. Triplicate measures of r1 and r2 (in $mM^{-1}.s^{-1}$) are expressed as mean +/− SEM (detailed values in Fig. S9).

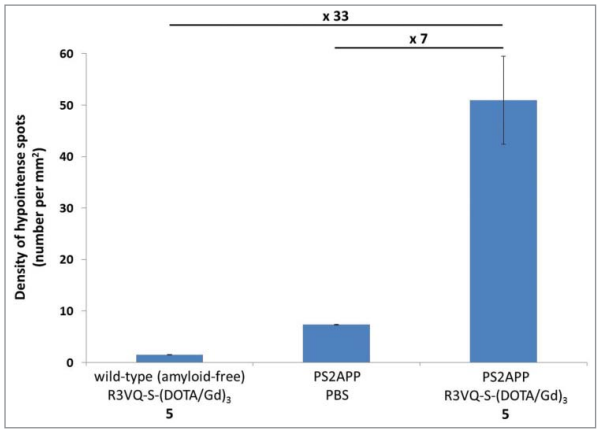


Figure 6. Quantification of hypointense spots detected on MR images. Measures from MR images obtained on *post mortem* brain tissues (Fig. 5A) confirmed the major increase in amyloid plaques detection in PS2APP brains incubated with the R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ **5** compared to the controls, *i.e.*, PS2APP brains incubated with PBS or wild-type amyloid-free brains incubated with R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ **5**.

the MRI labeling with **5** in PS2APP, MR images were registered with 4G8 (Fig. 5B, middle frame) and anti-His-tag (Fig. 5B, right frame) sections. The numerous hypointense spots observed on MR images were co-localized with amyloid deposits detected by 4G8 IHC, and with the conjugate **5** labeled by anti-His-tag (Fig. 5B, red arrows). PS2APP brains incubated in PBS did not show hypointense spots on MRI and, on histological sections, their amyloid plaques were not labeled by anti-His-tag (Fig. 5A, PS2APP/PBS frames). Hemispheres of wild-type mice devoid of amyloid deposits incubated with **5** did not display any hypointense spots on MRI nor any spots labeled with anti-His-tag on histological sections (Fig. 5A, Wild-type/**5** frames). Taken together, these results demonstrated a strong increase of amyloid plaque detection in MR images of PS2APP brains following incubation with **5**.

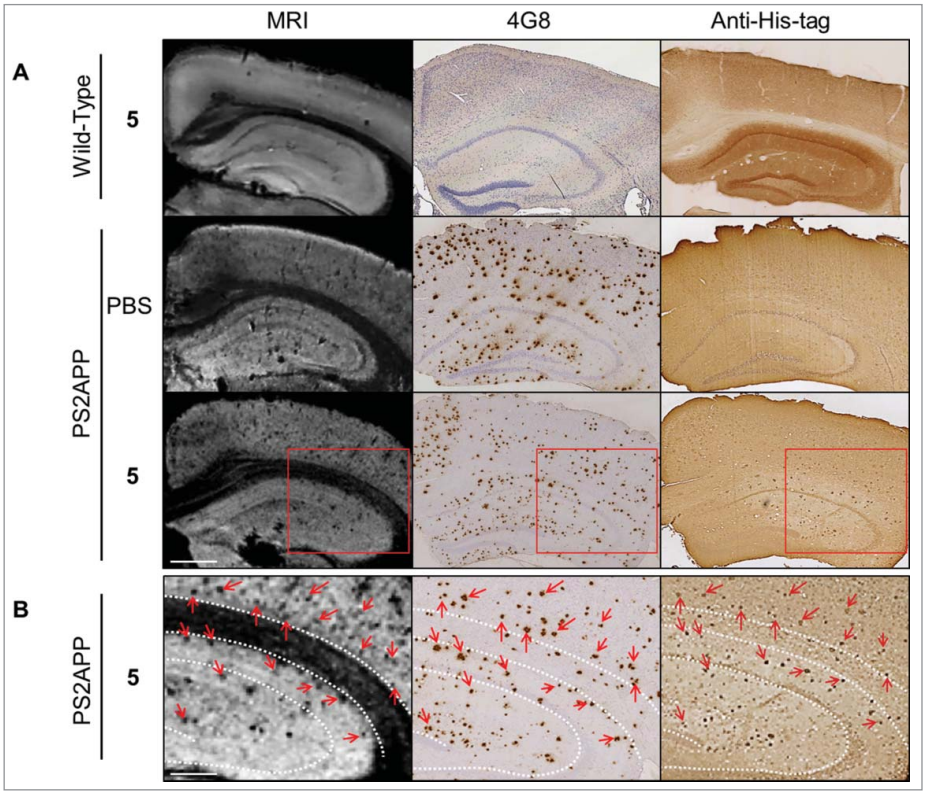


Figure 5. *In vitro* MRI revelation of amyloid deposits by the contrast agent R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ **5**. (A) PS2APP or wild-type (amyloid free) brains were incubated with PBS or **5** before MRI acquisitions (left frames). IHC were realized with 4G8 antibody as a reference anti-beta amyloid antibody (middle frames), or an anti-His-tag antibody to reveal the amyloid deposits labeled by the contrast agent **5** (right frames). MRI acquisitions were performed with a 25 μm isotropic resolution (n = 2/group). Red squares show the magnified areas used for the registration. Scale bar = 500 μm. See Fig. 6 for hypointense spots quantification. (B) Registration was done between MRI, 4G8 and anti-His-tag IHC on PS2APP tissues incubated with **5**. Hypointense spots on MR images correspond to amyloid deposits labeled by **5** on the anti-His-tag IHC and by 4G8 (red arrows). White dotted lines represent landmarks that delimited the corpus callosum and the hippocampus. Scale bar = 250 μm.

Discussion

High-yield chemoselective conjugation provides a chemically-defined VHH-based imaging probe

One of the key issues for the development of antibody-based probes is the synthesis of perfectly defined conjugates, which allows stringent quality control. We designed new imaging probes by linking an Aß-specific VHH (R3VQ) to the MR contrastophore Gd through a DOTA chelate following two strategies: the random conjugation to the primary amines of the VHH and the site-specific conjugation to a cysteine introduced in the *C*-terminal part of the VHH.

We found that the random approach produced variable batches, which are difficult to reproduce and may lead to unreliable results due to the variable amount of DOTA/Gd. For example, the obtained unlabeled and over-labeled VHHs can result in a saturation effect, in a modification of the VHH properties for its target, or in a significant impact on their pharmacokinetics, as recently shown with a near-infrared fluorescent VHH.[54] In our case, the functional properties of the conjugate mixtures were indeed affected compared to the starting VHH, with a significant decrease of the Aß recognition when one to two DOTA/Gd are attached. This effect could be due to steric hindrance in the vicinity of the antigen recognition site, which increased when more amino groups are derivatized.[55]

In contrast, the site-specific conjugation led to a well-defined homogeneous compound labeled uniquely in its *C*-terminal part with a defined amount of contrast agent (*i.e.*, three Gd per VHH). This represents a critical advantage for consistent studies and for translation to clinic. Indeed, antibody-based drugs have attained tremendous success in the past decade, and several reports have highlighted the importance of their quality control.[56,57] It is worth noting that we implemented the site-specific conjugation in an easy and a high-yield optimized process. To our knowledge, one-pot thio-addition of maleimide compounds to a protein directly eluted from the affinity purification column has never been described before. This novel strategy simplifies the process and improves the overall yield of the resulting conjugate.

Our synthetic approach is fully convergent since the preformed Gd building block is tethered to the VHH at the last step. Taking advantage of suitably functionalized synthons, it can therefore facilitate the generation of a variety of conjugates, while enabling the fine tuning of their composition (*e.g.*, stoichiometry of the contrastophore, nature of the spacer). The chemical structures can be even more diversified by using other VHH of interest as the scaffold, as recently shown by our group with an anti-Tau VHH targeting neurofibrillary tangles.[45] The conjugates and their modular construction can be readily designed according to their downstream application.

R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ imaging probe crosses the BBB and binds to amyloid deposits in vivo

We then focused on the well-defined R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ conjugate and evaluated its functionality. Development of molecular imaging probes for intracerebral targets remains challenging. Antibodies are valuable tools for developing such specific probes, but their penetration in the central nervous system is prevented by the BBB. In the case of AD, a few antibody-derived small proteins (*i.e.*, VHHs and affibodies) have been proposed to target Aβ peptides. Most of them recognize only the dimeric or oligomeric forms of the peptide and thus are mainly described to block amyloid deposits formation.[22,28,58-62] To our knowledge, only a few VHHs directed against human parenchymal amyloid deposits have been reported,[30,31] with one described as able to efficiently cross the BBB *in vitro*.[31]

Although several studies have also shown that several VHHs are able to penetrate into the brain *in vivo*,[28,29,45] BBB crossing by VHH remains highly variable.[30,63] Here, we show that R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ binds the Aß peptide with high specificity and sensitivity and labels amyloid deposits on brain section of a mouse model of amyloidosis. Furthermore, we demonstrated its ability to cross the BBB and to label amyloid deposits after intravenous injection in mice. This result is consistent with our recent publication showing, by *in vivo* two-photon imaging and *ex vivo* IHC, that R3VQ conjugated to a fluorescent label does cross the BBB.[45] Knowing that the DOTAREM (*i.e.*, the monomer building block of compound **4**) does not cross the BBB by itself,[40] all our results suggest that the R3VQ allows the contrast agent of interest to penetrate at least partially into the brain. Hence, contrary to previously described Aß-targeting VHH, affibodies and conventional antibody-based strategies, R3VQ crosses the BBB on its own, rapidly diffuses into the brain and reaches its intracerebral target *in vivo*. It remains that the BBB penetration by VHH cannot be generalized, may arise from different mechanisms and surely depends on the considered VHH.

R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ contrast agent has high relaxivities and detects amyloid deposits in brain tissue

A contrast agent is characterized by relaxivity parameters r1 and r2 that reflect its potential to actually modify contrast on MR images. Interestingly, the r1 and r2 relaxivities of R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ **5** reached values up to 5 times higher than those of the non-conjugated synthon **4** and 10 times higher than those of a clinically used contrast agent (*i.e.*, DOTAREM). Notably, as relaxivity is expressed relative to the Gd concentration, and considering that each VHH is linked to three Gd, the overall relaxometry of R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ **5** was up to 30 times higher than that of DOTAREM. Two hypotheses can explain this dramatic increase in r1 and r2: 1) an increase in the size and rigidity of the contrast agent resulting from the conjugation, which probably led to the reduced rotational correlation time and thus an increased relaxivity; and 2) the capturing of water molecules within the VHH vicinity, which led to the increased number of outer sphere-coordinated water molecules.

In our last experiment, we evaluated the potential of R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ **5** to reveal amyloid deposits by MRI. Whole brains from transgenic mouse model of amyloidosis (PS2APP) were incubated with the imaging probe or PBS, and were then imaged by MRI at 11.7 Tesla with a high isotropic resolution of 25 μm. Control images of PS2APP brains incubated in PBS showed a small number of hypointense

lesions, probably due to blood vessels and amyloid deposits containing iron as previously described.[64-66] MR images of brains incubated with R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ **5** demonstrated a significant increase in the number of detected hypointense spots, 7 times higher than in PS2APP brains incubated with PBS. Registration of MR images with 4G8-stained histological sections confirmed that the spots corresponded to amyloid deposits. A second registration with histological sections stained with an anti-His-tag antibody confirmed that the MR hypointense spots corresponded to R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ **5** accumulation. Some mismatch between hypointense spots, anti-His-tag and 4G8-positive labels could be explained by methodological discrepancies due to limitations in the precision of co-registration resulting from the different thickness of MRI and IHC sections (25 μm versus 5 μm, respectively) and from tissue deformation associated to different histological steps (fixation, paraffin embedding, brain cutting). Moreover, 4G8 antibody was incubated directly on slices, whereas the R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ **5** was incubated on the whole brains. Hence, diffusion or concentration differences could explain that fewer deposits or fainter staining were visible following anti-His-tag IHC. Nevertheless, the majority of the amyloid deposits labeled by the anti-His-tag antibody were visible on the MR images. Finally, images acquired on wild-type brains incubated with the imaging probe did not show any contrast modification, thus confirming the absence of unspecific labeling on MR images. This experiment thus shows that the imaging agent **5** is able to readily diffuse in tissue, which is consistent with previous reports,[23,24] and that it specifically modifies the contrast of amyloid deposits on MR images, allowing their visualization and thus opening new perspectives for *in vivo* imaging.

Developing sensitive contrast agents for MRI detection of amyloid deposits is very challenging. Further development of R3VQ-Gd-based reagent for *in vivo* imaging applications still relies on several optimizations. New synthon design is possible to further improve the relaxometric properties of the conjugate, in particular by increasing its DOTA/Gd content, or by constraining its structure *i.e.*, reducing the rotational correlation time of the contrast agent. One can also improve its ability to cross the BBB, for example by modulating its basic isoelectric point.[29] After its penetration in the brain, the increase in the local concentration of the VHH-based probe around amyloid deposits, due to its affinity for the plaques, is also a critical parameter that could be further improved. Finally, toxicity and pharmacokinetic properties should be taken into account. Considering the stability of the chelate, along with the reported short half-life of VHHs (around 12 min), the free gadolinium toxicity should not be an issue.[67-70] The pharmacokinetic profile of R3VQ-S-(DOTA/Gd)$_3$ **5** will allow optimization of the injected dose and the time-frame according to its clearance.

In conclusion, our study describes the design of a chemically-defined bioconjugate combining the properties of 1) an antigen-specific VHH that crossed the BBB, and 2) a Gd contrast agent. We highlight the advantages of the site-specific labeling that provides, in an easy two-step process, a high quality imaging probe along with intact functional properties. All these parameters are essential when considering the translation to clinic, which requires highly specific and well-defined probes. Our imaging agent spontaneously crossed the BBB, reached its intracerebral target *in vivo*, and also displayed high relaxivities allowing the detection of amyloid deposits *in vitro* by MRI. The efficacy, the versatility and the robustness of our synthetic strategy, together with the unique properties of site-specific engineered VHHs opens the way for future development of tailored VHH-based imaging probes targeting intracerebral antigens.

Materials and methods

Production of R3VQ, R3VQ-NH$_2$ 1 and R3VQ-SH 3

The three proteins were prepared as previously described.[45] Both G_3S spacer and *C*-terminal dipeptide SA improved the expression of the VHH **3**. The VHHs **1** and **3** were purified by immobilized metal affinity chromatography (HITRAP charged with Ni^{2+}). After extensive washings with PBS containing 300 mM NaCl (PBS/NaCl) and 0.1% Triton X114 (100 column volumes), and then PBS/NaCl (100 column volumes), they were eluted in PBS/NaCl buffer containing 500 mM imidazole (PBS/NaCl/imidazole). All VHHs reached high production yield (16-20 mg/L of culture) and low level of endotoxin (< 0.5 EU/mL, as measured by the Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate assay following the manufacturer's instructions (Lonza)).

R3VQ-NH$_2$ **1**

AAA: Ala 15.8 (16), Arg 9.1 (9), Asp+Asn 13.4 (13), Glu+Gln 16.0 (15), Gly 13.4 (14), His 5.7 (7), Ile 3.1 (3), Leu 8.4 (8), Lys 4.1 (4), Phe 4 (4), Pro 6.1 (7), Ser 11.3 (13), Thr 10.0 (11), Tyr 4.8 (5), Val 11.1 (11).

MS: 15,752.0088 ($C_{681}H_{1053}N_{209}O_{216}S_4$ calcd 15,752.3949)

R3VQ-SH **3**

AAA: Ala 16.1 (16), Arg 10.2 (10), Asp+Asn 13.6 (13), Glu+Gln 11.9 (11), Gly 19.1 (20), His 6.0 (7), Ile 3.1 (3), Leu 8.5 (8), Lys 2.2 (2), Phe 4 (4), Pro 4.3 (4), Ser 15.5 (18), Thr 9.5 (10), Tyr 4.8 (5), Val 12.9 (12).

MS: 15,724.5859 ($C_{671}H_{1041}N_{213}O_{217}S_5$ calcd 15,724.2820).

Synthesis of R3VQ-N-(DOTA/Gd)$_n$ 2a and 2b

The R3VQ-NH$_2$ **1** eluted from the affinity column was dialyzed in PBS/NaCl. 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid mono (*N*-hydroxysuccinimide ester) (DOTA-NHS) (274 μg, 4 eq. relative to amino group) dissolved in PBS/NaCl (120 μl) was added to **1** (480 μL, 0.6 mg/mL) and the solution was stirred at room temperature. Aliquots (10 μL) were withdrawn every 15 min, diluted with 100 mM Tris buffer pH 7.3 (90 μL) and analyzed by HPLC/MS to monitor the reaction progress. After 3 h, the solution was cooled to 4 °C and the buffer was exchanged to 0.4 M Na acetate buffer pH 5 by using VIVASPIN 500 centrifugal filter device (3,000 MWCO PES) (Sartorius). The resulting DOTA-VHH conjugate (480 μL) was added with $GdCl_3$ (149 μg, 45 eq. relative to average DOTA groups) in the same buffer (5 μL). The solution was stirred at room temperature for 2.5 h. The buffer was exchanged to PBS/NaCl at 4 °C with the same VIVASPIN device as above and the solution was concentrated to afford the R3VQ-N-(DOTA/

$Gd)_{0\text{-}2}$ conjugate **2a** (105 μL, 1.48 mg/mL). The overall yield is 67%. The conjugate **2b** was obtained using the same protocol except that DOTA-NHS was added to **1** portionwise (0.5 eq every 45 min, total of 5.5 eq. relative to amino groups). The solution was stirred at room temperature for 8 h. The overall yield is 74%.

R3VQ-N-$(DOTA/Gd)_{0\text{-}2}$ **2a**

AAA: Ala 16.0 (16), Arg 10.0 (9), Asp+Asn 12.8 (13), Glu+Gln 15.0 (15), Gly 13.8 (14), His 6.7 (7), Ile 3.0 (3), Leu 8.2 (8), Lys 4.5 (4), Phe 4 (4), Pro 8.5 (7), Ser 10.5 (13), Thr 10.1 (11), Tyr 4.8 (5), Val 11.1 (11).

MS: 16,293.1328 ($(DOTA/Gd)_1$: $C_{697}H_{1076}N_{213}O_{223}S_4Gd$ calcd 16,293.0421)

16,833.5586 ($(DOTA/Gd)_2$: $C_{713}H_{1099}N_{217}O_{230}S_4Gd_2$ calcd 16,833.6735)

Synthesis of R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$ 5

To study the redox state of the VHH cysteines, R3VQ-SH **3** was submitted to a reduction (157 eq. of TCEP, 25 °C, 1 h, pH 8.2) followed by an alkylation (78 eq. of iodoacetamide, 25 °C, 1 h, pH 7.5) in an 0.1 M ammonium hydrogen carbonate buffer pH 8.2, with or without previous denaturation (RAPIGEST SF 0.1%, 55 °C, 1 h, pH 8.2, according to manufacturer's protocol).

The R3VQ-SH **3** eluted from the affinity column was dialyzed in PBS/NaCl. Due to the tendency of R3VQ-SH **3** to dimerize, a mild reduction step was introduced before the synthesis of **5** (5 eq. of TCEP, 30 min at 4 °C). **4** (1.35 mg, 3 eq. per VHH) in aqueous solution (135 μL) was added to the reduced R3VQ-SH **3** (1.5 mL, 2 mg/mL in PBS/NaCl) and the solution was stirred at 4 °C for 3 h at pH 6.8. The solution was then diafiltered using VIVASPIN 2000 centrifugal filter device (3,000 MWCO PES) (Sartorius). 1 mL of **5** (2.36 mg/mL) was obtained with a yield of 70%. The same reaction was also performed directly in the affinity column elution buffer (PBS/NaCl/imidazole), and gave an 83% overall yield.

AAA: Ala 14.9 (16), Arg 10.2 (10), Asp+Asn 12.2 (13), Glu+Gln 11.1 (11), Gly 24.6 (23), His* (7), Ile 3.1 (3), Leu 8.5 (8), Lys 11.7* (5), Phe 4 (4), Pro 4.8 (4), Ser 14.9 (18), Thr 9.1 (10), Tyr 5.0 (5), Val 12.6 (12). [*His cannot be determined due to co-elution with ammonium. Lys is overestimated due to co-elution with the maleimido derivative in the conditions of the analysis.]

MS: 18,113.7383 ($C_{753}H_{1168}N_{235}O_{248}S_5Gd_3$ calcd 18,113.0720).

Evaluation of the MRI properties of the contrast agents

Briefly, longitudinal and transversal relaxivities (r1 and r2) of the contrast agents as well as of a commercial solution of Gd (DOTA/Gd, DOTAREM, Guerbet, France) were assessed at 1.4 Tesla (MINISPEC mq60, Bruker, Billerica, MA), 7 Tesla (Agilent, USA) and 11.7 Tesla (Bruker, Germany). The r1 and r2 were determined from linear fits of R1 (*i.e.*, 1/T1) and R2 (*i.e.*, 1/T2) as a function of contrast agent concentration obtained by serial dilution of a stock solution in deionized water (in triplicate, from 0 to 5 mM of Gd for DOTAREM and **4**, and from 0 to 1 mM of Gd for **5**) by using the following equations:

$$\left(\frac{1}{T1}\right)\text{obs} = \left(\frac{1}{T1}\right)\text{d} + \text{r1}[\text{M}] \quad (1)$$

$$\left(\frac{1}{T2}\right)\text{obs} = \left(\frac{1}{T2}\right)\text{d} + \text{r2}[\text{M}] \quad (2)$$

where $(\frac{1}{T1})$obs and $(\frac{1}{T2})$obs are the observed relaxation rate, $(\frac{1}{T1})$d and $(\frac{1}{T2})$d are the water proton relaxation rate of the pure water solvent, and [M] is the total concentration of the contrast agent, respectively.

Detailed description of the used parameters is available in Supporting Information.

Animals and brain tissue

Brain tissues were obtained from female double transgenic PS2APP mice (overexpressing mutant forms of human presenilin 2 and human ß-amyloid precursor protein, Tg(Thy1-APPSwe)71Jgr x Tg(Prnp-PSEN2*N141I)30Jgr, see also http://www.alzforum.org/research-models/ps2app-ps2n141i-x-appswe, n = 10),[46] and their wild-type littermates (n = 5). For the *in vitro* experiments, mice aged 18-19 months were deeply anesthetized (sodium pentobarbital, 100 mg/kg), and transcardially perfused with 0.1 M PBS pH 7.4 followed by 4% buffered paraformaldehyde (Sigma Aldrich, Germany). After perfusion, brains were extracted, post-fixed overnight in the same fixative at 4 °C and preserved in PBS/NaCl buffer containing 0.2% of sodium azide until MRI or IHC procedures. For the *in vivo* experiments, 13-14 months PS2APP mice were injected in the tail vein with R3VQ-S-$(DOTA/Gd)_3$ at a dose of 50 mg/kg (n = 3) or with PBS (n = 2). Mice were sacrificed after 4 hours and IHC was performed on brain sections as described below. All animal experiments were conducted in accordance with the European Communities Council Directive (2010/63/UE). Animal care was in accordance with institutional guidelines and experimental procedures were approved by local ethics committees (authorizations 12-062; ethic committee CETEA-CEA DSV IdF).

In vitro *procedure for MRI acquisition*

The ability of **5** to detect amyloid deposits by MRI was tested with an *in vitro* procedure on *post mortem* brains from PS2APP male mice and their wild-type littermate (PS2APP incubated with **5**: n = 3; PS2APP incubated with PBS + Triton (control): n = 2; wild-type incubated with **5**: n = 2).

Hemispheres were incubated with **5** (300 μL at 5 mg/mL in PBS + 0.2% Triton) or PBS + 0.2% Triton overnight, followed by several wash-out cycles for at least 48 hours before MR images acquisition. These hemispheres were all imaged on an 11.7 Tesla (Bruker, Germany) spectrometer interfaced with a console running PARAVISION 6 and equipped with a rodent gradient insert of 760 mT/m used for emission, and a cryoprobe (Bruker, Germany) was used for reception. Images were acquired with a 3D-FLASH sequence (TR = 40 msec, TE = 15 msec, Nex = 4, bandwidth = 37.5 kHz, FOV = 12.8 × 12.8 ×

6.4 mm^3, Mtx = 512 × 512 × 256, resulting in a 25 μm isotropic resolution). Hypointense spots quantification is described in the supplementary detailed experimental procedures.

