



HAL
open science

Contribution à l'étude des anticorps dirigés contre le peptide $A\beta$ et de leur implication dans l'angiopathie amyloïde cérébrale

Yannick Chantran

► **To cite this version:**

Yannick Chantran. Contribution à l'étude des anticorps dirigés contre le peptide $A\beta$ et de leur implication dans l'angiopathie amyloïde cérébrale. Immunologie. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT : 2020SORUS198 . tel-03406145

HAL Id: tel-03406145

<https://theses.hal.science/tel-03406145>

Submitted on 27 Oct 2021

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.

Thèse de Doctorat

Contribution à l'étude des anticorps dirigés contre le peptide A β
et de leur implication dans l'angiopathie amyloïde cérébrale

Par Yannick CHANTRAN

Sous la direction du Pr. Pierre AUCOUTURIER

Soutenue publiquement le 17 Novembre 2020

Composition du jury

Pr Charles Duyckaerts	Président du jury
Pr Yannick BÉJOT	Rapporteur
Pr Luc Mouthon	Rapporteur
Pr Isabelle Limon	Examinatrice
Pr Marie Sarazin	Examinatrice
Pr Pierre Aucouturier	Directeur de thèse

Table des matières

Remerciements	p.11
Résumé	p.15
Abréviations	p.19
Introduction	
I. Le peptide β-amyloïde	p.25
1.1. Synthèse du peptide $A\beta$	p.25
1.1.1. L'Amyloid Precursor Protein.....	p.25
1.1.2. Catabolisme de l'APP et synthèse de l' $A\beta$	p.27
1.1.3. Fonctions des fragments de l'APP.....	p.29
1.2. Diversité du peptide $A\beta$	p.30
1.2.1. Diversité de séquence.....	p.30
1.2.2. Modifications post-traductionnelles.....	p.30
1.2.3. Formes agrégées de peptide $A\beta$	p.31
1.3. L' $A\beta$ dans les fluides biologiques.....	p.32
1.4. Clairance de l' $A\beta$ cérébral.....	p.32
Hydrolyse enzymatique extracellulaire.....	p.32
Phagocytose et dégradation intracellulaire.....	p.32
Clairance par la barrière hémato-encéphalique.....	p.33
Drainage dans le LCR.....	p.33
2. Pathologies liées à l'$A\beta$	p.34
2.1. Maladie d'Alzheimer.....	p.34
2.1.1. Epidémiologie.....	p.34
2.1.2. Clinique.....	p.34
2.1.3. Marqueurs radiologiques.....	p.34
2.1.4. Marqueurs biologiques.....	p.35
2.1.5. Caractéristiques neuropathologiques.....	p.35
2.2. L'Angiopathie Amyloïde Cérébrale.....	p.36
2.2.1. Epidémiologie.....	p.37
2.2.2. Clinique.....	p.38
2.2.3. Marqueurs radiologiques.....	p.39
2.2.4. Marqueurs biologiques non sérologiques.....	p.40
2.2.5. Caractéristiques neuropathologiques de l'AAC.....	p.40
2.3. Angiopathie amyloïde cérébrale et maladie d'Alzheimer.....	p.41
2.4. Facteurs influençant l'accumulation pathologique d' $A\beta$ dans l'encéphale.....	p.42
Facteurs influençant la synthèse de l' $A\beta$ et son agrégation.....	p.43
Facteurs favorisant l'accumulation vasculaire d' $A\beta$	p.43
3. Anticorps anti-$A\beta$	p.45

3.1. Mécanismes d'action des anticorps anti-A β	p.45
3.1.1. Diminution de la synthèse d'A β	p.46
3.1.2. Neutralisation des formes solubles d'A β et inhibition de l'aggrégation.....	p.46
3.1.3. Désagrégation de fibrilles préformées	p.47
3.1.4. Activation de la phagocytose microgliale.....	p.47
3.1.4. Favorisation de l'efflux de l'A β médié par les anticorps.....	p.48
3.1.5. Neutralisation et Peripheral sink.....	p.48
3.1.6. Hydrolyse de l'A β	p.49
3.2. Etudes concernant les anticorps anti-A β « naturels »	p.51
3.2.1. Anticorps naturels.....	p.51
3.2.2 Caractéristiques des anticorps anti-A β	p.53
Caractère ubiquitaire.....	p.53
Isotypie.....	p.53
Reconnaissance antigénique.....	p.54
Présence dans le LCR.....	p.55
Circulation sous forme de complexes immuns.....	p.55
3.2.3. Anticorps anti-A β dans la maladie d'Alzheimer.....	p.57
Comparaisons avec des sujets sains.....	p.57
Facteurs de variabilité chez les patients souffrant de MA.....	p.58
Variables démographiques.....	p.58
Variables biologiques ou radiologiques.....	p.58
Variables cliniques.....	p.58
3.3. Immunothérapies anti-A β dans la Maladie d'Alzheimer.....	p.60
3.3.1. Immunothérapie active contre l'A β entier.....	p.60
3.3.1.1. L'essai ANI792.....	p.60
3.3.1.2. Immunogénicité de ANI792.....	p.61
3.2.1.3. Effets de l'immunisation active sur les marqueurs associés à la Maladie d'Alzheimer.....	p.62
3.2.1.3. Effets de l'immunisation active sur l'AAC.....	p.63
3.2.1.4. Immunisation active par l'A β , effets indésirables et méningoencéphalites.....	p.64
3.3.2. Essais thérapeutiques utilisant des anticorps monoclonaux anti-A β	p.67
3.3.2.1. Les anticorps monoclonaux anti-A β utilisés en thérapeutique.....	p.67
3.3.2.2. Effets des anticorps monoclonaux anti-A β sur les marqueurs associés à la maladie d'Alzheimer.....	p.69
Effets neuropathologiques.....	p.69
Effets radiologiques.....	p.69
Effets biologiques.....	p.70
Effets cliniques.....	p.71
3.3.2.3. Effets des anticorps monoclonaux anti-A β sur l'AAC et ses complications.....	p.72
Anticorps anti-A β et AAC.....	p.72

Effets neuropathologiques des anticorps monoclonaux anti-A β sur l'AAC.....	p.72
Amyloid-Related Imaging Abnormalities.....	p.73
ARIA-E.....	p.74
ARIA-H.....	p.76
3.3.2. Essais thérapeutiques utilisant des anticorps naturels anti-A β (IVIg)	p.78
Etudes précliniques.....	p.78
Effets des IVIg dans la Maladie d'Alzheimer.....	p.79
Problématique et objectifs.....	p.81
Matériel et Méthodes.....	p.87
I. Partie méthodologique : Mise au point d'une méthode d'analyse des anticorps anti-Aβ.....	p.89
I.1. Préparations antigénique.....	p.89
I.2. Contrôle des préparations antigéniques par cryoTEM.....	p.89
I.3. Contrôle des préparations antigéniques par réaction à la Thioflavine T.....	p.90
I.4. Détection des anticorps anti-A β par ELISA multiparamétrique.....	p.90
I.5. Détection des anticorps anti-A β par résonance plasmonique de surface.....	p.91
I.6. Analyse des courbes de dilution.....	p.93
2. Etude corrélative – Variations physiologiques et pathologiques des anticorps anti-Aβ sériques.....	p.96
2.1. Animaux.....	p.96
2.1.1. Variations physiologiques.....	p.96
2.1.2. Variations pathologiques.....	p.96
2.2. Sujets humains.....	p.96
2.2.1. Variation en fonction de l'âge.....	p.96
2.2.2. Variations pathologiques : corrélation entre profil sérologique et phénotype clinique de l'angiopathie amyloïde cérébrale (étude AACAb)	p.97
2.2.2.1. Sujets.....	p.97
2.2.2.2. Imagerie.....	p.98
2.2.2.3. Contrôles qualités de la méthode ELISA.....	p.98
2.2.2.4. Calcul des coefficients de pondération du MAST-Index.....	p.99
3. Partie expérimentale : effets de préparations enrichies en IgG ou IgM anti-Aβ de faible, moyenne, et forte avidité sur les manifestations de l'AAC dans la souris APP23.....	p.100
3.1. Immunisation de souris sauvages.....	p.100
3.2. Collection de sérum par ponction intracardiaque.....	p.100
3.3. Fractionnement des protéines sériques par chromatographie d'exclusion de taille.....	p.100
3.4. Identification des fractions enrichies en IgM par immuno-empreinte.....	p.101
3.4. Immunisation passive de souris APP23.....	p.101

3.5. Sacrifice des souris APP23 immunisées et préparation des cerveaux.....	p.101
3.5. Histochimie et Immunohistochimie.....	p.102
3.6. Méthode d'analyse.....	p.102
4. Analyses Statistiques.....	p.103
Résultats	p.105
I. Partie méthodologique : Mise au point d'une méthode d'analyse des anticorps anti-Aβ.....	p.107
1.1. Préparations de différentes formes agrégées d'A β	p.107
1.2. Importance du pré-traitement en phase acide pour la détection des anticorps anti-A β circulants par ELISA.....	p.110
1.3. Modélisation des courbes de dilution	p.112
1.3.1. Modèle sigmoïde et propriétés des anticorps.....	p.112
6.2. Comparaison de deux modèles sigmoïdes.....	p.115
2. Etude corrélative – Variations physiologiques et pathologiques des anticorps anti-Aβ sériques	p.117
2.1. Anticorps naturels anti-A β chez la souris et développement en fonction de l'âge.....	p.117
2.2. Développement des anticorps anti-A β en fonction de l'âge chez l'humain.....	p.119
2.3. Anticorps anti-A β dans des modèles murins de Maladie d'Alzheimer et d'Angiopathie Amyloïde Cérébrale.....	p.121
2.4. Corrélation entre profil sérologique et phénotype clinique de l'angiopathie amyloïde cérébrale chez l'homme : cohorte AACAb.....	p.123
2.4.1. Patients, données démographiques et radiologiques.....	p.123
2.4.2. Reproductibilité et contrôles qualités internes de l'ELISA multiparamétrique.....	p.124
2.4.3. Corrélations entre les différents paramètres de l'ELISA multiparamétrique.....	p.125
2.4.4. Profils sérologiques associés aux phénotypes cliniques de l'AAC.....	p.127
2.4.4.1. Par analyse des MAST-Index.....	p.127
2.4.4.2. Analyse par régression logistique multivariée.....	p.131
3. Partie expérimentale : effets de préparations enrichies en IgG ou IgM anti-Aβ de faible, moyenne, et forte avidité sur les manifestations de l'AAC dans la souris APP23.....	p.134
3.1. Obtention de préparations enrichies en IgG ou IgM anti-A β de faible, moyenne, et forte avidité.....	p.134
3.2. Effets des préparations d'anticorps anti-A β sur les souris APP23.....	p.137
Discussion.....	p.141
I. Partie méthodologique : mise au point d'une méthode d'analyse des anticorps anti-Aβ.....	p.143
2. Etudes corrélatives.....	p.145

3. Partie expérimentale : effets de préparations enrichies en IgG ou IgM anti-A β de faible, moyenne, et forte avidité sur les manifestations de l'AAC dans la souris APP23..... p.148

Bibliographie..... p.151

Annexes..... p.181

Annexe I.....p. 184

Annexe II..... p. 191

Annexe III..... p. 217

Annexe IV..... p. 241

Remerciements

Remerciements

Je remercie le Pr. Charles Duyckaerts d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Merci au Pr. Yannick Béjot et au Pr. Luc Mouthon d'avoir accepté « d'évaluer ce travail en tant que rapporteurs.

Merci également au Pr. Isabelle Limon et au Pr. Marie Sarazin pour leur participation à mon jury de thèse en tant qu'examinatrices.

Toute ma gratitude va au Pr. Pierre Aucouturier, pour avoir été mon mentor sur le plan scientifique d'abord au cours de mon Master, puis pour ma thèse. Il a su me guider et me soutenir tout au long de ce travail, d'une part en me faisant bénéficier de son expérience dans l'étude des anticorps et l'immunochimie, et d'autre part en me donnant l'opportunité de mettre en pratique et à l'épreuve de nouvelles idées et de développer des compétences propres, notamment en analyse de données. Son apport ne se limite pas à sa compétence scientifique ni à ses qualités d'encadrant dans le domaine de la recherche, puisqu'il dirige le département hospitalier au sein duquel j'ai été formé en immunologie biologique. Je sais que, dans les périodes les plus sereines comme dans les moments les plus tourmentés, j'ai bénéficié de sa part d'un indéfectible soutien. Qu'il trouve ici l'expression de toute l'estime intellectuelle et humaine que je lui porte.

Je remercie le Dr Benoît Delatour d'avoir été mon tuteur de thèse, ainsi que le Dr Régis Blaise d'avoir expertisé mon travail lors de ma mi-thèse. Je remercie également l'école doctorale « Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique – ED394 » (Sorbonne Université), et particulièrement ses directeurs et directrices, le Pr. Xavier Houard, le Dr. Catherine Monnot, ainsi que le Pr. Isabelle Cremer pour leur aide et leur soutien.

Je remercie tous les membres de l'équipe Système Immunitaire et Neuroinflammation, notamment Guillaume Dorothee, son directeur, Carole Elbim, Slavica Krantic, Mélanie Morin-Brureau, Thomas Chaigneau, et tous ceux qui en ont fait, ou en font encore partie, notamment mes anciens et actuels co-thésard : d'abord Marie et Cira, puis Yuan, sans oublier Chloë et Karen. Un remerciement particulier à Grégoire, pour ses qualités humaines, et pour nos échanges scientifiques et statistiques. Je remercie également les techniciens et les étudiants que j'ai eu la chance d'encadrer, et dont le travail a grandement contribué aux résultats de cette thèse. Les techniciennes Romane Bertrand, Marine Chapey, Mélanie Féroul, et Johanna Félix, ainsi que Barbara Trifault, stagiaire en filière technique. Les étudiants de M1 : Margaux Cauhapé, Liz Urbano Ramirez, Emile Laisne, et surtout Samal Bissenova, Olivia Cattaneo et Maxime de Jong, pour leur travail précieux sur les sérums de souris. Les étudiants en M2 : Diana Doukhi pour son travail en immunohistochimie sur les cerveaux

de souris APP23, et surtout Florian Kruse, pour nos échanges et sa contribution sur les aspects méthodologiques et sur les sérums de souris immunisés.

Ce travail ne serait rien sans la collaboration étroite entretenue avec le réseau de neurologie vasculaire et en particulier avec les cliniciens de St-Antoine, en particulier le Pr Sonia Alamowitch et le Dr Jean Capron. Qu'ils reçoivent ici l'assurance de mon estime la plus profonde.

Merci à Guislaine Frebourg et Tahar Bouceba de l'Institut de Biologie Paris-Seine pour leur assistance sur les expériences de cryoTEM et de BIAcore.

Je remercie toute l'équipe médicale et paramédicale du département d'Immunologie Biologique des Hôpitaux Universitaires de l'Est Parisien / Sorbonne Université, pour leur soutien, et pour avoir très souvent pallié à mes absences liées aux exigences de la recherche. Je remercie le Dr Catherine Johanet pour son soutien et ses compétences professionnelles et humaines. Je remercie mes désormais collègues Eric Ballot et surtout Aïcha Abbas pour leur aide côté hôpital, ainsi que tous les internes, le personnel technique, et les cadres, en particulier Christine Tricot, pour nos échanges. Merci à Rémy Couderc, Joanna Vitte et Jocelyne Just de m'avoir mis le pied à l'étrier en Allergologie, ainsi qu'à tout le personnel du secteur d'allergologie de Trousseau. Merci également à Michel Vaubourdolle et Rachel Levy pour leur soutien.

Je remercie également les collègues à qui je dois beaucoup côté enseignement : Eric Ballot encore une fois, l'école de Sages-Femmes de St-Antoine et en particulier Michèle Rivière, sa directrice. Merci à Philippe le Rouzic de m'avoir fait confiance pour les enseignements à Jussieu.

Je remercie mes amis, collègues et/ou anciens co-internes, notamment Nabih Emmanuel, Delphine, Marion, Hélène, Thibault, Mathilde, Martin, Inana, Audrey, Matthieu et Simon.

Je remercie ma famille pour leur soutien, et en particulier ma mère Brigitte, mon père Paul, et mon frère Antoine.

Finalement, je ne serai certainement pas arrivé au bout de ce travail sans le soutien inconditionnel de ma compagne Camilla. Celui de mon fils Elio arrivé au cours de cette thèse, certes plus discret, m'apporte encore plus de joie. Merci à eux.

Résumé

Résumé

Le peptide β -amyloïde (ou $A\beta$) s'accumule dans le parenchyme cérébral et les capillaires au cours de la maladie d'Alzheimer (MA), et dans les vaisseaux artériels cérébraux au cours de l'angiopathie amyloïde cérébrale (AAC). L'AAC se manifeste, entre autres, par des présentations hémorragiques (AAC-he), ou inflammatoires (AAC-ri). Des travaux expérimentaux chez l'animal et des essais cliniques d'immunothérapie anti- $A\beta$ chez l'homme montrent que les anticorps réactifs vis-à-vis de l' $A\beta$ peuvent moduler son accumulation parenchymateuse, mais auraient tendance à majorer les dépôts vasculaires et à déclencher ses différentes manifestations de l'AAC. Or, tous les individus présentent spontanément des auto-anticorps naturels anti- $A\beta$. L'étude de ces anticorps dans le sang pour distinguer sujets âgés et patients atteints de MA a donné des résultats contradictoires. Dans l'AAC-ri, des éléments de preuve suggèrent la présence de ces anticorps dans le liquide céphalo-rachidien en phase aiguë, mais leur présence dans le sérum demeure inconnue.

Nous avons mis au point une technique dérivée de l'ELISA pour l'analyse de différentes caractéristiques des anticorps anti- $A\beta$ sériques : leurs réactivités vis-à-vis de différentes préparations d' $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$, leurs isotypes, leurs concentrations et une estimation de leur avidité apparente pour l'antigène et l'isotype considéré. Cette technique a été appliquée à l'étude des anticorps anti- $A\beta$ sériques chez l'animal et chez l'homme. Des études pilotes en modèle murin suggèrent la présence spontanée d'IgG et d'IgM anti- $A\beta$ chez la souris. Tout comme d'autres auto-anticorps naturels, ici les anticorps anti-actine, leur production semble augmenter avec l'âge. Ces résultats préliminaires suggèrent également que la production d'IgG anti- $A\beta$ soit sous la dépendance d'une coopération T-B. Chez l'homme, nous avons montré la présence des anticorps anti- $A\beta$ dès l'enfance, à un âge où les dépôts cérébraux sont absents : la production de ces anticorps n'est donc pas initiée par l'existence de dépôts. En outre, comme chez la souris, leur présence dans le sérum augmente avec l'âge. Nous avons ensuite étudié sur une cohorte de 105 participants sains ou présentant une AAC-he ou une AAC-ri, l'existence de profils sérologiques spécifiques complexes, impliquant particulièrement les IgG3, les IgG4, les IgA et les IgM anti- $A\beta$. Enfin, nous présentons les résultats préliminaires d'une étude expérimentale chez la souris APP23, un modèle transgénique présentant des dépôts parenchymateux et vasculaires. Les souris APP23 auxquelles ont été administré des IgG anti- $A\beta$ de forte affinité semblent présenter une plus forte réaction astrocytaire, cependant sans augmentation de l' $A\beta$ vasculaire, ni augmentation des microsaignements. Ces derniers sembleraient plutôt associés aux IgG anti- $A\beta$ naturelles issues de souris non immunisées.