Brains were then processed for 4G8 and anti-His-tag IHC as previously described.[45] MR images and histological sections were manually registered using ImageJ freeware (http://rsbweb.nih.gov/ij/): the MR images were rotated in 3 directions until the best matching planes with the histology sections were found.[71]

Associated content

Supplemental materials

Supplementary detailed experimental procedures are available. Nine supplementary figures are available: Fig. S1, Schematic representation of R3VQ, R3VQ-NH_2 **1** and R3VQ-SH **3**; Fig. S2, Immunostaining of amyloid plaques by R3VQ-NH_2 **1**; Fig. S3, SDS-PAGE analysis of the VHHs and their conjugates; Fig. S4, MS analysis of **2b**; Fig. S5, RP-HPLC and MS analyses of the maleimide-$(DOTA/Gd)_3$ **4**; Fig. S6, Characterization of R3VQ-SH **3** before and after mild reducing conditions, and of the nanoimaging agent **5**; Fig. S7, Anti-His-tag control immunostaining of brain sections from PS2APP and wild-type mice; Fig. S8, IHC with anti-His-tag antibody on PS2APP brain paraffin sections obtained after intravenous administration of **5** and after direct incubation of an entire brain hemisphere with **5**; Fig. S9, Detailed MR relaxometric parameters r1 and r2.

Disclosure of potential conflicts of interest

The authors declare no competing financial interest. C. Czech and F. Grueninger are employees of F. Hoffmann-La Roche.

Acknowledgments

We are grateful to F. Bonhomme for the MS analyses by direct infusion, to F. Groh for the Amino Acid Analysis, to H. Cahuzac for helping in the synthesis of VHH conjugates, and to A. Louie (UC Davis) for providing access to 1.4 Tesla spectrometer and for training and advice on relaxometric analyses. We gratefully acknowledge financial support from the Institut Roche de Recherche et Médecine Translationnelle. This work was also supported by the program "Investissements d'avenir" ANR-10-IAIHU-06, the Pompidou Foundation and the France Alzheimer Foundation that are acknowledged. This work was partly carried out on the HISTOMICS platform of the ICM and the MRI platform of CEA-MIRCen, and we thank all technical staff involved.

ORCID

Marc Dhenain http://orcid.org/0000-0001-8804-4101
Sylvie Bay http://orcid.org/0000-0002-3538-2163

References

1. Hermanson GT. In: Bioconjugate techniques. Antibody modification and conjugation. Academic Press; 2013. p. 783-823.
2. Beck A, Goetsch L, Dumontet C, Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of antibody drug conjugates. Nat Rev Drug Discov 2017; 16:315-37; PMID:28303026; https://doi.org/10.1038/nrd.2016.268
3. Behrens CR, Liu B. Methods for site-specific drug conjugation to antibodies. mAbs 2014; 6:46-53; PMID:24135651; https://doi.org/10.4161/mabs.26632
4. Krall N, da Cruz FP, Boutureira O, Bernardes GJL. Site-selective protein-modification chemistry for basic biology and drug development. Nat Chem 2016; 8:103-13; PMID:26791892; https://doi.org/10.1038/nchem.2393
5. Massa S, Xavier C, Muyldermans S, Devoogdt N. Emerging site-specific bioconjugation strategies for radioimmunotracer development. Expert Opin Drug Deliv 2016; 13:1149-63; PMID:27116898; https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1178235
6. Panowski S, Bhakta S, Raab H, Polakis P, Junutula JR. Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy. mAbs 2014; 6:34-45; PMID:24423619; https://doi.org/10.4161/mabs.27022
7. Spicer CD, Davis BG. Selective chemical protein modification. Nat Commun 2014; 5:4740; PMID:25190082; https://doi.org/10.1038/ncomms5740
8. Kim CH, Axup JY, Schultz PG. Protein conjugation with genetically encoded unnatural amino acids. Curr Opin Chem Biol 2013; 17:412-9; PMID:23664497; https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.04.017
9. Tian F, Lu Y, Manibusan A, Sellers A, Tran H, Sun Y, Phuong T, Barnett R, Hehli B, Song F, et al. A general approach to site-specific antibody drug conjugates. Proc Natl Acad Sci U S A 2014; 111:1766-71; PMID:24443552; https://doi.org/10.1073/pnas.1321237111
10. Junutula JR, Raab H, Clark S, Bhakta S, Leipold DD, Weir S, Chen Y, Simpson M, Tsai SP, Dennis MS, et al. Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. Nat Biotechnol 2008; 26:925-32; PMID:18641636; https://doi.org/10.1038/nbt.1480
11. Albrecht H, Burke PA, Natarajan A, Xiong CY, Kalicinsky M, DeNardo GL, DeNardo SJ. Production of soluble ScFvs with C-terminal-free thiol for site-specific conjugation or stable dimeric ScFvs on demand. Bioconjug Chem 2004; 15:16-26; PMID:14733579; https://doi.org/10.1021/bc030018+
12. Olafsen T, Cheung CW, Yazaki PJ, Li L, Sundaresan G, Gambhir SS, Sherman MA, Williams LE, Shively JE, Raubitschek AA, et al. Covalent disulfide-linked anti-CEA diabody allows site-specific conjugation and radiolabeling for tumor targeting applications. Protein Eng Des Sel 2004; 17:21-7; PMID:14985534; https://doi.org/10.1093/protein/gzh009
13. Mume E, Orlova A, Larsson B, Nilsson AS, Nilsson FY, Sjoberg S, Tolmachev V. Evaluation of ((4-hydroxyphenyl)ethyl)maleimide for site-specific radiobromination of anti-HER2 affibody. Bioconjug Chem 2005; 16:1547-55; PMID:16287254; https://doi.org/10.1021/bc050056o
14. Ahlgren S, Orlova A, Rosik D, Sandstrom M, Sjoberg A, Baastrup B, Widmark O, Fant G, Feldwisch J, Tolmachev V. Evaluation of maleimide derivative of DOTA for site-specific labeling of recombinant affibody molecules. Bioconjug Chem 2008; 19:235-43; PMID:18163536; https://doi.org/10.1021/bc700307y
15. Lundberg E, Hoiden-Guthenberg I, Larsson B, Uhlen M, Graslund T. Site-specifically conjugated anti-HER2 Affibody molecules as one-step reagents for target expression analyses on cells and xenograft samples. J Immunol Methods 2007; 319:53-63; PMID:17196217; https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.10.013
16. Sirk SJ, Olafsen T, Barat B, Bauer KB, Wu AM. Site-specific, thiol-mediated conjugation of fluorescent probes to cysteine-modified diabodies targeting CD20 or HER2. Bioconjug Chem 2008; 19:2527-34; PMID:19053310; https://doi.org/10.1021/bc800113v
17. Massa S, Xavier C, De Vos J, Caveliers V, Lahoutte T, Muyldermans S, Devoogdt N. Site-specific labeling of cysteine-tagged camelid single-domain antibody-fragments for use in molecular imaging. Bioconjug Chem 2014; 25:979-88; PMID:24815083; https://doi.org/10.1021/bc500111t
18. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. Nature 1993; 363:446-8; PMID:8502296; https://doi.org/10.1038/363446a0
19. De Vos J, Devoogdt N, Lahoutte T, Muyldermans S. Camelid single-domain antibody-fragment engineering for (pre)clinical in vivo

molecular imaging applications: Adjusting the bullet to its target. Expert Opin Biol Ther 2013; 13:1149-60; PMID:23675652; https://doi.org/10.1517/14712598.2013.800478
20. Harmsen MM, De Haard HJ. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. Appl Microbiol Biotechnol 2007; 77:13-22; PMID:17704915; https://doi.org/10.1007/s00253-007-1142-2
21. De Genst E, Silence K, Decanniere K, Conrath K, Loris R, Kinne R, Muyldermans S, Wyns L. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103:4586-91; PMID:16537393; https://doi.org/10.1073/pnas.0505379103
22. Lafaye P, Achour I, England P, Duyckaerts C, Rougeon F. Single-domain antibodies recognize selectively small oligomeric forms of amyloid beta, prevent Abeta-induced neurotoxicity and inhibit fibril formation. Mol Immunol 2009; 46:695-704; PMID:18930548; https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.09.008
23. Perruchini C, Pecorari F, Bourgeois JP, Duyckaerts C, Rougeon F, Lafaye P. Llama VHH antibody fragments against GFAP: Better diffusion in fixed tissues than classical monoclonal antibodies. Acta Neuropathol 2009; 118:685-95; PMID:19597828; https://doi.org/10.1007/s00401-009-0572-6
24. Li Z, Krippendorff BF, Sharma S, Walz AC, Lave T, Shah DK. Influence of molecular size on tissue distribution of antibody fragments. mAbs, 2016; 8:113-9; PMID:25484055; https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1111497
25. Baral TN, Magez S, Stijlemans B, Conrath K, Vanhollebeke B, Pays E, Muyldermans S, De Baetselier P. Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated human trypanolytic factor. Nat Med 2006; 12:580-4; PMID:16604085; https://doi.org/10.1038/nm1395
26. Achour I, Cavelier P, Tichit M, Bouchier C, Lafaye P, Rougeon F. Tetrameric and homodimeric camelid IgGs originate from the same IgH locus. J Immunol 2008; 181:2001-9; PMID:18641337; https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.2001
27. Vincke C, Loris R, Saerens D, Martinez-Rodriguez S, Muyldermans S, Conrath K. General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. J Biol Chem 2009; 284:3273-84; PMID:19010777; https://doi.org/10.1074/jbc.M806889200
28. David MA, Jones DR, Tayebi M. Potential candidate camelid antibodies for the treatment of protein-misfolding diseases. J Neuroimmunol 2014; 272:76-85; PMID:24864011; https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.05.001
29. Li T, Bourgeois JP, Celli S, Glacial F, Le Sourd AM, Mecheri S, Weksler B, Romero I, Couraud PO, Rougeon F, et al. Cell-penetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the blood-brain barrier and specifically recognize astrocytes: Application to brain imaging. FASEB J 2012; 26:3969-79; PMID:22730440; https://doi.org/10.1096/fj.11-201384
30. Nabuurs RJ, Rutgers KS, Welling MM, Metaxas A, de Backer ME, Rotman M, Bacskai BJ, van Buchem MA, van der Maarel SM, van der Weerd L. In vivo detection of amyloid-beta deposits using heavy chain antibody fragments in a transgenic mouse model for Alzheimer's disease. PLoS One 2012; 7:e38284; PMID:22675537; https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038284
31. Rutgers KS, Nabuurs RJ, van den Berg SA, Schenk GJ, Rotman M, Verrips CT, van Duinen SG, Maat-Schieman ML, van Buchem MA, de Boer AG, et al. Transmigration of beta amyloid specific heavy chain antibody fragments across the in vitro blood-brain barrier. Neuroscience 2011; 190:37-42; PMID:21683126; https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.05.076
32. Rissiek B, Koch-Nolte F, Magnus T. Nanobodies as modulators of inflammation: Potential applications for acute brain injury. Front Cell Neurosci 2014; 8:344; PMID:25374510; https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00344
33. Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, Bergstrom M, Savitcheva I, Huang GF, Estrada S, et al. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh compound-B. Ann Neurol 2004; 55:306-19; PMID:14991808; https://doi.org/10.1002/ana.20009
34. Clark CM, Schneider JA, Bedell BJ, Beach TG, Bilker WB, Mintun MA, Pontecorvo MJ, Hefti F, Carpenter AP, Flitter ML, et al. Use of florbetapir-PET for imaging beta-amyloid pathology. JAMA 2011; 305:275-83; PMID:21245183; https://doi.org/10.1001/jama.2010.2008
35. Villemagne VL, Furumoto S, Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, Hodges J, Harada R, Yates P, Piguet O, Pejoska S, Dore V, et al. In vivo evaluation of a novel tau imaging tracer for Alzheimer's disease. Eur J Nucl Med Mol Imag 2014; 41:816-26; PMID:24514874; https://doi.org/10.1007/s00259-013-2681-7
36. Maruyama M, Shimada H, Suhara T, Shinotoh H, Ji B, Maeda J, Zhang MR, Trojanowski JQ, Lee VM, Ono M, et al. Imaging of tau pathology in a tauopathy mouse model and in Alzheimer patients compared to normal controls. Neuron 2013; 79:1094-108; PMID:24050400; https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.037
37. Hickey JL, Lim S, Hayne DJ, Paterson BM, White JM, Villemagne VL, Roselt P, Binns D, Cullinane C, Jeffery CM, et al. Diagnostic imaging agents for Alzheimer's disease: Copper radiopharmaceuticals that target Abeta plaques. J Am Chem Soc 2013; 135:16120-32; PMID:24070589; https://doi.org/10.1021/ja4057807
38. Ono M, Saji H. Recent advances in molecular imaging probes for beta-amyloid plaques. Med Chem Comm 2015; 6:391-402; https://doi.org/10.1039/C4MD00365A
39. Teipel S, Drzezga A, Grothe MJ, Barthel H, Chetelat G, Schuff N, Skudlarski P, Cavedo E, Frisoni GB, Hoffmann W, et al. Multimodal imaging in Alzheimer's disease: Validity and usefulness for early detection. Lancet Neurol 2015; 14:1037-53; PMID:26318837; https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00093-9
40. Santin MD, Debeir T, Bridal SL, Rooney T, Dhenain M. Fast in vivo imaging of amyloid plaques using mu-MRI Gd-staining combined with ultrasound-induced blood-brain barrier opening. NeuroImage 2013; 79:288-94; PMID:23660031; https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.04.106
41. Ramakrishnan M, Wengenack TM, Kandimalla KK, Curran GL, Gilles EJ, Ramirez-Alvarado M, Lin J, Garwood M, Jack CR, Jr., Poduslo JF. Selective contrast enhancement of individual Alzheimer's disease amyloid plaques using a polyamine and Gd-DOTA conjugated antibody fragment against fibrillar Abeta42 for magnetic resonance molecular imaging. Pharm Res 2008; 25:1861-72; PMID:18443900; https://doi.org/10.1007/s11095-008-9600-9
42. Sigurdsson EM, Wadghiri YZ, Mosconi L, Blind JA, Knudsen E, Asuni A, Scholtzova H, Tsui WH, Li Y, Sadowski M, et al. A non-toxic ligand for voxel-based MRI analysis of plaques in AD transgenic mice. Neurobiol Aging 2008; 29:836-47; PMID:17291630; https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.12.018
43. Wadghiri YZ, Sigurdsson EM, Sadowski M, Elliott JI, Li Y, Scholtzova H, Tang CY, Aguinaldo G, Pappolla M, Duff K, et al. Detection of Alzheimer's amyloid in transgenic mice using magnetic resonance microimaging. Magn Reson Med 2003; 50:293-302; PMID:12876705; https://doi.org/10.1002/mrm.10529
44. Yang J, Wadghiri YZ, Hoang DM, Tsui W, Sun Y, Chung E, Li Y, Wang A, de Leon M, Wisniewski T. Detection of amyloid plaques targeted by USPIO-Abeta1-42 in Alzheimer's disease transgenic mice using magnetic resonance microimaging. NeuroImage 2011; 55:1600-9; PMID:21255656; https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.01.023
45. Li T, Vandesquille M, Koukouli F, Dudeffant C, Youssef I, Lenormand P, Ganneau C, Maskos U, Czech C, Grueninger F, et al. Camelid single-domain antibodies: A versatile tool for in vivo imaging of extracellular and intracellular brain targets. J Control Release 2016; 243:1-10; PMID:27671875; https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.019
46. Richards JG, Higgins GA, Ouagazzal AM, Ozmen L, Kew JN, Bohrmann B, Malherbe P, Brockhaus M, Loetscher H, Czech C, et al. PS2APP transgenic mice, coexpressing hPS2mut and hAPPswe, show age-related cognitive deficits associated with discrete brain amyloid deposition and inflammation. J Neurosci 2003; 23:8989-9003; PMID:14523101.
47. Cuatrecasas P, Parikh I. Adsorbents for affinity chromatography. Use of N-hydroxysuccinimide esters of agarose. Biochemistry 1972; 11:2291-9; PMID:5028497; https://doi.org/10.1021/bi00762a013

48. Dumoulin M, Conrath K, Van Meirhaeghe A, Meersman F, Heremans K, Frenken LGJ, Muyldermans S, Wyns L, Matagne A. Single-domain antibody fragments with high conformational stability. Protein Sci 2002; 11:500-15; PMID:11847273; https://doi.org/10.1110/ps.34602
49. Olichon A, Schweizer D, Muyldermans S, de Marco A. Heating as a rapid purification method for recovering correctly-folded thermotolerant VH and VHH domains. BMC Biotechnol 2007; 7:7; PMID:17257422; https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-7
50. Papini A, Rudolph S, Siglmuller G, Musiol HJ, Gohring W, Moroder L. Alkylation of histidine with maleimido-compounds. Int J Pept Protein Res 1992; 39:348-55; PMID:1428524; https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1992.tb01594.x
51. Paulech J, Solis N, Cordwell SJ. Characterization of reaction conditions providing rapid and specific cysteine alkylation for peptide-based mass spectrometry. Biochim Biophys Acta 2013; 1834:372-9; PMID:22910378; https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.08.002
52. Selkoe DJ. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. Ann N Y Acad Sci 2000; 924:17-25; PMID:11193794; https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05554.x
53. Caravan P, Ellison JJ, McMurry TJ, Lauffer RB. Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: Structure, dynamics, and applications. Chem Rev 1999; 99:2293-352; PMID:11749483; https://doi.org/10.1021/cr980440x
54. Debie P, Van Quathem J, Hansen I, Bala G, Massa S, Devoogdt N, Xavier C, Hernot S. Effect of dye and conjugation chemistry on the biodistribution profile of near-infrared-labeled nanobodies as tracers for image-guided surgery. Mol Pharm 2017; 14:1145-53; PMID:28245129; https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b01053
55. Berzofsky JA, Berkover IJ. In: Fundamental immunology. Antigen-antibody interaction. Raven Press; 1984. p. 595-644.
56. Beck A, Wagner-Rousset E, Ayoub D, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianferani S. Characterization of therapeutic antibodies and related products. Anal Chem 2013; 85:715-36; PMID:23134362; https://doi.org/10.1021/ac3032355
57. Wakankar A, Chen Y, Gokarn Y, Jacobson FS. Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates. mAbs 2011; 3:161-72; PMID:21441786; https://doi.org/10.4161/mabs.3.2.14960
58. Gronwall C, Sjoberg A, Ramstrom M, Hoiden-Guthenberg I, Hober S, Jonasson P, Stahl S. Affibody-mediated transferrin depletion for proteomics applications. Biotechnol J 2007; 2:1389-98; PMID:17639529; https://doi.org/10.1002/biot.200700053
59. Habicht G, Haupt C, Friedrich RP, Hortschansky P, Sachse C, Meinhardt J, Wieligmann K, Gellermann GP, Brodhun M, Gotz J, et al. Directed selection of a conformational antibody domain that prevents mature amyloid fibril formation by stabilizing Abeta protofibrils. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104:19232-7; PMID:18042730; https://doi.org/10.1073/pnas.0703793104
60. Luheshi LM, Hoyer W, de Barros TP, van Dijk Hard I, Brorsson AC, Macao B, Persson C, Crowther DC, Lomas DA, Stahl S, et al. Sequestration of the Abeta peptide prevents toxicity and promotes degradation in vivo. PLoS Biol 2010; 8:e1000334; PMID:20305716; https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000334
61. Morgado I, Wieligmann K, Bereza M, Ronicke R, Meinhardt K, Annamalai K, Baumann M, Wacker J, Hortschansky P, Malesevic M, et al. Molecular basis of beta-amyloid oligomer recognition with a conformational antibody fragment. Proc Natl Acad Sci U S A 2012; 109:12503-8; PMID:22814377; https://doi.org/10.1073/pnas.1206433109
62. Pain C, Dumont J, Dumoulin M. Camelid single-domain antibody fragments: Uses and prospects to investigate protein misfolding and aggregation, and to treat diseases associated with these phenomena. Biochimie 2015; 111:82-106; PMID:25656912; https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.01.012
63. Rotman M, Welling MM, van den Boogaard ML, Moursel LG, van der Graaf LM, van Buchem MA, van der Maarel SM, van der Weerd L. Fusion of hIgG1-Fc to 111In-anti-amyloid single domain antibody fragment VHH-pa2H prolongs blood residential time in APP/PS1 mice but does not increase brain uptake. Nucl Med Biol 2015; 42:695-702; PMID:25960433; https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2015.03.003
64. Petiet A, Delatour B, Dhenain M. Models of neurodegenerative disease - Alzheimer's anatomical and amyloid plaque imaging. Methods Mol Biol 2011; 771:293-308; PMID:21874485; https://doi.org/10.1007/978-1-61779-219-9_16
65. Jack CR Jr, Wengenack TM, Reyes DA, Garwood M, Curran GL, Borowski BJ, Lin J, Preboske GM, Holasek SS, Adriany G, et al. In vivo magnetic resonance microimaging of individual amyloid plaques in Alzheimer's transgenic mice. J Neurosci 2005; 25:10041-8; PMID:16251453; https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2588-05.2005
66. Nabuurs RJ, Natte R, de Ronde FM, Hegeman-Kleinn I, Dijkstra J, van Duinen SG, Webb AG, Rozemuller AJ, van Buchem MA, van der Weerd L. MR microscopy of human amyloid-beta deposits: Characterization of parenchymal amyloid, diffuse plaques, and vascular amyloid. J Alzheimers Dis 2013; 34:1037-49; PMID:23340037; https://doi.org/10.3233/JAD-122215
67. Amet S, Launay-Vacher V, Clement O, Frances C, Tricotel A, Stengel B, Gauvrit JY, Grenier N, Reinhardt G, Janus N, et al. Incidence of nephrogenic systemic fibrosis in patients undergoing dialysis after contrast-enhanced magnetic resonance imaging with gadolinium-based contrast agents the prospective fibrose nephrogenique systemique study. Invest Radiol 2014; 49:109-15; PMID:24169070; https://doi.org/10.1097/RLI.0000000000000000
68. European Medicines Agency. Assessment report for Gadolinium-containing contrast agents. 2010; EMA/740640/2010.
69. Guerbet LLC. Dotarem® (gadoterate meglumine) injection. Medical Imaging Drugs Advisory Committee (MIDAC) - Advisory Committee Briefing Document NDA 204-781. U.S. Food Drug Admin 2013.
70. Saake M, Langner S, Schwenke C, Weibart M, Jansen O, Hosten N, Doerfler A. MRI in multiple sclerosis: An intra-individual, randomized and multicentric comparison of gadobutrol with gadoterate meglumine at 3 T. Eur Radiol 2016; 26:820-8; PMID:26123410; https://doi.org/10.1007/s00330-015-3889-7
71. Petiet A, Santin M, Bertrand A, Wiggins CJ, Petit F, Houitte D, Hantraye P, Benavides J, Debeir T, Rooney T, et al. Gadolinium-staining reveals amyloid plaques in the brain of Alzheimer's transgenic mice. Neurobiol Aging 2012; 33:1533-44; PMID:21531045; https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.03.009

Camelid single-domain antibodies: A versatile tool for *in vivo* imaging of extracellular and intracellular brain targets

Tengfei Li [a,b,c,1], **Matthias Vandesquille** [d,e,f,g,1], **Fani Koukouli** [h], **Clémence Dudeffant** [b,f,g], **Ihsen Youssef** [b], **Pascal Lenormand** [a], **Christelle Ganneau** [d,e], **Uwe Maskos** [h], **Christian Czech** [i], **Fiona Grueninger** [i], **Charles Duyckaerts** [b], **Marc Dhenain** [f,g], **Sylvie Bay** [d,e], **Benoît Delatour** [b], **Pierre Lafaye** [a,*]

[a] Institut Pasteur, CITECH, Plateforme d'Ingénierie des Anticorps, 75724 Paris Cedex 15, France.
[b] Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06 UMR S 1127, and Inserm, U 1127, and CNRS UMR 7225, and ICM, F-75013, Paris, France.
[c] Université Paris Descartes, Paris 5, France .
[d] Institut Pasteur, Unité de Chimie des Biomolécules, 75724 Paris Cedex 15, France.
[e] CNRS UMR 3523, 75724 Paris Cedex 15, France.
[f] Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Direction de la Recherche Fondamentale (DRF), Institut d'Imagerie Biomédicale (I2BM), MIRCen, F-92260 Fontenay-aux-Roses, France.
[g] Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay UMR 9199, Neurodegenerative Diseases Laboratory, F-92260 Fontenay-aux-Roses, France.
[h] Institut Pasteur, Neurobiologie intégrative des systèmes cholinergiques, CNRS UMR 3571, Paris, France.
[l] F. Hoffmann-La Roche AG, Pharmaceutical Research and Early Development, NORD DTA, Roche Innovation Center Basel, CH-4070 Basel, Switzerland.
[1] Authors contributed equally to this work.
*Corresponding author. E-mail address: pierre.lafaye@pasteur.fr

ABSTRACT

Detection of intracerebral targets with imaging probes is challenging due to the non-permissive nature of blood-brain barrier (BBB). The present work describes two novel single-domain antibodies (VHHs or nanobodies) that specifically recognize extracellular amyloid deposits and intracellular tau neurofibrillary tangles, the two core lesions of Alzheimer's disease (AD). Following intravenous administration in transgenic mouse models of AD, *in vivo* real-time two-photon microscopy showed gradual extravasation of the VHHs across the BBB, diffusion in the parenchyma and labeling of amyloid deposits and neurofibrillary tangles. Our results demonstrate that VHHs can be used as specific BBB-permeable probes for both extracellular and intracellular brain targets and suggest new avenues for therapeutic and diagnostic applications in neurology.

Keywords:
VHH
Blood-brain barrier
In vivo Imaging
Alzheimer's disease
Tau
Abeta

1. Introduction

Brain penetration of targeted compounds, such as high affinity antibodies, is a prerequisite for the treatment and diagnosis of central nervous system pathologies. However, the entry into the central nervous system of most of blood-circulating molecules is seriously limited by the blood-brain barrier (BBB). It has been shown that only 0.02% - 0.1% of conventional immunoglobulins present in serum can penetrate into brain parenchyma [1,2]. Hijacking the BBB receptor-mediated transcytosis system has been envisioned as a way of promoting passage of agents in the brain. Antibodies directed against the transferrin receptor [3], or the insulin receptor [4] have hence been used as Trojan horses to transport therapeutic molecules across the BBB. Unfortunately, receptor-mediated transcytosis targets are highly and broadly expressed in tissues and are often implicated in critical cellular functions, therefore raising possible safety risks [5,6]. Artificial BBB opening by ultrasound [7,8] or by means of BBB permeability enhancers (*e.g.* mannitol [9]) is also an option to facilitate the penetration of compounds within the brain but these methods also have safety limitations [10].

Another approach of targeting intracerebral epitopes relies on the use of homodimeric heavy chain-only antibodies naturally produced in camelidae [11]. These “non-conventional” single-domain antibodies are devoid of light chains and their heavy chain variable domain (VHH) acts as a fully functional binding moiety [12]. VHHs have several unique features such as relatively low molecular weight, high production yield, high stability and solubility with the ability to specifically bind target epitopes at subnanomolar affinity. Due to their small size (15 kDa), VHHs occupy only 1/10 of the volume filled by conventional antibodies [11]. Consequently, they can diffuse more rapidly and deeply in fixed tissues [13] and have a better biodistribution profile *in vivo* than conventional antibody fragments [14,15]. Depending on their binding properties, VHHs can be used either to visualize and/or to interact with intracellular targets [16–22].

We recently demonstrated that some VHHs with a basic isoelectric point (pI) are able to readily transmigrate across the BBB *in vivo* after peripheral injection, without the need of any invasive or hazardous procedures (such as opening of the barrier using chemical or ultrasound sonication) [18]. These VHHs can be used as specific transporters as demonstrated by *in vivo* labeling of astrocytes with a VHH-fluorophore conjugate targeting the intracellular protein GFAP [18].

In the present work we engineered two new VHHs that were able to detect extracellular or intracellular pathological brain targets, namely the two main neuropathological lesions in Alzheimer’s disease (amyloid plaques and neurofibrillary tangles - NFTs). We designed sensitive and specific anti-Aβ and anti-tau VHHs that allowed detection of plaques and NFTs in brain tissue from patients with Alzheimer’s disease and from mouse models of the disease. We also showed that plaques and tangles could be visualized *in vivo* in mice following intravenous administration of these probes.

2. Materials and methods

The main experimental procedures are described here. Detailed materials and methods are provided in Supplementary Materials.

2.1. Human AD brain extracts and immunization

A male alpaca was immunized with 1mg of fibrillar synthetic Aβ 42 peptide (Bachem). One alpaca was immunized with tangles-enriched AD extracts (Braak stage V and VI) that were obtained from the NeuroCEB brain bank. This bank is associated to a brain donation program run by a consortium of patient associations (including France Alzheimer Association) and declared to the Ministry of Research and Universities, as requested by French Law. An explicit written consent was obtained for the brain donation in accordance with the French Bioethical Laws. Another alpaca was immunized with a synthetic mono-phosphorylated peptide derived from the C-terminus of the tau protein. A detailed description is provided in Supplementary Materials.

2.2. Library construction, phage preparation and phage display

The library construction was described in [23]. Phages were prepared by transformation of *E.coli* host cells with a recombinant phagemid and a helper phage. A large number of phages (10^{13}) and different blocking buffers were used to perform each round of phage-display. A complete description is provided in Supplementary Materials.

2.3. Selection of specific phage-VHHs and binding epitope determination of monoclonal phage-VHH

The libraries of anti-Aβ and anti-pTau VHHs were panned for reactivity with biotinylated Aβ42, Aβ40 peptides and full-length pTau protein respectively. Epitope mapping of Aβ specific VHHs was performed by the ELISA inhibition test. A detailed protocol is provided in Supplementary Materials.

2.4. Expression of VHHs

The coding sequences of the selected VHHs (R3VQ and A2) in the vector pHEN1 were sub-cloned into a bacterial expression vector pET23d (Novagen) containing a 6-Histidine tag using NcoI and NotI restriction sites. Purified VHHs were isolated from transformed *E. coli* BL21 (DE3) pLysS cells by immobilized-metal affinity chromatography (IMAC). The full method is described in Supplementary Materials.

2.5. Determination of pI by IsoElectric Focusing (IEF)

The pI of VHHs was determined by isoelectric focusing using IEF 3-10 Gel (Invitrogen). NEPGHE (non equilibrium pH gradient gel electrophoresis) with sample application at the anode was also used because it allows optimal protein analysis in the basic range of the gel including pI 8.5 to 10.5 (SERVA Gel IEF 3-10 instruction manual).

2.6. Preparation of AlexaFluor 488-conjugated VHH and mAb

The cysteine present in the C-terminal region of VHH and the SH group in the hinge region of reference mAbs (4G8 and muRb86) were used to realize the conjugation with the maleimido-AF488 fluorophore (Invitrogen). A detailed description is provided in Supplementary Materials.

2.7. Animal models

PS2APP mice overexpressing hAPP Swedish mutation combined with PS2 N141I mutation [24,25] were used as animal models harboring Aβ-positive lesions. PS2APP mice start to develop overt Aβ deposition in the brain at approximately 6 months of age.
Tg4510 mice with the hMAPT P301L gene mutation [26] were used as NFT-bearing mouse model. NFT start to appear in the cortex by 4 months of age and one month later in the hippocampus. All animal experiments were performed in accordance with the guidelines established by European Union legislation regarding the use and care of laboratory animals. Four PIs of the present study (B. D., Pi.L., M.V. and M.D.) have received official agreements from the French Ministry of Agriculture to carry out research and experiments on animals.

2.8. Stereotaxic injections of VHHs

Stereotaxic injections of each VHH were performed in anesthetized mice. Two microliters of VHH was injected into the frontal cortex at the rate of 0.2µl /min. Two or 24 hours later, brains were collected for histological analysis. A detailed protocol is provided in Supplementary Materials.

2.9. Immunohistochemistry and double immunofluorescence staining

Immunohistochemistry was primarily performed on 4µm thick paraffin sections. A pre-treatment with formic acid was performed before neutralization of endogenous peroxidase activity. After incubation with primary and secondary antibodies (see Supplementary Materials), standard immuno-peroxydase method was applied with DAB as final chromogen. Immunohistochemistry on free-floating sections, fresh tissues and VHH-exposed tissues was performed with similar procedures. Double immunofluorescence staining was implemented on paraffin sections using standard protocols. A detailed description is provided in Supplementary Materials.

2.10. Estimation of lesion loads by VHHs and reference antibodies

Comparative lesion loads detected by VHHs vs reference antibodies were assessed on immunostained sections obtained from PS2APP and Tg4510 mice. The full method is described in Supplementary Materials.

2.11. Intravenous administration of AF488-conjugated VHH and monoclonal antibodies

AlexaFluor conjugated VHH was slowly injected into the caudal vein of the AD mice. Two-photon imaging was then performed during the 2-4 subsequent hours. For control experiments relying on peripheral injections with no *in vivo* imaging, the same procedures were applied but no cranial surgery was performed. A detailed protocol is provided in Supplementary Materials.

2.12. In vivo two-photon imaging

Mice were anesthetized. Their head was immobilized and a small craniotomy was performed above the right hemisphere. A detailed description of the craniotomy surgery is provided in Supplementary Materials. Two-photon imaging was performed with a two-photon laser-

scanning microscope system and PrairieView software (Prairie Technologies, Middelton, WI), using a 16x 0.8 NA water immersion objective (Nikon, Tokyo, Japan) with the two-photon laser tuned to 920 nm (MaiTai DeepSee, Spectra Physics, Mountain View, CA). The images were acquired at 512 x 512 with a pixel size of 0.5 um. Care was taken to use less than 20 mW of laser power in the tissue. The raw data obtained were processed using Image J software for analysis and 3D rendering.

3. RESULTS

3.1. Selection and characterization of a VHH recognizing extracellular targets

3.1.1. Generation and optimization of R3VQ

One alpaca was immunized with a fibrillar synthetic Aβ42 peptide and a specific VHH library was constructed from cDNA encoding VHH domains isolated from lymphocytes. The total size of the library contained 1x 10^8 phage-VHHs. VHHs were selected by Phage Display through 3 panning cycles with biotinylated Aβ42 and Aβ40 peptides at different concentrations of antigens, buffer and washing conditions. Four hundreds individual clones were tested by ELISA using biotinylated Aβ42. Two VHHs were obtained, called R3VQ and R3VE respectively. They differed by only one amino acid: a glutamine (Q) of R3VQ was replaced by a glutamic acid (E) in R3VE. R3VQ recognized an epitope located in the central part of the Aβ peptide between aa 17-28 (Fig. S1A).
C terminal His tagged VHH R3VQ and R3VE were obtained after subcloning of their genes in pET23d vector. Both VHHs had high production yields about 20 and 9mg/l of culture, respectively. Note that in the present study, R3VQ and R3VE represent R3VQ-His and R3VE-His antibodies unless otherwise mentioned. As a basic pI favors BBB passage [18], we decided to focus our study on R3VQ, which had a higher pI than R3VE (see below). R3VQ showed good purity with only one band observed by SDS-PAGE (Fig. 1A). It had a basic pI > 8.3 (Fig. 1B). By ELISA, R3VQ showed strong binding to Aβ40 and Aβ42 (Fig. 1C).

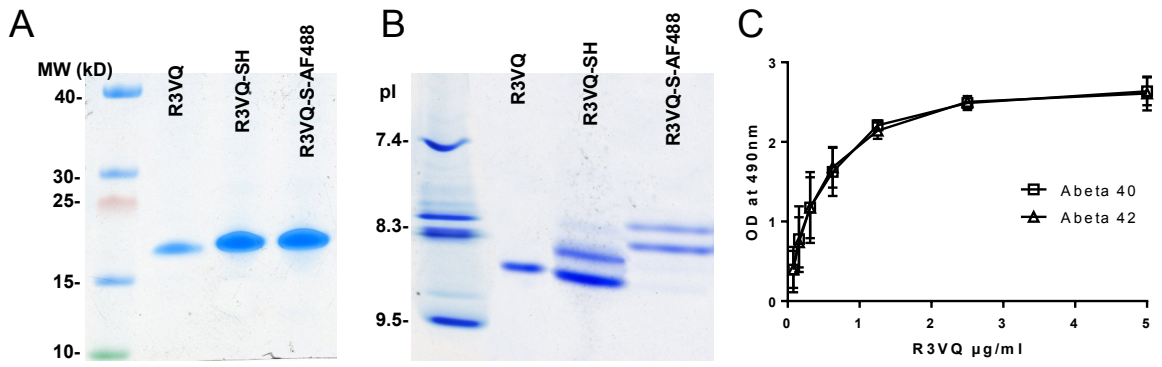


Fig. 1. Biochemical characterization of R3VQ and its variants.

(A) Analysis of R3VQ variants by SDS-PAGE. (B) Determination of pI of R3VQ variants by NEPHGE on 3-10 IEF gel. (C) Binding of purified R3VQ to biotinylated Aβ40 and 42 determined by ELISA.

We engineered a fluorescent conjugate to allow *in vivo* imaging with microscopic resolution. For this purpose, an additional cysteine residue was inserted in the C terminal part of the sequence of R3VQ (referred as R3VQ-SH), thus allowing a C terminal thio-addition of a maleimido-Alexa fluor dye (AF488) by a site specific approach [27]. The coding sequence of R3VQ-SH contained a N-terminal 6-histidine tag for purification and detection.
In this way we obtained a well-defined conjugate with only one AF488 molecule (Fig. 1A). This final compound was referred to as R3VQ-S-AF488. The pI of R3VQ-SH and R3VQ-S-AF488 were analyzed by NEPHGE using IEF 3-10 gel. The pI of R3VQ-SH was between 8.3 and 9.5 (Fig. 1B), similar to that of R3VQ. The addition of maleimido-AF488 to R3VQ-SH decreased its pI to ca. 8.3 (Fig. 1B). The two bands on IEF gel indicate the presence of two isoforms for both R3VQ-SH and R3VQ-S-AF488.

3.1.2. Immunodetection of Aβ brain lesions in mice and in human brain sections

VHH immunohistochemistry (IHC) was performed in plaques-enriched AD tissues (isocortical samples) and in PS2APP mice [24,25] harboring amyloid deposits. R3VQ showed excellent sensitivity and selectivity in detecting extracellular amyloid plaques and cerebral amyloid angiopathy (CAA), both on human and mouse paraffin sections pre-treated with formic acid [28] (Fig. 2A-B). Immunodetection of amyloid plaques was also possible on fresh brain tissues from AD patients without the use of any antigen retrieval pre-treatement (Fig. S1B). Double labeling performed on mouse sections using 4G8 (as a gold-standard anti-Aβ monoclonal antibody (mAb)) and R3VQ showed a very good colocalization of the two antibodies (Fig. 2C). Comparison of amyloid loads detected by R3VQ and 4G8 showed excellent correlation between the results obtained with the two antibodies (Fig. S1C). No labeling was observed following R3VQ IHC on tissues from age-matched wild type C57Bl/6 mice (Fig. S1D). The R3VE variant showed similar immunodetection to R3VQ on PS2APP mouse tissue (Fig. S1E).

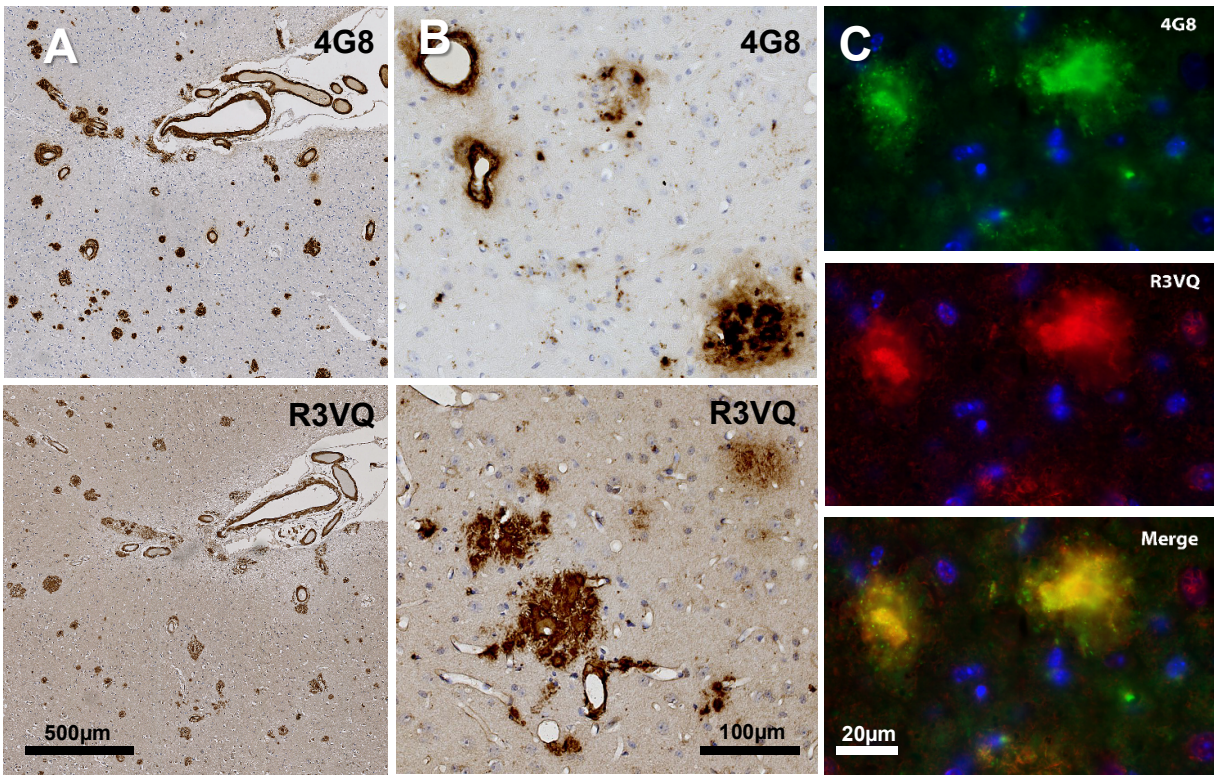


Fig. 2. Immunohistochemical characterization of VHH R3VQ as a specific probe for labeling of amyloid deposits.
R3VQ show similar sensitivity and selectivity to reference antibody 4G8 for detecting amyloid plaques and cerebral amyloid angiopathy (CAA) on both human AD (A) and PS2APP mouse (B) paraffin sections. Double immunofluorescent staining of 4G8 (green) and R3VQ (red) on brain tissue from a young PS2APP mouse confirmed the high specificity of R3VQ (C).

3.2. In vivo labeling of Aβ-positive lesions

3.2.1. Diffusion of R3VQ after stereotaxic brain injection

To test the ability of R3VQ to diffuse in the brain and to label *in vivo* amyloid plaques, six micrograms of R3VQ was stereotaxically injected into the cortex of 12-month old PS2APP mice (n=2). The mice were sacrificed 2 hours after injection. IHC revealed that R3VQ diffused in a large spherical region (approximatively 3 mm diameter) and amyloid plaques were detected in this volume (Fig. S2A). The results demonstrate a good ability of R3VQ to diffuse through living tissue and to label Aβ lesions quite rapidly (< 2 hours). To summarize, the VHH R3VQ was able to diffuse in the brain and specifically target amyloid plaques *in vivo*.

3.2.2. BBB transit and diffusion of R3VQ after intravenous injection

To investigate if R3VQ-S-AF488 crossed the BBB, a 50-mg/kg dose was injected iv into two 12-month-old PS2APP mice. In parallel, two age-matched PS2APP were injected with PBS (negative controls) or with AlexaFluor 488 conjugated anti-Aβ mAb 4G8 (4G8-S-AF488; 50 mg/kg) as controls for BBB passage of standard immunoglobulins. Four hours after injection, the mice were sacrificed and paraffin brain sections were prepared. In R3VQ-S-AF488 injected mice immunostaining using anti-His mAb showed extensive plaque labeling throughout the brain. This demonstrates that the VHH conjugate was able to cross the BBB,

diffuse widely in the living brain and label its target. In contrast, no staining was found in mice injected with PBS (Fig. S3) and only few plaques in restricted brain regions were detected following 4G8-S-AF488 injections, underlining very limited BBB permeability for regular immunoglobulins (Fig. S3).

3.2.3. Real-time imaging of R3VQ after intravenous injection

A 50-mg/kg dose of R3VQ-S-AF488 was injected in the tail vein of a one-year-old PS2APP mouse. The conjugate extravasation and diffusion in the brain was recorded for 4 hours post injection using two-photon microscopy of a cortical brain window (from surface to 360 µm deep). Fig. 3A displays *in vivo* imaging of the same region of interest at 1 and 30 min post-injection of R3VQ-S-AF488. A few seconds after iv injection, strong labeling of arborescent vessels was observed. After 20 min only few capillary vessels were still labeled. This suggested a short half-life (10-20 min) of conjugated VHH in the blood circulation [29]. Shortly after injection a green fluorescent "cloud" formed and spread in the parenchymal space, reminiscent of the diffusion observed following stereotaxic injection of R3VQ (Fig. S2A). Thirty minutes after injection, both amyloid plaques and vascular Aβ (CAA) began to be visualized. *In vivo* labeling of Aβ deposition in plaques and vessels remained up to four hours after injection (Fig. 3B and Video S1), suggesting a half-life of R3VQ-S-AF488 extending over several hours in the brain. Four hours after the intravenous injection of R3VQ-S-AF488, the brain was harvested and paraffin sections were prepared.
Using anti-His mAb, immunodetection of amyloid plaques by R3VQ-S-AF488 was observed throughout the entire brain with an accompanying background signal which could correspond to the diffusion halo of the VHH (Fig. 3C). Additional experiments were performed with a lower dose of R3VQ-S-AF488 (10 mg/kg) and *in vivo* detection of Aβ deposition was observed but with decreased intensity. These results demonstrated that R3VQ brain penetration and its ability to label brain Aβ lesions were dose-dependent, an observation which was also confirmed by IHC (Fig. 3D).

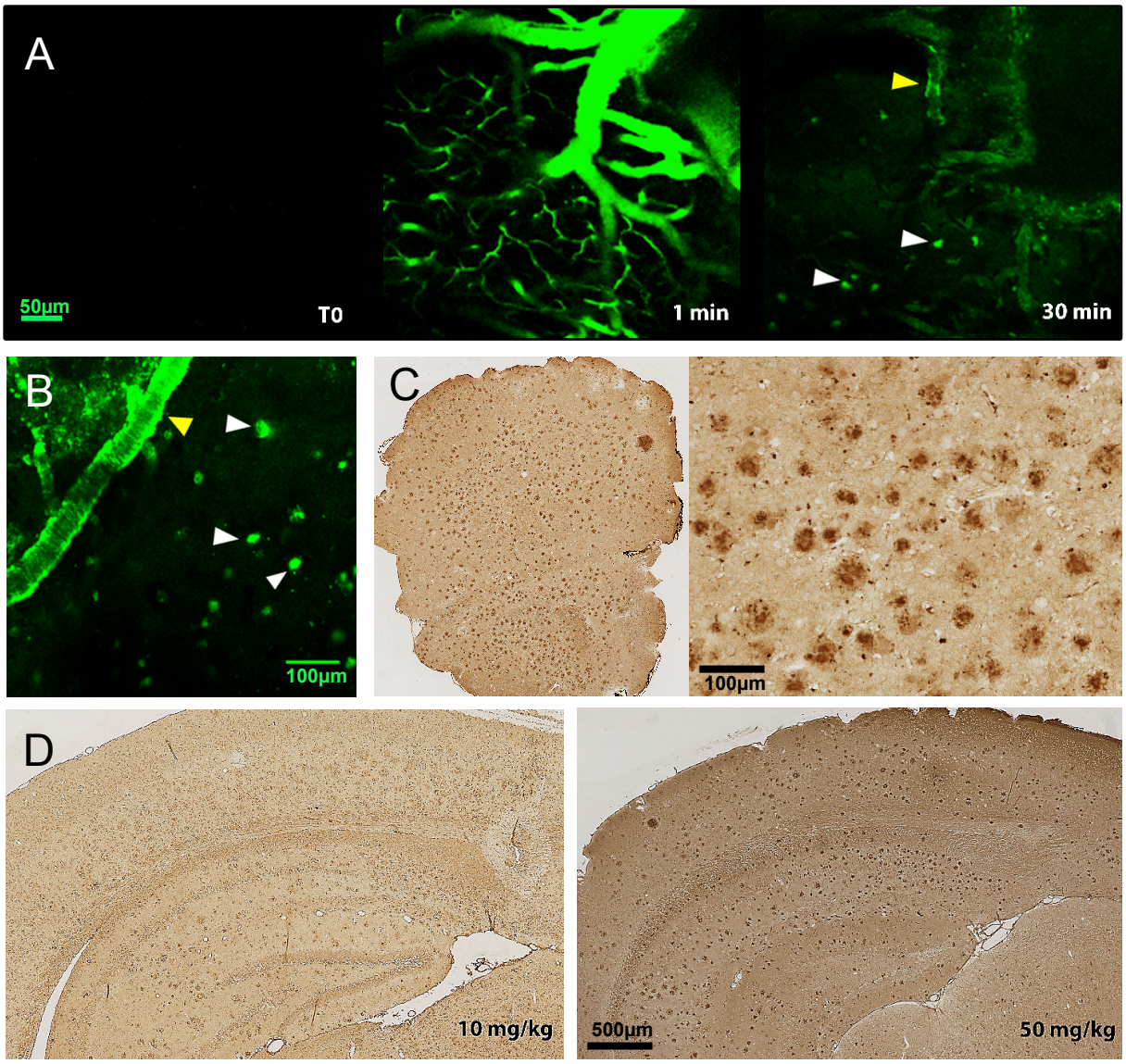


Fig. 3. In vivo imaging of VHH R3VQ-S-AF488 using two-photon microscopy.