Cette contribution à l'étude des anticorps anti- $A\beta$ permet de mieux comprendre les variations physiologiques et pathologiques de ces anticorps, et suggère que leur analyse comme potentiel biomarqueur de l'AAC, et de ses manifestations hémorragiques ou inflammatoires.

Abréviations

AAC	angiopathie amyloïde cérébrale	f-40	A β ₁₋₄₀ fibrillaire
AAC-he	hémorragies liées à l'AAC	f-42	A β ₁₋₄₂ fibrillaire
AAC-ri	inflammations liées à l'AAC	FLAIR	Fluid Attenuated Inversion Recovery
ABRA	Abeta related angiitis	GFAP	Glial fibrillary acidic protein
ACP	Analyse en Composantes Principales	GWAS	Genome-Wide Association Study
ADAD	Autosomal Dominant Alzheimer's Disease	HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
ADAS-Cog	Alzheimer's Disease Assesment Scale-Cognitive	HFIP	HexaFluoroIsoPropanol
AICD	APP intracellular C-terminal Domain	HRP	HorseRadish Peroxydase
APP	amyloid precursor protein	IATI	Innotest Amyloid Tau Index
ARIA	Amyloid-Related Imaging Abnormalities	Iba1	ionized calcium-binding adapter molecule 1
ARIA-E	ARIA-edema or effusion type	ICH	hémorragie intracérébrale
ARIA-H	ARIA-hemorrhagic type	IFA	Incomplete Freund's Adjuvant
AUC	Area Under the Curve	IL	Interleukine
AVC	accident vasculaire cérébral	IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
A β	peptide β -amyloïde	IV	Intraveineuse
BHE	barrière hémato-encéphalique	IVIg	Immunoglobulines par voie intraveineuse
BSA	Bovine Serum Albumine	K' _{A App}	Constante apparente d'avidité
CAPS	cross-linked A β protein species	KPI	Kunitz-type Protease Inhibitor
CFA	Complete Freund's Adjuvant	LCR	liquide céphalo-rachidien
cSS	sidérose corticale superficielle	LOAD	Late-Onset alzheimer's Disease
CTF	Carboxy-Terminal Fragment	LRP	Low Density Lipoprotein receptor related protein
CV	Coefficient de Variation	LTP	long-term potentiation
DFG	[¹⁸ F]flurodéoxyglucose	MA	maladie d'Alzheimer
DMSO	DiMéthylSulfOxyde	MAST	Maximum Avidity Steepness Titer
DNF	dégénérescence neuro-fibrillaire	MCI	Mild Cognitive Impairment
DO	Densité Optique	MMSE	Mini-Mental State Evaluation
EOAD	Early-Onset alzheimer's Disease		

PBS	Phosphate Buffered Saline	SEC	Chromatographie d'Exclusion de Taille
PFA	ParaFormaldéhyde	SNC	système nerveux central
Pgp	GlycoProtéine P	Sp	Spécificité
PiB	Pittsburgh Compound B	SPR	Résonance Plasmonique de Surface
PSEN	Préséniline	TEM	microscopie électronique à transmission
RAGE	Receptor for Advanced Glycation Endproducts	TEP	Tomographie par Emission de Positons
ROC	Receiver Operating Characteristic	TFNE	Transient Focal Neurologic Episode
s-40	A β ₁₋₄₀ soluble	ThT	Thioflavine T
s-42	A β ₁₋₄₂ soluble	TNF	Tumor necrosis factor
Se	Sensibilité	VIF	Variance Inflation Factor

Introduction

I. Le peptide β -amyloïde

Le peptide β -amyloïde ($A\beta$) est le composant principal des dépôts amyloïdes présents, d'une part, dans le parenchyme cérébral au cours de la maladie d'Alzheimer (MA) (Masters et al., 1985), et d'autre part, dans la paroi des vaisseaux cérébraux, au cours de l'angiopathie amyloïde cérébrale (AAC) (Glennner & Wong, 1984). Nous verrons par la suite que les anticorps anti- $A\beta$ peuvent avoir des mécanismes d'actions très variés et peuvent moduler les différentes étapes de sa synthèse et de sa clairance.

Décrire la physiologie du peptide $A\beta$ est donc essentiel d'une part pour appréhender les mécanismes liés à l'accumulation pathologique de l' $A\beta$ dans la MA et l'AAC, et d'autre part pour comprendre les propriétés biologiques et les mécanismes d'action bénéfiques ou délétères des anticorps anti- $A\beta$.

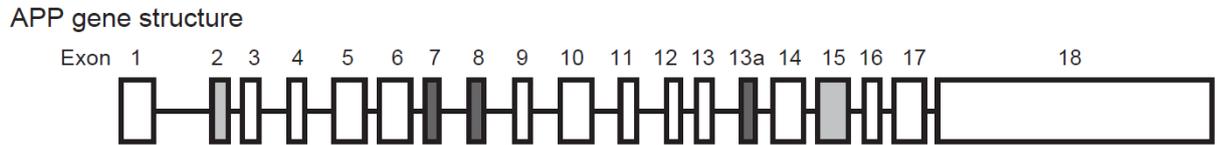
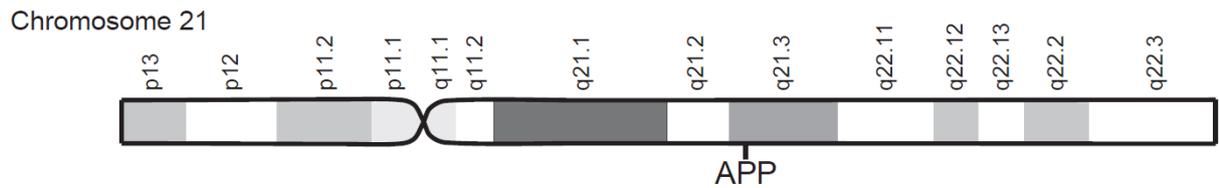
I.1. Synthèse du peptide $A\beta$

I.1.1. L'Amyloid Precursor Protein

Le peptide $A\beta$ est issu du clivage d'une glycoprotéine transmembranaire appelée *Amyloid Precursor Protein* (APP) (Kang et al., 1987). Le gène de l'APP est situé sur le bras long du chromosome 21 (21q21.3), mesure environ 240 kilobases et s'étend sur 18 exons (Yoshikai, 1990) (**Figure 1**). Ce gène appartient à une famille relativement conservée au cours de l'évolution, retrouvée chez un nombre important d'espèces de vertébrés (Dawkins, 2014).

Concernant sa structure, l'APP est une protéine de type I, *i.e.* possédant un seul domaine transmembranaire. L'extrémité amino-terminale extracellulaire est longue, tandis que le domaine carboxy-terminal intracellulaire (APP intracellular domain ou AICD) est court. La portion de l'APP correspondant au peptide $A\beta$ chevauche une partie du domaine extracellulaire, et une partie du domaine transmembranaire (**Figure 1**).

Un système d'épissage alternatif complexe et encore mal connu est à l'origine de l'expression de différentes isoformes de l'APP. Il existerait plus de 10 isoformes d'APP (Li et al., 1999). Les trois isoformes principales, sont l'APP₆₉₅, l'APP₇₅₁ et l'APP₇₇₀. Ces trois isoformes expriment les deux principaux domaines extracellulaires appelés E1 et E2. Un autre domaine appelé KPI (pour Kunitz-type Protease Inhibitor) est présent sur l'APP₇₅₁ et l'APP₇₇₀, mais pas sur l'APP₆₉₅ (Beyreuther et al., 1993).



Major mRNA splice variants



APP-770

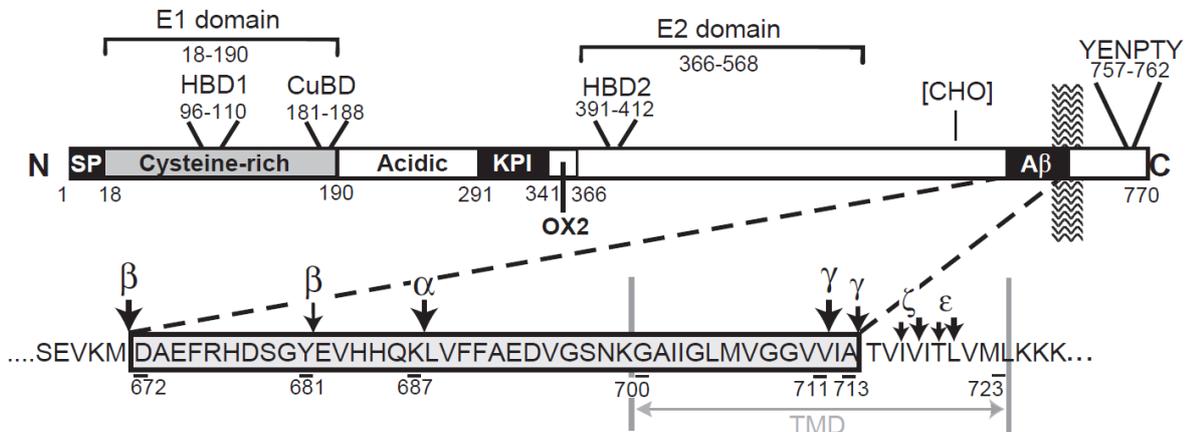


Figure I. Structure de l'Amyloid Precursor Protein (APP). **A.** Structure du gène de l'APP. **B.** Isoformes majeures de l'APP issues d'un épissage alternatif. L'isoforme APP₆₉₅ est celle principalement exprimée par les neurones. **C.** Principaux domaines de l'APP₇₇₀, et séquence correspondant à l'Aβ₁₋₄₂ (encadrée). Différents sites de clivage enzymatique sont indiqués par des flèches. D'après Dawkins et al., 2014.

Concernant son expression, l'APP est exprimée par des types cellulaires très variés, aussi bien au niveau central que périphérique. L'expression des différentes isoformes de l'APP dépend du type cellulaire. Au niveau central, les neurones sont la principale cellule exprimant l'APP, chez le sujet sain et atteint de MA (Bahmanyar et al., 1987). En condition physiologique, les neurones expriment préférentiellement l'APP695. En conditions pathologiques, la synthèse d'isoformes possédant le domaine KPI semble toutefois augmentée (Moir et al., 1998), ce qui peut aboutir à une surproduction d'A β ₁₋₄₂ (Ho et al., 1996). La question de savoir si d'autres cellules du système nerveux central (SNC) expriment ou non l'APP est sujette à controverse : l'expression de l'APP par les cellules gliales, notamment les astrocytes et les cellules microgliales, a été observée in vitro (Leblanc et al., 1991 ; Forloni et al., 1992 ; Rohan de Silva et al., 1997), mais la spécificité du signal observé a été contestée par certains auteurs (Guo et al., 2012). L'APP serait également exprimé par différentes cellules de l'unité neuro-vasculaires : cellules musculaires lisses, cellules endothéliales et péricytes (Forloni et al., 1992 ; Kawai et al., 1993 ; Natté et al., 1999a ; Wisniewski et al., 1994).

En périphérie, l'APP est exprimée par de nombreux tissus : la glande surrénale, les muscles lisses, striés et cardiaque, le foie, le rein, le poumon, le pancréas, la prostate, la rate et le thymus (Selkoe et al., 1988 ; Arai et al., 1991). L'APP serait exprimé par les fibroblastes (Müller 2017). Concernant les éléments figurés du sang, les plaquettes seraient la principale source d'APP et d'A β plasmatique, présentant des niveaux d'expression comparable au SNC (Li 1999, Bush et al., 1990, van Nostrand et al., 1991), mais l'APP serait également exprimé par des leucocytes tels que les lymphocytes T, les monocytes et les neutrophiles (Mönning et al., 1992 ; Nordstedt et al., 1994).

Les fonctions de l'APP sont encore mal comprises, en dépit du caractère bien conservé dans l'évolution, de l'expression considérée comme ubiquitaire, et des nombreux domaines fonctionnels de cette protéine. Par l'absence de TATA box et la présence, au niveau de la région promotrice, de sites de liaison pour différents facteurs de transcriptions associés à la prolifération et à la différenciation cellulaire, certains auteurs ont suggéré qu'il s'agirait d'un gène de ménage (Beyreuther et al., 1993). Les protéines de la famille de l'APP seraient des protéines multifonctionnelles jouant notamment un rôle dans le développement du système nerveux central et périphérique, dans la plasticité et les fonctions synaptiques chez l'adulte, et la neuroprotection (Dawkins et al., 2014 ; Müller et al., 2017).

1.1.2. Catabolisme de l'APP et synthèse de l'A β

L'APP transmembranaire subit une dégradation complexe, qui peut aboutir à de nombreux fragments protéiques, dont l'A β . On distingue des voies de dégradation dites canoniques, par un groupe

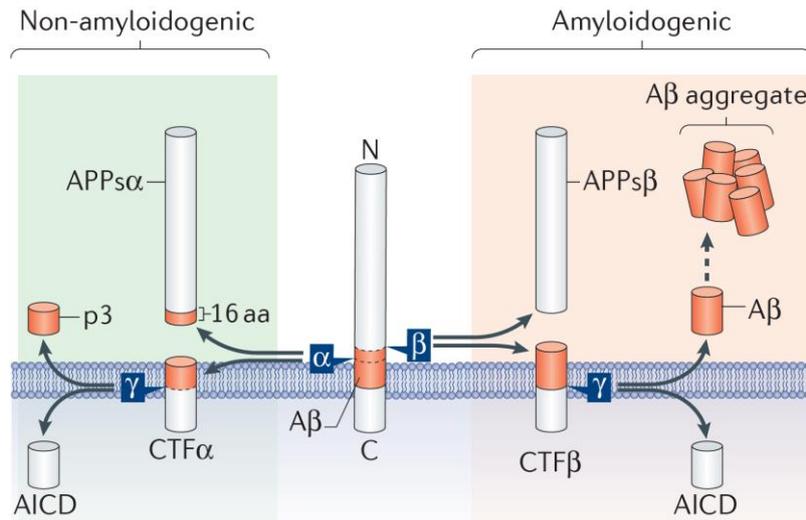
d'enzymes appelées secrétases, ainsi que des voies de dégradation non-canoniques. La voie canonique se divise en voie non-amyloïdogénique et amyloïdogénique, présentées dans la **Figure 2**.

La voie canonique non-amyloïdogénique est initiée par les α -secrétases (principalement ADAM10 dans le SNC), qui clive l'APP au niveau d'APP₆₁₂ (A β ₁₆), libérant dans le milieu extracellulaire l'APP α . Le fragment restant, enchâssé dans la membrane (C-terminal fragment α ou CTF α) est ensuite clivé par le complexe γ -secrétase, qui inclut différentes protéines dont les présénilines PSI ou PS2). Ce clivage libère un peptide extracellulaire p3 correspondant à la partie aminotermine du peptide A β (A β _{17-x}), et libère également le fragment AICD intracellulaire.

La voie canonique amyloïdogénique est initiée par les β -secrétases (principalement BACE1 et BACE2 dans le système nerveux central), qui clive l'APP au niveau de l'extrémité amino-terminale d'A β , libérant dans le milieu extracellulaire l'APP β . Le CTF β est ensuite clivé par les γ -secrétases, et libère le peptide A β _{1-x} extracellulaire, et l'AICD intracellulaire.

Il faut préciser que l'action des γ -secrétases se fait par hydrolyses successives, en partant d'un site d'endoprotéolyse ϵ majeur situé au niveau d'A β ₄₉, ou d'un site d'endoprotéolyse ϵ mineur en conditions physiologiques situé au niveau d'A β ₄₈ (Müller et al., 2017). L'action des γ -secrétases se fait ensuite par exoprotéolyse successive tous les 3 aminoacides environ, permettant de libérer, à partir du site ϵ majeur, l'A β _{x-46}, A β _{x-43}, A β _{x-40}, et l'A β _{x-37}, et à partir du site ϵ mineur, l'A β _{x-45}, l'A β _{x-42}, et l'A β _{x-38}. Cette précision permet i) d'expliquer l'abondance relative d'A β ₁₋₄₀ comparativement à celle d'A β ₁₋₄₂ dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et dans le plasma ; ii) d'indiquer que l'A β ₁₋₄₀ et l'A β ₁₋₄₂, qui sont les composants majoritaires des dépôts respectivement vasculaires et parenchymateux, sont les produits de deux voies de synthèse distinctes en amont : l'A β ₁₋₄₀ n'est donc pas un produit de dégradation de l'A β ₁₋₄₂ et les dépôts vasculaires d'A β ₁₋₄₀ ne sont donc pas le reliquat d'anciens dépôts parenchymateux d'A β ₁₋₄₂ en voie de clairance vers les vaisseaux.

D'autres voies de dégradation de l'APP, dites « non-canoniques », ont été décrites, telles que la voie δ -secrétase, la voie η -secrétase, la voie de la méprine- β , et la voie-caspase dépendante. Elles font intervenir d'autres enzymes et d'autres sites de clivage, qui laissent en général un CTF avec un A β intact, à l'exception de la méprine- β . Ces voies non-canoniques peuvent donc elles aussi aboutir à la synthèse d'A β , par action des β - et γ -secrétases sur le CTF (Müller et al., 2017).



c Aβ-generating and N-terminal cleavage sites

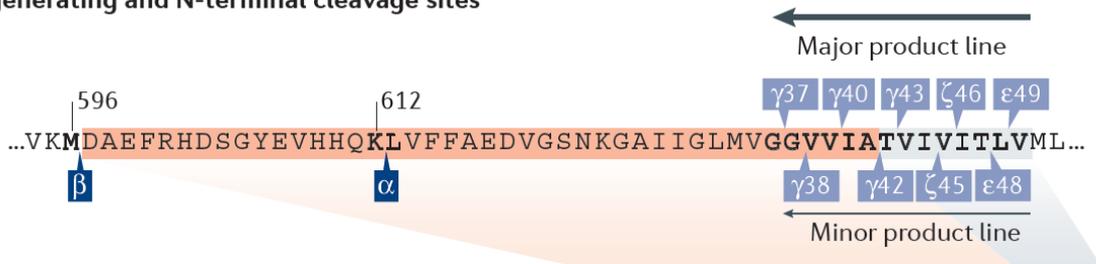


Figure 2. Synthèse de l'Aβ à partir de l'APP. A. Voies canoniques amyloïdogénique et non-amyloïdogénique de clivage de l'APP. **B.** Séquence de l'APP correspondant à l'Aβ, illustrant les sites de clivage majeurs des α-, β-, et γ-secrétases et les voies de production de l'Aβ₁₋₄₀ et de l'Aβ₁₋₄₂ à partir des sites d'endoprotéolyse majeur et mineur des gamma-secrétases. D'après Muller et al., 2017.