(A, B) *In vivo* imaging in the brain after iv injection of R3VQ-S-AF488 in a one-year-old PS2APP mouse. Maximum intensity projection with a projected volume extending 360μm deep from the surface of the cortex. T0 represents the baseline imaging before iv injection. Yellow arrowheads indicate vascular Aβ and white arrowheads indicate parenchymal Aβ deposits. (B) was obtained four hours after injection. (C) *Ex vivo* detection of amyloid plaques in PS2APP mouse that received iv injection of R3VQ-S-AF488 four hours before sacrifice. Immunostaining of amyloid plaques by extrinsic R3VQ was observed throughout the brain. The right image showed a magnified view from the left image. (D) Comparison of immunostaining of amyloid plaques in PS2APP mice receiving iv injections of either 10 mg/kg or 50 mg/kg of R3VQ-S-AF488.

The basic pI of VHHs has been proposed to be an important parameter predicting their ability to transmigrate across the BBB [18]. R3VE-S-AF488 conjugate was prepared with a pI of ca. 7.5 (Fig. S4A, B). A 10 mg/kg dose of R3VE-S-AF488 was iv injected in a one-year-old PS2APP mouse. Forty-five minutes after injection, only cerebral amyloid angiopathy was

shown without signs of extravasation or labeling of amyloid plaques (Fig. S4C), supporting the hypothesis that the positive charges present on the surface of VHHs play a critical role for brain penetration of these antibodies across the BBB.
Finally, R3VQ-S-AF488 at 50 mg/kg was intravenously injected in a wild-type mouse. Except for initial blood vessel labeling, no specific *in vivo* staining in the brain parenchyma was observed using two-photon microscopy imaging. A fluorescent cloud appeared 1 hour after injection (suggesting presence of unbound R3VQ-S-AF488 in the brain) but then rapidly vanished (Fig. S5). These data indicate that R3VQ-S-AF488 crosses the BBB in wild-type mice but is not retained in the absence of amyloid plaques.

In summary, using two-photon microscopy after intravenous injection of R3VQ-S-AF488, we demonstrated the ability of the VHH R3VQ to cross the BBB, to reach its extracellular cerebral target and to transport fluorescent probes across the BBB, allowing its real-time visualization.

3.3. Selection and characterization of a VHH recognizing intracellular targets

3.3.1. Generation and engineering of A2

One alpaca was immunized with AD phospho-tau (pTau) enriched brain extracts and a second alpaca was immunized with a mono-phosphorylated peptide derived from the C-terminus of the tau protein (pS422 peptide) coupled to the KLH protein. The sera of immunized alpacas recognized both pTau and non-phosphorylated tau. The immunized animals generated 2 phage-VHH libraries of about $3x10^8$ clones each. In order to expand the diversity of VHHs, a pooled library from these two animals was used for panning experiments by Phage Display. After 3 panning cycles with pTau protein, one clone was found to bind specifically to pTau and was referred to as A2. C-terminally His tagged A2 was produced as described above for R3VQ VHH (yield 5 mg/l of culture). Only one band was observed by SDS-PAGE (Fig. 4A). Analysis by IEF-NEPHGE showed that the pI of A2 was higher than 9.5 (Fig. 4B). ELISA was performed on pTau and pS422 peptide coupled to ovalbumin. pTau corresponded to the full-length tau protein phosphorylated at multiple sites including S422. A2 bound to both full-length pTau protein and the pS422-containing peptide. Lack of binding to non-phosphorylated-tau demonstrated that A2 was specific for a phosphorylated epitope (Fig. 4C).
For the purpose of *in vivo* analysis, an A2-SH variant was prepared and conjugated to AF488 as previously described for R3VQ-S-AF488 (see above). The pI of A2-SH and A2-S-AF488 was between 9.5 and 10.7. The addition of maleimido-AF488 to A2-SH slightly decreased the pI of A2-SH as already observed with R3VQ-S-AF488 (Fig. 4B).

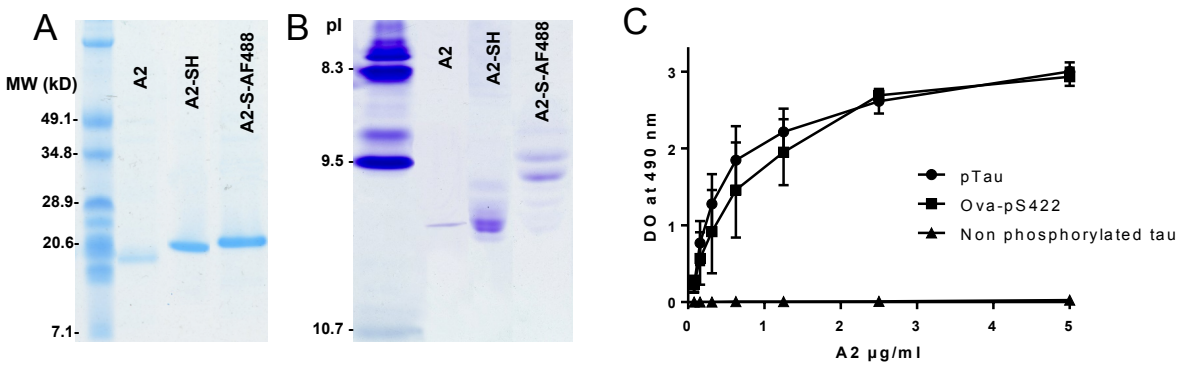


Fig. 4. Biochemical characterization of VHH A2 and its variants.

(A) Protein analysis of VHH A2, A2-SH and A2-S-AF488 by SDS-PAGE. (B) Determination of pI of A2 variants by NEPHGE on 3-10 IEF gel. (C) Binding of A2 to phospho-tau (pTau), non-phosphorylated tau and Ova-pS422 peptide.

3.3.2. Immunodetection of tau brain lesions in mice and in human brain sections

VHH A2 allowed detection of intracellular neurofibrillary tangle-like structures in Tg4510 mouse brain tissues using paraffin sections with or without any antigen retrieval pretreatment (Fig. 5B). Specific staining of neurofibrillary tau inclusions with A2 was also readily obtained on free floating sections from Tg4510 mice (Fig. S6A). Comparable staining was observed using the reference anti-pTau AT8 mAb [30]. No labeling was noted with tissues from age-matched wild type mice (Fig. S6A). Double labeling performed on mouse sections using the A2 and reference antibody AT8 showed strong colocalization of the two immunostainings (Fig. 5C). The load of tau lesions detected by A2 and AT8 antibodies were highly correlated underlining similar sensitivity-specificity profiles (Fig. S6B).
Using paraffin-fixed AD brain sections, VHH A2 detected neurofibrillary tau tangles in neuronal soma, tortuous fibers and dystrophic neurites was also obtained in (Fig. 5A). Additional experiments (Fig. S7) showed that VHH A2 also recognized tau-positive lesions from other tauopathies e.g. glial inclusions in tissues from patients with fronto-temporal dementia (oligodendroglial coiled bodies) or with progressive supranuclear palsy (astrocytic tufts).
To our knowledge, this is the first VHH that has been shown to detect tau lesions in both tau transgenic mouse and human tauopathy brain tissues.

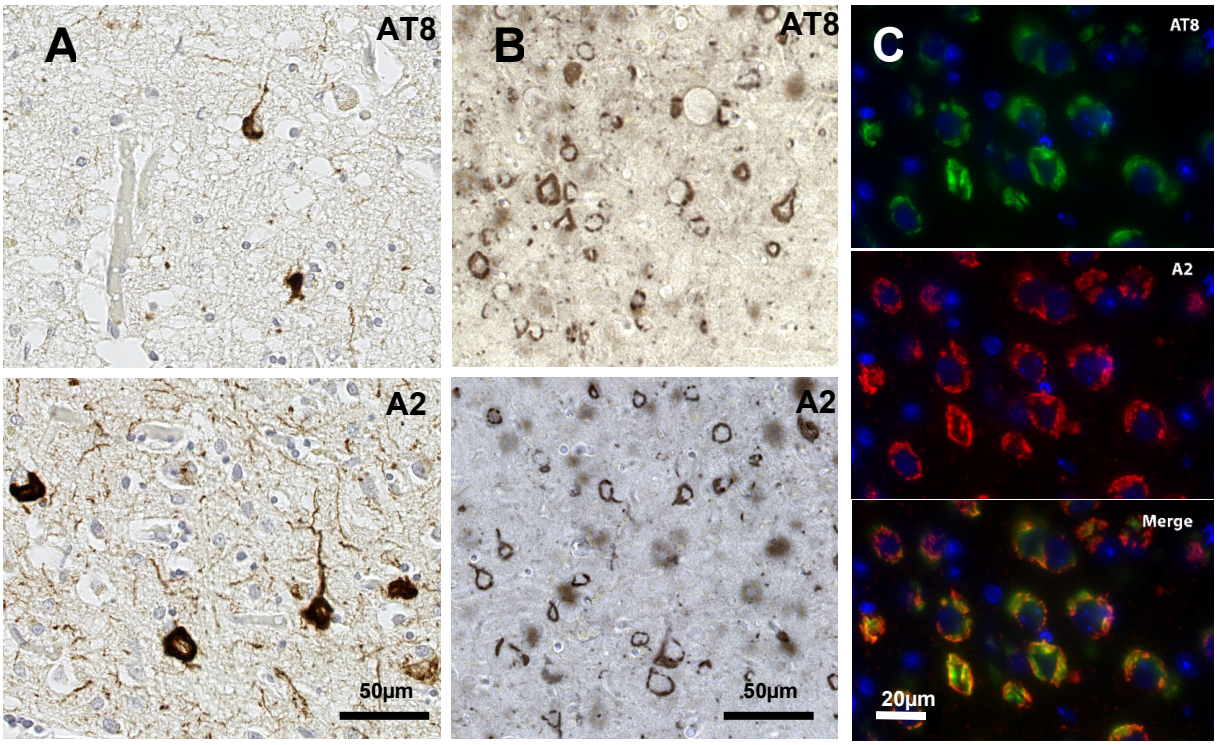


Fig. 5. Immunohistochemical characterization of VHH A2 as a specific probe for labeling neurofibrillary tangles.

A2 shows similar sensitivity and selectivity to AT8 in detecting NFTs on both human AD (A) and Tg4510 mouse (B) brain sections. Double immunofluorescence staining of AT8 and A2 on Tg4510 mouse tissue confirmed the high specificity of A2 (C).

3.4. In vivo labeling of tau-positive lesions:

3.4.1. Diffusion of A2 after stereotaxic brain injection

To test the ability of A2 to immunolabel tau lesions *in vivo*, A2 was stereotaxically injected into the cortex of 10-month-old Tg4510 mice. The mice were sacrificed 2 hours after injection. IHC revealed that A2 had diffused throughout the entire brain and bound to pTau aggregates in numerous cortical and subcortical regions (Fig. S2B).

3.4.2. BBB transit and diffusion of A2 after intravenous injection

To investigate if A2-S-AF488 crosses the BBB, the same systematic approach as implemented for R3VQ-S-AF488 (see above) was applied. A 10 mg/kg dose of A2-S-AF488 was injected iv in two 8-month-old Tg4510 mice that were sacrificed 4 hours later. Immunostaining using anti-A2 polyclonal antibody showed binding to a large number of NFT-like structures in the brain, demonstrating that A2-S-AF488 crossed the BBB, diffused extensively throughout the brain *in vivo* and labeled pTau aggregates. By contrast, no staining was found in the mice injected with PBS or with a conventional antibody specific for pTau (Fig. S3).

3.4.3. Real-time imaging A2 after intravenous injection

VHH A2-S-AF488 (10 mg/kg) was injected in the tail vein of Tg4510 mice. A2-S-AF488 extravasation and diffusion in the brain was monitored for 4 hours post injection using two-

photon microscopy imaging of the cortical surface up to 350 µm deep. Immediately after iv injection, cerebral blood vessels showed strong fluorescence, as observed for R3VQ. Identification of NFT-like structures was possible 2 hours after injection (Fig. 6A). A persistent and specific labeling of NFTs was observed even 4 hours after injection (Fig. 6B) and the 3D reconstruction of the immuno-detected objects revealed the standard flame-shaped morphology of tangles (Video S2). Four hours after injection, the mice were sacrificed, immunohistochemistry was performed using anti-A2 polyclonal antibody to demonstrate the presence of A2-S-AF488 in the brain. Extensive tau immunostaining throughout the brain was also confirmed in postmortem tissue (Fig. 6C).

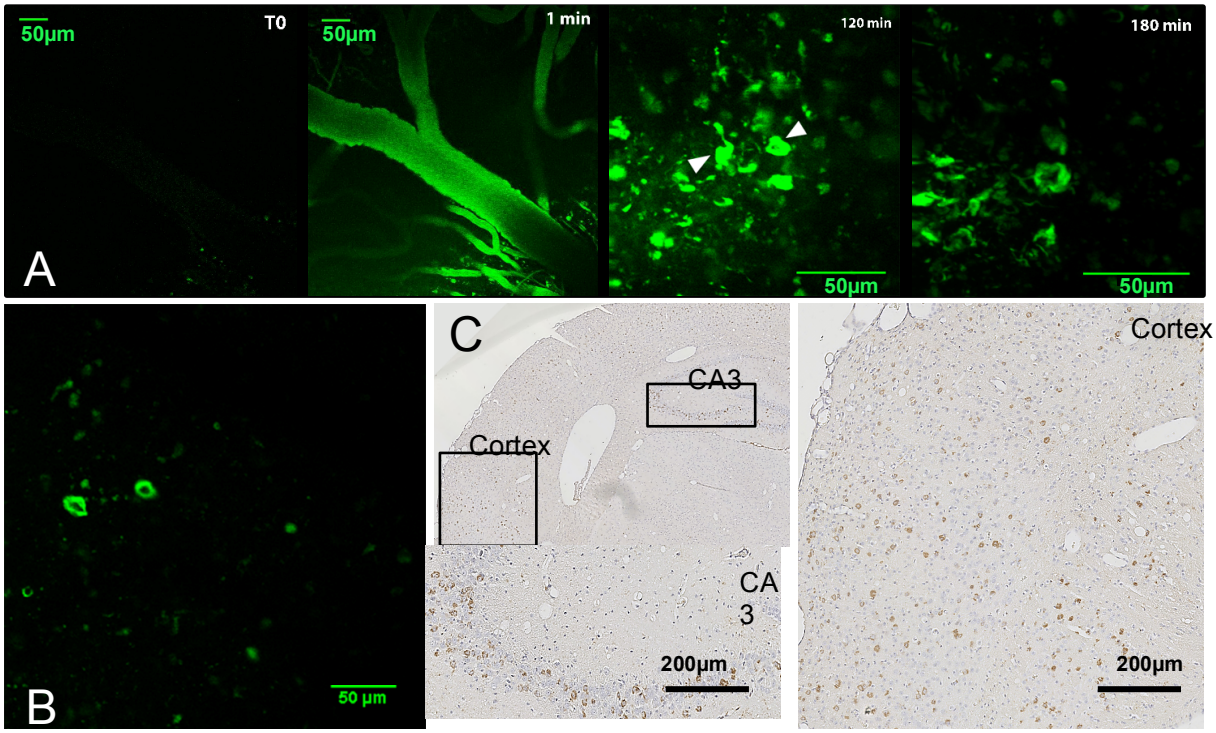


Fig. 6. In vivo imaging of VHH A2-S-AF488 using two-photon microscopy.

(A) Maximum intensity projection of fluorescence in an 8-month-old Tg4510 mouse at different timepoints after iv injection of A2-S-AF488 at 10 mg/kg. Whereas only faint non-specific signal could be detected before iv injection (T0), a strong staining of arborescent vessels was observed a few seconds after iv injection. Specific labeling of NFTs (white arrows) occurred only after 120 min, with a maximum intensity after 180 min. (B) Specific staining of NFTs was observed 4 hours post injection. (C) *Ex vivo* detection of NFT labeling by extrinsic A2 VHH on brain sections obtained from Tg4510 mice four hours after iv injection of A2-S-AF488. The image on the bottom left and the image on the right showed magnified views in the cortex and CA3.

In summary, VHH A2-S-AF488 efficiently crossed the BBB and penetrated into neurons to reach its cytoplasmic target. As for *in vivo* R3VQ experiments, target labeling was visible four hours after administration demonstrating slow turnover of target-associated VHHs in the brain.

4. DISCUSSION

4.1. VHHs bind to both extracellular and intracellular brain targets

VHHs were generated to Aβ42 and phospho-tau (R3VQ and A2, respectively). Their specificities were biochemically assessed and then confirmed by immunohistochemistry on both human and AD transgenic mouse brain tissues. To the best of our knowledge, the VHH A2 presented here is the first engineered VHH capable of immunodetecting AD-associated intraneuronal NFT pathology.
By means of stereotaxic injection we then confirmed the ability of R3VQ and A2 to label their targets *in vivo* after rapid diffusion in brain tissue, a result that may be explained by the small size of the constructs [13]. Notably, the antigen binding properties of both VHHs were preserved after conjugation with AlexaFluor 488, therefore opening up opportunities to use labeled VHHs for *in vivo* imaging.

4.2. VHHs cross the BBB and efficiently diffuse in the brain

A few VHHs have been shown to cross the BBB by receptor-mediated transcytosis [31,32]. We have previously shown that VHH E9 with basic pI was able to passively cross the BBB, diffuse in the brain parenchyma and label astrocytes *in vivo* [18].
An anti-Aβ VHH (pa2H) was previously reported to cross the BBB *in vivo* [29]. However pa2H brain uptake was too low to allow *in vivo* imaging. More recently the same research group designed a glutathione PEGylated liposomal encapsulation system to enhance the delivery of pa2H across the BBB [33]. SPECT imaging performed in this study did not however allow the visualization of pa2H brain penetration. In our study plaques and NFTs were detected *in vivo* after a single iv injection of fluorescent R3VQ and A2 respectively, confirming they readily cross the BBB and have exquisite sensitivity of the engineered VHHs. The presence of VHHs throughout the brain was subsequently confirmed by immunohistochemistry. Labeling of amyloid plaques and NFTs by R3VQ and A2 respectively was detectable with high signal intensity up to 4 hours post-injection, suggesting a long half-life of VHHs in the brain, at least when bound to target. Indeed, Nabuurs and collaborators indicated that their anti-Aβ VHH remained detectable in the brain for at least 24 hours post-injection [29].
R3VQ-S-AF488 demonstrated rapid diffusion (0.5-1 h post-injection) throughout the brain of PS2APP mice and showed high specificity for Aβ deposits in both parenchymal (Aβ plaques) and vascular spaces (CAA). In the Tg4510 mice receiving iv injection of A2-S-AF488, the specific staining of NFTs was observed 2h post-injection, much later than with R3VQ-S-AF488, probably because A2-S-AF488 had to cross two barriers: the BBB and the cell membrane of neurons containing NFTs.

Traumatic uncontrolled BBB opening during the two-photon imaging procedure related to local brain bleeding due to craniotomy could have explained our results, however such a possibility is implausible. First we observed that both R3VQ and A2 VHHs were distributed throughout the whole brain following iv injection and not only in the vicinity of the cranial window as would be the case if there was local bleeding. Second, four hours after iv injection into transgenic mice *without any cranial surgery* both fluorescent VHHs labeled their respective targets in the brain.
It remains possible that the passage of VHHs across the BBB resulted from a “naturally-compromised” barrier in the transgenic mice. Indeed, during normal aging, the permeability of the BBB increases, and disruption of the BBB occurs in a number of neurological disorders,

including AD [34,35]. A recent study indicates however a lack of BBB permeability in the PS2APP transgenic line we used for R3VQ imaging [36], even at the oldest ages. Evidence of BBB leakage has been reported in Tg4510 mice but starting at 9 months of age [37] however we conducted *in vivo* imaging in younger animals. We confirmed the absence of BBB leakage in the two models we used by demonstrating that conventional immunoglobulin specific for the targeted antigens did not significantly penetrate into the CNS following iv injection. Finally, it could be argued that high VHH concentrations (from 10 to 50 mg/kg) induce a transient disruption of the BBB and an extravasation of the VHH. However, our previous study using an Evans Blue dye exclusion assay showed that VHHs do not compromise the BBB even using VHH at very high concentration (133 mg/kg, *i.e.* 4 mg for an adult mouse) [18].

To summarize we showed that both R3VQ and A2 can cross the BBB after peripheral administration and bind to extracellular (plaques) and intracellular (tangles) brain targets. The factors influencing VHH transit across the BBB are poorly understood. The molecular size of VHHs was demonstrated to be an important parameter for their brain penetration with a rate of passage decreased for large-sized VHH constructs: dimers of VHH (molecular weight of 28kDa) or a VHH fused to EGFP (molecular weight of 40 kDa) [18]. The molecular weight of the VHH-S-AF488 used in the present study was slightly increased by the addition of a fluorophore (+ 1 kDa), but this modification did not affect their apparent brain penetration. Basic pI also appears to be an important parameter since a VHH variant with a near-neutral pI (R3VE) showed only limited brain penetration. In our previous study using an anti-GFAP VHH we showed that BBB crossing was not energy-dependent, suggesting active transport is not involved [18]. The transmigration of basic VHHs through the BBB probably occurs by adsorptive-mediated endocytosis initiated by non-specific, charge-based interactions with proteins at the endothelial cell surface [38–41]. Recent studies demonstrated that proteins with high net positive charge have indeed the ability to penetrate mammalian cells and deliver macromolecules into cells *in vitro* and *in vivo* [42,43]. Understanding the precise mechanism of VHH BBB passage will be important for optimizing efficient targeted probes in the future.

4.3. VHH potential for AD diagnosis

Until now the development of imaging markers for AD brain lesions has focused on PET ligands [44–50]. However PET imaging suffers from numerous drawbacks, namely, low spatial resolution, exposure to radiation, limited availability and high cost. Conversely, MRI provides information with high spatial resolution, does not rely on ionizing radiations and is widely available for clinical use. Previous attempts have been made to use MR contrast agents for visualizing amyloid deposits in AD mouse models. However these studies relied on artificial BBB opening by ultrasound [7,8] or BBB permeability enhancers such as mannitol [9]. With the goal of developing a more physiological approach we are currently improving a method for site-specifically conjugating VHHs to paramagnetic gadolinium. The VHHs described in the present work could be conjugated with gadolinium to provide a novel MR imaging agents for AD.

An important parameter to consider is the potential immunogenicity of VHHs in human patients, if they would be applied for diagnosis and/or follow-up of the patients with AD. VHHs actually have multiple advantages for diagnostic applications, such as small size, high stability, fast blood clearance [12]. Also VHH sequences share high homology with human VH

sequences[51]. All these characteristics predict low immunogenicity of VHHs. Indeed, previous studies underlined that VHHs did not induce an immunogenic reaction after injection in mice [52–54] and a lower risk of immunogenicity was expected in humans. Moreover, VHHs can be humanized without loss of their stability, affinity and specificity [55,56], and numerous VHHs are currently in clinical development (http://www.ablynx.com/rd-portfolio/overview/).

4.4. Conclusions

We describe novel VHHs that could be potentially used as *in vivo* imaging agents able to detect brain lesions observed in human diseases, e.g. Alzheimer's disease. VHH R3VQ binds to brain Aβ deposits and VHH A2 recognizes neuronal pathological tau inclusions. VHHs are able to penetrate the brain more efficiently than conventional IgGs and they can be readily site-specifically modified for *in vivo* imaging of neurodegenerative diseases with extracellular or intracellular misfolded protein aggregates.

Acknowledgments

We would like to thank the GIE Neuro-CEB of Hôpital de la Pitié-Salpêtrière for providing human AD brain tissue. We gratefully acknowledge financial support from the Institut Roche de Recherche et Médecine Translationnelle. This work was also supported by the “Foundation France Alzheimer” and the “Foundation Georges Pompidou”. The present work was also supported by funding from the program “Investissements d'avenir ANR-10-IAIHU-06”. The immunohistochemistry of this work was carried out on the HISTOMICS platform of the ICM and we sincerely acknowledge all staff involved.

References

[1] M.J. Coloma, H.J. Lee, A. Kurihara, E.M. Landaw, R.J. Boado, S.L. Morrison, W.M. Pardridge, Transport across the primate blood-brain barrier of a genetically engineered chimeric monoclonal antibody to the human insulin receptor., Pharm. Res. 17 (2000) 266–74. doi:10.1023/A:1007592720793.

[2] F. Bard, C. Cannon, R. Barbour, R.L. Burke, D. Games, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, M. Lee, I. Lieberburg, R. Motter, M. Nguyen, F. Soriano, N. Vasquez, K. Weiss, B. Welch, P. Seubert, D. Schenk, T. Yednock, Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease., Nat. Med. 6 (2000) 916–9. doi:10.1038/78682.

[3] J. Niewoehner, B. Bohrmann, L. Collin, E. Urich, H. Sade, P. Maier, P. Rueger, J.O. Stracke, W. Lau, A.C. Tissot, H. Loetscher, A. Ghosh, P.-O. Freskgård, Increased brain penetration and potency of a therapeutic antibody using a monovalent molecular shuttle., Neuron. 81 (2014) 49–60. doi:10.1016/j.neuron.2013.10.061.

[4] R.J. Boado, E.K.-W. Hui, J.Z. Lu, R.K. Sumbria, W.M. Pardridge, Blood-brain barrier molecular trojan horse enables imaging of brain uptake of radioiodinated recombinant protein in the rhesus monkey., Bioconjug. Chem. 24 (2013) 1741–9. doi:10.1021/bc400319d.

[5] J. a. Couch, Y.J. Yu, Y. Zhang, J.M. Tarrant, R.N. Fuji, W.J. Meilandt, H. Solanoy, R.K. Tong, K. Hoyte, W. Luk, Y. Lu, K. Gadkar, S. Prabhu, B. a. Ordonia, Q. Nguyen, Y. Lin, Z. Lin, M. Balazs, K. Scearce-Levie, J. a. Ernst, M.S. Dennis, R.J. Watts, Addressing Safety Liabilities of TfR Bispecific Antibodies That Cross the Blood-Brain Barrier, Sci. Transl. Med. 5 (2013) 183ra57–183ra57. doi:10.1126/scitranslmed.3005338.

[6] S. Ohshima-Hosoyama, H. a Simmons, N. Goecks, V. Joers, C.R. Swanson, V. Bondarenko, R. Velotta, K. Brunner, L.D. Wood, R.H. Hruban, M.E. Emborg, A monoclonal antibody-GDNF fusion protein is not neuroprotective and is associated with proliferative pancreatic lesions in parkinsonian monkeys., PLoS One. 7 (2012) e39036. doi:10.1371/journal.pone.0039036.

[7] M.D. Santin, T. Debeir, S.L. Bridal, T. Rooney, M. Dhenain, Fast in vivo imaging of amyloid plaques using µ-MRI Gd-staining combined with ultrasound-induced blood-brain barrier opening., Neuroimage. 79 (2013) 288–94. doi:10.1016/j.neuroimage.2013.04.106.

[8] B. Matharu, N. Spencer, F. Howe, B. Austen, Gadolinium-complexed Aβ-binding contrast agents for MRI diagnosis of Alzheimer's Disease., Neuropeptides. (2015) 1–8. doi:10.1016/j.npep.2015.07.001.

[9] E.M. Sigurdsson, Y.Z. Wadghiri, L. Mosconi, J. a. Blind, E. Knudsen, A. Asuni, H. Scholtzova, W.H. Tsui, Y. Li, M. Sadowski, D.H. Turnbull, M.J. de Leon, T. Wisniewski, A non-toxic ligand for voxel-based MRI analysis of plaques in AD transgenic mice, Neurobiol. Aging. 29 (2008) 836–847. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2006.12.018.

[10] A. Rodriguez, S.B. Tatter, W. Debinski, Neurosurgical Techniques for Disruption of the Blood-Brain Barrier for Glioblastoma Treatment., Pharmaceutics. 7 (2015) 175–87. doi:10.3390/pharmaceutics7030175.

[11] C. Hamers-Casterman, T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Hamers, E.B. Songa, N. Bendahman, R. Hamers, Naturally occurring antibodies devoid of light chains., Nature. 363 (1993) 446–8. doi:10.1038/363446a0.

[12] S. Muyldermans, Nanobodies: natural single-domain antibodies., Annu. Rev. Biochem.

82 (2013) 775–97. doi:10.1146/annurev-biochem-063011-092449.
[13] C. Perruchini, F. Pecorari, J.-P. Bourgeois, C. Duyckaerts, F. Rougeon, P. Lafaye, Llama VHH antibody fragments against GFAP: better diffusion in fixed tissues than classical monoclonal antibodies., Acta Neuropathol. 118 (2009) 685–95. doi:10.1007/s00401-009-0572-6.
[14] V. Cortez-Retamozo, M. Lauwereys, G. Hassanzadeh Gh, M. Gobert, K. Conrath, S. Muyldermans, P. De Baetselier, H. Revets, Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels., Int. J. Cancer. 98 (2002) 456–62. doi:10.1002/ijc.10212.
[15] Z. Li, B.-F. Krippendorff, S. Sharma, A.C. Walz, T. Lavé, D.K. Shah, Influence of molecular size on tissue distribution of antibody fragments., MAbs. 8 (2016) 113–9. doi:10.1080/19420862.2015.1111497.
[16] U. Rothbauer, K. Zolghadr, S. Tillib, D. Nowak, L. Schermelleh, A. Gahl, N. Backmann, K. Conrath, S. Muyldermans, M.C. Cardoso, H. Leonhardt, Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies., Nat. Methods. 3 (2006) 887–9. doi:10.1038/nmeth953.
[17] J. Helma, K. Schmidthals, V. Lux, S. Nüske, A.M. Scholz, H.-G. Kräusslich, U. Rothbauer, H. Leonhardt, Direct and dynamic detection of HIV-1 in living cells., PLoS One. 7 (2012) e50026. doi:10.1371/journal.pone.0050026.
[18] T. Li, J.-P. Bourgeois, S. Celli, F. Glacial, A.-M. Le Sourd, S. Mecheri, B. Weksler, I. Romero, P.-O. Couraud, F. Rougeon, P. Lafaye, Cell-penetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the blood-brain barrier and specifically recognize astrocytes: application to brain imaging., FASEB J. 26 (2012) 3969–79. doi:10.1096/fj.11-201384.
[19] I. Van Audenhove, K. Van Impe, D. Ruano-Gallego, S. De Clercq, K. De Muynck, B. Vanloo, H. Verstraete, L.Á. Fernández, J. Gettemans, Mapping cytoskeletal protein function in cells by means of nanobodies., Cytoskeleton (Hoboken). 70 (2013) 604–22. doi:10.1002/cm.21122.
[20] A. Rocchetti, C. Hawes, V. Kriechbaumer, Fluorescent labelling of the actin cytoskeleton in plants using a cameloid antibody., Plant Methods. 10 (2014) 12. doi:10.1186/1746-4811-10-12.
[21] B. Traenkle, F. Emele, R. Anton, O. Poetz, R.S. Haeussler, J. Maier, P.D. Kaiser, A.M. Scholz, S. Nueske, A. Buchfellner, T. Romer, U. Rothbauer, Monitoring interactions and dynamics of endogenous beta-catenin with intracellular nanobodies in living cells., Mol. Cell. Proteomics. 14 (2015) 707–23. doi:10.1074/mcp.M114.044016.
[22] J. Maier, B. Traenkle, U. Rothbauer, Real-time analysis of epithelial-mesenchymal transition using fluorescent single-domain antibodies., Sci. Rep. 5 (2015) 13402. doi:10.1038/srep13402.
[23] P. Lafaye, I. Achour, P. England, C. Duyckaerts, F. Rougeon, Single-domain antibodies recognize selectively small oligomeric forms of amyloid beta, prevent Abeta-induced neurotoxicity and inhibit fibril formation., Mol. Immunol. 46 (2009) 695–704. doi:10.1016/j.molimm.2008.09.008.
[24] L. Ozmen, A. Albientz, C. Czech, H. Jacobsen, Expression of transgenic APP mRNA is the key determinant for beta-amyloid deposition in PS2APP transgenic mice., Neurodegener. Dis. 6 (2009) 29–36. doi:10.1159/000170884.
[25] C. Weidensteiner, F. Metzger, A. Bruns, B. Bohrmann, B. Kuennecke, M. von Kienlin, Cortical hypoperfusion in the B6.PS2APP mouse model for Alzheimer's disease: comprehensive phenotyping of vascular and tissular parameters by MRI., Magn.

Reson. Med. 62 (2009) 35–45. doi:10.1002/mrm.21985.
[26] K. Santacruz, J. Lewis, T. Spires, J. Paulson, L. Kotilinek, M. Ingelsson, a Guimaraes, M. DeTure, M. Ramsden, E. McGowan, C. Forster, M. Yue, J. Orne, C. Janus, a Mariash, M. Kuskowski, B. Hyman, M. Hutton, K.H. Ashe, Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function., Science. 309 (2005) 476–81. doi:10.1126/science.1113694.
[27] P. Agarwal, C.R. Bertozzi, Site-specific antibody-drug conjugates: the nexus of bioorthogonal chemistry, protein engineering, and drug development., Bioconjug. Chem. 26 (2015) 176–92. doi:10.1021/bc5004982.
[28] I. Alafuzoff, D.R. Thal, T. Arzberger, N. Bogdanovic, S. Al-Sarraj, I. Bodi, S. Boluda, O. Bugiani, C. Duyckaerts, E. Gelpi, S. Gentleman, G. Giaccone, M. Graeber, T. Hortobagyi, R. Höftberger, P. Ince, J.W. Ironside, N. Kavantzas, A. King, P. Korkolopoulou, G.G. Kovács, D. Meyronet, C. Monoranu, T. Nilsson, P. Parchi, E. Patsouris, M. Pikkarainen, T. Revesz, A. Rozemuller, D. Seilhean, W. Schulz-Schaeffer, N. Streichenberger, S.B. Wharton, H. Kretzschmar, Assessment of beta-amyloid deposits in human brain: a study of the BrainNet Europe Consortium., Acta Neuropathol. 117 (2009) 309–20. doi:10.1007/s00401-009-0485-4.
[29] R.J. a Nabuurs, K.S. Rutgers, M.M. Welling, A. Metaxas, M.E. de Backer, M. Rotman, B.J. Bacskai, M. a van Buchem, S.M. van der Maarel, L. van der Weerd, In vivo detection of amyloid-β deposits using heavy chain antibody fragments in a transgenic mouse model for Alzheimer's disease., PLoS One. 7 (2012) e38284. doi:10.1371/journal.pone.0038284.
[30] M. Mercken, M. Vandermeeren, U. Lübke, J. Six, J. Boons, A. Van de Voorde, J.J. Martin, J. Gheuens, Monoclonal antibodies with selective specificity for Alzheimer Tau are directed against phosphatase-sensitive epitopes., Acta Neuropathol. 84 (1992) 265–72. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1384266 (accessed December 18, 2013).
[31] A. Muruganandam, J. Tanha, S. Narang, D. Stanimirovic, Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transmigrate across human blood-brain barrier endothelium., FASEB J. 16 (2002) 240–2. doi:10.1096/fj.01-0343fje.
[32] K.S. Rutgers, A. van Remoortere, M. a van Buchem, C.T. Verrips, S.M. Greenberg, B.J. Bacskai, M.P. Frosch, S.G. van Duinen, M.L. Maat-Schieman, S.M. van der Maarel, Differential recognition of vascular and parenchymal beta amyloid deposition., Neurobiol. Aging. 32 (2011) 1774–83. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2009.11.012.
[33] M. Rotman, M.M. Welling, A. Bunschoten, M.E. de Backer, J. Rip, R.J. a Nabuurs, P.J. Gaillard, M. a van Buchem, S.M. van der Maarel, L. van der Weerd, Enhanced glutathione PEGylated liposomal brain delivery of an anti-amyloid single domain antibody fragment in a mouse model for Alzheimer's disease., J. Control. Release. 203 (2015) 40–50. doi:10.1016/j.jconrel.2015.02.012.
[34] M. a Erickson, W. a Banks, Blood-brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer's disease., J. Cereb. Blood Flow Metab. 33 (2013) 1500–13. doi:10.1038/jcbfm.2013.135.
[35] F. Marques, J.C. Sousa, N. Sousa, J.A. Palha, Blood-brain-barriers in aging and in Alzheimer's disease., Mol. Neurodegener. 8 (2013) 38. doi:10.1186/1750-1326-8-38.
[36] N. Bien-Ly, C.A. Boswell, S. Jeet, T.G. Beach, K. Hoyte, W. Luk, V. Shihadeh, S. Ulufatu, O. Foreman, Y. Lu, J. DeVoss, M. van der Brug, R.J. Watts, Lack of Widespread BBB Disruption in Alzheimer's Disease Models: Focus on Therapeutic Antibodies., Neuron.

88 (2015) 289–97. doi:10.1016/j.neuron.2015.09.036.
[37] L.J. Blair, H.D. Frauen, B. Zhang, B. a Nordhues, S. Bijan, Y.-C. Lin, F. Zamudio, L.D. Hernandez, J.J. Sabbagh, M.-L.B. Selenica, C. a Dickey, Tau depletion prevents progressive blood-brain barrier damage in a mouse model of tauopathy., Acta Neuropathol. Commun. 3 (2015) 8. doi:10.1186/s40478-015-0186-2.
[38] N.J. Abbott, Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery., J. Inherit. Metab. Dis. 36 (2013) 437–49. doi:10.1007/s10545-013-9608-0.
[39] A. Abulrob, H. Sprong, P. Van Bergen en Henegouwen, D. Stanimirovic, The blood-brain barrier transmigrating single domain antibody: mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells., J. Neurochem. 95 (2005) 1201–14. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03463.x.
[40] U. Bickel, T. Yoshikawa, W.M. Pardridge, Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier., Adv. Drug Deliv. Rev. 46 (2001) 247–79. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11259843.
[41] a W. Vorbrodt, Ultracytochemical characterization of anionic sites in the wall of brain capillaries., J. Neurocytol. 18 (1989) 359–68. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2746307.
[42] J.J. Cronican, D.B. Thompson, K.T. Beier, B.R. McNaughton, C.L. Cepko, D.R. Liu, Potent delivery of functional proteins into Mammalian cells in vitro and in vivo using a supercharged protein., ACS Chem. Biol. 5 (2010) 747–52. doi:10.1021/cb1001153.
[43] J.J. Cronican, K.T. Beier, T.N. Davis, J.-C. Tseng, W. Li, D.B. Thompson, A.F. Shih, E.M. May, C.L. Cepko, A.L. Kung, Q. Zhou, D.R. Liu, A class of human proteins that deliver functional proteins into mammalian cells in vitro and in vivo., Chem. Biol. 18 (2011) 833–8. doi:10.1016/j.chembiol.2011.07.003.
[44] C.M. Clark, 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.M. Reiman, S.P. Zehntner, D.M. Skovronsky, Use of florbetapir-PET for imaging beta-amyloid pathology., JAMA. 305 (2011) 275–83. doi:10.1001/jama.2010.2008.
[45] Y. Kimura, M. Ichise, H. Ito, H. Shimada, Y. Ikoma, C. Seki, H. Takano, S. Kitamura, H. Shinotoh, K. Kawamura, M.-R. Zhang, N. Sahara, T. Suhara, M. Higuchi, PET Quantification of Tau Pathology in Human Brain with 11C-PBB3., J. Nucl. Med. 56 (2015) 1359–65. doi:10.2967/jnumed.115.160127.
[46] W.E. Klunk, H. Engler, A. Nordberg, Y. Wang, G. Blomqvist, D.P. Holt, M. Bergström, I. Savitcheva, G. Huang, S. Estrada, B. Ausén, M.L. Debnath, J. Barletta, J.C. Price, J. Sandell, B.J. Lopresti, A. Wall, P. Koivisto, G. Antoni, C.A. Mathis, B. Långström, Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B., Ann. Neurol. 55 (2004) 306–19. doi:10.1002/ana.20009.
[47] M. Maruyama, H. Shimada, T. Suhara, H. Shinotoh, B. Ji, J. Maeda, M.-R. Zhang, J.Q. Trojanowski, V.M.-Y. Lee, M. Ono, K. Masamoto, H. Takano, N. Sahara, N. Iwata, N. Okamura, S. Furumoto, Y. Kudo, Q. Chang, T.C. Saido, A. Takashima, J. Lewis, M.-K. Jang, I. Aoki, H. Ito, M. Higuchi, Imaging of tau pathology in a tauopathy mouse model and in Alzheimer patients compared to normal controls., Neuron. 79 (2013) 1094–108. doi:10.1016/j.neuron.2013.07.037.
[48] N. Okamura, S. Furumoto, M.T. Fodero-Tavoletti, R.S. Mulligan, R. Harada, P. Yates, S. Pejoska, Y. Kudo, C.L. Masters, K. Yanai, C.C. Rowe, V.L. Villemagne, Non-invasive

assessment of Alzheimer's disease neurofibrillary pathology using 18F-THK5105 PET., Brain. 137 (2014) 1762–71. doi:10.1093/brain/awu064.
[49] M. Brendel, A. Jaworska, F. Probst, F. Overhoff, V. Korzhova, S. Lindner, J. Carlsen, P. Bartenstein, R. Harada, Y. Kudo, C. Haass, F. van Leuven, N. Okamura, J. Herms, A. Rominger, microPET Imaging of Tau Pathology with [18F]-THK5117 in two Transgenic Mouse Models., J. Nucl. Med. 49 (2016) 1–32. doi:10.2967/jnumed.115.163493.
[50] D. Sehlin, X.T. Fang, L. Cato, G. Antoni, L. Lannfelt, S. Syvänen, Antibody-based PET imaging of amyloid beta in mouse models of Alzheimer's disease., Nat. Commun. 7 (2016) 10759. doi:10.1038/ncomms10759.
[51] I. Achour, P. Cavelier, M. Tichit, C. Bouchier, P. Lafaye, F. Rougeon, Tetrameric and homodimeric camelid IgGs originate from the same IgH locus., J. Immunol. 181 (2008) 2001–9. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18641337.
[52] T.N. Baral, S. Magez, B. Stijlemans, K. Conrath, B. Vanhollebeke, E. Pays, S. Muyldermans, P. De Baetselier, Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated human trypanolytic factor., Nat. Med. 12 (2006) 580–4. doi:10.1038/nm1395.
[53] K. Coppieters, T. Dreier, K. Silence, H. de Haard, M. Lauwereys, P. Casteels, E. Beirnaert, H. Jonckheere, C. Van de Wiele, L. Staelens, J. Hostens, H. Revets, E. Remaut, D. Elewaut, P. Rottiers, Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis., Arthritis Rheum. 54 (2006) 1856–66. doi:10.1002/art.21827.
[54] V. Cortez-Retamozo, N. Backmann, P.D. Senter, U. Wernery, P. De Baetselier, S. Muyldermans, H. Revets, Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate., Cancer Res. 64 (2004) 2853–7. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15087403 (accessed January 10, 2014).
[55] C. Vincke, R. Loris, D. Saerens, S. Martinez-Rodriguez, S. Muyldermans, K. Conrath, General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold., J. Biol. Chem. 284 (2009) 3273–84. doi:10.1074/jbc.M806889200.
[56] J.D. Unciti-Broceta, T. Del Castillo, M. Soriano, S. Magez, J. a Garcia-Salcedo, Novel therapy based on camelid nanobodies., Ther. Deliv. 4 (2013) 1321–36. doi:10.4155/tde.13.87.

Références

1. 2017 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* **13,** 325–373 (2017).
2. From the Centers for Disease Control and Prevention. Public health and aging: trends in aging--United States and worldwide. *JAMA* **289,** 1371–1373 (2003).
3. Querfurth, H. W. & LaFerla, F. M. Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **362,** 329–344 (2010).
4. Robinson, M., Lee, B. Y. & Hane, F. T. Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 2: Genetics and Epidemiology. *J. Alzheimers Dis. JAD* **57,** 317–330 (2017).
5. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. (American Psychiatric Association, 2013).
6. Nestor, P. J., Fryer, T. D. & Hodges, J. R. Declarative memory impairments in Alzheimer's disease and semantic dementia. *NeuroImage* **30,** 1010–1020 (2006).
7. Ergis, A.-M. & Eusop-Roussel, E. [Early episodic memory impairments in Alzheimer's disease]. *Rev. Neurol. (Paris)* **164 Suppl 3,** S96–S101 (2008).
8. Salmon, D. P. & Bondi, M. W. Neuropsychological assessment of dementia. *Annu. Rev. Psychol.* **60,** 257–282 (2009).
9. Carlesimo, G. A. & Oscar-Berman, M. Memory deficits in Alzheimer's patients: a comprehensive review. *Neuropsychol. Rev.* **3,** 119–169 (1992).
10. Masters, C. L. *et al.* Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Dis. Primer* **1,** 15056 (2015).
11. McKhann, G. M. *et al.* 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. J. Alzheimers Assoc.* **7,** 263–269 (2011).
12. Dubois, B. *et al.* Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol.* **13,** 614–629 (2014).
13. Dubois, B. *et al.* Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimers Dement.* **12,** 292–323 (2016).

14. Counts, S. E., Ikonomovic, M. D., Mercado, N., Vega, I. E. & Mufson, E. J. Biomarkers for the Early Detection and Progression of Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics* **14,** 35–53 (2017).
15. Lane, C. A., Hardy, J. & Schott, J. M. Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurol.* **25,** 59–70 (2018).
16. Sperling, R. A. *et al.* Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* **7,** 280–292 (2011).
17. Jack, C. R. *et al.* An operational approach to National Institute on Aging-Alzheimer's Association criteria for preclinical Alzheimer disease. *Ann. Neurol.* **71,** 765–775 (2012).
18. Elman, J. A. *et al.* Neural compensation in older people with brain amyloid-β deposition. *Nat. Neurosci.* **17,** 1316–1318 (2014).
19. Petersen, R. C. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J. Intern. Med.* **256,** 183–194 (2004).
20. Blennow, K., de Leon, M. J. & Zetterberg, H. Alzheimer's disease. *Lancet Lond. Engl.* **368,** 387–403 (2006).
21. Jellinger, K. A. Neuropathological aspects of Alzheimer disease, Parkinson disease and frontotemporal dementia. *Neurodegener. Dis.* **5,** 118–121 (2008).
22. Fändrich, M. On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **64,** 2066–2078 (2007).
23. Pearson, H. A. & Peers, C. Physiological roles for amyloid beta peptides. *J. Physiol.* **575,** 5–10 (2006).
24. Bai, X.-C. *et al.* An atomic structure of human γ-secretase. *Nature* **525,** 212–217 (2015).
25. Hunter, S. & Brayne, C. Understanding the roles of mutations in the amyloid precursor protein in Alzheimer disease. *Mol. Psychiatry* **23,** 81–93 (2018).
26. Hane, F. T., Lee, B. Y. & Leonenko, Z. Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 1: Pathology. *J. Alzheimers Dis.* **57,** 1–28 (2017).