I.1.3. Fonctions des fragments de l'APP

Les différents produits de dégradation de l'APP joueraient également des fonctions physiologiques (Müller et al., 2017). En particulier, l'Aβ a été décrit comme jouant un rôle régulateur de l'homéostasie neuronale. A très faibles concentrations, de l'ordre du pM, il faciliterait la LTP et les processus de mémorisation, ainsi que la libération de neuromédiateurs présynaptiques via une action agonistique sur les récepteurs nicotiniques à l'Acétylcholine (Puzzo et al., 2008 ; Puzzo et al., 2011 ; Lawrence et al., 2014).

I.2. Diversité du peptide A β

En réalité, ce qu'on désigne comme le peptide A β regroupe une variété de peptides distincts par leur séquence, les modifications post-traductionnelles qu'ils ont subies, leur conformation et leur état d'agrégation (Agrawal et al., 2019 ; Chen et al., 2017).

I.2.1. Diversité de séquence

Nous venons de voir que la voie canonique amyloïdogénique aboutit à la synthèse de différents peptides A β sauvages de différentes longueurs et donc de différentes séquences. Cette diversité est essentiellement carboxy-terminale, puisqu'elle fait suite à l'action des γ -secrétases en partant du site d'endoprotéolyse ϵ .

Il existe également une diversité amino-terminale du peptide A β . Cette diversité est liée en partie à l'action des α - ou β -secrétases, aboutissant respectivement à l'A β_{17-x} ou à l'A β_{1-x} . En outre, BACE-1 peut également cliver l'APP au niveau d'A β_{10} , donnant lieu à la production d'A β_{11-x} (Seubert 1992, Kummer 2014). D'autres raccourcissements aminoterminaux interviennent sans action des secrétases, vraisemblablement après la synthèse de l'A β . L'A β_{2-x} serait le résultat de l'action de l'aminopeptidase A ou de la méprine β (Wiltfang 2001). L'A β_{3-x} serait le résultat d'une hydrolyse médiée par le Cu²⁺ (Guntert 2006). L'A β_{4-x} et l'A β_{5-x} sont également des formes prépondérantes d'A β (Masters 1985 ; Guntert 2006). Il existe également des formes plus courtes : A β_{7-x} , A β_{8-x} , et A β_{9-x} (Kummer 2014).

I.2.2. Modifications post-traductionnelles

Certaines modifications post-traductionnelles ajoutent un niveau de diversité supplémentaire quant aux différents peptides A β . Ces différentes modifications peuvent avoir un impact sur les propriétés du peptide, qu'il s'agisse de stabilité, de propension à l'agrégation, de propriétés biologiques ou d'immunogénicité.

Le principal site d'oxydation de l'A β est une Méthionine en position 35, donnant un sulfoxyde de méthionine. Cette oxydation, qui pourrait résulter d'un stress oxydant augmenté chez les patients atteints de MA, diminue la propension de l'A β à la fibrilloformation. L'A β possède trois sites de phosphorylation : 2 sérines en A β_8 et A β_{26} , et une thréonine en A β_{10} . La phosphorylation en A β_{26} augmenterait son potentiel neurotoxique, tandis que la phosphorylation en A β_8 diminuerait sa susceptibilité à l'hydrolyse et augmenterait son oligomérisation et à la fibrillation de l'A β (Roher, 2017). La glycosylation et la nitration sont possibles au niveau d'A β_{10} . La glycosylation ne semble

concerner que des espèces courtes, et pas l'A β ₁₋₄₀, ni l'A β ₁₋₄₂. La nitration semble réduire la propension du peptide à l'agrégation. La pyroglutamylation peut avoir lieu en A β 3 et A β 11. Ces isoformes montreraient une plus grande propension à l'agrégation et à la neurotoxicité. L'isomérisation et la racémisation des aspartates et des asparagines conduit à la formation d'isomères D- et L-aspartate et isoaspartate en A β 1 et 7. Ces formes sont particulièrement abondantes dans les plaques parenchymateuses, et non dans les dépôts vasculaires. (Roher, 2017 ; Kummer, 2014)

I.2.3. Formes agrégées de peptide A β

Les monomères d'A β solubles possèdent une propension à adopter une conformation riche en feuillets β . Ces conformères ont tendance à s'agréger en polymères de différentes tailles et structures : des oligomères de bas poids moléculaires, puis de plus haut poids moléculaires, jusqu'aux protofibrilles et aux fibrilles amyloïdes, qui s'accumulent dans les dépôts parenchymateux et neurovasculaires. Ces différents assemblages suivent une classification complexe, et des dénominations qui ne sont pas homogènes entre différents auteurs. (Jan 2010, Yagi 2007, Toyama 2011, Chen et al., 2017).

Sur le plan technique, ces différents types de polymères d'A β sont regroupés en fraction soluble ou insoluble, selon qu'on les retrouve dans le surnageant ou le culot après ultracentrifugation d'une homogénat de cerveau. Les monomères et les oligomères sont présents dans la fraction soluble (Stine et al., 2003). Au sein de la fraction insoluble, la fraction dispersible demeure dans le surnageant après centrifugation classique et contient une partie des fibrilles (Stine et al., 2003). Le culot contient l'A β associé à la membrane, qui peut être extrait à l'aide d'un détergent, et à l'A β associé aux plaques, qui peut être extrait du culot par l'acide formique (Thal et al., 2015).

Différentes conditions font varier la facilité avec laquelle le peptide A β va s'agréger : la séquence de l'A β , le temps, la concentration, le pH, la température, et la force ionique sont décrits classiquement (Stine et al., 2003). Précisons que l'agrégation d'A β ne suit vraisemblablement pas un chemin linéaire entre le monomère et la fibrille mature : certains oligomères tels que les dimères sont des intermédiaires de la fibrilloformation, tandis que d'autres tels que les trimères ou les globulomères sont des impasses quant à la fibrilloformation, ce qui n'implique pas que ces formes soient dénuées de toxicité ou d'importance physiopathologique.

Les fibrilles amyloïdes d'A β sont le composant majeur des plaques amyloïdes et des dépôts neurovasculaire d'AAC (Glennner et al., 1984 ; Wong et al., 1985 ; Joachim et al., 1988). Le contenu protéique du core des plaques séniles est à 70% composé de protéines qui contiennent la séquence de l'A β , avec une hétérogénéité assez importante quant à l'extrémité aminotermine du peptide, et une relative homogénéité quant à l'extrémité carboxyterminale, correspondant à de l'A β _{x-42}. Les

dépôts cérébrovasculaires étaient quant à eux plus homogènes, constitués majoritairement d'A β ₁₋₄₀ (Miller et al., 1993).

1.3. L'A β dans les fluides biologiques

Le peptide A β est présent dans le LCR et dans le plasma (Seubert et al., 1992), avec une d'A β dans le LCR qui est environ 50 à 100 fois supérieure à celle du plasma (Bateman et al., 2006). Il semble exister une variation nyctémérale de concentration d'A β dans le LCR (Lucey et al., 2017). Dans le LCR, le peptide A β a une demi-vie d'environ 9 heure, tandis qu'elle est d'environ 3 heures dans le plasma (Ovod et al., 2017). Dans le LCR de sujets non déments, l'A β _{x-40} représente plus de 70% de l'A β monomérique, tandis que l'A β _{x-38} et l'A β _{x-42} en représente seulement 20% et 10%, respectivement (Tarasoff-Conway et al., 2015).

Si l'A β périphérique peut pénétrer le SNC (Zlokovic et al., 1993), il semble toutefois que la majorité de l'A β présent dans le LCR soit d'origine centrale, tandis que l'A β d'origine centrale ne représente qu'une relativement faible proportion de l'A β périphérique (Bateman et al., 2006).

1.4. Clairance de l'A β cérébral

La clairance de l'A β cérébral suit vraisemblablement des voies multiples et complexes (Tarasoff-Conway et al., 2015).

Hydrolyse enzymatique extracellulaire

L'A β cérébral peut être dégradé par différentes enzymes, telles que la néprilysine, les enzymes de conversion de l'endothéline, l'enzyme de conversion de l'angiotensine, l'enzyme dégradant l'insuline, le système fibrinolytique, et les matrice métalloprotéases sont susceptibles de dégrader l'A β (Morelli et al., 2002 ; Morelli et al., 2004 ; Hernandez-Guillamon et al., 2015).

Phagocytose et dégradation intracellulaire

Après phagocytose par des cellules microgliales (Wilcock et al., 2004), des astrocytes (Guenette et al., 2003), ou même par des macrophages périvasculaires (Hawkes et al., 2009) ou des cellules musculaires lisses, l'A β peut être dégradé par différentes voies telles que celle du protéasome après ubiquitinylation, la voie endo-lysosomale, ou la voie autophagie-lysosomale (Tarasoff-Conway et al., 2015).

Clairance par la barrière hémato-encéphalique

Des transporteurs spécifiques de l'A β ont été identifiés au niveau de la BHE, et l'influx et l'efflux d'A β entre les compartiments central et vasculaire sont partiellement élucidés (Tanzi et al., 2004). Le récepteur RAGE semble être l'acteur majeur impliqué dans l'influx d'A β de la circulation sanguine vers le compartiment central (Deane et al., 2003). La plupart des autres transporteurs présents au niveau de la BHE sont des transporteurs d'efflux d'A β . LRP-1 semble majoritairement impliquée (Shibata et al., 2000 ; Zlokovic et al., 2005), mais également la glycoprotéine P (Pgp1 ou ABCB1 ou MDR1) (Cirrito et al., 2005), BCRP/ABCG2 (Zhang et al., 2013), l'alpha2macroglobuline, ABCA1, qui médie un transport d'A β ApoE-médié, ou encore la mégaline (LRP2) qui médie un transport d'A β médié par la clusterine ou ApoJ (Tarasoff-Conway et al., 2015).

Drainage dans le LCR

L'A β présent dans le liquide interstitiel est susceptible d'être drainé par diffusion ou par transport de masse (*bulk flow*) dans le LCR, via les espaces périvasculaires puis les espaces de Virchow-Robin, pour rejoindre la circulation par les voies d'efflux du LCR dans la circulation : les villosités arachnoïdes, la lame criblée de l'ethmoïde, ou les espaces périneuraux jusqu'aux ganglions lymphatiques cervicaux (Tarasoff-Conway et al., 2015).

2. Pathologies liées à l'Aβ

2.1. Maladie d'Alzheimer

2.1.1. Épidémiologie

La maladie d'Alzheimer (MA) est la première cause de démence. Elle affecte typiquement le sujet âgé : 3% des sujets entre 65-75 ans, 17% des sujets entre 75-85 ans, 32% des sujets au-delà de 85 ans. Le sex ratio M:F est de 1:2 (Soria Lopez, 2019).

Il existe des formes génétiques de MA. Ces formes occasionnent généralement une MA à début précoce et sont autosomiques dominantes (autosomal dominant Alzheimer's Disease ou ADAD). Parmi les ADAD, on peut distinguer les formes génétiques avec duplication du gène de l'APP, qui peuvent être dues à une trisomie 21 (Donahue et al., 1998) ou à une duplication locale (Cabrejo et al., 2006), des mutations de l'APP ou des présénilines. Ces formes représentent environ 1% des cas de MA.

La très grande majorité des MA sont des cas sporadiques, et débutent généralement après 65 ans (late onset alzheimer's disease ou LOAD). Environ 5% des cas d'Alzheimer sporadique sont à début précoce (early onset alzheimer's disease ou EOAD). Le principal facteur de risque génétique est l'allèle ε4 du gène de l'ApoE (Corder et al., 1993). Cependant, des études GWAS ont identifié plus de 25 loci à risque de MA (Kunkle et al., 2019), qui intéressent les fonctions synaptiques, le métabolisme lipidique, et le système immunitaire (Hinz et al., 2017, Rosenthal et al., 2014 ; Karch et al., 2015 ; Lambert et al., 2013)

2.1.2. Clinique

Sur le plan clinique, le déclin cognitif, d'apparition progressive, évolue sur plusieurs années, de façon stéréotypée. Durant la phase asymptomatique, les lésions encéphaliques sont présentes, mais précèdent de plusieurs années l'apparition des troubles cognitifs. Durant la phase prodromale, des symptômes cognitifs peuvent être détectés, mais n'altèrent pas la vie quotidienne du sujet. C'est notamment le cas des sujets catégorisés comme Mild Cognitive Impairment (MCI). Le syndrome démentiel qui caractérise la MA ne survient que tardivement (Soria Lopez, 2019).

Au premier plan domine un syndrome amnésique avec perte de la mémoire épisodique. On retrouve en général au second plan l'un des troubles cognitifs suivants : une aphasie, qui se manifeste d'abord par un manque du mot et par l'utilisation de périphrases ou de termes vagues, puis par des troubles de la compréhension écrite et orale ; une apraxie qui empêche l'exécution de certains gestes, et, plus

tardivement, par des troubles de l'écriture caractérisés par une micrographie ; un agnosie qui se caractérise par des troubles de la reconnaissance visuelle ou auditive, par exemple la reconnaissance des visages (Soria Lopez, 2019).

Il existe des présentations atypiques de la MA, qui représentent environ 5-15% des cas. Lors de celles-ci, l'atteinte mnésique est plus tardive et passe au second plan : la reconnaissance visuelle dans l'atrophie cortical postérieure, le langage dans le variant logopénique de l'aphasie primaire progressive, ou les fonctions exécutives et le comportement dans le variant frontal (Villain et al., 2019).

2.1.3. Marqueurs radiologiques

Des marqueurs volumétriques, tels qu'une atrophie hippocampique et pariétale, peuvent être mesurés par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). Il existe également des marqueurs radiologiques utilisés en recherche. La Tomographie par Emission de Positrons (TEP) peut rendre compte de différents marqueurs, tels que la charge amyloïde, par exemple en utilisant le Pittsburgh compound B (PiB) ou le Florbétapir : il y a dans ce cas une augmentation du signal indiquant la présence de dépôts amyloïdes parenchymateux ou vasculaires dans l'encéphale. D'autres marqueurs TEP peuvent être utilisés pour la pathologie Tau (Flortapir), le métabolisme (DFG) ou la neuroinflammation (TSPO/DPA) (Soria Lopez, 2019).

2.1.4. Marqueurs biologiques

L'essentiel des biomarqueurs validés dans la MA sont des biomarqueurs du LCR. Les patients atteints de MA présentent une diminution de l'A β 42 dans le LCR (Motter et al., 1995), et une augmentation de Tau total (Vandermeeren et al., 1993) et de p-Tau. La combinaison de ces paramètres donne une bonne sensibilité et spécificité pour le diagnostic de MA. (Sunderland et al., 2003 ; Verbeek et al., 2003). Ces modifications ont donné lieu à l'élaboration d'un marqueur du LCR appelé IAT1 (de Riva et al., 2014).

2.1.5. Caractéristiques neuropathologiques

Sur le plan macroscopique, la MA se caractérise notamment par une atrophie corticale (Duyckaerts et al., 2009). Concernant les aspects microscopiques, la MA est caractérisée i) par la présence de plaques séniles : une structure extracellulaire parenchymateuse complexe contenant de la substance amyloïde et dont le composant essentiel est l'A β (Masters et al., 1985) ; ii) par la présence de dégénérescences neurofibrillaires, composées de protéine Tau excessivement et anormalement

phosphorylée (Brion et al., 1985). Ces lésions s'accompagnent classiquement d'une perte neuronale et synaptique, ainsi que d'une composante neuroinflammatoire caractérisée par une activation des cellules microgliales et astrocytaires.

Concernant les dépôts d'A β extracellulaires parenchymateux, tous ne prennent pas la forme typique de la plaque sénile, et tous ne sont pas nécessairement associés à des troubles cognitifs (Arriagada et al., 1992 ; Delaère et al., 1991). Différentes classifications de ces dépôts existent (Thal et al., 2006 ; Duyckaerts et al., 2009), qui les distinguent sur des critères morphologiques, sur leur propriétés tinctoriales vis-à-vis des aux colorants de l'amyloïde telle que le rouge Congo ou la Thioflavine, et sur leur immunoréactivité vis-à-vis de différents anticorps anti-A β . La question demeure de savoir si ces dépôts représentent différents stades de maturité d'une même entité aboutissant à la plaque sénile, ou différentes entités. Par exemple, les dépôts dits « diffus » sont faiblement immunoréactifs car peu riches en A β , ne prennent pas la coloration rouge Congo et ne sont donc pas amyloïdes. Dans certaines structures cérébrales, ils peuvent prendre l'aspect de dépôts en lac ou de dépôts cotonneux (*fleecy amyloid, cotton wool amyloid*). Ce type de dépôts est également présent chez des individus âgés cognitivement normaux. Les dépôts focaux sont de taille plus petite, très immunoréactifs, et présentent un core amyloïde de contour sphérique, entourés ou non d'un halo diffus. Certains dépôts focaux sont associés à la présence de cellules phagocytaires et de neurites anormaux tau positifs. Le dépôt focal amyloïde et entouré d'une couronne neuritique correspond à la plaque sénile (Duyckaerts et al., 2009). Comme le laissent penser leur variabilité morphologique, tinctoriale et immunologique, différents types de dépôts parenchymateux contiennent chacun des mélanges complexes des différents types d'A β (Thal et al., 2006, Rabano et al., 2005),

Les dépôts parenchymateux s'accumulent suivant une séquence stéréotypée dans différentes régions neuroanatomiques, décrits par Dietmar Thal et allant de I à VI. Ils débutent dans le néocortex, puis atteignent l'allocortex, les noyaux gris du diencephale, certains noyaux du tronc cérébral, puis d'autres ainsi que le cervelet (Thal et al., 2002a).

2.2. L'Angiopathie Amyloïde Cérébrale

L'angiopathie amyloïde cérébrale (AAC) correspond à la présence de dépôts amyloïdes dans la paroi des vaisseaux cérébraux : les vaisseaux leptoméningés, les artères de moyen et petit calibre, les artérioles, les capillaires ou les veines présents dans le parenchyme cérébral, généralement au niveau cortical.

Toutes les AAC ne sont pas liées à l'A β . Certaines mutations dans divers peptides ou protéines, tels que les protéines ABri, ADan, la Cystatine C, la Transthyrétine, la protéine Prion, ou la Gelsoline sont à l'origine de formes héréditaires familiales rares d'AAC (Revesz et al., 2009). Quelques formes

sporadiques d'AAC non liées à l'A β incluent les amyloïdoses cérébrales consécutives à une amyloïdose systémique AL ou AA (Schroder et al., 1999).

La forme la plus courante d'AAC est liée à l'A β . Il existe des formes génétiques liées à des mutations du gène de l'APP, qui donnent des A β mutés particulièrement vasculotropiques, telles que les mutations Dutch ou Iowa (Greenberg et al., 2020). Cependant, la très grande majorité des cas d'AAC sporadiques sont liés à un A β sauvage. Le terme d'AAC fera référence à ces dernières formes dans la suite de ce manuscrit.

2.2.1. Épidémiologie

Les trois principaux facteurs de risque d'AAC sont la présence d'une MA, l'âge, et les variations alléliques de l'ApoE (Vinters et al., 1987 ; Greenberg et al., 1998).

A titre d'illustration, sur 1100 autopsies consécutives, l'AAC était présente chez plus de 95% des sujets présentant une MA (Jellinger et al., 2007).

Puisque l'âge et l'allèle $\epsilon 4$ sont également des facteurs de risque de MA, il n'est pas toujours évident de départager dans la littérature l'influence directe de l'âge et de l'ApoE sur la survenue de l'AAC, de celle liée à la MA. En effet, peu de séries décrivent la prévalence de l'AAC en s'affranchissant de la présence d'une MA définie sur le plan neuropathologique. A titre d'illustration, entre 80 et 90 ans, 50-60% des sujets déments et 20-40% des sujets non-déments présentaient une AAC (Keage et al., 2009). Dans la série autopsique de Jellinger, chez les sujets sans MA neuropathologique, l'AAC avait une prévalence de 5% entre 60-69 ans, 20% entre 70-79 ans, 31% entre 80-89 ans, 43% après 89 ans (Jellinger et al., 2007).

Les allèles de l'ApoE sont également associés à l'AAC, mais résultats contradictoires ont été obtenus par différents groupes. Certains groupes ont montré que la présence de l'allèle $\epsilon 4$ de l'ApoE, sans augmenter le nombre de vaisseaux atteints, augmentait la sévérité de l'atteinte vasculaire, qui est corrélée avec la survenue des hémorragies intracérébrales (Alonzo et al., 1998). D'autres groupes ont montré que l'allèle $\epsilon 2$ de l'ApoE était associé à la présence de vasculopathies (Greenberg et al., 1998) et à la survenue d'hémorragies (Nicoll et al., 1997), tandis de l'allèle $\epsilon 4$ serait présent dans des phénotypes non hémorragiques (Charidimou et al., 2015a). Une fois les facteurs confondants contrôlés, les deux allèles seraient associés à l'AAC (Yu et al., 2015)

2.2.2. Clinique

L'AAC est associée à une augmentation du risque d'hémorragie intracérébrale (ICH pour intracérébral hemorrhage). L'AAC est la seconde cause d'AVC hémorragique après l'hypertension artérielle, et son importance semble croissante (Béjot et al., 2013). Elle représente environ 20% des AVC hémorragiques non traumatiques du sujet âgé. Le risque de survenue d'une ICH lobaire est corrélé non pas au nombre mais à la sévérité des dépôts et donc corrélé à la présence de l'allèle $\epsilon 4$ de l'ApoE, même en l'absence de marqueurs neuropathologiques de MA (Alonzo et al., 1998 ; Charidimou et al., 2015 ; Charidimou et al., 2017). La topographie de ces hématomes lobaires correspond aux zones corticales privilégiées par les dépôts vasculaires, préférentiellement en occipital (Rosand et al., 2005). Le risque de récurrence des ICH est d'environ 10% par an (Biffi et al., 2010)

L'AAC a également été associé à une augmentation du risque d'AVC ischémique. Dans une série autopsique, l'AAC serait présente dans 13% des cas d'AVC ischémique, contre 3% des contrôles (Cadavid et al., 2000). Bien que l'AAC soit rarement présente dans la substance blanche, il y a une corrélation positive entre l'importance des dépôts et la perte de la substance blanche (Tian et al., 2004).

L'AAC est un facteur de risque de déclin cognitif et de démence (Greenberg et al., 2014). La contribution de l'AAC est difficile à distinguer de celle des autres facteurs de risques fréquents chez le sujet âgé, tels que la MA, ou les facteurs de risques cardiovasculaires. Dans l'étude en population générale MRC Cognitive Function and Aging Study, la présence d'AAC augmentait le risque de démence d'un Odds Ratio de 9.3, en contrôlant sur l'âge, et sur les autres marqueurs neuropathologiques de démence, notamment la présence de plaques séniles et de DNF (Neuropathology et al., 2001, Greenberg et al., 2004). Le déclin cognitif associé à l'AAC serait multifactoriel, dû à la composante ischémique et microhémorragique (Charidimou et al., 2017)

Les auras amyloïdes (amyloid spells), ou épisodes neurologiques focaux transitoires (transient focal neurological episodes ou TFNE) sont des épisodes récurrents, transitoires et stéréotypés qui se présentent comme un épisode ischémique transitoire, des convulsions ou une aura migraineuse. Elles seraient associées à la présence de cSS et à un risque d'ICH (Vales Monteiro et al., 2019)

Les manifestations inflammatoires de l'AAC (AAC-ri) se présentent comme une forme rare de syndrome méningoencéphalitique spontané, se présentant par un déclin cognitif subaigu ou rapidement progressif, accompagné de céphalées, de convulsions, ou de déficits focaux (Eng et al., 2004). Son pronostic sombre peut être amélioré par corticothérapie ou cyclophosphamide (Charidimou et al., 2017, Auriel et al., 2016). A l'imagerie, elle se caractérise par des hyperintensités asymétriques sur séquences T2* ou FLAIR, et une atteinte des fibres en U (Auriel et al., 2016 ; Eng et

al., 2004). Deux sous-types histologiques ont été définis, l'un dénommé ABRA pour A β -related angiitis correspondant à une granulomatose intramurale, l'autre dénommé AAC-ri proprement dite pour AAC-related inflammation, correspondant à des infiltrats périvasculaires à prédominance lymphocytaire (Salvarani et al., 2013). Sur le plan clinique et radiologique cependant, il semble n'exister que peu de différences (Chu et al., 2016).

2.2.3. Marqueurs radiologiques

Les marqueurs radiologiques d'AAC visibles à l'IRM sont présentés en **Figure 3**. Ils incluent : les marqueurs hémorragiques (hématome lobaire, microsaignements strictement lobaires, sidérose corticale superficielle (cSS)), des marqueurs plutôt ischémiques (hypersignaux de la substance blanche, dilatation des espaces périvasculaires, microinfarct corticaux), et éventuellement des marqueurs inflammatoires (hyperintensités asymétriques sur séquences T2* ou FLAIR, atteinte des fibres en U (Boulouis et al., 2017 ; Auriel et al., 2016 ; Eng et al., 2004)).

La présence de microsaignements multiples strictement lobaires ou de cSS sur séquence T2*/SWI font désormais partie des critères dits « de Boston » pour le diagnostic de l'AAC (Knudsen et al., 2001, Linn et al., 2010, Charidimou et al., 2019). Même en l'absence de séquelles d'ICH, la présence de microsaignements multiples strictement lobaires est très spécifique de l'AAC en contexte hospitalier (Martinez-Ramirez et al., 2015). La cSS est associée à la survenue d'auras amyloïdes (Greenberg et al., 1993 ; Charidimou et al., 2012 ; Raposo et al., 2011) et au risque de survenue d'un ICH (Linn et al., 2010).

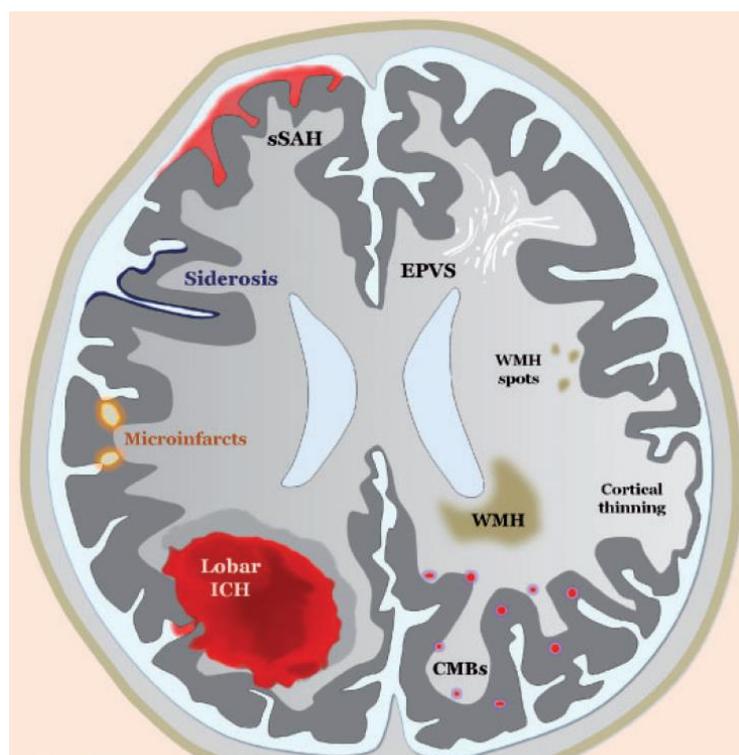


Figure 3. Représentation schématique du spectre des manifestations radiologiques hémorragiques et ischémiques de l'AAC. D'après Charidimou et al., 2017.

2.2.4. Marqueurs biologiques non sérologiques

Concernant les marqueurs du LCR, et de façon similaire à la MA, les concentrations d'A β 42 dans le LCR sont diminuées chez les patients atteints d'AAC. Les concentrations d'A β 40 le sont également, comparativement aux sujets contrôle et aux sujets MA. Les concentrations de protéine Tau totale et de p-Tau sont plus élevées dans l'AAC que chez les sujets contrôles, mais moins que chez les sujets MA (Verbeek et al., 2009 ; Renard et al., 2012).

Concernant les marqueurs plasmatiques, des résultats contradictoires ont été obtenus par différentes équipes. Certains auteurs n'ont pas trouvé de différence concernant les concentrations d'A β plasmatique entre patients présentant une AAC-he et ceux présentant une hémorragie hypertensive (Greenberg et al., 2000). En revanche, une autre équipe a trouvé une augmentation de l'A β ₁₋₄₂ et de l'A β ₁₋₄₀ dans les plasmas des sujets avec AAC-he probable comparés à ceux de sujets sains (Hernandez-Guillamon et al., 2012).

2.2.5. Caractéristiques neuropathologiques de l'AAC

L'AAC se caractérise par la présence d'A β vasculaire dans l'encéphale. Ces dépôts sont extracellulaires. Ils impliquent systématiquement la media, entourant les cellules musculaires lisses, puis l'adventice, et enfin, toute l'épaisseur de la paroi vasculaire. Aux stades de sévérité avancés, on observe une perte des cellules musculaires lisses, tandis que l'endothélium est toujours préservé. L'atteinte vasculaire aboutit à différents types de vasculopathies : nécrose fibrinoïde, aspect en « double tonneau », microanévrisme, occlusion du vaisseau, hémorragie... (Attems et al., 2005a ; Attems et al., 2005b) Cette sévérité de l'atteinte du vaisseau correspond à la gradation de sévérité proposée par Vonsattel (Vonsattel et al., 1991)

Sur le plan topographique, l'atteinte vasculaire est distribuée très irrégulièrement, et souvent qualifiée de « patchy » dans la littérature (Vinters et al., 1987). Tout comme pour les dépôts parenchymateux, l'évolution des dépôts vasculaires dans la MA suit une séquence stéréotypée : les études concordent en général pour dire que le lobe occipital est le plus fréquemment touché, suivi par les lobes frontaux, temporaux, et pariétaux. Cela a conduit Olichney de proposer son système de sévérité (Olichney et al., 1997). Les noyaux gris centraux, le thalamus et le cervelet sont plus rarement affectés, tandis que la substance blanche et le tronc cérébral sont en général épargnés (Thal et al., 2002, Thal et al., 2008). Pour une zone donnée, l'atteinte vasculaire suit une distribution centripète : les vaisseaux les plus fréquemment touchés sont les artères leptoméningées, suivies par les artères puis par capillaires corticaux, tandis que les vaisseaux plus profonds de la substance blanche sont rarement touchés (Attems et al., 2005b).

2.3. Angiopathie amyloïde cérébrale et maladie d'Alzheimer

En raison de leur association fréquente, de facteurs de risques communs, et du fait qu'elles impliquent des peptides similaires, il est parfois difficile de distinguer dans la littérature ce qui est lié à l'AAC *per se*, de la composante parenchymateuse. Cependant, il est de plus en plus admis que MA et AAC sont des pathologies relativement indépendantes (Greenberg et al., 2020).

Au moins trois hypothèses ont été évoquées pour expliquer la formation des dépôts cérébrovasculaires d'A β (Kumar-Singh et al., 2008).

L'hypothèse systémique suppose une origine périphérique à l'A β cérébrovasculaire. Le fait que les dépôts débutent du côté abluminal de la membrane basale suggère plutôt une origine centrale (Yamaguchi et al., 1992). De même, même s'il existe un influx d'A β périphérique médié par le transporteur RAGE endothélial, il est admis que la périphérie est au final un compartiment d'efflux de l'A β de provenance centrale (Deane et al., 2003). De plus, de hauts niveaux d'A β périphériques ne semblent pas favoriser de dépôts centraux chez la souris (Fukuchi et al., 1996).

L'hypothèse vasculaire suppose une origine locale de l'A β cérébrovasculaire. En effet, plusieurs types cellulaires vasculaires expriment l'APP : les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales, et les péricytes (Kawai et al., 1993 ; Natté et al., 1999b ; Wisniewski et al., 1994). De surcroît, la stimulation de cellules musculaires lisses par de l'A β entraînerait une surproduction d'A β (Davis-Salinas et al., 1995 ; Verbeek et al., 1997).

L'hypothèse du drainage suppose que l'A β vasculaire prend son origine par la production neuronale d'A β et atteindrait le vaisseau comme voie d'efflux de l'A β (Weller et al., 1998). Des arguments importants vont dans le sens de cette hypothèse. Premièrement, on sait que l'A β est capable de diffuser loin de son site de production (Meyer-Luehmann et al., 2003). Deuxièmement, le croisement des souris APP KO et APP23 montre que la production cérébrale d'A β est suffisante pour induire des dépôts parenchymateux et vasculaires (Calhoun et al., 1999). Si l'hypothèse du drainage est correcte, elle ne signifie pas pour autant que les dépôts vasculaires sont la forme terminale des dépôts parenchymateux en voie de clairance.

En effet, il existe une différence de composition des dépôts parenchymateux et vasculaires. La quantité d'A β _{x-40} extraite du cerveau de sujets atteints de MA, mais pas la quantité d'A β _{x-42}, était corrélée à l'importance de l'AAC chez ces sujets (Gravina et al., 1995). En effet, les dépôts parenchymateux, en tout cas du core de plaques séniles, semblent composés principalement d'A β _{x-42}, et dans une moindre mesure, d'A β _{x-40}, contrairement aux dépôts vasculaires qui ne présenteraient que très peu d'A β _{x-42}, et majoritairement d'A β _{x-40} (Miller et al., 1993), ce qui a été confirmé par spectrométrie de masse après désorption par laser (Kakuda et al., 2017). De surcroît,

les dépôts parenchymateux présenteraient une grande diversité aminoterminal, signe d'une digestion enzymatique, tandis que cette diversité est plus faible pour les dépôts vasculaires (Miller et al., 1993 ; Zampar et al., 2020).

Que l'A β 40 et l'A β 42 caractérisent principalement les dépôts vasculaires et parenchymateux, respectivement, a toutefois été contesté par certains auteurs. Certaines études vont dans le sens d'une richesse des dépôts parenchymateux en A β 40, en particulier des dépôts dits « matures », le core des plaques séniles (Michno et al., 2020). D'autres auteurs ont souligné la richesse en A β 42 des dépôts vasculaires (Roher et al., 1993). Dans tous les cas, la variabilité du contenu des dépôts parenchymateux et vasculaires, et le fait que certains dépôts parenchymateux puissent en réalité être vasculocentrés, rendent compliquée la mise en œuvre pratique de cette distinction. Plusieurs auteurs avancent que la composition de certains dépôts parenchymateux est très proche de dépôts vasculaires (Rabano et al., 2005), mais il n'est pas exclu que ces dépôts ne correspondent à de l'angiopathie dyshorique centrée sur un dépôt vasculaire.

En outre, depuis les années 2000, la littérature distingue l'AAC capillaire de l'AAC artérielle. Ces deux types de dépôts ne montrent qu'une faible corrélation (Attems et al., 2004a). Contrairement aux dépôts artériels, les dépôts capillaires semblent en continuité physique avec les dépôts denses parenchymateux (Preston et al., 2003), seraient composés majoritairement d'A β x-42, et leur importance serait corrélée avec celle des marqueurs neuropathologiques de la MA, mais pas avec l'AAC artérielle (Attems et al., 2004b). L'AAC capillaire est associée à l'ApoE4 (Thal et al., 2008), mais pas à l'ApoE2 (Yu et al., 2015). Les dépôts capillaires seraient associés à des modifications de l'expression ou à des polymorphismes de gènes de transporteurs de la BHE impliqués dans l'efflux d'A β , tels de la Pgp (Carrano et al., 2014) ou LRPI (Thal et al., 2008).

2.4. Facteurs influençant l'accumulation pathologique d'A β dans l'encéphale

Quelle que soit leur relation, la MA et l'AAC sont deux pathologies liées à une accumulation intracérébrale d'A β . Cette accumulation pathologique doit être liée à un déséquilibre entre la synthèse des formes pathogènes d'A β et leur élimination. De façon simplifiée, on considère désormais que les formes génétique de MA et d'AAC sont essentiellement dues à un excès de production, tandis que les formes sporadiques de MA et d'AAC seraient liées à un défaut de clairance de l'A β .