27. Cirrito, J. R. *et al.* In vivo assessment of brain interstitial fluid with microdialysis reveals plaque-associated changes in amyloid-beta metabolism and half-life. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **23,** 8844–8853 (2003).
28. Masters, C. L. *et al.* Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82,** 4245–4249 (1985).
29. Kayed, R. & Lasagna-Reeves, C. A. Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity. *J. Alzheimers Dis. JAD* **33 Suppl 1,** S67-78 (2013).
30. Gandy, S. The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* **115,** 1121–1129 (2005).
31. Duyckaerts, C., Delatour, B. & Potier, M.-C. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **118,** 5–36 (2009).
32. Brilliant, M. J., Elble, R. J., Ghobrial, M. & Struble, R. G. The distribution of amyloid beta protein deposition in the corpus striatum of patients with Alzheimer's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **23,** 322–325 (1997).
33. Wisniewski, H. M., Sadowski, M., Jakubowska-Sadowswka, K., Tarnawski, M. & Wegiel, J. Diffuse, Lake-like Amyloid-β Deposits in the Parvopyramidal Layer of the Presubiculum in Alzheimer Disease: *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **57,** 674–683 (1998).
34. Thal, D. R. *et al.* Fleecy Amyloid Deposits in the Internal Layers of the Human Entorhinal Cortex are Comprised of N-terminal Truncated Fragments of Aβ: *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **58,** 210–216 (1999).
35. Güntert, A., Döbeli, H. & Bohrmann, B. High sensitivity analysis of amyloid-beta peptide composition in amyloid deposits from human and PS2APP mouse brain. *Neuroscience* **143,** 461–475 (2006).
36. Jarrett, J. T., Berger, E. P. & Lansbury, P. T. 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 (Mosc.)* **32,** 4693–4697 (1993).

37. Mann, D. M. A. *et al.* Cases of Alzheimer's disease due to deletion of exon 9 of the presenilin-1 gene show an unusual but characteristic beta-amyloid pathology known as 'cotton wool' plaques. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **27,** 189–196 (2001).

38. Le, T. V., Crook, R., Hardy, J. & Dickson, D. W. Cotton wool plaques in non-familial late-onset Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **60,** 1051–1061 (2001).

39. Shepherd, C. E., Gregory, G. C., Vickers, J. C. & Halliday, G. M. Novel 'inflammatory plaque' pathology in presenilin-1 Alzheimer's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **31,** 503–511 (2005).

40. *Molecular biology of Alzheimer's disease: genes and mechanisms involved in amyloid generation*. (Harwood Acad. Publ, 1998).

41. Gouras, G. K. *et al.* Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am. J. Pathol.* **156,** 15–20 (2000).

42. Gouras, G. K., Almeida, C. G. & Takahashi, R. H. Intraneuronal Aβ accumulation and origin of plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **26,** 1235–1244 (2005).

43. Mori, C. *et al.* Intraneuronal Abeta42 accumulation in Down syndrome brain. *Amyloid Int. J. Exp. Clin. Investig. Off. J. Int. Soc. Amyloidosis* **9,** 88–102 (2002).

44. D'Andrea, M. R. *et al.* Lipofuscin and Aβ42 exhibit distinct distribution patterns in normal and Alzheimer's disease brains. *Neurosci. Lett.* **323,** 45–49 (2002).

45. Oddo, S. *et al.* Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* **39,** 409–421 (2003).

46. Love, S. & Miners, J. S. Cerebrovascular disease in ageing and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **131,** 645–658 (2016).

47. Mattsson, N. *et al.* Association of brain amyloid-β with cerebral perfusion and structure in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Brain J. Neurol.* **137,** 1550–1561 (2014).

48. Levy, E. *et al.* Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science* **248,** 1124–1126 (1990).

49. Kumar-Singh, S. *et al.* Dense-core senile plaques in the Flemish variant of Alzheimer's disease are vasocentric. *Am. J. Pathol.* **161,** 507–520 (2002).
50. Thal, D. R., Griffin, W. S. T., de Vos, R. A. I. & Ghebremedhin, E. Cerebral amyloid angiopathy and its relationship to Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **115,** 599–609 (2008).
51. Castellani, R. J., Rolston, R. K. & Smith, M. A. Alzheimer disease. *Dis.--Mon. DM* **56,** 484–546 (2010).
52. Thal, D. R., Walter, J., Saido, T. C. & Fändrich, M. Neuropathology and biochemistry of Aβ and its aggregates in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **129,** 167–182 (2015).
53. Hardy, J. & Higgins, G. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256,** 184–185 (1992).
54. Schönheit, B., Zarski, R. & Ohm, T. G. Spatial and temporal relationships between plaques and tangles in Alzheimer-pathology. *Neurobiol. Aging* **25,** 697–711 (2004).
55. Duyckaerts, C. & Hauw, J. J. Prevalence, incidence and duration of Braak's stages in the general population: can we know? *Neurobiol. Aging* **18,** 362–369; discussion 389-392 (1997).
56. Braak, H. & Braak, E. Frequency of Stages of Alzheimer-Related Lesions in Different Age Categories. *Neurobiol. Aging* **18,** 351–357 (1997).
57. Braak, H. & Del Tredici, K. The preclinical phase of the pathological process underlying sporadic Alzheimer's disease. *Brain J. Neurol.* **138,** 2814–2833 (2015).
58. Aizenstein, H. J. *et al.* Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. *Arch. Neurol.* **65,** 1509–1517 (2008).
59. Delaère, P. *et al.* Large amounts of neocortical beta A4 deposits without neuritic plaques nor tangles in a psychometrically assessed, non-demented person. *Neurosci. Lett.* **116,** 87–93 (1990).
60. Giannakopoulos, P. *et al.* Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology* **60,** 1495–1500 (2003).
61. Dickson, D. W. *et al.* Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol. Aging* **13,** 179–189 (1992).

62. Gómez-Isla, T. *et al.* Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **41,** 17–24 (1997).
63. Ingelsson, M. *et al.* Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology* **62,** 925–931 (2004).
64. Geerts, H., Roberts, P., Spiros, A. & Carr, R. A strategy for developing new treatment paradigms for neuropsychiatric and neurocognitive symptoms in Alzheimer's disease. *Front. Pharmacol.* **4,** 47 (2013).
65. Selkoe, D. J. Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav. Brain Res.* **192,** 106–113 (2008).
66. Viola, K. L. & Klein, W. L. Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **129,** 183–206 (2015).
67. Buée, L., Bussière, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A. & Hof, P. R. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **33,** 95–130 (2000).
68. Guo, T., Noble, W. & Hanger, D. P. Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **133,** 665–704 (2017).
69. Arendt, T., Stieler, J. T. & Holzer, M. Tau and tauopathies. *Brain Res. Bull.* **126,** 238–292 (2016).
70. Lee, V. M., Goedert, M. & Trojanowski, J. Q. Neurodegenerative tauopathies. *Annu. Rev. Neurosci.* **24,** 1121–1159 (2001).
71. Murray, M. E. *et al.* Clinicopathologic assessment and imaging of tauopathies in neurodegenerative dementias. *Alzheimers Res. Ther.* **6,** 1 (2014).
72. Duyckaerts, C., Delatour, B. & Potier, M.-C. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **118,** 5–36 (2009).
73. Delacourte, A. *et al.* The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* **52,** 1158–1165 (1999).

74. Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E. & Hyman, B. T. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **1,** a006189 (2011).

75. Gómez-Isla, T. *et al.* Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **16,** 4491–4500 (1996).

76. Grignon, Y., Duyckaerts, C., Bennecib, M. & Hauw, J. J. Cytoarchitectonic alterations in the supramarginal gyrus of late onset Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **95,** 395–406 (1998).

77. Whitwell, J. L. Progression of atrophy in Alzheimer's disease and related disorders. *Neurotox. Res.* **18,** 339–346 (2010).

78. Castellani, R. J., Rolston, R. K. & Smith, M. A. Alzheimer disease. *Dis.--Mon. DM* **56,** 484–546 (2010).

79. Duyckaerts, C. *et al.* Cortical atrophy in senile dementia of the Alzheimer type is mainly due to a decrease in cortical length. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **66,** 72–74 (1985).

80. Lei, P. *et al.* Motor and cognitive deficits in aged tau knockout mice in two background strains. *Mol. Neurodegener.* **9,** 29 (2014).

81. Belaidi, A. A. & Bush, A. I. Iron neurochemistry in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: targets for therapeutics. *J. Neurochem.* **139,** 179–197 (2016).

82. Peters, D. G., Connor, J. R. & Meadowcroft, M. D. The relationship between iron dyshomeostasis and amyloidogenesis in Alzheimer's disease: Two sides of the same coin. *Neurobiol. Dis.* **81,** 49–65 (2015).

83. Connor, J. R., Snyder, B. S., Beard, J. L., Fine, R. E. & Mufson, E. J. Regional distribution of iron and iron-regulatory proteins in the brain in aging and Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* **31,** 327–335 (1992).

84. Ding, B. *et al.* Correlation of iron in the hippocampus with MMSE in patients with Alzheimer's disease. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* **29,** 793–798 (2009).

85. P, R. E., H, L. P., A, T. T., Panthea, H. & George, B. Increased Iron Levels and Decreased Tissue Integrity in Hippocampus of Alzheimer's Disease Detected in vivo with Magnetic Resonance Imaging. *J. Alzheimeraposs Dis.* 127–136 (2013). doi:10.3233/JAD-130209
86. Wang, Z.-X. *et al.* Serum Iron, Zinc, and Copper Levels in Patients with Alzheimer's Disease: A Replication Study and Meta-Analyses. *J. Alzheimers Dis. JAD* **47,** 565–581 (2015).
87. Faux, N. G. *et al.* An anemia of Alzheimer's disease. *Mol. Psychiatry* **19,** 1227–1234 (2014).
88. Li, Y. *et al.* Biometal Dyshomeostasis and Toxic Metal Accumulations in the Development of Alzheimer's Disease. *Front. Mol. Neurosci.* **10,** (2017).
89. Everett, J. *et al.* Evidence of redox-active iron formation following aggregation of ferrihydrite and the Alzheimer's disease peptide β-amyloid. *Inorg. Chem.* **53,** 2803–2809 (2014).
90. Collingwood, J. F. *et al.* Three-dimensional tomographic imaging and characterization of iron compounds within Alzheimer's plaque core material. *J. Alzheimers Dis. JAD* **14,** 235–245 (2008).
91. Quintana, C. *et al.* Study of the localization of iron, ferritin, and hemosiderin in Alzheimer's disease hippocampus by analytical microscopy at the subcellular level. *J. Struct. Biol.* **153,** 42–54 (2006).
92. Telling, N. D. *et al.* Iron Biochemistry is Correlated with Amyloid Plaque Morphology in an Established Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Cell Chem. Biol.* **24,** 1205-1215.e3 (2017).
93. Guo, C. *et al.* Deferoxamine inhibits iron induced hippocampal tau phosphorylation in the Alzheimer transgenic mouse brain. *Neurochem. Int.* **62,** 165–172 (2013).
94. Guo, C. *et al.* Intranasal deferoxamine reverses iron-induced memory deficits and inhibits amyloidogenic APP processing in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **34,** 562–575 (2013).
95. McLachlan, D. R., Smith, W. L. & Kruck, T. P. Desferrioxamine and Alzheimer's disease: video home behavior assessment of clinical course and measures of brain aluminum. *Ther. Drug Monit.* **15,** 602–607 (1993).
96. Bowman, G. L. *et al.* Blood-brain barrier impairment in Alzheimer disease: stability and functional significance. *Neurology* **68,** 1809–1814 (2007).

97. Starr, J. M., Farrall, A. J., Armitage, P., McGurn, B. & Wardlaw, J. Blood-brain barrier permeability in Alzheimer's disease: a case-control MRI study. *Psychiatry Res.* **171,** 232–241 (2009).

98. Donahue, J. E. *et al.* RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **112,** 405–415 (2006).

99. Sengillo, J. D. *et al.* Deficiency in mural vascular cells coincides with blood-brain barrier disruption in Alzheimer's disease. *Brain Pathol. Zurich Switz.* **23,** 303–310 (2013).

100. Marco, S. & Skaper, S. D. Amyloid beta-peptide1-42 alters tight junction protein distribution and expression in brain microvessel endothelial cells. *Neurosci. Lett.* **401,** 219–224 (2006).

101. Carrano, A. *et al.* Amyloid Beta induces oxidative stress-mediated blood-brain barrier changes in capillary amyloid angiopathy. *Antioxid. Redox Signal.* **15,** 1167–1178 (2011).

102. Erickson, M. A. & Banks, W. A. Blood-brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer's disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* **33,** 1500–1513 (2013).

103. Bien-Ly, N. *et al.* Lack of Widespread BBB Disruption in Alzheimer's Disease Models: Focus on Therapeutic Antibodies. *Neuron* **88,** 289–297 (2015).

104. Ujiie, M., Dickstein, D. L., Carlow, D. A. & Jefferies, W. A. Blood-brain barrier permeability precedes senile plaque formation in an Alzheimer disease model. *Microcirc. N. Y. N 1994* **10,** 463–470 (2003).

105. Keaney, J. & Campbell, M. The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J.* **282,** 4067–4079 (2015).

106. Montagne, A. *et al.* Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron* **85,** 296–302 (2015).

107. van de Haar, H. J. *et al.* Blood-Brain Barrier Leakage in Patients with Early Alzheimer Disease. *Radiology* **281,** 527–535 (2016).

108. van de Haar, H. J. *et al.* Neurovascular unit impairment in early Alzheimer's disease measured with magnetic resonance imaging. *Neurobiol. Aging* **45,** 190–196 (2016).

109. Buxton, R. B. Quantifying CBF with arterial spin labeling. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* **22,** 723–726 (2005).

110. Cordonnier, C. & van der Flier, W. M. Brain microbleeds and Alzheimer's disease: innocent observation or key player? *Brain* **134,** 335–344 (2011).

111. Cairns, N. J., Chadwick, A., Luthert, P. J. & Lantos, P. L. Astrocytosis, βA4-protein deposition and paired helical filament formation in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* **112,** 68–75 (1992).

112. DeKosky, S. T. & Scheff, S. W. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann. Neurol.* **27,** 457–464 (1990).

113. Scheff, S. W. & Price, D. A. Synapse loss in the temporal lobe in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **33,** 190–199 (1993).

114. Scheff, S. W., Sparks, D. L. & Price, D. A. Quantitative assessment of synaptic density in the outer molecular layer of the hippocampal dentate gyrus in Alzheimer's disease. *Dement. Basel Switz.* **7,** 226–232 (1996).

115. Scheff, S. W., Price, D. A., Schmitt, F. A., DeKosky, S. T. & Mufson, E. J. Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology* **68,** 1501–1508 (2007).

116. Forner, S., Baglietto-Vargas, D., Martini, A. C., Trujillo-Estrada, L. & LaFerla, F. M. Synaptic Impairment in Alzheimer's Disease: A Dysregulated Symphony. *Trends Neurosci.* **40,** 347–357 (2017).

117. Marcello, E., Epis, R. & Di Luca, M. Amyloid flirting with synaptic failure: towards a comprehensive view of Alzheimer's disease pathogenesis. *Eur. J. Pharmacol.* **585,** 109–118 (2008).

118. Jack, C. R. & Holtzman, D. M. Biomarker modeling of Alzheimer's disease. *Neuron* **80,** 1347–1358 (2013).

119. Price, J. L. & Morris, J. C. Tangles and plaques in nondemented aging and 'preclinical' Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **45,** 358–368 (1999).

120. Duyckaerts, C. *et al.* PART is part of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **129,** 749–756 (2015).

121. Crary, J. F. *et al.* Primary age-related tauopathy (PART): a common pathology associated with human aging. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **128,** 755–766 (2014).

122. Mirra, S. S. *et al.* The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* **41,** 479–486 (1991).

123. Dubois, B. *et al.* Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol.* **9,** 1118–1127 (2010).

124. Albert, M. S. *et al.* The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* **7,** 270–279 (2011).

125. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* **69,** 89–95 (2001).

126. U.S. Department of Health and Human Services & Food and Drug Administration. Early Alzheimer's Disease: Developing Drugs for Treatment Guidance for Industry. Revision 1. (2018).

127. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on the clinical investigation of medicines for the treatment of Alzheimer's disease. CPMP/EWP/553/95 Rev.2. (2018).

128. Jack, C. R. *et al.* Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurol.* **12,** 207–216 (2013).

129. Andreasen, N., Sjögren, M. & Blennow, K. CSF markers for Alzheimer's disease: total tau, phospho-tau and Abeta42. *World J. Biol. Psychiatry Off. J. World Fed. Soc. Biol. Psychiatry* **4,** 147–155 (2003).

130. Bjerke, M. & Engelborghs, S. Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Early and Differential Alzheimer's Disease Diagnosis. *J. Alzheimers Dis.* **62,** 1199–1209 (2018).

131. Strozyk, D., Blennow, K., White, L. R. & Launer, L. J. CSF Abeta 42 levels correlate with amyloid-neuropathology in a population-based autopsy study. *Neurology* **60,** 652–656 (2003).

132. Tapiola, T. *et al.* Cerebrospinal fluid {beta}-amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain. *Arch. Neurol.* **66,** 382–389 (2009).

133. Mollenhauer, B. *et al.* CSF amyloid-β peptides in neuropathologically diagnosed dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* **24,** 383–391 (2011).

134. Hampel, H. *et al.* Core candidate neurochemical and imaging biomarkers of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* **4,** 38–48 (2008).

135. Fox, N. C., Scahill, R. I., Crum, W. R. & Rossor, M. N. Correlation between rates of brain atrophy and cognitive decline in AD. *Neurology* **52,** 1687–1687 (1999).

136. Zarow, C. *et al.* Correlates of hippocampal neuron number in Alzheimer's disease and ischemic vascular dementia. *Ann. Neurol.* **57,** 896–903 (2005).

137. Vemuri, P. *et al.* Alzheimer's disease diagnosis in individual subjects using structural MR images: validation studies. *NeuroImage* **39,** 1186–1197 (2008).

138. Josephs, K. A. *et al.* Beta-amyloid burden is not associated with rates of brain atrophy. *Ann. Neurol.* **63,** 204–212 (2008).

139. Reiman, E. M. *et al.* 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 (2012).

140. Schott, J. M. *et al.* Assessing the onset of structural change in familial Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **53,** 181–188 (2003).

141. Dickerson, B. C., Wolk, D. A. & Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. MRI cortical thickness biomarker predicts AD-like CSF and cognitive decline in normal adults. *Neurology* **78,** 84–90 (2012).

142. Schröder, J. & Pantel, J. Neuroimaging of hippocampal atrophy in early recognition of Alzheimer's disease--a critical appraisal after two decades of research. *Psychiatry Res.* **247,** 71–78 (2016).

143. Frisoni, G. B., Fox, N. C., Jack, C. R., Scheltens, P. & Thompson, P. M. The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* **6,** 67–77 (2010).

144. Bobinski, M. *et al.* The histological validation of post mortem magnetic resonance imaging-determined hippocampal volume in Alzheimer's disease. *Neuroscience* **95,** 721–725 (2000).

145. Whitwell, J. L. *et al.* MRI correlates of neurofibrillary tangle pathology at autopsy: a voxel-based morphometry study. *Neurology* **71,** 743–749 (2008).

146. Burton, E. J. *et al.* Medial temporal lobe atrophy on MRI differentiates Alzheimer's disease from dementia with Lewy bodies and vascular cognitive impairment: a prospective study with pathological verification of diagnosis. *Brain J. Neurol.* **132,** 195–203 (2009).

147. Kehoe, E. G., McNulty, J. P., Mullins, P. G. & Bokde, A. L. W. Advances in MRI biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Biomark. Med.* **8,** 1151–1169 (2014).

148. Blennow, K., Hampel, H., Weiner, M. & Zetterberg, H. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* **6,** 131–144 (2010).

149. Chupin, M. *et al.* Fully automatic hippocampus segmentation and classification in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment applied on data from ADNI. *Hippocampus* **19,** 579–587 (2009).

150. Leung, K. K. *et al.* Automated cross-sectional and longitudinal hippocampal volume measurement in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *NeuroImage* **51,** 1345–1359 (2010).

151. de Flores, R., La Joie, R. & Chételat, G. Structural imaging of hippocampal subfields in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience* **309,** 29–50 (2015).

152. Pini, L. *et al.* Brain atrophy in Alzheimer's Disease and aging. *Ageing Res. Rev.* **30,** 25–48 (2016).

153. Jagust, W. Positron emission tomography and magnetic resonance imaging in the diagnosis and prediction of dementia. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* **2,** 36–42 (2006).

154. Mosconi, L. *et al.* Pre-clinical detection of Alzheimer's disease using FDG-PET, with or without amyloid imaging. *J. Alzheimers Dis. JAD* **20,** 843–854 (2010).

155. Chetelat, G. *et al.* Dissociating atrophy and hypometabolism impact on episodic memory in mild cognitive impairment. *Brain J. Neurol.* **126,** 1955–1967 (2003).

156. Nestor, P. J., Fryer, T. D., Ikeda, M. & Hodges, J. R. Retrosplenial cortex (BA 29/30) hypometabolism in mild cognitive impairment (prodromal Alzheimer's disease). *Eur. J. Neurosci.* **18,** 2663–2667 (2003).

157. Herholz, K. *et al.* Discrimination between Alzheimer dementia and controls by automated analysis of multicenter FDG PET. *NeuroImage* **17,** 302–316 (2002).

158. Silverman, D. H. *et al.* Positron emission tomography in evaluation of dementia: Regional brain metabolism and long-term outcome. *JAMA* **286,** 2120–2127 (2001).

159. Mosconi, L. *et al.* Multicenter standardized 18F-FDG PET diagnosis of mild cognitive impairment, Alzheimer's disease, and other dementias. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **49,** 390–398 (2008).

160. Drzezga, A. *et al.* Cerebral metabolic changes accompanying conversion of mild cognitive impairment into Alzheimer's disease: a PET follow-up study. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **30,** 1104–1113 (2003).

161. Fouquet, M. *et al.* Longitudinal brain metabolic changes from amnestic mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Brain J. Neurol.* **132,** 2058–2067 (2009).

162. Nordberg, A. PET imaging of amyloid in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* **3,** 519–527 (2004).

163. Klunk, W. E. *et al.* Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann. Neurol.* **55,** 306–319 (2004).

164. Rowe, C. C. *et al.* Imaging of amyloid beta in Alzheimer's disease with 18F-BAY94-9172, a novel PET tracer: proof of mechanism. *Lancet Neurol.* **7,** 129–135 (2008).

165. Rowe, C. C. & Villemagne, V. L. Brain amyloid imaging. *J. Nucl. Med. Technol.* **41,** 11–18 (2013).

166. Sabri, O., Seibyl, J., Rowe, C. & Barthel, H. Beta-amyloid imaging with florbetaben. *Clin. Transl. Imaging* **3,** 13–26 (2015).

167. Blennow, K., Mattsson, N., Schöll, M., Hansson, O. & Zetterberg, H. Amyloid biomarkers in Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **36,** 297–309 (2015).

168. Villemagne, V. L. Amyloid imaging: Past, present and future perspectives. *Ageing Res. Rev.* **30,** 95–106 (2016).

169. Ikonomovic, M. D. *et al.* Post-mortem correlates of in vivo PiB-PET amyloid imaging in a typical case of Alzheimer's disease. *Brain J. Neurol.* **131,** 1630–1645 (2008).

170. Mintun, M. A. *et al.* [11C]PIB in a nondemented population: potential antecedent marker of Alzheimer disease. *Neurology* **67,** 446–452 (2006).

171. Lockhart, A. *et al.* PIB is a non-specific imaging marker of amyloid-beta (A) peptide-related cerebral amyloidosis. *Brain* **130,** 2607–2615 (2007).

172. Villemagne, V. L. *et al.* Amyloid β deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol.* **12,** 357–367 (2013).

173. Fodero-Tavoletti, M. T. *et al.* Characterization of PiB binding to white matter in Alzheimer disease and other dementias. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **50,** 198–204 (2009).

174. Brendel, M. *et al.* Cross-sectional comparison of small animal [18F]-florbetaben amyloid-PET between transgenic AD mouse models. *PloS One* **10,** e0116678 (2015).

175. Snellman, A. *et al.* Longitudinal amyloid imaging in mouse brain with 11C-PIB: comparison of APP23, Tg2576, and APPswe-PS1dE9 mouse models of Alzheimer disease. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **54,** 1434–1441 (2013).