Facteurs influençant la synthèse de l'A β et son agrégation

In vitro, une plus forte concentration d'A β favorise son agrégation. *In vivo*, dans les duplications du gène de l'APP, qu'il s'agisse de la trisomie 21 ou de duplications du gène, la synthèse d'A β est augmentée et ces patients présentent une amyloïdose cérébrale précoce. Les isoformes d'APP possédant un domaine KPI, dont l'expression est augmentée dans le cerveau avec l'âge et en conditions pathologiques (Moir et al., 1998), orienteraient vers la voie amyloïdogénique plutôt que vers l'action des α -secrétases et augmenteraient ainsi la quantité d'A β produit (Ho et al., 1996). De même, les mutations de l'APP hors de la séquence codant l'A β peuvent modifier le catabolisme de l'A β . Par exemple, les mutations de l'APP autour du site de clivage des secrétases peuvent augmenter (comme la mutation Swedish Lys670Met Asn671Leu) ou diminuer (A673T) la quantité d'A β sauvage produit, sans modifier le ratio A β 42:A β 40, ce qui confère une susceptibilité dans le premier cas, une protection dans le second aux pathologies à dépôts d'A β (Hunter et al., 2018). C'est également le cas des mutations de la PSEN1, généralement après le codon 200 (Greenberg et al., 2020).

Le type d'A β produit influence également son agrégabilité : si l'A β ₁₋₄₂ est un sous-produit mineur du catabolisme de l'APP, représentant environ 10% de l'A β produit, contre plus de 70% pour l'A β ₁₋₄₀, il possède en revanche une propension beaucoup plus importante à s'agréger. Les mutations de l'APP au sein de la séquence codant l'A β sont à l'origine de différents A β mutés, qui possèdent différentes propensions à l'agrégation. En outre, des modifications post-traductionnelles de l'A β peuvent également influencer son agrégabilité (Roher et al., 2017). La présence et l'abondance de certains cofacteurs peuvent également faciliter ou non l'agrégation de l'A β . C'est le cas de certains cations divalents tels que Zn²⁺ ou Cu²⁺ (Matheou et al., 2016), de l'ApoE (Baum et al., 2000), ou de la présence de cholestérol et de certains gangliosides de membrane (Matsusaki et al., 2014).

Facteurs favorisant l'accumulation vasculaire d'A β

Comme nous l'avons déjà présenté, il est admis que l'A β 40 a plutôt un tropisme vasculaire, tandis que l'A β 42 a plutôt un tropisme parenchymateux. Ainsi, le ratio A β 40:A β 42 est plus élevé dans les dépôts vasculaires artériels que dans les plaques séniles, ce qui n'est cependant pas le cas si l'on considère les dépôts capillaires, et certains dépôts parenchymateux hors des plaques séniles (Roher et al., 1993, Attems et al., 2004). Certaines mutations de l'APP ou de la PSEN1 vont favoriser le clivage par les γ -secrétases sur certains sites ϵ , et vont donc favoriser la production d'A β ₁₋₄₂ (London (Val717Ile) ou les mutations de la PSEN1 avant le codon 200), ou inversement favoriser la production d'A β ₁₋₄₀ (Dutch (Glu693Gln), Italian (Glu693Lys), Iowa (Asp693Asn), ou Piedmont (Leu705Val)).

Les mutations favorisant une élévation du ratio A β 42:A β 40 vont plutôt donner des phénotypes parenchymateux type MA, tandis que celles favorisant une diminution du ratio A β 42:A β 40 vont plutôt donner des phénotypes vasculaires (Hunter et al., 2018 ; Greenberg et al., 2020).

Les peptides A β tronqués à leurs extrémités carboxyterminale, aminoterninale, ou ayant subi des modifications post-traductionnelles semblent posséder un tropisme vasculaire variable (Kakuda et al., 2017). De façon générale, les peptides A β dont la taille est inférieure à l'A β 42 ont un tropisme vasculaire, tandis que l'A β 42 et l'A β 43 ont plutôt un tropisme parenchymateux (Greenberg et al., 2020). Certains A β mutés possèdent un tropisme vasculaire. En particulier, les mutations Arctic et Flemish sont caractérisées par des dépôts vasculaires, mais aussi parenchymateux d'A β 40, sans augmentation de la synthèse globale d'A β (Greenberg et al., 2020).

Il n'existe pas de preuve directe chez l'homme qu'un défaut de clairance de l'A β favorise la survenue de dépôts vasculaires plutôt que parenchymateux. Dans des modèles murins cependant, il a été montré un défaut d'efflux pour l'A β 40 porteur de la mutation Dutch, comparativement à l'A β 40 sauvage, potentiellement à l'origine de son accumulation vasculaire (Agyare et al., 2012).

3. Anticorps anti-A β

Il existe des anticorps réactifs vis-à-vis de l'A β humain et/ou murin (ci-après « anticorps anti-A β »). Différents anticorps peuvent lier ou non différents peptides A β dans différents états d'agrégation, sous forme soluble ou de dépôts cérébraux. Dès les premiers articles sur les anticorps anti-A β , Gaskin et al., ont montré que 4 lignées de cellules B immortalisées provenant d'une patiente atteinte de MA produisaient des IgM capables de se fixer aux plaques séniles et aux dépôts cérébrovasculaires sur des coupes de cerveaux de sujets MA (Gaskin et al., 1993). La plupart des autres lignées établies à partir de sujets MA ou âgés sains, capable de lier l'A β en ELISA n'ont cependant pas montré de réactivité vis-à-vis des plaques ou des dépôts vasculaires (Xu et al., 1997).

Certains arguments expérimentaux suggèrent que la réactivité fibrillaire dépend de l'épitope, et que seuls les anticorps réactifs vis-à-vis de l'extrémité aminotermine du peptide seraient susceptibles de se fixer sur les dépôts fibrillaires avec une affinité suffisante (Miller et al., 2003 ; Bard et al., 2004)

On peut d'ailleurs mettre en évidence la présence d'immunoglobulines dans les dépôts cérébraux. Différentes études immuno-histologiques ont en outre montré que des immunoglobulines sont fixées *in situ* sur certaines plaques séniles (Nath et al., 2003 ; Kellner et al., 2009). La majorité des plaques neuritiques présentes chez les sujets MA et les sujets contrôles avec plaques ont présenté une décoration par les IgG. De surcroît, les sujets avec la plus faible charge amyloïde intracérébrale montraient la plus forte proportion de plaques décorées par les IgG, et une augmentation du nombre de cellules CD68+, interprétées comme correspondant à de la microglie activée. (Kellner et al., 2009). Concernant les dépôts vasculaires aussi bien artériels que capillaires, ils contiennent également des IgG. La charge de ces dépôts en IgG est d'ailleurs corrélée avec l'infiltration de cellules T, chez les sujets non-immunisés aussi bien qu'immunisés contre A β (Zotova et al., 2013).

3.1. Mécanismes d'action des anticorps anti-A β

Les anticorps anti-A β pourraient moduler l'accumulation intracérébrale de l'A β , par différents mécanismes d'action partiellement élucidés. Ces différents mécanismes et propriétés ne sont pas mutuellement exclusifs pour un anticorps donné. Ils ne sont pas non plus nécessairement tous mis en jeu pour n'importe quel anticorps. En effet, ces mécanismes de modulation de l'accumulation de l'A β doivent dépendre des propriétés de l'anticorps anti-A β considéré : de sa réactivité vis-à-vis de telle ou telle espèce d'A β , par exemple sa propension à lier l'A β ₁₋₄₀ ou l'A β ₁₋₄₂, ou bien à lier les formes solubles ou les fibrilles ; de son affinité vis-à-vis de ces différentes espèces ; de son isotype, pour activer telle ou telle propriété effectrice ; du compartiment dans lequel il se trouve, sanguin ou central.

Bien sûr, la preuve de concept de ces mécanismes a souvent été mise en évidence expérimentalement au moyen d'anticorps monoclonaux anti-A β , ou parfois, en utilisant des préparations d'immunoglobulines par voie intra-veineuse (IVIg), suggérant alors que de tels mécanismes puissent être à l'œuvre spontanément chez des sujets avec ou sans pathologie amyloïde.

3.1.1. Diminution de la synthèse d'A β

Certains anticorps reconnaissant les parties amino- et carboxy-terminales de l'A β pourraient diminuer ou moduler l'accès des secrétases aux sites de clivage de l'APP (Deng et al., 2012). Ainsi, ces anticorps que l'on devrait plutôt considérer comme des anticorps anti-APP, et qui d'ailleurs ne lient pas nécessairement l'A β soluble, pourrait modifier la quantité et le type d'A β produit (par exemple A β ₁₋₄₀ plutôt qu'A β ₁₋₄₂) et la quantité d'A β produit (Thomas et al., 2011 ; Thomas et al., 2013). De surcroît, ces anticorps anti-APP auraient des effets bénéfiques sur la cognition dans des modèles de souris transgéniques indépendamment de leur effet sur la modulation de la synthèse de l'A β (Rakover et al., 2007)

3.1.2. Neutralisation des formes solubles d'A β et inhibition de l'agrégation

Un autre mécanisme d'action des anticorps anti-A β serait de limiter la synthèse de fibrilles amyloïdes, par capture des formes solubles d'A β , ou bien par la préservation d'espèces d'A β dans des conformations non-amyloïdogéniques. En effet, des anticorps monoclonaux anti-A β sont capables de d'inhiber l'agrégation de l'A β *in vitro* (Solomon et al., 1996). Il a été montré *in vitro* que les IVIg inhibent la formation d'oligomères solubles (Klaver et al., 2010) et la fibrilloformation (Cattepoel et al., 2013 ; Valls-Comamala et al., 2017). L'inhibition de la fibrilloformation a pu être reproduite avec des IgG anti-A β purifiées à partir de ces préparations, et non avec les IgG non retenues par le processus de purification (Du et al., 2003).

La liaison d'un anticorps à l'A β dans le compartiment central peut avoir plusieurs effets. D'une part, un effet de déplacement des équilibres dynamiques entre les monomères, les différents oligomères et les formes fibrillaires, éventuellement en défaveur de la formation d'espèces insolubles ou neurotoxiques. D'autre part, un effet neuroprotecteur par neutralisation de formes toxiques solubles (oligomères, protofibrilles) ou insolubles (fibrilles amyloïdes). Il semble en effet que les formes agrégées de l'A β , et en particulier les oligomères solubles, soient les plus neurotoxiques (Hong et al., 2018).

Les résultats de nombreux groupes concordent pour dire que les IVIg réduisent la neurotoxicité du peptide A β , ou bien sur lignée cellulaires (Widiapradja et al., 2012 ; Du et al., 2003 ; Szabo et al., 2008), ou bien sur cultures primaires de neurones (Magga et al., 2010). Outre la neutralisation des

espèces neurotoxiques, les IVIg diminueraient la neurotoxicité directe du peptide A β en inhibant les voies de mort cellulaire par apoptose caspase-3 dépendante, et augmenteraient la synthèse de la protéine anti-apoptotique bcl2 (Widiapradja et al., 2012). Cet effet neuroprotecteur des IVIg sur culture de lignée de neurones a pu être reproduit avec des IgG anti-A β purifiées à partir de ces préparations, et non avec les IgG non retenues par le processus de purification (Du et al., 2003). Sur le plan électrophysiologique, les IVIg restauraient de façon dose dépendante l'inhibition de la LTP médiée par l'A β (Cattepoel et al., 2013).

3.1.3. Désagrégation de fibrilles préformées

D'autres anticorps monoclonaux anti-A β semblent capables de désagréger des fibrilles amyloïdes préformées et ainsi de resolubiliser l'A β *in vitro* (Solomon et al., 1997 ; Istrin et al., 2006). Cette propriété semble dépendante de l'épitope ciblé par ces anticorps, en l'occurrence la partie N-terminale de l'A β . Cette resolubilisation conduit à une diminution de la neurotoxicité de l'A β fibrillaire (Solomon et al., 1997).

Il a également été montré *in vitro* que les IVIg sont capables de dissocier les fibrilles préformées (Cattepoel et al., 2013) et que cela est dû à la fraction des Ig réactives vis-à-vis de l'A β (Du et al., 2003). En revanche, l'incubation d'IVIg sur coupes de cerveaux de souris transgénique ne permet pas de mettre en évidence une diminution des plaques ou une augmentation de la solubilisation de l'A β (Magga et al., 2010).

3.1.4. Activation de la phagocytose microgliale

Plusieurs équipes se sont intéressées à l'activation microgliale par les anticorps anti-A β , avec des résultats relativement contradictoires : les anticorps anti-A β faciliteraient la phagocytose de l'A β par les cellules gliales, en particulier les cellules microgliales, par opsonisation des particules solubles ou non d'A β , ce qui aurait un effet bénéfique. Toutefois, l'activation des cellules microgliales ayant phagocyté l'A β aurait quant à elle un effet potentiellement délétère.

Dans des cultures primaires de cellules microgliales murines, des anticorps monoclonaux anti-A β (Takata et al., 2007), les IVIg (Cattepoel et al., 2013), et anticorps anti-A β purifiés à partir d'IVIg (Gold et al., 2013) sont capables d'opsoniser, c'est-à-dire de faciliter la phagocytose de l'A β par les cellules gliales. Ce phénomène a pu également être mis en évidence *ex vivo*, en incubant des cellules gliales avec ou sans IVIg sur des coupes de cerveaux de souris transgéniques : la présence d'IVIg majorait la réduction des plaques induite par les cellules microgliales, mais pas celle induite par les astrocytes. Après administration périphérique d'IVIg dans un modèle de souris transgénique, les

mêmes auteurs ont montré une co-localisation des IgG humaines et des dépôts parenchymateux d'A β , structures entourées par de la microglie activée (Maggia et al., 2010).

La phagocytose de l'A β par les cellules microgliales induit la sécrétion de cytokines proinflammatoires telles que le TNF-alpha et l'IL-6 (Gold et al., 2013). Cette activation microgliale conduisant à un microenvironnement proinflammatoire a été confirmée par d'autres auteurs (Morkuniene et al., 2013), y compris sur de la microglie humaine (Lue et al., 2002).

Le caractère bénéfique ou délétère de cette inflammation microgliale est débattu. Les surnageant de cultures primaires de microglies traitées par A β et anticorps anti-A β ont plutôt montré un caractère neuroprotecteur (Gold et al., 2013). Cependant, dans des co-cultures primaires de neurones et de cellules microgliales murines, la présence d'anticorps monoclonal contre les polymères d'A β potentialise l'effet neurotoxique de l'A β , de façon Fc-dépendant et microgliale dépendante. (Morkuniene et al., 2013). De façon similaire, dans des cultures primaires d'hippocampes de rats, la présence d'anticorps monoclonal contre les polymères d'A β potentialise l'effet neurotoxique de l'A β (Nath et al., 2003). Cependant, toujours dans des cultures primaires d'hippocampes, des IgG anti-A β naturelles de sujets sains ont montré un effet neuroprotecteur (Britschgi et al., 2009).

3.1.4. Favorisation de l'efflux de l'A β médié par les anticorps

Les anticorps anti-A β périphériques semblent pouvoir pénétrer dans l'encéphale par diffusion passive (Banks et al., 2002). L'influx actif dans l'encéphale a été montré pour certaines IgG (Zlokovic et al., 1990), mais pas directement pour les IgG anti-A β . Il n'y a toutefois pas de raison a priori pour que ce passage soit dépendant de la spécificité antigénique de l'anticorps. Il est admis que les anticorps qui pénètrent dans l'encéphale le font sous forme libre. La formation de complexes A β -anticorps en périphérie ne modifie pas l'influx d'A β et il ne semble pas que RAGE, qui joue un rôle dans l'influx d'A β libre, joue un rôle dans l'influx de ces complexes (Deane et al., 2003 ; Deane et al., 2005).

En revanche, des arguments expérimentaux suggèrent que LRP-1, mais surtout le FcRn exprimé sur le pôle abluminale des cellules endothéliales joue un rôle important dans l'efflux des complexes immuns IgG monoclonale-A β , en particulier dans un contexte de vieillissement physiologique ou pathologique (Deane 2005).

3.1.5. Neutralisation et Peripheral sink

Il est admis que seule une très faible proportion des anticorps administré par voie périphérique diffuse dans le compartiment central, de l'ordre de 0.1% ou moins. Si les principaux mécanismes d'action des anticorps anti-A β prennent place au niveau central, c'est un argument fort à l'encontre

des immunothérapies passives administrées par voie périphériques : la biodisponibilité au site d'action serait alors très faible.

En 2001, de Mattos et al., ont apporté la preuve de concept d'un mécanisme d'action baptisé *peripheral sink*, ou « siphon périphérique », au cours duquel l'activité des anticorps anti-A β est essentiellement périphérique : la formation de complexes antigène-anticorps dans le sang favoriserait un déplacement d'équilibre de l'A β libre du milieu central et vers la circulation sanguine. L'anticorps monoclonal anti-A β m266, l'équivalent murin du solanezumab, liant essentiellement l'A β soluble. Son administration périphérique chez la souris PDAPP multipliait par 1000 les concentrations d'A β plasmatique, et diminuait la charge d'A β cérébral sans que cet anticorps ne se fixe aux dépôts encéphaliques (de Mattos et al., 2001). Ce mécanisme pourrait également être à l'œuvre avec des anticorps naturels : chez les souris transgéniques traitées par IVIg par voie périphérique, l'A β plasmatique est augmenté, tandis que l'A β soluble dans l'hippocampe, le cortex, et le LCR est diminué. Des arguments suggèrent que ce renfort de l'efflux d'A β serait médié par LRPI, notamment au niveau du plexus choroïde (Gu et al., 2014).

On peut toutefois s'interroger sur le rôle de la fraction d'IVIg atteignant le compartiment central. Chez la souris sauvage ou transgénique, si une faible proportion des IVIg administrées semble atteindre le compartiment central, elle le fait avec une très faible constante d'élimination et donc une accumulation dans le temps. Ce passage se fait a priori sans altération de la BHE, via un mécanisme de transport saturable, de la même façon chez les animaux sauvages ou transgéniques (St-Amour et al., 2013 ; St Amour et al., 2014). Il semble que la biodisponibilité des IVIg au niveau central soit supérieur en IV qu'en IP, et que ce passage pourrait principalement avoir lieu au niveau du plexus choroïde plutôt que via la BHE (Magga et al., 2010). Dans un modèle murin de MA, des IgG humaines colocalisées au niveau des zone A β -reactives du parenchyme étaient présentes chez les souris traitées par IVIg parentérales (Magga et al., 2010). Il semble donc qu'en première analyse, tous les mécanismes d'actions, y compris centraux, envisagés plus haut pour les anticorps anti-A β monoclonaux puissent être envisagés également pour les IVIg.

3.1.6. Hydrolyse de l'A β

Certains anticorps anti-A β catalytiques seraient capables de cliver l'A β soluble. C'est le cas d'IgM monoclonales issues de patients présentant un lymphome lymphoplasmocytaire, capables de cliver l'A β ₁₋₄₀ entre les acides-aminés 28 et 29 (site majeur) et 16 et 17 (site mineur), et de relarguer ces fragments. Ces anticorps ont un effet neuroprotecteur sur des lignées de neurones incubées avec de l'A β ₄₀. Cet effet pourrait avoir lieu en théorie aussi bien en périphérie qu'au niveau central. De façon intéressante, certains auteurs ont montré que des IgM anti-A β administrées par voie IV

pouvaient se retrouver au niveau central (Banks et al., 2007). Les préparations d'IVIg pures, contenant essentiellement des IgG, n'ont pas montré d'activité catalytique vis-à-vis de l'A β . Cependant, les IgG anti-A β extraites d'IVIg ont quant à elles montré une propension à hydrolyser l'A β (Paul et al., 2010).

L'étude des propriétés biologiques des anticorps anti-A β a conduit à plusieurs voies de recherche. D'une part, des études corrélatives entre phénotypes sérologiques et phénotypes cliniques. Par exemple, la recherche de différences sérologiques entre sujets sains et sujets atteints de MA, qui pourraient soit expliquer la survenue ou non de la maladie par la présence ou l'absence d'espèces anti-A β protectrices ou pathogènes, soit signaler un processus pathologique actif *via* l'apparition ou l'augmentation de certains anticorps liés à une réaction adaptative. D'autre part, des études interventionnelles, lors desquelles l'induction d'une réponse immunitaire anti-A β , ou l'administration d'anticorps anti-A β , pourrait moduler le processus pathologique.

3.2. Etudes concernant les anticorps anti-A β « naturels »

3.2.1. Anticorps naturels

Chez tous les individus, il existe une immunité humorale innée qui conduit à la production spontanée d'un ensemble d'anticorps dits "naturels", indépendamment des anticorps induits par les stimulations aléatoires par tel ou tel microorganisme pathogène. Ces anticorps sont présents en dehors de toute stimulation antigénique apparente vis-à-vis de l'antigène d'intérêt, en général un antigène provenant d'un agent infectieux. Dans la pratique, ces anticorps « spontanés » pourraient être le résultat d'un contact infraclinique avec le pathogène, d'une interaction avec la flore ou d'autres micro-organismes non-pathogènes de l'environnement, d'une exposition à des antigènes environnementaux tels que des allergènes, ou bien d'un processus actif vis-à-vis d'auto-antigènes.

Un élégant modèle d'étude des anticorps naturels a été proposé par Wostmann en 1970 (Wostmann et al., 1970). Ce modèle de souris « antigen-free » utilise des souris axéniques nourries uniquement avec un mélange de composés de bas poids moléculaires pour éviter la stimulation par des antigènes alimentaires. Ces souris antigen-free possèdent moins de cellules produisant des IgG ou des IgA, mais tout autant de cellules produisant des IgM, avec un répertoire sensiblement identique à celui des souris élevées dans des conditions conventionnelles (Hooijkaas et al., 1984 ; Haury et al., 1997), et des capacités de commutation de classe et de maturation d'affinité après stimulation antigénique similaires aux souris conventionnelles (Taniguchi et al., 1978)

On considère généralement que les anticorps naturels sont des IgM, qui seraient produites chez l'homme par un lignage de cellules B indépendant des lymphocytes B conventionnels équivalent aux lymphocytes B1 CD5+ péritonéaux murins (Montecino-Rodriguez et al., 2012), issues de gènes d'immunoglobulines non mutés (Baccala et al., 1989), et produites de façon T-indépendante (Malanchère et al., 1995). Toutefois ce paradigme ne semble pas rendre compte de toute la diversité des anticorps naturels (Avrameas et al., 2013) : en effet, il existe également un répertoire naturel d'IgG (Malanchère et al., 1995, Lacroix-Desmazes et al., 1995, Nagele et al., 2013) et d'IgA (Panda et al., 2015), par différentes sous-populations de lymphocytes B (Zhou et al., 2004), et dont les régions variables des gènes d'immunoglobulines présentent des mutations somatiques (Casali et al., 1996).

Du point de vue de leur spécificité antigénique, on considère que les anticorps naturels sont dans une large mesure polyréactifs, c'est-à-dire qu'ils peuvent lier une remarquable diversité d'antigènes sans communauté structurale ou fonctionnelle apparente. Les anticorps naturels sont également autoréactifs (Avrameas et al., 2013). Le répertoire des anticorps naturels serait relativement stable et sélectionné vis-à-vis d'un ensemble relativement restreint d'auto-antigènes au cours de la vie et entre les individus, tandis qu'ils seraient très variables au cours des âges et entre individus vis-à-vis d'antigènes exogènes (Mouthon et al., 1995a ; Mouthon et al., 1995b ; Lacroix-Desmazes et al., 1995). Leur apparition au cours de l'évolution chez les organismes triploblastiques aurait avant tout

permis l'élimination des cellules sénescents et des corps apoptotiques, ou des produits du soi altéré (Lutz et al., 2007). Les fonctions des anticorps naturels seraient cependant plus larges : ils protégeraient des agents infectieux, en particulier chez le nouveau-né, mais interviendraient également comme facteur protecteur de nombreux processus pathologiques de l'adulte et du sujet âgé, tels que la tumorigenèse, l'athérosclérose, ou les maladies neurodégénératives (Rothstein et al., 2016).

A partir du milieu des années 1980s, les travaux de plusieurs équipes ont montré la présence, dans le sang de sujets atteints de MA mais aussi dans le sang de sujets sains, des cellules B productrices d'anticorps liant les plaques séniles (Simpson et al., 1986) et les dépôts vasculaires d'A β (Gaskin et al., 1993). En particulier, Gaskin et al., isolent 4 lignées de cellules B immortalisées provenant d'une patiente atteinte de MA, produisant des IgM capable de lier les plaques séniles et l'AAC. Le séquençage du cDNA de 3 régions variables de ces anticorps indiquera qu'ils dérivent tous d'une même cellule B ayant subi des hypermutations somatiques, et possédaient tous une affinité relativement haute vis-à-vis de l'A β (Fang et al., 1995). La plupart des autres lignées établies à partir de sujets MA ou âgés sains capable de lier l'A β en ELISA n'ont pas montré de réactivité vis-à-vis des plaques ou des dépôts vasculaires. A la différence des anticorps liant les dépôts tissulaires, la plupart de ces anticorps étaient en outre polyréactifs vis-à-vis d'autoantigènes. Le séquence des régions variables et leur affinité n'ont pas été déterminées (Xu et al., 1997).

3.2.2 Caractéristiques des anticorps anti-A β

Caractère ubiquitaire

A l'exception de Hyman et al., 2001, la totalité des articles rapportent une détection des anticorps anti-A β chez tous les individus, la plupart étant des individus âgés avec ou sans MA. Les quelques travaux ayant étudié la présence des anticorps anti-A β chez des individus sains non âgés ont également retrouvé ces anticorps, chez les adultes jeunes (Maftai et al., 2012 ; Brettschneider et al., 2005) et chez les enfants (Baril et al., 2004). Des résultats contradictoires ont été présentés concernant les variations du taux d'anticorps anti-A β circulant en fonction de l'âge. Certaines équipes n'ont pas trouvé de variation significative en fonction de l'âge (Maftai et al., 2012 ; Brettschneider et al., 2005 ; Baril et al., 2004 ; Jianping et al., 2006), d'autre une diminution chez les sujets sains âgés (Gustaw-Rothenberg et al., 2010 ; Sohn et al., 2009 ; Britschgi et al., 2009).

Les IVIg contiennent essentiellement des IgG polyclonales purifiées à partir de sang d'individus supposés sains. Les préparations d'IVIg humaines contiennent des IgG réactives vis-à-vis de l'A β (Dodel et al., 2002). Les quatre sous-classes d'IgG y semblent représentées dans des proportions classiques (Du et al., 2003 ; Balakrishnan et al., 2010).

En raison de leur présence chez tous les individus, sains aussi bien que malades, les anticorps anti-A β ont donc été désignés comme faisant partie des auto-anticorps naturels (« naturally/spontaneously occurring (auto-)antibodies »), préexistant à tout processus apparent d'immunisation.

Isotypie

La plupart des travaux consacrés aux anticorps anti-A β présents chez les sujets sains ou atteints de MA se sont contentés d'étudier les immunoglobulines totales anti-A β (Weksler et al., 2002 ; Brettschneider et al., 2005) ou le plus souvent les IgG. Les études ayant étudié les IgM anti-A β en ont également détecté, à taux plus faible que les IgG (Britschgi et al., 2009 ; Dorothée et al., 2012). A notre connaissance, aucune étude n'a cherché à détecter spécifiquement les IgA, les IgE ou les IgD anti-A β . De la même façon, peu d'études se sont intéressées aux sous-classes des IgG anti-A β . L'isotype principal semble être IgG1, suivi par IgG3, tandis que la réponse IgG4 semble inconstante et la réponse IgG2 virtuellement absente (Baril et al., 2004 ; Dorothée et al., 2012).

Reconnaissance antigénique

De nombreux antigènes ont été utilisés pour détecter les anticorps anti-A β , mais rares sont les études qui ont comparé les réponses humorales spontanées et leur spécificité vis-à-vis de plusieurs préparations antigéniques.

L'A β_{1-40} et l'A β_{1-42} montrent tous les deux des réactivités, de même que différentes formes agrégées telles que les oligomères (Nath et al., 2003, Klaver et al., 2011 ; Szabo et al., 2010 ; Dorothée et al., 2012 ; Gruden et al., 2007) ou des fibrilles (Gruden et al., 2004 ; O'Nuallain et al., 2006), et différentes formes ayant subi des modifications post-traductionnelles, comme l'oxydation (Moir et al., 2005 ; Britschgi et al., 2009) et la présence de pyroglutamate (Britschgi et al., 2009). Du point de vue de l'étude de la réactivité des anticorps anti-A β vis-à-vis de différentes espèces d'A β , l'étude de Britschgi et al., est la plus remarquable, ayant étudié la réactivité des anticorps naturels anti-A β sur une puce présentant plus d'une cinquantaine de peptides A β , sauvages ou mutés, tronqués ou non, agrégés ou non, et ayant ou non subi des modifications post-traductionnelles. Les auteurs ont pu détecter une réactivité vis-à-vis de tous ces peptides, mettant en avant le large répertoire reconnu par ces anticorps anti-A β , avec des réactivités relativement variables (Britschgi et al., 2009).

Concernant les spécificités des IgG anti-A β provenant des IVIg, différentes IVIg de différents fournisseurs peuvent présenter de fortes variations de spécificités, par exemple entre la reconnaissance d'A β_{1-40} et A β_{1-42} (Balakrishnan et al., 2010) ou de différentes conformation d'A β_{1-42} (Klaver 2010 19840873). Les épitopes préférentiels suggérés concernent plutôt le domaine intramembranaire C-terminal (Balakrishnan et al., 2010). Il a été décrit une réactivité préférentielle vis-à-vis des formes agrégées fibrillaires ou oligomériques (CAPS) plutôt que vis-à-vis des monomères d'A β_{1-40} . De plus, ces anticorps reconnaîtraient les oligomères hydrosolubles SDS-résistants extraits de cerveaux de patients atteints de MA (Welzel et al., 2012). On peut admettre sans risque que différentes espèces d'anti-A β sont présentes dans les IVIg, et que ces différentes espèces sont susceptibles d'avoir différents effets biologiques (Wang et al., 2016).

La question de la réactivité croisée des anticorps anti-A β vis-à-vis de différentes formes du peptide A β a été peu étudiée. Vraisemblablement, compte-tenu du fort taux d'identité de séquence entre différents peptides A β (par exemple entre l'A β_{1-40} , l'A β_{1-42} et des peptides A β présentant des mutations ponctuelles), il doit exister une très forte réactivité croisée entre les anticorps anti-A β polyclonaux présents chez l'homme. A titre d'exemple, la réactivité des anticorps anti-A β_{1-40} présents dans le LCR est largement inhibée par une pré-incubation par du peptide A β_{1-40} , A β_{1-42} , et A β_{25-35} (Du et al., 2001), ce qui argumente en faveur de l'existence d'épitopes linéaires et de réactivité croisée, même si, même dans le cas des espèces d'A β monomériques, la réactivité des anticorps naturels anti-A β semble pouvoir être partiellement liée à des épitopes conformationnels (Gaskin et

al., 1993). Par ailleurs, la réactivité d'IgG issues d'IVIg et purifiées contre les fibrilles d'A β n'est pas inhibée par de l'A β monomériques, tandis qu'elle est inhibée par d'autres fibrilles amyloïdes non-A β (O'Nuallain et al., 2006 ; O'Nuallain et al., 2008 ; O'Nuallain et al., 2010).

Il semble donc que la réactivité des anticorps anti-A β naturels puisse être en grande partie croisée entre différentes espèces d'A β , sans exclure non plus l'existence de certaines spécificités relatives aussi bien à la séquence qu'à la conformation.

Présence dans le LCR

Plusieurs études ont conclu à la présence d'anticorps naturels anti-A β dans le LCR de sujets âgés sains et de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Du et al., 2001 ; Britschgi et al., 2009 ; Kimura et al., 2017 ; Maftai et al., 2013). Une autre étude contredit ces résultats, n'ayant détecté des anticorps anti-A β dans le LCR d'aucun sujet contrôle, et chez seulement 27% des sujets atteints de MA (Nath et al., 2003).

L'une des questions importante autour des anticorps anti-A β est de savoir si une synthèse intrathécale de ces anticorps a lieu en conditions physiologique ou pathologiques. Britschgi et al., ont conclu à la présence d'IgG anti-A β dans le LCR avec un profil de réactivité similaire aux anticorps du plasma, mais à des concentrations bien plus faibles. Les IgM anti-A β étaient indétectables dans le LCR de sujets MA et de sujets sains (Britschgi et al., 2009). Cela dit, certains arguments expérimentaux suggèrent que des IgM anti-A β administrées par voie IV peuvent se retrouver au niveau central (Banks et al., 2007).

De même, Maftai et al., ont trouvé une corrélation entre les concentrations de complexes immuns IgG-A β présents dans le LCR et dans le sang (Maftai et al., 2013). Ces différents éléments argumentent en faveur du fait que les espèces d'anticorps anti-A β présentes au niveau des compartiments central et périphérique sont sensiblement les mêmes, en tout cas chez les sujets âgés sains et les patients atteints de MA. Compte-tenu du fait qu'il est admis que la plupart des anticorps sont d'origine périphérique puis diffusent dans le compartiment central, il est raisonnable de penser que les anticorps anti-A β présents au niveau central sont d'origine périphérique.

Circulation sous forme de complexes immuns

En 2004, Li et al., publient une étude montrant que les souris transgénique exprimant l'APP humain et immunisées contre le peptide A β humain produisent des anticorps liant l'A β , mais que ces anticorps ne peuvent être détectés directement car ils circulent sous formes de complexes immuns. Leur détection nécessite une étape de dissociation en phase acide de ces complexes immuns, puis de

neutralisation extemporanément à leur liaison à l'antigène lors de la technique ELISA (Li et al., 2004 ; Li et al., 2007). De façon intéressante, les anticorps anti-A β produits par les souris sauvages (i.e. exprimant l'APP murin) vaccinées contre l'A β humain, tout comme les souris transgénique (i.e. exprimant l'APP humain sauvage) vaccinées contre un A β humain muté, présentent des anticorps anti-A β essentiellement sous forme libre. Ceci laisse supposer que la circulation des anticorps anti-A β sous forme de complexes immuns ne concerne que les anticorps réactifs vis-à-vis de la forme endogène de la protéine, c'est-à-dire de l'auto-antigène, y compris chez les souris transgéniques. Cela dit, on ignore la nature de l'agent de liaison des anticorps anti-A β circulant. Il pourrait bien sûr s'agir d'A β circulant, mais aussi d'autres protéines circulantes ou même d'anticorps anti-idiotypes (Loeffler et al., 2015), ces hypothèses n'étant pas mutuellement exclusives.

Ce phénomène de masquage et de démasquage des anticorps anti-A β a pu être reproduit *in vitro* en utilisant un anticorps monoclonal anti-A β et de l'A β synthétique (Gustaw et al., 2008). L'existence de ces complexes immuns circulants a été également montrée par Maftei et al., en utilisant une technique d'ELISA sandwich utilisant un anticorps de capture monoclonal anti-A β et un anticorps de révélation anti-IgG (Maftei et al., 2012 ; Maftei et al., 2013), aussi il est raisonnable de penser que ces complexes existent bel et bien. Cependant, la méthode la plus employée pour révéler les anticorps masqués utilise un traitement en phase acide, et différents auteurs se sont interrogés sur les possibilités suivantes : i) qu'au moins une partie du signal généré par le traitement en phase acide soit artéfactuel par altération du paratope d'anticorps n'ayant pas a priori de réactivité vis-à-vis d'A β à l'état circulant ; ii) inversement, qu'une partie du signal généré par des anticorps anti-A β authentiques ne soit perdu par modification de leur paratope.

On peut ainsi séparer le signal obtenu en ELISA après prétraitement en phase acide de l'échantillon en 4 composantes distinctes : i) le signal spécifique résultant de la liaison d'anticorps anti-A β libres ou démasqués à l'antigène ; ii) la perte de signal spécifique résultant de l'altération de certains anticorps anti-A β par le traitement acide ; le signal non spécifique résultant de la liaison d'anticorps originellement non réactifs vis-à-vis d'A β mais altérés par le traitement acide et se liant iii) à l'A β ou iv) au plastique de la plaque (Li et al., 2007). Szabo et al., ont notamment montré que la liaison des anticorps au plastique n'était pas un phénomène négligeable et surtout qu'il s'agissait d'une phénomène Fab-dépendant (Szabo et al., 2010).

En résumé, tous les travaux qui ont pris le soin d'étudier ces anticorps complexés concluent i) à la présence de ces complexes dans le sang aussi bien que dans le LCR et ii) à la pertinence de prendre en compte ces anticorps complexés pour mettre en évidence dans spécificités sérologiques dans la MA (Gustaw et al., 2008 ; Britschgi et al., 2009 ; Gustaw-Rothenberg et al., 2010 ; Storace et al., 2010 ; Szabo et al., 2010 ; Klaver et al., 2011 ; Maftei et al., 2012 ; Dorothée et al., 2012 ; Maftei et al., 2013).