176. Bermejo-Pareja, F., Antequera, D., Vargas, T., Molina, J. A. & Carro, E. Saliva levels of Abeta1-42 as potential biomarker of Alzheimer's disease: a pilot study. *BMC Neurol.* **10,** 108 (2010).

177. Ossenkoppele, R. *et al.* Tau PET patterns mirror clinical and neuroanatomical variability in Alzheimer's disease. *Brain J. Neurol.* **139,** 1551–1567 (2016).

178. Schöll, M. *et al.* PET Imaging of Tau Deposition in the Aging Human Brain. *Neuron* **89,** 971–982 (2016).

179. Eisenmenger, L. B. *et al.* Advances in PET Imaging of Degenerative, Cerebrovascular, and Traumatic Causes of Dementia. *Semin. Nucl. Med.* **46,** 57–87 (2016).

180. Lagarde, J., Sarazin, M. & Bottlaender, M. In vivo PET imaging of neuroinflammation in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm. Vienna Austria 1996* (2017). doi:10.1007/s00702-017-1731-x

181. Kuge, Y. *et al.* [1-11C]Octanoate as a PET Tracer for Studying Ischemic Stroke. Evaluation in a Canine Model of Thromboembolic Stroke with Positron Emission Tomography. *Biol. Pharm. Bull.* **23,** 984–988 (2000).

182. Marik, J. *et al.* PET of Glial Metabolism Using 2-18F-Fluoroacetate. *J. Nucl. Med.* **50,** 982–990 (2009).

183. Sperling, R. Potential of functional MRI as a biomarker in early Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **32 Suppl 1,** S37-43 (2011).

184. Dona, O., Thompson, J. & Druchok, C. Comprehensive Review on Magnetic Resonance Imaging in Alzheimer's Disease. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **44,** 213–225 (2016).

185. Buckner, R. L., Andrews-Hanna, J. R. & Schacter, D. L. The brain's default network: anatomy, function, and relevance to disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1124,** 1–38 (2008).

186. Amlien, I. K. & Fjell, A. M. Diffusion tensor imaging of white matter degeneration in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neuroscience* **276,** 206–215 (2014).

187. Sexton, C. E., Kalu, U. G., Filippini, N., Mackay, C. E. & Ebmeier, K. P. A meta-analysis of diffusion tensor imaging in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **32,** 2322.e5–18 (2011).

188. Benveniste, H. & Blackband, S. MR microscopy and high resolution small animal MRI: applications in neuroscience research. *Prog. Neurobiol.* **67,** 393–420 (2002).

189. Driehuys, B. *et al.* Small animal imaging with magnetic resonance microscopy. *ILAR J.* **49,** 35–53 (2008).

190. Maronpot, R. R., Sills, R. C. & Johnson, G. A. Applications of magnetic resonance microscopy. *Toxicol. Pathol.* **32 Suppl 2,** 42–48 (2004).

191. Duerk, J. L. All you really need to know about MRI physics. Moriel NessAiver. University of Maryland, Baltimore, 1996, $35.00 book/$395.00 transparencies. *J. Magn. Reson. Imaging* **7,** 613–614 (1997).

192. Schultz, C. & Engelhardt, M. Anatomy of the hippocampal formation. *Front. Neurol. Neurosci.* **34,** 6–17 (2014).

193. Kesner, R. P., Lee, I. & Gilbert, P. A behavioral assessment of hippocampal function based on a subregional analysis. *Rev. Neurosci.* **15,** 333–351 (2004).

194. Duvernoy, H. M., Cattin, F., Risold, P.-Y., Vannson, J. L. & Gaudron, M. *The human hippocampus: functional anatomy, vascularization and serial sections with MRI*. (Springer, 2013).

195. West, M. J., Coleman, P. D., Flood, D. G. & Troncoso, J. C. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet Lond. Engl.* **344,** 769–772 (1994).

196. Fukutani, Y. *et al.* Neuronal loss and neurofibrillary degeneration in the hippocampal cortex in late-onset sporadic Alzheimer's disease. *Psychiatry Clin. Neurosci.* **54,** 523–529 (2000).

197. von Gunten, A. *et al.* Cognitive impact of neuronal pathology in the entorhinal cortex and CA1 field in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **27,** 270–277 (2006).

198. Mueller, S. G. *et al.* Hippocampal atrophy patterns in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Hum. Brain Mapp.* **31,** 1339–1347 (2010).

199. La Joie, R. *et al.* Hippocampal subfield volumetry in mild cognitive impairment, Alzheimer's disease and semantic dementia. *NeuroImage Clin.* **3,** 155–162 (2013).

200. Pluta, J., Yushkevich, P., Das, S. & Wolk, D. In vivo analysis of hippocampal subfield atrophy in mild cognitive impairment via semi-automatic segmentation of T2-weighted MRI. *J. Alzheimers Dis. JAD* **31,** 85–99 (2012).

201. Apostolova, L. G. *et al.* Conversion of mild cognitive impairment to Alzheimer disease predicted by hippocampal atrophy maps. *Arch. Neurol.* **63,** 693–699 (2006).

202. Mueller, S. G. & Weiner, M. W. Selective effect of age, Apo e4, and Alzheimer's disease on hippocampal subfields. *Hippocampus* **19,** 558–564 (2009).

203. Wisse, L. E. M. *et al.* Hippocampal subfield volumes at 7T in early Alzheimer's disease and normal aging. *Neurobiol. Aging* **35,** 2039–2045 (2014).

204. Giuliano, A. *et al.* Hippocampal subfields at ultra high field MRI: An overview of segmentation and measurement methods: SEGMENTATION AND MEASUREMENT METHODS FOR HIPPOCAMPAL SUBFIELDS. *Hippocampus* **27,** 481–494 (2017).

205. Dhenain, M. *et al.* Characterization of in vivo MRI detectable thalamic amyloid plaques from APP/PS1 mice. *Neurobiol. Aging* **30,** 41–53 (2009).

206. Jack, C. R. *et al.* In vivo visualization of Alzheimer's amyloid plaques by magnetic resonance imaging in transgenic mice without a contrast agent. *Magn. Reson. Med.* **52,** 1263–1271 (2004).

207. Benveniste, H., Einstein, G., Kim, K. R., Hulette, C. & Johnson, G. A. Detection of neuritic plaques in Alzheimer's disease by magnetic resonance microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96,** 14079–14084 (1999).

208. Chamberlain, R. *et al.* Comparison of amyloid plaque contrast generated by T2-weighted, T2*-weighted, and susceptibility-weighted imaging methods in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Magn. Reson. Med.* **61,** 1158–1164 (2009).

209. Helpern, J. A. *et al.* MRI assessment of neuropathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Magn. Reson. Med.* **51,** 794–798 (2004).

210. van Rooden, S. *et al.* Cerebral amyloidosis: postmortem detection with human 7.0-T MR imaging system. *Radiology* **253,** 788–796 (2009).

211. Dhenain, M., Privat, N., Duyckaerts, C. & Jacobs, R. E. Senile plaques do not induce susceptibility effects in T2*-weighted MR microscopic images. *NMR Biomed.* **15,** 197–203 (2002).

212. Zhang, J. *et al.* Detection of amyloid plaques in mouse models of Alzheimer's disease by magnetic resonance imaging. *Magn. Reson. Med.* **51,** 452–457 (2004).

213. Vanhoutte, G., Dewachter, I., Borghgraef, P., Van Leuven, F. & Van der Linden, A. Noninvasive in vivo MRI detection of neuritic plaques associated with iron in APP[V717I] transgenic mice, a model for Alzheimer's disease. *Magn. Reson. Med.* **53,** 607–613 (2005).

214. Lee, S.-P., Falangola, M. F., Nixon, R. A., Duff, K. & Helpern, J. A. Visualization of ?-amyloid plaques in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease using MR microscopy without contrast reagents. *Magn. Reson. Med.* **52,** 538–544 (2004).

215. Braakman, N. *et al.* Longitudinal assessment of Alzheimer's β-amyloid plaque development in transgenic mice monitored by in vivo magnetic resonance microimaging. *J. Magn. Reson. Imaging* **24,** 530–536 (2006).

216. Borthakur, A. *et al.* In vivo measurement of plaque burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* **24,** 1011–1017 (2006).

217. J, T. S. *et al.* Automated Detection of Amyloid-β-Related Cortical and Subcortical Signal Changes ina Transgenic Model of Alzheimer's Disease using High-Field MRI. *J. Alzheimeraposs Dis.* 221–237 (2011). doi:10.3233/JAD-2010-101035

218. Nakada, T., Matsuzawa, H., Igarashi, H., Fujii, Y. & Kwee, I. L. In vivo visualization of senile-plaque-like pathology in Alzheimer's disease patients by MR microscopy on a 7T system. *J. Neuroimaging Off. J. Am. Soc. Neuroimaging* **18,** 125–129 (2008).

219. van Rooden, S. *et al.* Cortical phase changes in Alzheimer's disease at 7T MRI: A novel imaging marker. *Alzheimers Dement.* **10,** e19–e26 (2014).

220. van Bergen, J. M. G. *et al.* Colocalization of cerebral iron with Amyloid beta in Mild Cognitive Impairment. *Sci. Rep.* **6,** (2016).

221. Tiepolt, S. *et al.* Quantitative Susceptibility Mapping of Amyloid-β Aggregates in Alzheimer's Disease with 7T MR. *J. Alzheimers Dis. JAD* (2018). doi:10.3233/JAD-180118

222. Jack, C. R. In Vivo Magnetic Resonance Microimaging of Individual Amyloid Plaques in Alzheimer's Transgenic Mice. *J. Neurosci.* **25,** 10041–10048 (2005).

223. Meadowcroft, M. D., Connor, J. R., Smith, M. B. & Yang, Q. X. MRI and histological analysis of beta-amyloid plaques in both human Alzheimer's disease and APP/PS1 transgenic mice. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* **29,** 997–1007 (2009).

224. El Tayara, N. E. T., Volk, A., Dhenain, M. & Delatour, B. Transverse relaxation time reflects brain amyloidosis in young APP/PS1 transgenic mice. *Magn. Reson. Med.* **58,** 179–184 (2007).

225. El Tannir El Tayara, N. *et al.* Age-related evolution of amyloid burden, iron load, and MR relaxation times in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* **22,** 199–208 (2006).

226. Meadowcroft, M. D., Peters, D. G., Dewal, R. P., Connor, J. R. & Yang, Q. X. The effect of iron in MRI and transverse relaxation of amyloid-beta plaques in Alzheimer's disease. *NMR Biomed.* **28,** 297–305 (2015).

227. Nabuurs, R. J. A. *et al.* MR microscopy of human amyloid-β deposits: characterization of parenchymal amyloid, diffuse plaques, and vascular amyloid. *J. Alzheimers Dis. JAD* **34,** 1037–1049 (2013).

228. Takahashi, S. *et al.* Age-related changes in the concentrations of major and trace elements in the brain of rats and mice. *Biol. Trace Elem. Res.* **80,** 145–158 (2001).

229. Falangola, M. F., Lee, S.-P., Nixon, R. A., Duff, K. & Helpern, J. A. Histological co-localization of iron in Abeta plaques of PS/APP transgenic mice. *Neurochem. Res.* **30,** 201–205 (2005).

230. Boretius, S., Kasper, L., Tammer, R., Michaelis, T. & Frahm, J. MRI of cellular layers in mouse brain in vivo. *NeuroImage* **47,** 1252–1260 (2009).

231. Benveniste, H., Kim, K., Zhang, L. & Johnson, G. A. Magnetic resonance microscopy of the C57BL mouse brain. *NeuroImage* **11,** 601–611 (2000).

232. Johnson, G. A., Cofer, G. P., Gewalt, S. L. & Hedlund, L. W. Morphologic phenotyping with MR microscopy: the visible mouse. *Radiology* **222,** 789–793 (2002).

233. Watanabe, T., Frahm, J. & Michaelis, T. Cell layers and neuropil: contrast-enhanced MRI of mouse brain *in vivo*: CELL LAYERS AND NEUROPIL OF MOUSE BRAIN *IN VIVO*. *NMR Biomed.* **26,** 1870–1878 (2013).

234. Watanabe, T., Frahm, J. & Michaelis, T. Cell layers and neuropil: contrast-enhanced MRI of mouse brain *in vivo*: CELL LAYERS AND NEUROPIL OF MOUSE BRAIN *IN VIVO*. *NMR Biomed.* **26,** 1870–1878 (2013).

235. Dhenain, M., Delatour, B., Walczak, C. & Volk, A. Passive staining: a novel ex vivo MRI protocol to detect amyloid deposits in mouse models of Alzheimer's disease. *Magn. Reson. Med.* **55,** 687–693 (2006).

236. Petiet, A. *et al.* Gadolinium-staining reveals amyloid plaques in the brain of Alzheimer's transgenic mice. *Neurobiol. Aging* **33,** 1533–1544 (2012).

237. Burgess, A., Shah, K., Hough, O. & Hynynen, K. Focused ultrasound-mediated drug delivery through the blood–brain barrier. *Expert Rev. Neurother.* **15,** 477–491 (2015).

238. Hynynen, K. Ultrasound for drug and gene delivery to the brain. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60,** 1209–1217 (2008).

239. Marquet, F., Tung, Y.-S., Teichert, T., Ferrera, V. P. & Konofagou, E. E. Noninvasive, transient and selective blood-brain barrier opening in non-human primates in vivo. *PloS One* **6,** e22598 (2011).

240. Santin, M. D. *et al.* In Vivo Detection of Amyloid Plaques by Gadolinium-Stained MRI Can Be Used to Demonstrate the Efficacy of an Anti-amyloid Immunotherapy. *Front. Aging Neurosci.* **8,** 55 (2016).

241. Santin, M. D., Debeir, T., Bridal, S. L., Rooney, T. & Dhenain, M. Fast in vivo imaging of amyloid plaques using μ-MRI Gd-staining combined with ultrasound-induced blood-brain barrier opening. *NeuroImage* **79,** 288–294 (2013).

242. Shokrollahi, H. Contrast agents for MRI. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **33,** 4485–4497 (2013).

243. Fries, P. *et al.* The issues and tentative solutions for contrast-enhanced magnetic resonance imaging at ultra-high field strength. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **6,** 559–573 (2014).

244. Tóth, É., Helm, L. & Merbach, A. E. Relaxivity of MRI Contrast Agents. in *Contrast Agents I* (ed. Krause, W.) **221,** 61–101 (Springer Berlin Heidelberg, 2002).

245. Verwilst, P., Park, S., Yoon, B. & Kim, J. S. Recent advances in Gd-chelate based bimodal optical/MRI contrast agents. *Chem. Soc. Rev.* **44,** 1791–1806 (2015).

246. Hermann, P., Kotek, J., Kubíček, V. & Lukeš, I. Gadolinium(iii) complexes as MRI contrast agents: ligand design and properties of the complexes. *Dalton Trans.* 3027 (2008). doi:10.1039/b719704g

247. Debroye, E. & Parac-Vogt, T. N. Towards polymetallic lanthanide complexes as dual contrast agents for magnetic resonance and optical imaging. *Chem. Soc. Rev.* **43,** 8178–8192 (2014).

248. Gries, H. Extracellular MRI Contrast Agents Based on Gadolinium. in *Contrast Agents I* (ed. Krause, W.) **221,** 1–24 (Springer Berlin Heidelberg, 2002).

249. Runge, V. M. Critical Questions Regarding Gadolinium Deposition in the Brain and Body After Injections of the Gadolinium-Based Contrast Agents, Safety, and Clinical Recommendations in Consideration of the EMA's Pharmacovigilance and Risk Assessment Committee Recommendation for Suspension of the Marketing Authorizations for 4 Linear Agents. *Invest. Radiol.* **52,** 317–323 (2017).

250. Gulani, V. *et al.* Gadolinium deposition in the brain: summary of evidence and recommendations. *Lancet Neurol.* **16,** 564–570 (2017).

251. Olchowy, C. *et al.* The presence of the gadolinium-based contrast agent depositions in the brain and symptoms of gadolinium neurotoxicity - A systematic review. *PLOS ONE* **12,** e0171704 (2017).

252. Kanda, T., Ishii, K., Kawaguchi, H., Kitajima, K. & Takenaka, D. High signal intensity in the dentate nucleus and globus pallidus on unenhanced T1-weighted MR images: relationship with increasing cumulative dose of a gadolinium-based contrast material. *Radiology* **270,** 834–841 (2014).

253. Zhang, Y., Cao, Y., Shih, G. L., Hecht, E. M. & Prince, M. R. Extent of Signal Hyperintensity on Unenhanced T1-weighted Brain MR Images after More than 35 Administrations of Linear Gadolinium-based Contrast Agents. *Radiology* **282,** 516–525 (2017).

254. Tedeschi, E. *et al.* In vivo dentate nucleus MRI relaxometry correlates with previous administration of Gadolinium-based contrast agents. *Eur. Radiol.* **26,** 4577–4584 (2016).

255. Moser, F. G. *et al.* High Signal Intensity in the Dentate Nucleus and Globus Pallidus on Unenhanced T1-Weighted MR Images: Comparison between Gadobutrol and Linear Gadolinium-Based Contrast Agents. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* (2018). doi:10.3174/ajnr.A5538

256. Pullicino, R., Radon, M., Biswas, S., Bhojak, M. & Das, K. A Review of the Current Evidence on Gadolinium Deposition in the Brain. *Clin. Neuroradiol.* **28,** 159–169 (2018).

257. Rogosnitzky, M. & Branch, S. Gadolinium-based contrast agent toxicity: a review of known and proposed mechanisms. *BioMetals* **29,** 365–376 (2016).

258. Wadghiri, Y. Z. *et al.* Detection of Alzheimer's amyloid in transgenic mice using magnetic resonance microimaging. *Magn. Reson. Med.* **50,** 293–302 (2003).

259. Poduslo, J. F. *et al.* Molecular targeting of Alzheimer's amyloid plaques for contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Neurobiol. Dis.* **11,** 315–329 (2002).

260. Scholtzova, H. *et al.* Memantine leads to behavioral improvement and amyloid reduction in Alzheimer's-disease-model transgenic mice shown as by micromagnetic resonance imaging. *J. Neurosci. Res.* **86,** 2784–2791 (2008).

261. Wadghiri, Y. Z. *et al.* Detection of amyloid plaques targeted by bifunctional USPIO in Alzheimer's disease transgenic mice using magnetic resonance microimaging. *PloS One* **8,** e57097 (2013).

262. Sigurdsson, E. M., Scholtzova, H., Mehta, P. D., Frangione, B. & Wisniewski, T. Immunization with a nontoxic/nonfibrillar amyloid-beta homologous peptide reduces Alzheimer's disease-associated pathology in transgenic mice. *Am. J. Pathol.* **159,** 439–447 (2001).

263. Sigurdsson, E. M. *et al.* A non-toxic ligand for voxel-based MRI analysis of plaques in AD transgenic mice. *Neurobiol. Aging* **29,** 836–847 (2008).

264. Higuchi, M. *et al.* 19F and 1H MRI detection of amyloid beta plaques in vivo. *Nat. Neurosci.* **8,** 527–533 (2005).

265. Bort, G. *et al.* Gadolinium-based contrast agents targeted to amyloid aggregates for the early diagnosis of Alzheimer's disease by MRI. *Eur. J. Med. Chem.* **87,** 843–861 (2014).

266. Matharu, B., Spencer, N., Howe, F. & Austen, B. Gadolinium-complexed Aβ-binding contrast agents for MRI diagnosis of Alzheimer's Disease. *Neuropeptides* **53,** 63–70 (2015).

267. Poduslo, J. F. *et al.* In vivo targeting of antibody fragments to the nervous system for Alzheimer's disease immunotherapy and molecular imaging of amyloid plaques: Targeting of antibody fragments to AD amyloid plaques. *J. Neurochem.* **102,** 420–433 (2007).

268. Ramakrishnan, M. *et al.* Selective Contrast Enhancement of Individual Alzheimer's Disease Amyloid Plaques Using a Polyamine and Gd-DOTA Conjugated Antibody Fragment Against Fibrillar Aβ42 for Magnetic Resonance Molecular Imaging. *Pharm. Res.* **25,** 1861–1872 (2008).

269. Rapoport, S. I., Bachman, D. S. & Thompson, H. K. Chronic effects of osmotic opening of the blood-brain barrier in the monkey. *Science* **176,** 1243–1245 (1972).

270. Yang, J. *et al.* Detection of amyloid plaques targeted by USPIO-Aβ1-42 in Alzheimer's disease transgenic mice using magnetic resonance microimaging. *NeuroImage* **55,** 1600–1609 (2011).

271. Poduslo, J. F. & Curran, G. L. Glycation increases the permeability of proteins across the blood-nerve and blood-brain barriers. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **23,** 157–162 (1994).

272. Poduslo, J. F. & Curran, G. L. Polyamine modification increases the permeability of proteins at the blood-nerve and blood-brain barriers. *J. Neurochem.* **66,** 1599–1609 (1996).

273. Robinson, M., Yasie Lee, B., Leonenko, Z. & 1 Department of Biology, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada; Drugs and drug delivery systems targeting amyloid-β in Alzheimer's disease. *AIMS Mol. Sci.* **2,** 332–358 (2015).

274. Bhaskar, S. *et al.* Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: perspectives on tracking and neuroimaging. *Part. Fibre Toxicol.* **7,** 3 (2010).

275. Koffie, R. M. *et al.* Nanoparticles enhance brain delivery of blood-brain barrier-impermeable probes for in vivo optical and magnetic resonance imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108,** 18837–18842 (2011).

276. Nabuurs, R. J. A. *et al.* Polyfluorinated bis-styrylbenzenes as amyloid-β plaque binding ligands. *Bioorg. Med. Chem.* **22,** 2469–2481 (2014).

277. Yanagisawa, D. *et al.* In vivo detection of amyloid β deposition using 19F magnetic resonance imaging with a 19F-containing curcumin derivative in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* **184,** 120–127 (2011).

278. Li, S. *et al.* Detection of Aβ plaques by a novel specific MRI probe precursor CR-BSA-(Gd-DTPA)n in APP/PS1 transgenic mice. *Anat. Rec. Hoboken NJ 2007* **293,** 2136–2143 (2010).

279. Kandimalla, K. K., Wengenack, T. M., Curran, G. L., Gilles, E. J. & Poduslo, J. F. Pharmacokinetics and amyloid plaque targeting ability of a novel peptide-based magnetic resonance contrast agent in wild-type and Alzheimer's disease transgenic mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **322,** 541–549 (2007).

280. Zhang, D. *et al.* The detection of β-amyloid plaques in an Alzheimer's disease rat model with DDNP-SPIO. *Clin. Radiol.* **70,** 74–80 (2015).

281. Hu, B. *et al.* Nanotheranostics: Congo Red/Rutin-MNPs with Enhanced Magnetic Resonance Imaging and H2O2-Responsive Therapy of Alzheimer's Disease in APPswe/PS1dE9 Transgenic Mice. *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla* **27,** 5499–5505 (2015).

282. Larbanoix, L. *et al.* Potential amyloid plaque-specific peptides for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **31,** 1679–1689 (2010).

283. André, S. *et al.* Validation by Magnetic Resonance Imaging of the Diagnostic Potential of a Heptapeptide-Functionalized Imaging Probe Targeted to Amyloid-β and Able to Cross the Blood-Brain Barrier. *J. Alzheimers Dis. JAD* **60,** 1547–1565 (2017).

284. Ansciaux, E. *et al.* In vitro and in vivo characterization of several functionalized ultrasmall particles of iron oxide, vectorized against amyloid plaques and potentially able to cross the blood-brain barrier: toward earlier diagnosis of Alzheimer's disease by molecular imaging. *Contrast Media Mol. Imaging* **10,** 211–224 (2015).

285. Suzuki, K. *et al.* Ligand-based molecular MRI: O-17 JJVCPE amyloid imaging in transgenic mice. *J. Neuroimaging Off. J. Am. Soc. Neuroimaging* **24,** 595–598 (2014).

286. Sundberg, E. J. & Mariuzza, R. A. Molecular recognition in antibody-antigen complexes. *Adv. Protein Chem.* **61,** 119–160 (2002).

287. Hamers-Casterman, C. *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363,** 446–448 (1993).

288. Muyldermans, S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* **82,** 775–797 (2013).

289. De Genst, E. *et al.* Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103,** 4586–4591 (2006).

290. Joosten, V., Lokman, C., Van Den Hondel, C. A. & Punt, P. J. The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeasts and filamentous fungi. *Microb. Cell Factories* **2,** 1 (2003).