3.2.3. Anticorps anti-A β dans la maladie d'Alzheimer

Comparaisons avec des sujets sains

Nous avons souligné plus haut les caractéristiques des anticorps anti-A β constamment retrouvées par différentes équipes : leur présence spontanée chez tous les individus, dans le sang comme dans le LCR, sous forme d'IgG et d'IgM polyclonales réactives contre différentes espèces d'A β , et présentes sous forme libre minoritaire et complexée majoritaire. Cependant, et vraisemblablement en raison de leur caractère ubiquitaire, polyclonal, multiréactif et partiellement masqué, les comparaisons sérologiques entre certains groupes pathologiques (principalement des sujets âgés atteints de MA sporadique) et un groupe contrôle (en général des sujets âgés sans MA clinique) a donné des résultats extrêmement contradictoires.

Un premier groupe de travaux a trouvé une diminution du taux d'anticorps anti-A β dans la MA relativement aux sujets contrôles (Du et al., 2001 ; Weksler et al., 2002 ; Moir et al., 2005 ; Brettschneider et al., 2005 ; Jianping et al., 2006 ; Song et al., 2007 ; Sohn et al., 2009). Une de ces publications mentionnaient cette diminution dans le LCR (Du et al., 2001). Une publication n'a retrouvé cette différence que pour un antigène sur deux préparations testées (« CAPS » d'A β_{1-40} cross-linké post-oxydation), soulignant l'idée que ces différences sérologiques entre groupes pathologiques puissent concerner certains antigènes et pas d'autres (Moir et al., 2005). Il est également intéressant de noter qu'aucune publication parmi ce groupe n'a utilisé de protocole de dissociation des anticorps anti-A β complexés. L'une de ces publications rapporte en outre une diminution de l'avidité des anticorps anti-A β dans la MA (Jianping et al., 2006).

Un second groupe de travaux a trouvé une augmentation du taux d'anticorps anti-A β dans la MA relativement aux sujets contrôles (Nath et al., 2003 ; Mruthinti et al., 2004 ; Gruden et al., 2004 ; Gruden et al., 2007 ; Gustaw et al., 2008 ; Gustaw-Rothenberg et al., 2010 ; Maftei et al., 2013). Deux de ces publications ont trouvé une augmentation des anticorps anti-A β dans le LCR de sujets atteints de MA (Nath et al., 2003 ; Maftei et al., 2013). Deux groupes ont montré une augmentation des anticorps anti-A β complexés (Gustaw et al., 2008, et Gustaw-Rothenberg et al., 2010 ; Maftei et al., 2013).

Un troisième groupe de travaux n'a pas retrouvé de différences significatives concernant le taux d'anticorps anti-A β dans la MA relativement aux sujets contrôles (Hyman et al., 2001 ; Baril et al., 2004 ; Britschgi et al., 2009 ; Storace et al., 2010 ; Klaver et al., 2011 ; Dorothée et al., 2012). L'un de ces groupes a étudié le LCR (Britschgi et al., 2009). De façon intéressante, la plupart de ces travaux ont utilisé un protocole de dissociation des complexes immuns, soit direct (Britschgi et al., 2009 ;

Klaver et al., 2011 ; Dorothée et al., 2012), soit indirect par purification des anticorps anti-A β sur colonne et élution en phase acide (Storace et al., 2010)

Facteurs de variabilité chez les patients souffrant de MA

Certains travaux sur les anticorps anti-A β ont mis en évidence des différences sérologiques dans certains sous-groupes de patients souffrant de MA.

Variables démographiques

Bretschneider et al., ont trouvé une augmentation de taux d'anticorps anti-A β chez les femmes atteintes de MA comparativement aux hommes (Bretschneider et al., 2005), ce qui n'a pas été trouvé par d'autres auteurs (Hyman et al., 2001). Certains groupes n'ont pas trouvé de variation significative du taux d'anticorps anti-A β en fonction de l'âge chez les patients MA (Bretschneider et al., 2005, Hyman et al., 2001). Inversement, d'autres auteurs ont montré une diminution (Sohn et al., 2009 ; Gustaw-Rothenberg et al., 2010) ou une augmentation (Maftai et al., 2013) des anticorps anti-A β en fonction de l'âge chez les patients MA. Aucune étude n'a rapporté d'association entre les allèles d'ApoE et le taux d'anticorps anti-A β (Weksler et al., 2002 ; Bretschneider et al., 2005 ; Britschgi et al., 2009 ; Maftai et al., 2013)

Variables biologiques ou radiologiques

Kimura et al., ont montré une corrélation inverse entre le taux d'anticorps anti-A β dans le LCR et le taux d'A β 42 mais pas d'A β 40 ni de p-Tau dans le LCR. Le taux d'anticorps anti-A β circulant n'était corrélé avec aucun marqueur du LCR (Kimura et al., 2017) ni avec le taux d'A β plasmatique (Hyman et al., 2001). Kimura et al., ont montré une corrélation négative entre le taux des anticorps anti-A β dans le LCR et l'atrophie du lobe medio-temporal (Kimura et al., 2017)

Variables cliniques

Encore une fois, différentes équipes ont avancé des résultats contradictoires. Certains auteurs ont trouvé une diminution des IgG réactives vis-à-vis d'oligomères d'A β ₁₋₄₂ chez les patients modérés à sévères par comparaison avec les patients au stade léger (Britschgi et al., 2009). D'autres ont montré une augmentation des anticorps anti-A β avec la sévérité (Gruden et al., 2007 ; Maftai et al., 2013). D'autres enfin n'ont pas trouvé de corrélation entre le taux d'anticorps anti-A β et le MMSE (Brettschneider et al., 2005 ; Gustaw-Rothenberg et al., 2010).

Dans une étude prospective, Storace et al., ont montré que, chez les sujets MCI qui vont progresser vers une MA, le taux d'anticorps anti-A β non dissociés est plus faible mais le taux après dissociation est augmenté, comparativement aux sujets contrôles et aux MCI stables (Storace et al., 2010).

Selon Gruden et al., le taux d'anticorps anti-A β augmente avec la durée de la maladie (Gruden et al., 2004 ; Gruden et al., 2007), tandis que, selon Gustaw-Rothenberg et al., ce taux diminue à distance du diagnostic (Gustaw-Rothenberg et al., 2010).

Enfin, Dorothée et al., ont trouvé une diminution des anticorps anti-A β dans des formes atypiques de maladie d'Alzheimer, alors qu'ils n'ont pas trouvé cette différence concernant les patients MA typiques. (Dorothée et al., 2012)

3.3. Immunothérapies anti-A β dans la Maladie d'Alzheimer

Plusieurs types d'immunothérapies anti-A β ont été, ou sont toujours, à l'essai dans la maladie d'Alzheimer. Les premières immunothérapies actives ont utilisé une vaccination par le peptide A β entier, induisant non seulement la production d'anticorps anti-A β , mais aussi une réponse adaptative T à l'encontre d'A β . Nous le verrons, cette réponse cellulaire T a été considérée comme l'origine d'effets indésirables graves, et les immunothérapies suivantes se sont orientées vers les propriétés thérapeutiques et la supposée innocuité de la composante humorale anti-A β , soit par le biais d'anticorps monoclonaux anti-A β , soit par le biais d'immunisation active contre des épitopes B uniquement, soit par le biais de l'administration d'IgG anti-A β « naturelles » par IVIg.

3.3.1. Immunothérapie active contre l'A β entier

3.3.1.1. L'essai ANI792

A la fin des années 1990s, plusieurs travaux ont montré que la vaccination de souris PDAPP, un modèle transgénique de la MA, par le peptide A β_{1-42} , empêchait la formation des dépôts parenchymateux ou réduisait leur évolution selon que la vaccination ait lieu avant ou après leur apparition (Schenk et al., 1999). Cette vaccination améliorait les performances cognitives des souris (Janus et al., 2000 ; Morgan et al., 2000).

Ces résultats encourageants ont incité Elan/Wyeth-Ayerst Pharmaceuticals à démarrer chez l'homme un essai d'immunisation active : l'essai ANI792 (NCT00021723). Initialement, le vaccin utilisait du peptide A β_{1-42} pré-agrégé, avec la saponine QS21 comme adjuvant. Plus tard, 0.4% de polysorbate-80 ont été ajoutés à la formulation pour en améliorer la stabilité. La phase I évaluant la tolérance et l'immunogénicité a débuté en Décembre 1999 (Nicoll et al., 2003), les recrutements en Avril 2000, et les administrations en Septembre 2000 (Holmes et al., 2008). 80 sujets présentant une MA légère à modérée ont été traités par 4 administrations sur 6 mois de 50 ou 225 μ g d'A β ou 50 or 100 μ g de QS-21 (64 traités, 16 placebo). Durant la phase I, le protocole a été amendé pour ajouter une extension optionnel comprenant 4 administrations supplémentaires de la formulation avec polysorbate (51 traités, 13 placebo). Parallèlement, la phase IIa évaluant l'efficacité a débuté en Octobre 2001, recrutant 372 sujets : 300 traités par l'A β , 72 par placebo (Gilman et al., 2005). Les administrations ont été arrêtées en Janvier 2002, après que 4 patients aient déclarées une méningoencéphalite (Check et al., 2002). Les dernières injections de la phase I n'ont pas été réalisées en raison de la suspension de l'essai de phase IIa. Le suivi des sujets la phase I a eu lieu jusqu'en Septembre 2006 (Holmes et al., 2008).

3.3.1.2. Immunogénicité d'ANI792

Bien qu'aucune des méthodes employées pour analyser les sérologies chez les patients traitées par ANI792 n'employait la dissociation des complexes immuns, Hock et al., ont toutefois pu détecter des anticorps anti-A β chez 66% des sujets, allant jusqu'à un titre à 1:200 (Hock et al., 2002). Lee et al., ont noté la présence d'une réactivité vis-à-vis d'épitopes mineurs dans les parties amino-terminale et centrale de l'A β chez 11% des sujets avant traitement. (Lee et al., 2005).

Chez les patients de phase I, l'immunogénicité a été évaluée par ELISA en utilisant l'A β ₁₋₄₂ pré-agrégé comme antigène et en révélant les immunoglobulines d'isotypes IgG, IgA ou IgM. La limite de détection était un titre au 1:100. Un patient était considéré comme "répondeur" à la vaccination s'il présentait un titre d'IgG/A/M \geq 1:1000, 4 semaines après la dernière administration, ou un titre \geq 1:5000 n'importe quel moment après le début des injections (Bayer et al., 2005). Durant la phase 2a, cette définition des patients répondeurs a changée, puisqu'un patient était considéré comme répondeur s'il présentait un titre d'IgG \geq 1:2200 dans au moins un échantillon post-administration (Gilman et al., 2005).

L'immunogénicité de la formulation a été considérée comme mauvaise. En phase I, après 4 administrations, 16% des sujets ayant reçu 50 μ g d'A β et 27% des sujets ayant reçu 225 μ g d'A β étaient répondeurs. Les formulations contenant 100 μ g d'adjuvant n'ont pas montré un taux de réponse anticorps supérieur à 50 μ g. Après 8 injections, dont 4 avec polysorbate, 36% et 77% sujets ayant reçu respectivement 50 μ g et 225 μ g d'A β étaient répondeurs (Bayer et al., 2005). Au cours de la phase 2a, 20% (59/300) sujets ayant reçu entre 1 et 3 administrations de 225 μ g d'A β ont été désignés comme répondeurs. Toutefois, il semble que la plupart des sujets, même classifiés « non répondeurs », aient développé une réponse anticorps, ne serait-ce qu'à taux faible (Gilman et al., 2005).

Concernant la durabilité de l'immunisation, l'importance du titre suivant immédiatement les administrations était corrélée à la persistance à long terme de la réponse anticorps (Holmes et al., 2008). Une telle persistance était présente, bien qu'à taux faible, 5 ans après l'administration, chez 90% des sujets répondeurs, tandis que les sujets non répondeurs ne présentaient pas d'anticorps détectables à 5 ans (Vellas et al., 2009). Concernant les isotypes des anticorps induits, la réponse humorale concernait les IgM aussi bien que les IgG, à des titres comparables (Gilman et al., 2005). Concernant leur spécificité antigénique, virtuellement tous les sujets vaccinés répondeurs présentaient des anticorps dirigés contre l'extrémité amino-terminale du peptide A β (Lee et al., 2005 Lee). Ces anticorps induits marquaient les plaques séniles, les dépôts diffus, et les dépôts vasculaires sur coupe de souris transgéniques et de cerveau humain (Hock et al., 2002). L'immunoréactivité vis-à-vis des dépôts parenchymateux était abolie par une préincubation des échantillons avec de l'A β ₁₋₈,

de ce fait considéré comme épitope majeur post-immunisation. En plus des épitopes mineurs présents dans les sérums pré-immuns, certains étaient également présents post-immunisation chez certains patients (Lee et al., 2005). Concernant le passage des anticorps anti-A β au niveau central, un signal était détectable dans le LCR, bien qu'en général à taux beaucoup plus faibles que dans le sérum, qu'il y ait ou non une altération de la BHE (Hock et al., 2002). Hock et al., ont pu détecter des IgG dans le LCR chez 20% (4/20) sujets (Hock et al., 2003). Gilman et al., ont détecté des IgG ou IgM anti-A β dans le LCR chez 15% (9/57) sujets, dont 5 répondeurs.

3.2.1.3. Effets de l'immunisation active sur les marqueurs associés à la Maladie d'Alzheimer

Chez certains sujets répondeurs, la vaccination par le peptide A β a été associée à une diminution des dépôts d'A β parenchymateux et des plaques séniles, voire à leur disparition, dans certaines zones corticales (Masliah et al., 2005 ; Patton et al., 2006 ; Bombois et al., 2007). L'importance de la diminution des dépôts parenchymateux était corrélée au titre d'anticorps (Holmes et al., 2008). La charge tissulaire globale en A β ₁₋₄₂ était diminuée dans les zones montrant également une diminution des dépôts parenchymateux (Masliah et al., 2005). Toutefois, d'autres auteurs décrivent une augmentation de l'A β soluble total chez les patients traités (Patton et al., 2006).

Concernant les mécanismes de la clairance de l'A β , de l'A β intracellulaire était présent dans des cellules CD68+ pouvant correspondre à des cellules microgliales ou macrophagiques, suggérant une majoration de la phagocytose de l'A β (Masliah et al., 2005). Par ailleurs, le marquage CD68 était augmenté et corrélé à la charge intracérébrale d'A β , chez les patients immunisés (Zotova et al., 2011). Ceci est à rapprocher de l'augmentation du TNf alpha intracérébral chez ces patients (Maarouf et al., 2010). Certains auteurs ont paradoxalement constaté une diminution de la densité des neurones chez les patients immunisés. Cependant, cette diminution concernait principalement les neurones présentant des marqueurs de dégénérescence tels que pPKR, et était associée à une augmentation du marquage par Iba1, CD68 et CD64, suggérant un rôle des cellules microgliales dans la perte neuronale (Paquet et al., 2015), tandis que les neurones résiduels exprimaient moins de marqueurs apoptotiques (Paquet et al., 2018).

La vaccination par A β ne semble pas avoir eu d'effet notable sur la pathologie Tau (Masliah et al., 2005 ; Bombois et al., 2007), bien que certains auteurs aient décrit des effets modestes mais significatifs sur la morphologie des neurites et sur la pathologie tau hippocampique (Serrano-Pozo et al., 2010), associée à une diminution de la quantité de pTau (Boche 2010).

Le titre d'anticorps post-immunisation était corrélé à l'importance des modifications radiologiques à 1 an, en tout cas concernant le volume cérébral total et le volume ventriculaire, mais pas le volume

hippocampique. Les patients répondeurs présentaient une diminution plus importante du volume cérébral, et un plus grand élargissement du volume ventriculaire, sans présenter une diminution significativement plus importante du volume hippocampique, comparativement au placebo (Fox et al., 2005). Toutefois, à 5 ans, seule la différence concernant le volume ventriculaire était encore significative (Vellas et al., 2009).

Concernant les test cognitifs, les patients répondeurs de la phase IIa présentaient une amélioration de leurs performances à 1 an (Hock et al., 2003 ; Fox et al., 2005), encore présente à 5 ans (Vellas et al., 2009). Ces résultats n'ont toutefois pas été retrouvés chez les patient de phase I (Holmes et al., 2008). En outre, la clairance des dépôts parenchymateux n'était pas nécessairement associée à une amélioration du MMSE (Holmes et al., 2008).

3.2.1.3. Effets de l'immunisation active sur l'AAC

Dans des modèles animaux murins (Liu et al., 2009), canins (Davis et al., 2017) ou simiens (Joseph-Maturin et al., 2013) prompts à présenter des dépôts vasculaires, l'immunisation active par le peptide A β est susceptible d'augmenter les dépôts d'A β vasculaires et les manifestations hémorragiques intracérébrales. Chez l'homme, il semble également que la vaccination active augmente les dépôts vasculaires et les vasculopathies associées à l'AAC. Boche et al., ont montré une augmentation de l'A β 42 et de l'A β 40 vasculaire chez les sujets immunisés, atteignant toute la circonférence et toute l'épaisseur du vaisseau. Cette augmentation de l'AAC était associée à une augmentation des microhémorragies et des microinfarctus. (Boche et al., 2008). D'autres auteurs ont retrouvé une majoration des vasculopathies, en particulier des images en double tonneau, mais sans perte des cellules musculaires lisses (Sakai et al., 2014). Selon Zotova et al., l'importance de l'AAC et des microhémorragies ne corrélait avec aucun marqueur microglial (Zotova et al., 2013).

Masliah et al., n'ont pas retrouvé d'effet global de la vaccination sur l'AAC concernant 1 sujet traité ayant présenté une méningoencéphalite (Masliah et al., 2005). Cependant, chez ce patient, les dépôts d'AAC étaient sévères dans le lobe présentant la plus forte diminution de l'A β parenchymateux, tandis que les autres lobes ne présentaient pas particulièrement plus de dépôts vasculaires (Patton et al., 2006). La redistribution de l'A β 42 du parenchyme vers les vaisseaux serait associée à une redistribution de l'ApoE (Sakai 2014). Chez les individus vaccinés, la composition de ces dépôts vasculaires semble se rapprocher de celle des dépôts parenchymateux, tandis que leur composition est bien distincte chez les sujets atteints de MA non vaccinés (Patton et al., 2006). Il semble qu'à plus long terme, les dépôts vasculaires aient également tendance à diminuer chez les sujets vaccinés (Bombois et al., 2007 ; Boche et al., 2008).

3.2.1.4. Immunisation active par l'A β , effets indésirables et méningoencéphalites

Les administrations d'A β de l'essai AN-1792 ont été arrêtées quand 4 sujets français inclus en phase IIa ont déclaré une méningoencéphalite (Check, 2002). Au total chez les patients traités, 1 cas (<2%) de méningoencéphalite clinique est survenu durant la phase I, et 18 cas (6%) durant la phase IIa.