291. Muyldermans, S. Single domain camel antibodies: current status. *J. Biotechnol.* **74,** 277–302 (2001).

292. Wesolowski, J. *et al.* Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **198,** 157–174 (2009).

293. Moutel, S. *et al.* NaLi-H1: A universal synthetic library of humanized nanobodies providing highly functional antibodies and intrabodies. *eLife* **5,** (2016).

294. Muruganandam, A., Tanha, J., Narang, S. & Stanimirovic, D. Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transmigrate across human blood-brain barrier endothelium. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **16,** 240–242 (2002).

295. Liu, W. *et al.* Recent advances in the selection and identification of antigen-specific nanobodies. *Mol. Immunol.* **96,** 37–47 (2018).

296. Holliger, P. & Hudson, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.* **23,** 1126–1136 (2005).

297. Desmyter, A., Spinelli, S., Roussel, A. & Cambillau, C. Camelid nanobodies: killing two birds with one stone. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **32,** 1–8 (2015).

298. Pain, C., Dumont, J. & Dumoulin, M. Camelid single-domain antibody fragments: Uses and prospects to investigate protein misfolding and aggregation, and to treat diseases associated with these phenomena. *Biochimie* **111,** 82–106 (2015).

299. Gonzalez-Sapienza, G., Rossotti, M. A. & Tabares-da Rosa, S. Single-Domain Antibodies As Versatile Affinity Reagents for Analytical and Diagnostic Applications. *Front. Immunol.* **8,** 977 (2017).

300. Ewert, S., Cambillau, C., Conrath, K. & Plückthun, A. Biophysical properties of camelid V(HH) domains compared to those of human V(H)3 domains. *Biochemistry (Mosc.)* **41,** 3628–3636 (2002).

301. van der Linden, R. H. *et al.* Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim. Biophys. Acta* **1431,** 37–46 (1999).

302. Dumoulin, M. *et al.* Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **11,** 500–515 (2002).

303. Pérez, J. M. *et al.* Thermal unfolding of a llama antibody fragment: a two-state reversible process. *Biochemistry (Mosc.)* **40,** 74–83 (2001).

304. Harmsen, M. M., van Solt, C. B., van Zijderveld-van Bemmel, A. M., Niewold, T. A. & van Zijderveld, F. G. Selection and optimization of proteolytically stable llama single-domain antibody fragments for oral immunotherapy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72,** 544–551 (2006).

305. Kijanka, M., Dorresteijn, B., Oliveira, S. & van Bergen en Henegouwen, P. M. P. Nanobody-based cancer therapy of solid tumors. *Nanomed.* **10,** 161–174 (2015).

306. Oliveira, S., Heukers, R., Sornkom, J., Kok, R. J. & van Bergen En Henegouwen, P. M. P. Targeting tumors with nanobodies for cancer imaging and therapy. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **172,** 607–617 (2013).

307. Perruchini, C. *et al.* Llama VHH antibody fragments against GFAP: better diffusion in fixed tissues than classical monoclonal antibodies. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **118,** 685–695 (2009).

308. Abulrob, A., Sprong, H., en Henegouwen, P. V. B. & Stanimirovic, D. The blood-brain barrier transmigrating single domain antibody: mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells. *J. Neurochem.* **95,** 1201–1214 (2005).

309. Farrington, G. K. *et al.* A novel platform for engineering blood-brain barrier-crossing bispecific biologics. *FASEB J.* **28,** 4764–4778 (2014).

310. David, M. A., Jones, D. R. & Tayebi, M. Potential candidate camelid antibodies for the treatment of protein-misfolding diseases. *J. Neuroimmunol.* **272,** 76–85 (2014).

311. Neves, V., Aires-da-Silva, F., Corte-Real, S. & Castanho, M. A. R. B. Antibody Approaches To Treat Brain Diseases. *Trends Biotechnol.* **34,** 36–48 (2016).

312. Emmerson, C. D. *et al.* Enhancement of Polymeric Immunoglobulin Receptor Transcytosis by Biparatopic VHH. *PLoS ONE* **6,** e26299 (2011).

313. Triguero, D., Buciak, J. B., Yang, J. & Pardridge, W. M. Blood-brain barrier transport of cationized immunoglobulin G: enhanced delivery compared to native protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86,** 4761–4765 (1989).

314. Pardridge, W. M. Brain drug development and brain drug targeting. *Pharm. Res.* **24,** 1729–1732 (2007).

315. Rutgers, K. S. *et al.* Transmigration of beta amyloid specific heavy chain antibody fragments across the in vitro blood-brain barrier. *Neuroscience* **190,** 37–42 (2011).

316. Li, T. *et al.* Cell-penetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the blood-brain barrier and specifically recognize astrocytes: application to brain imaging. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **26,** 3969–3979 (2012).

317. Habicht, G. *et al.* Directed selection of a conformational antibody domain that prevents mature amyloid fibril formation by stabilizing Abeta protofibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104,** 19232–19237 (2007).

318. Morgado, I. *et al.* Molecular basis of β-amyloid oligomer recognition with a conformational antibody fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109,** 12503–12508 (2012).

319. Lafaye, P., Achour, I., England, P., Duyckaerts, C. & Rougeon, F. Single-domain antibodies recognize selectively small oligomeric forms of amyloid beta, prevent Abeta-induced neurotoxicity and inhibit fibril formation. *Mol. Immunol.* **46,** 695–704 (2009).

320. Chakravarty, R., Goel, S. & Cai, W. Nanobody: The "Magic Bullet" for Molecular Imaging? *Theranostics* **4,** 386–398 (2014).

321. Rashidian, M. *et al.* Noninvasive imaging of immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112,** 6146–6151 (2015).

322. Rashidian, M. *et al.* Predicting the response to CTLA-4 blockade by longitudinal noninvasive monitoring of CD8 T cells. *J. Exp. Med.* **214,** 2243–2255 (2017).

323. Huang, L. *et al.* SPECT imaging with 99mTc-labeled EGFR-specific nanobody for in vivo monitoring of EGFR expression. *Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging* **10,** 167–175 (2008).

324. Keyaerts, M. *et al.* Phase I Study of 68Ga-HER2-Nanobody for PET/CT Assessment of HER2 Expression in Breast Carcinoma. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **57,** 27–33 (2016).

325. Iezzi, M. E., Policastro, L., Werbajh, S., Podhajcer, O. & Canziani, G. A. Single-Domain Antibodies and the Promise of Modular Targeting in Cancer Imaging and Treatment. *Front. Immunol.* **9,** 273 (2018).

326. Li, T. *et al.* Camelid single-domain antibodies: A versatile tool for in vivo imaging of extracellular and intracellular brain targets. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **243,** 1–10 (2016).

327. Marieb, E. N., Hoehn, K., Moussakova, L. & Lachaîne, R. *Anatomie et physiologie humaines*. (Pearson ; ERPI, 2010).

328. Iliff, J. J. *et al.* A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β. *Sci. Transl. Med.* **4,** 147ra111 (2012).

329. Iliff, J. J. & Nedergaard, M. Is there a cerebral lymphatic system? *Stroke* **44,** S93-95 (2013).

330. Reeves, C., Galang, E., Padalia, R., Tran, N. & Padalia, D. Intrathecal Injection of Gadobutrol: A Tale of Caution. *J. Pain Palliat. Care Pharmacother.* **31,** 139–143 (2017).

331. Algin, O. & Turkbey, B. Intrathecal Gadolinium-Enhanced MR Cisternography: A Comprehensive Review. *Am. J. Neuroradiol.* **34,** 14–22 (2013).

332. Papisov, M. I. *et al.* Delivery of proteins to CNS as seen and measured by positron emission tomography. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2,** 201–209 (2012).

333. Iliff, J. J. *et al.* Brain-wide pathway for waste clearance captured by contrast-enhanced MRI. *J. Clin. Invest.* **123,** 1299–1309 (2013).

334. Ringstad, G., Vatnehol, S. A. S. & Eide, P. K. Glymphatic MRI in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Brain* **140,** 2691–2705 (2017).

335. Butt, M. T. Morphologic Changes Associated with Intrathecal Catheters for Direct Delivery to the Central Nervous System in Preclinical Studies. *Toxicol. Pathol.* **39,** 213–219 (2011).

336. Park, K.-W. *et al.* Neurotoxic Manifestations of an Overdose Intrathecal Injection of Gadopentetate Dimeglumine. *J. Korean Med. Sci.* **25,** 505 (2010).

337. Samardzic, D. & Thamburaj, K. Magnetic resonance characteristics and susceptibility weighted imaging of the brain in gadolinium encephalopathy. *J. Neuroimaging Off. J. Am. Soc. Neuroimaging* **25,** 136–139 (2015).

338. Mendoza H.R.B. ¿Es segura la administración de gadolinio intratecal? Nuevo caso de encefalopatía tras la realización de una cisternografía-RMN. *Revista Mexicana de Neurociencia* Julio-Agosto, 2016; 17(4): 125-132 (2016).

339. Duyckaerts, C., Potier, M.-C. & Delatour, B. Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **115,** 5–38 (2007).

340. Elder, G. A., Gama Sosa, M. A. & De Gasperi, R. Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Mt. Sinai J. Med. J. Transl. Pers. Med.* **77,** 69–81 (2010).

341. Ameen-Ali, K. E. *et al.* Review: Neuropathology and behavioural features of transgenic murine models of Alzheimer's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **43,** 553–570 (2017).

342. Jankowsky, J. L. *et al.* Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum. Mol. Genet.* **13,** 159–170 (2004).

343. Herzig, M. C., Van Nostrand, W. E. & Jucker, M. Mechanism of cerebral beta-amyloid angiopathy: murine and cellular models. *Brain Pathol. Zurich Switz.* **16,** 40–54 (2006).

344. Maia, L. F. *et al.* Changes in amyloid-β and Tau in the cerebrospinal fluid of transgenic mice overexpressing amyloid precursor protein. *Sci. Transl. Med.* **5,** 194re2 (2013).

345. Calhoun, M. E. *et al.* Neuronal overexpression of mutant amyloid precursor protein results in prominent deposition of cerebrovascular amyloid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96,** 14088–14093 (1999).

346. Davis, J. *et al.* Early-onset and robust cerebral microvascular accumulation of amyloid beta-protein in transgenic mice expressing low levels of a vasculotropic Dutch/Iowa mutant form of amyloid beta-protein precursor. *J. Biol. Chem.* **279,** 20296–20306 (2004).

347. Miao, J. *et al.* Cerebral microvascular amyloid beta protein deposition induces vascular degeneration and neuroinflammation in transgenic mice expressing human vasculotropic mutant amyloid beta precursor protein. *Am. J. Pathol.* **167,** 505–515 (2005).

348. Xu, F. *et al.* Early-onset subicular microvascular amyloid and neuroinflammation correlate with behavioral deficits in vasculotropic mutant amyloid beta-protein precursor transgenic mice. *Neuroscience* **146,** 98–107 (2007).

349. Wirths, O. *et al.* Intraneuronal Abeta accumulation precedes plaque formation in beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neurosci. Lett.* **306,** 116–120 (2001).

350. Blanchard, V. *et al.* Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with Abeta deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp. Neurol.* **184,** 247–263 (2003).

351. Boutajangout, A. *et al.* Characterisation of cytoskeletal abnormalities in mice transgenic for wild-type human tau and familial Alzheimer's disease mutants of APP and presenilin-1. *Neurobiol. Dis.* **15,** 47–60 (2004).

352. Garcia-Alloza, M. *et al.* Characterization of amyloid deposition in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol. Dis.* **24,** 516–524 (2006).

353. Savonenko, A. *et al.* Episodic-like memory deficits in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease: Relationships to β-amyloid deposition and neurotransmitter abnormalities. *Neurobiol. Dis.* **18,** 602–617 (2005).

354. Ozmen, L., Albientz, A., Czech, C. & Jacobsen, H. Expression of Transgenic APP mRNA Is the Key Determinant for Beta-Amyloid Deposition in PS2APP Transgenic Mice. *Neurodegener. Dis.* **6,** 29–36 (2009).

355. Weidensteiner, C. *et al.* Cortical hypoperfusion in the B6.PS2APP mouse model for Alzheimer's disease: comprehensive phenotyping of vascular and tissular parameters by MRI. *Magn. Reson. Med.* **62,** 35–45 (2009).

356. Billings, L. M., Oddo, S., Green, K. N., McGaugh, J. L. & LaFerla, F. M. Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* **45,** 675–688 (2005).

357. Caruso, D. *et al.* Age-related changes in neuroactive steroid levels in 3xTg-AD mice. *Neurobiol. Aging* **34,** 1080–1089 (2013).

358. Santacruz, K. *et al.* Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* **309,** 476–481 (2005).

359. Helboe, L., Egebjerg, J., Barkholt, P. & Volbracht, C. Early depletion of CA1 neurons and late neurodegeneration in a mouse tauopathy model. *Brain Res.* **1665,** 22–35 (2017).

360. Ramsden, M. *et al.* Age-dependent neurofibrillary tangle formation, neuron loss, and memory impairment in a mouse model of human tauopathy (P301L). *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **25,** 10637–10647 (2005).

361. Eisele, Y. S. & Duyckaerts, C. Propagation of Aß pathology: hypotheses, discoveries, and yet unresolved questions from experimental and human brain studies. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **131,** 5–25 (2016).

362. Andrä, K. *et al.* Expression of APP in transgenic mice: a comparison of neuron-specific promoters. *Neurobiol. Aging* **17,** 183–190 (1996).

363. Heuer, E., Rosen, R. F., Cintron, A. & Walker, L. C. Nonhuman primate models of Alzheimer-like cerebral proteopathy. *Curr. Pharm. Des.* **18,** 1159–1169 (2012).

364. Selkoe, D., Bell, D., Podlisny, M., Price, D. & Cork, L. Conservation of brain amyloid proteins in aged mammals and humans with Alzheimer's disease. *Science* **235,** 873–877 (1987).

365. Sani, S. *et al.* Distribution, progression and chemical composition of cortical amyloid-beta deposits in aged rhesus monkeys: similarities to the human. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **105,** 145–156 (2003).

366. Struble, R. G., Price, D. L., Cork, L. C. & Price, D. L. Senile plaques in cortex of aged normal monkeys. *Brain Res.* **361,** 267–275 (1985).

367. Rosen, R. F., Walker, L. C. & Levine, H. PIB binding in aged primate brain: enrichment of high-affinity sites in humans with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **32,** 223–234 (2011).

368. Nakamura, S. *et al.* Histopathological studies of senile plaques and cerebral amyloidosis in cynomolgus monkeys. *J. Med. Primatol.* **27,** 244–252 (1998).

369. Oikawa, N., Kimura, N. & Yanagisawa, K. Alzheimer-type tau pathology in advanced aged nonhuman primate brains harboring substantial amyloid deposition. *Brain Res.* **1315,** 137–149 (2010).

370. Härtig, W. *et al.* Abnormally phosphorylated protein tau in the cortex of aged individuals of various mammalian orders. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **100,** 305–312 (2000).

371. Schultz, C. *et al.* Filamentous tau pathology in nerve cells, astrocytes, and oligodendrocytes of aged baboons. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **59,** 39–52 (2000).

372. Duyckaerts, C., Delatour, B. & Potier, M.-C. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **118,** 5–36 (2009).

373. Wengenack, T. M., Jack, C. R., Garwood, M. & Poduslo, J. F. MR microimaging of amyloid plaques in Alzheimer's disease transgenic mice. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **35 Suppl 1,** S82-88 (2008).

374. Nabuurs, R. J. A. *et al.* MR Microscopy of Human Amyloid-β Deposits: Characterization of Parenchymal Amyloid, Diffuse Plaques, and Vascular Amyloid. *J. Alzheimers Dis.* **34,** 1037–1049 (2013).

375. Jack, C. R. *et al.* In vivo magnetic resonance microimaging of individual amyloid plaques in Alzheimer's transgenic mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **25,** 10041–10048 (2005).

376. Price, J. L., Davis, P. B., Morris, J. C. & White, D. L. The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **12,** 295–312 (1991).

377. Thal, D. R. *et al.* Sequence of Abeta-protein deposition in the human medial temporal lobe. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **59,** 733–748 (2000).

378. Iliff, J. J. *et al.* Brain-wide pathway for waste clearance captured by contrast-enhanced MRI. *J. Clin. Invest.* **123,** 1299–1309 (2013).

379. Ringstad, G., Vatnehol, S. A. S. & Eide, P. K. Glymphatic MRI in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Brain* **140,** 2691–2705 (2017).

380. Papisov, M. I., Belov, V. V. & Gannon, K. S. Physiology of the Intrathecal Bolus: The Leptomeningeal Route for Macromolecule and Particle Delivery to CNS. *Mol. Pharm.* **10,** 1522–1532 (2013).

381. Calias, P. *et al.* CNS Penetration of Intrathecal-Lumbar Idursulfase in the Monkey, Dog and Mouse: Implications for Neurological Outcomes of Lysosomal Storage Disorder. *PLoS ONE* **7,** e30341 (2012).

382. Felice, B. R. *et al.* Safety Evaluation of Chronic Intrathecal Administration of Idursulfase-IT in Cynomolgus Monkeys. *Toxicol. Pathol.* **39,** 879–892 (2011).

383. Chung, J.-K., Brown, E., Crooker, B., Palmieri, K. J. & McCauley, T. G. Biodistribution of Idursulfase Formulated for Intrathecal Use (Idursulfase-IT) in Cynomolgus Monkeys after Intrathecal Lumbar Administration. *PLOS ONE* **11,** e0164765 (2016).

384. Rieselbach, R. E., Di Chiro, G., Freireich, E. J. & Rall, D. P. Subarachnoid distribution of drugs after lumbar injection. *N. Engl. J. Med.* **267,** 1273–1278 (1962).

385. Gaberel, T. *et al.* Impaired Glymphatic Perfusion After Strokes Revealed by Contrast-Enhanced MRI: A New Target for Fibrinolysis? *Stroke* **45,** 3092–3096 (2014).

386. Goulay, R. *et al.* Subarachnoid Hemorrhage Severely Impairs Brain Parenchymal Cerebrospinal Fluid Circulation in Nonhuman Primate. *Stroke* **48,** 2301–2305 (2017).

387. Vandesquille, M. *et al.* Chemically-defined camelid antibody bioconjugate for the magnetic resonance imaging of Alzheimer's disease. *mAbs* **9,** 1016–1027 (2017).

388. d'Orange, M. *et al.* Potentiating tangle formation reduces acute toxicity of soluble tau species in the rat. *Brain* **141,** 535–549 (2018).

389. Schoch, A., Thorey, I. S., Engert, J., Winter, G. & Emrich, T. Comparison of the lateral tail vein and the retro-orbital venous sinus routes of antibody administration in pharmacokinetic studies. *Lab Anim.* **43,** 95–99 (2014).

390. Salichs, E., Ledda, A., Mularoni, L., Albà, M. M. & de la Luna, S. Genome-Wide Analysis of Histidine Repeats Reveals Their Role in the Localization of Human Proteins to the Nuclear Speckles Compartment. *PLoS Genet.* **5,** e1000397 (2009).

391. Chilumuri, A., Markiv, A. & Milton, N. G. N. Immunocytochemical staining of endogenous nuclear proteins with the HIS-1 anti-poly-histidine monoclonal antibody: A potential source of error in His-tagged protein detection. *Acta Histochem.* **116,** 1022–1028 (2014).

392. Blair, L. J. *et al.* Tau depletion prevents progressive blood-brain barrier damage in a mouse model of tauopathy. *Acta Neuropathol. Commun.* **3,** (2015).

393. Caravan, P., Ellison, J. J., McMurry, T. J. & Lauffer, R. B. Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chem. Rev.* **99,** 2293–2352 (1999).

394. Aime, S. *et al.* NMR, Relaxometric, and Structural Studies of the Hydration and Exchange Dynamics of Cationic Lanthanide Complexes of Macrocyclic Tetraamide Ligands. *J. Am. Chem. Soc.* **121,** 5762–5771 (1999).

395. Hervé, F., Ghinea, N. & Scherrmann, J.-M. CNS Delivery Via Adsorptive Transcytosis. *AAPS J.* **10,** 455–472 (2008).

396. Aime, S. *et al.* Insights into the use of paramagnetic Gd(III) complexes in MR-molecular imaging investigations. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* **16,** 394–406 (2002).

397. Corot, C. *et al.* Tumor imaging using P866, a high-relaxivity gadolinium chelate designed for folate receptor targeting. *Magn. Reson. Med.* **60,** 1337–1346 (2008).

université PARIS-SACLAY
ÉCOLE DOCTORALE
Signalisation et réseaux intégratifs en biologie (BIOSIGNE)

Titre : Développement et évaluation d'agents de contraste pour détecter la maladie d'Alzheimer par IRM : coloration par le Gadolinium et nanocorps ciblant les protéines Aβ et Tau.

Mots clés : Microscopie par IRM, Maladie d'Alzheimer, Gadolinium, Gadolinium staining, nanobodies, VHH.

Résumé : L'imagerie par résonnance magnétique (IRM) est devenue un outil incontournable en recherche biomédicale. Le développement d'outils de neuroimagerie pour le petit animal est primordial pour valider des hypothèses biologiques et tester l'efficacité de nouvelles thérapies. Dans le contexte de la maladie d'Alzheimer (MA), l'utilisation d'IRM à haut champ magnétique permet l'imagerie des plaques amyloïdes, signature moléculaire de cette pathologie. Cependant, seule une faible proportion de ces lésions sont détectées et aucune méthode de neuroimagerie ne permet actuellement d'imager les dégénérescences neurofibrillaires, deuxième signature microscopique de la MA. Dans cette thèse, deux méthodes complémentaires, utilisant différents agents de contraste à base de Gadolinium (Gd), ont été étudiées pour améliorer la détection des plaques amyloïdes par IRM. La première partie de cette thèse s'est intéressée à la méthode du « Gd- staining ». Une étude comparative réalisée sur différents modèles murins d'amyloïdose et sur des primates non-humains, a permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la détection des plaques amyloïdes grâce à cette technique. Également, nous avons montré pour la première fois qu'il est possible d'imager les lésions Aβ humaines, en *post mortem*, par Gadolinium-staining. La deuxième partie de cette thèse s'est intéressée au développement d'agents de contraste vectorisés, ciblant spécifiquement les lésions de la MA. Ces molécules seraient capables de traverser spontanément la barrière hémato-encéphalique, principale limite au développement de molécules à visée cérébrale, et permettraient de cibler spécifiquement les deux lésions caractéristiques de la MA. Ces propriétés font de ces molécules de outils potentiels intéressants pour l'imagerie cérébrale de la MA.

Title: Development and evaluation of contrast agents to detect Alzheimer's disease by MRI: Gadolinium staining and nanobodies targeting amyloid β and Tau proteins.

Keywords : Magnetic resonance microscopy, Alzheimer's disease, Gadolinium, Gadolinium staining, nanobodies, VHH

Abstract: Magnetic resonance imaging (MRI) has become a key tool for both clinical and preclinical research. Developing innovative neuroimaging techniques specifically designed for small animal models is therefore crucial to validate biological hypotheses and screen new drugs. Amyloid plaques and neurofibrillary tangles are the major lesions characterizing Alzheimer's disease (AD) and intensive research has been carried out in order to enable the accurate detection of amyloid plaques using high-field MRI. However, only a small portion of plaques are spontaneously detected by MRI and no method is so far available for neurofibrillary tangles imaging. Here, we develop two contrast-enhanced MRI techniques to improve amyloid plaques detection using high-field MRI. The first part of this work focuses on Gadolinium-Staining for amyloid plaques detection by MRI. We performed a comparative study between mice model of amyloidosis and non-human primate models, which allowed us to gain a better understanding of the origin of the contrast induced by amyloid plaques when performing contrast-enhanced MRI. We also showed for the first time that Gd-stained MRI is able to detect amyloid plaques in human-AD brain tissues. The second part of this manuscript describes two novel single-domain antibodies (VHHs or nanobodies) that are able to specifically recognize and bind amyloid plaques or neurofibrillary tangles. The detection of intracerebral targets with imaging probes is challenging due to the non-permissive nature of the blood-brain barrier. Interestingly, VHH exhibiting a basic isoelectric point are able to transmigrate across the blood-brain barrier, thus making them promising tools for *in vivo* imaging of AD's lesion at high-field MR.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France