Concernant les décès lors de l'étude de phase I, 5 sont survenus durant le suivi, aucun rapporté comme lié au traitement. L'un de ces décès était causé par un AVC (Bayer et al., 2005). Concernant les décès lors de la phase IIa, 5 décès ont été rapportés dans le groupe traité durant la période de suivi, dont un seul a été considéré comme lié au traitement et dû à un AVC ischémique, chez un patient non-répondeur sans méningoencéphalite. Deux décès supplémentaires sont survenus après la fin de la période de suivi (Gilman et al., 2005) : l'un chez un patient sans méningoencéphalite clinique et décrit sur le plan histologique par Masliah et al., (2005), l'autre chez un patient décédé par pneumopathie d'inhalation dans un contexte de réactivation de sa méningoencéphalite non contrôlée, décrit par Ferrer et al., (2004).

En dehors des méningoencéphalites, d'autres effets indésirables graves liés au traitement ont été rapportés, en phase I (3 patients ; Bayer et al., 2005) et en phase IIa : 2 cas d'encéphalopathie dont 1 sans méningoencéphalite, 2 cas de convulsions, 2 cas de confusion, 1 thrombose rétinienne, 1 cas d'hémiplégie, et 1 hémorragie cérébrale. Au total, deux cas d'hémorragie cérébrale ont été rapportés dans le groupe traité, contre 1 cas dans le groupe placebo (Gilman et al., 2005). Parmi ces deux cas, un cas était une hémorragie explicitement liée à l'AAC, chez un patient sans méningoencéphalite (Orgogozo et al., 2003).

Concernant les cas de méningoencéphalites, tous sont survenus moins de 6 mois après la dernière immunisation, généralement la 2^{ème} dose.

Sur le plan clinique, la présentation typique était un syndrome confusionnel d'apparition progressive, des céphalées, ou une léthargie. Les autres signes inconstamment rencontrés étaient les suivants : fièvre, nausées et vomissements, désorientation, somnolence, ataxie, difficulté à la marche, aphasie, ou hémiplésie. Des rechutes ont eu lieu dans 4 cas. Concernant la prise en charge thérapeutique, l'article d'Orgogozo mentionne seulement que certains patients étaient répondeurs à une corticothérapie IV. De façon intéressante, chez deux patients sévères non répondeurs à la corticothérapie, la plasmaphérèse a été très efficace chez un patient, tandis que l'autre a vraisemblablement présenté une réponse modeste.

Sur le plan radiologique, les patients se présentaient le plus souvent avec des hypersignaux corticaux ou sous-corticaux, prédominant plutôt au niveau postérieur et cérébelleux, éventuellement associés

à des hyperdensités de la substance blanche et à une prise de contraste méningée après injection de gadolinium. Aucune angiographie n'a été réalisée

Sur le plan biologique, parmi 17 LCR prélevés, 16 ont présenté une hypercellularité modérée et lymphocytaire (15 – 130 éléments / mm³, dont 70 à 100% de lymphocytes). L'hyperprotéinorachie allait de 0.33 à 3.1 g/L, avec une glycorachie normale. La recherche de bandes oligoclonales s'est révélée positive chez un patient au moment du premier prélèvement, et s'est positivée chez un autre patient plus tard. Cependant, 3/4 échantillons ont montré une concentration élevée d'IgG jusqu'à 0.1 g/L.

Concernant la réponse humorale anti-A β chez ces patients, tous avaient des IgM détectables dans le sérum (Orgogozo et al., 2003 ; Gilman et al., 2005). Concernant les IgG, les deux publications donnent des résultats contradictoires : d'après Orgogozo et al., (2003), 3/18 patients avaient des IgG indétectables, 7/18 patients étaient non-répondeurs avec IgG détectables, et 8/18 étaient répondeurs. D'après Gilman et al., (2005), 1/18 patients avait des IgG indétectables, 4/18 étaient non-répondeurs avec des IgG détectables, et 13/18 étaient répondeurs. Dans les deux cas, le taux de répondeurs est significativement plus élevé que les 16,3% de sujets répondeurs chez les patients sans méningoencéphalite.

Parmi les 9 sujets de la phase IIa ayant présenté des anticorps anti-A β dans le LCR, 4 ont développé une méningoencéphalite : 3 répondeurs et 1 non-répondeur (Gilman et al., 2005 15883316). Chez les patients avec méningoencéphalite, sur 8 échantillons disponibles post-immunisation, 6 présentaient des IgG et 4 des IgM réactives contre l'A β ₁₋₄₂ (Orgogozo et al., 2003).

Seulement 2 cas de méningoencéphalite clinique ont été décrits sur le plan histologique, en post-mortem, et à distance relative de l'évènement aigu.

Le premier cas, décrit par Nicoll et al., (2003), est celui de l'unique patiente de phase I ayant présenté une méningoencéphalite. Le tableau clinique incluait une fièvre, une somnolence, des vertiges et des troubles de la marche. A l'IRM, la patiente présentait des anomalies étendues de la substance blanche et une zone d'œdème plus localisée vraisemblablement d'origine inflammatoire. La patiente n'a pas répondu favorablement à la corticothérapie, et son état est resté sans amélioration jusqu'à son décès 12 mois après la première injection. Sur le plan histologique, un élément notable était la forte diminution des plaques séniles dans certaines zones du cortex chez cette patiente traitée. En revanche, les dépôts vasculaires correspondant à de l'AAC semblaient uniformément répartis entre les zones riches et pauvres en plaques. Les auteurs décrivent un infiltrat lymphocytaire dense dans les leptoméninges, prédominant autour des vaisseaux leptoméningés présentant de l'AAC, et des infiltrats lymphocytaires épars (« sparse ») dans le cortex, concentrés plutôt dans les espaces périvasculaires, mais parfois dans le parenchyme. Ces lymphocytes étaient des lymphocytes T

mémoires (CD3+ CD45RO+), pour la grande majorité CD4+. Il n'y avait pas de lymphocytes B (CD79a+ CD20+). Les auteurs rapportent également un infiltrat de cellules CD68+ correspondant à des phagocytes mononucléés dans la substance blanche (Nicoll et al., 2003).

Le second cas, décrit sur le plan histologique par Ferrer et al., (2004), est celui du patient #18 d'Orgogozo et al., (2003), décédé 4 mois après la réactivation sa méningoencéphalite en absence de réponse à la corticothérapie. Post-mortem, l'examen macroscopique montrait, en plus des lésions caractéristiques de la MA, de nombreuses petites hémorragies corticales. De façon similaire au cas décrit précédemment, les auteurs ont retrouvé des zones corticales avec une forte diminution des dépôts parenchymateux d'A β , sans modification particulière des dépôts vasculaires dans ces mêmes régions. A la différence du cas décrit précédemment, les auteurs décrivent des infiltrats lymphocytaires aussi bien vasculaires que parenchymateux où prédominent largement des lymphocytes T CD8+ (Ferrer et al., 2004).

Un troisième cas de sujet traité a été décrit sur le plan histologique par Masliah et al., (2005). Ce sujet n'a pas présenté de signes cliniques de méningoencéphalite. Comme dans les autres cas, certaines zones corticales présentaient peu de dépôts parenchymateux, et des cellules CD68+ positives pour l'A β , avec une persistance des dépôts vasculaires. De façon intéressante, les auteurs rapportent tout de même la présence d'infiltrats lymphocytaires périvasculaires dans les espaces leptoméningés, toutefois moins abondants que dans les deux cas précédents. Ces infiltrats semblent dans ce cas majoritairement composés de cellules B CD20+ et pour plus faible partie de cellules T CD3+ (Masliah et al., 2005).

Pour résumer les faits marquants concernant les effets indésirables durant l'essai AN1792, on peut d'abord souligner qu'en dehors des méningoencéphalites, certains ont été liés à l'AAC, qui a été rapportée comme majorée au moins dans les phases précoces suivant le traitement. Concernant le groupe des méningoencéphalites, on y trouve une sur-représentation des patients répondeurs, ce qui lie la survenue de ces événements à un processus efficace d'immunisation. La présence d'infiltrats cellulaires, par définition, et en particulier lymphocytaires dans l'encéphale semble en particulier associée à l'AAC. Des résultats contradictoires existent concernant le type de cellule lymphocytaire impliqué dans ces réactions, mais par leur présence, il est clair que les lymphocytes jouent un rôle dans ces complications. Cela n'exclut pas que les anticorps anti-A β puissent jouer un rôle de médiateurs dans ces réactions. Il est légitime de se demander pourquoi seulement 1 cas de méningoencéphalite a été rapporté lors de la phase I. Certains auteurs ont évoqué la présence de polysorbate 80 ajouté en phase IIa (et dans les 4 dernières administrations de la phase I), associé à une réponse T plutôt de type Th1 (Pride et al., 2008).

3.3.2. Essais thérapeutiques utilisant des anticorps monoclonaux anti-A β

Suite aux méningoencéphalites de l'essai AN-1792, il a été supposé que la composante cellulaire de la réponse anti-A β serait responsable de l'inflammation cérébrale, tandis que la composante humorale, c'est-à-dire les anticorps anti-A β , serait potentiellement bénéfique car pouvant augmenter la clairance de l'A β . La principale stratégie d'immunothérapie anti-A β a dès lors été l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-A β .

3.3.2.1. Les anticorps monoclonaux anti-A β utilisés en thérapeutique

Différents anticorps monoclonaux ont été ou sont encore à l'essai dans les pathologies liées à l'A β , chacun ayant ses propriétés propres en termes de réactivité antigénique, d'isotypie, et d'affinité.

Un premier groupe d'anticorps est réactif vis-à-vis de l'extrémité amino-terminale du peptide A β .

Le bapineuzumab (ou AAB-001), développé par Janssen et Pfizer, est une IgG1 monoclonale humanisée dont le biosimilaire murin est le clone 3D6. Ce clone a été produit par immunisation de souris avec de l'A β 1-5 conjugué à une immunoglobuline de mouton (Johnson-Wood et al., 1997). En conséquence, le bapineuzumab reconnaît la partie N-terminale du peptide A β , en particulier les résidus 1-5. Il s'agirait d'un épitope en conformation hélicoïdale plutôt qu'un épitope linéaire (Miles et al., 2013 ; Crespi et al., 2014). Sur coupe de cerveau de patients Alzheimer, il se lie aux dépôts parenchymateux et vasculaires (Bouter et al., 2015).

L'aducanumab (ou BIIB037), développé par Neurimmune et racheté par Biogen, est une IgG1 monoclonale humaine isolée à partir d'un sujet atteint de MA stable sur le plan cognitif, suivant un paradigme de "médecine translationnelle inverse". L'aducanumab reconnaît un épitope conformationnel N-terminal au niveau de l'A β 2-7. Sa particularité est qu'il ne se lie pas *in vitro* à des monomères d'A β 40 ou d'A β 42, mais de façon sélective à des espèces agrégées, telles que des oligomères solubles et des fibrilles, avec une affinité de l'ordre de 0.1 nM, similaire au bapineuzumab pour les formes agrégées (Frost et al., 2020 ; Arndt et al., 2018 ; Sevigny et al., 2016). Sur coupe de cerveau de souris Tg2576, il se lie préférentiellement aux dépôts parenchymateux diffus ou compacts, plutôt qu'à l'A β vasculaire (Sevigny et al., 2016).

Un second groupe d'anticorps est réactifs vis-à-vis d'épitopes médians de l'A β .

Le solanezumab (ou LY2062430), développé par Eli Lilly, est une IgG1 monoclonale humanisée dont le biosimilaire murin est le clone m266, qui a servi de modèle pour la preuve de concept du *peripheral sink* (DeMattos et al., 2001). Le solanezumab est dirigé contre un épitope en conformation

alpha-hélicoïdal dans la partie centrale du peptide A β 13-24 (Legleiter 2004 ; Ultsch 2016). Ses résidus de liaison, très proches de ceux du crenezumab, incluent notamment un motif PP enfoui très profondément dans la poche. Ceci pourrait d'une part expliquer la réactivité croisée de cet anticorps avec des protéines circulantes (Crespi et al., 2015 ; Watt et al., 2014). D'autre part, cela pourrait également expliquer sa propension à reconnaître préférentiellement l'A β sous forme de monomères solubles plutôt que d'oligomères soluble ou des dépôts tissulaires d'A β fibrillaires insoluble, avec une affinité de l'ordre du pM (DeMattos et al., 2001 ; Racke et al., 2005 ; Zhao et al., 2017). Cela dit, sur coupe de cerveau de patients Alzheimer, il se lie aux dépôts parenchymateux et vasculaires (Bouter et al., 2015).

Le crenezumab (ou MABT5102A), développé par Genentech, est une IgG4 monoclonale dont le biosimilaire murin est une IgG2b issue d'une souris immunisée par des liposomes d'A β 1-15 tétra palmitoylé, dont la portion d'A β adopte une conformation riche en feuillet β (Muhs et al., 2007). Paradoxalement, les études de modélisation semblent montrer que cet anticorps possède un épitope médian 16-26, ce qui permet d'expliquer sa réactivité croisée, comme celle du solanezumab, avec des protéines circulantes (Crespi et al., 2015 ; Watt et al., 2014). Cependant, contrairement au solanezumab, son épitope est dans une conformation non hélicoïdale expliquant leur profils de liaison distincts vis-à-vis de différentes espèces d'A β (Ultsch et al., 2016). Cet anticorps semble se lier aussi bien à de l'A β 42 monomérique, qu'oligomérique ou fibrillaire avec une affinité similaire (Adolfsson et al., 2012). Cependant, certaines études vont dans le sens d'une prédilection de cet anticorps pour les oligomères (Meilandt et al., 2019). Il peut toutefois se fixer aux plaques murines et humaines (Adolfsson et al., 2012), principalement en périphérie des dépôts, sans marquage de l'amyloïde vasculaire (Meilandt et al., 2019). Ceci dit, d'autres études ont montré la capacité de son biosimilaire murin à se fixer au dépôts vasculaires (Bouter et al., 2015) et parenchymateux, avec une plus faible affinité et une plus faible capacité de liaison aux dépôts parenchymateux que le bapineuzumab, le gantenerumab, ou le solanezumab (Fuller et al., 2015, Bouter et al., 2015). Il aurait également des propriétés d'inhibition de l'agrégation et de promotion du désassemblage des agrégats préformés. Sur coupe de cerveau de patients Alzheimer, il se lie aux dépôts parenchymateux et vasculaires (Bouter et al., 2015).

Le gantenerumab (RO4909832, ou RGI450), développé par Hoffmann-La Roche, est une IgG1 monoclonale obtenue par *phage display* à partir d'une librairie humaine, puis modifiée par maturation d'affinité *in vitro* pour se lier spécifiquement aux dépôts parenchymateux d'A β . En réalité, il lierait deux épitopes, l'un amino-terminale (1-10) et l'autre médian (19-26) (Bohrmann et al., 2012 ; Panza et al., 2014). Le gantenerumab posséderait une affinité un peu inférieure au nM, préférentielle vis-à-vis de l'A β sous forme fibrillaire plutôt qu'oligomérique, et surtout monomérique (Bohrmann et al., 2012). D'autres auteurs ont toutefois montré une affinité légèrement inférieure au pM vis-à-vis de l'A β 40 monomérique immobilisé, soit du même ordre que le bapineuzumab, et bien supérieure à

celle du crenezumab (Fuller et al., 2015). Le gantenerumab est capable de se fixer aux plaques (Bohrmann et al., 2012) et aux neurones (Fuller et al., 2015).

Le dernier groupe d'anticorps réactifs vis-à-vis d'épitopes carboxy-terminaux de l'A β inclut le ponezumab, développé par Pfizer, une IgG2 Δ a reconnaissant l'extrémité C-terminale du peptide A β 40, en particulier l'épitope 33-40. Son biosimilaire murin est le clone 2H6. Il ne se lie pas à l'A β ₁₋₄₂, ni à l'APP, mais décore cependant les dépôts parenchymateux murins et humains (LaPorte et al., 2012). Il s'agit d'une IgG2 ayant une modification de la région constante de chaîne lourde sur 2 aminoacides (Armour 2003). La déglycosylation ne change pas l'affinité de cet anticorps pour l'A β ₁₋₄₀, qui est de l'ordre de 10 nM, mais diminue son affinité pour les Fc γ Rc murins et pour le CIq humain. L'administration intracraniale de 2H6 diminue le nombre de dépôts parenchymateux, en augmentant l'expression des Fc γ RII/III et l'activation microgiale évaluée par l'expression de CD45. Ces derniers effets sont absents en utilisant un anticorps déglycosylé. (Carty 2006)

3.3.2.2. Effets des anticorps monoclonaux anti-A β sur les marqueurs associés à la maladie d'Alzheimer

Effets neuropathologiques

Peu de données neuropathologiques sont disponibles pour des patients traités par anticorps monoclonaux sans complications.

Chez trois patients traités par bapineuzumab, dont deux ayant présenté un œdème vasogénique, l'examen neuropathologique n'a pas montré de diminution apparente des plaques séniles comparativement aux sujets contrôles (Roher et al., 2011 ; Roher et al., 2013). Chez ces sujets, il n'a pas été observé de modification de l'A β total cérébral, mais une augmentation du TNF α chez les sujets traités, compatible avec une activation microgiale, ainsi qu'une augmentation du ratio A β 40/A β 42, plutôt liée à une forte augmentation de l'A β 40 qu'à une diminution de l'A β 42 (Roher et al., 2013). De façon similaire, un patient traité par solanezumab et étudié sur le plan neuropathologique a montré une augmentation très importante de l'A β 40 soluble et insoluble dans les lobes frontaux et temporaux, sans modification de l'A β 42 comparativement à des sujets MA non traités (Roher 2016).

Effets radiologiques

Concernant les modifications de mesures volumétriques en IRM induites par les anticorps anti-A β monoclonaux (par exemple concernant le volume cérébral total, cortical, hippocampique ou ventriculaire), aucune étude à notre connaissance ne rapporte de modification chez les sujets traités par rapport aux non-traités, ni pour le bapineuzumab (Vandenberghe et al., 2016 ; Salloway et al., 2018), le solanezumab (Honig 2018 ; Swcharz 2019 31388559), le gantenerumab (Ostrowitski 2017), le crenezumab (Cummings 2018 ; Salloway 2018), ou le ponezumab (Landen 2017b). Nous n'avons retrouvé dans la littérature aucune donnée de volumétrie pour l'aducanumab.

Concernant les modifications de charge amyloïde évaluée par imagerie, induites par les anticorps anti-A β monoclonaux (par exemple au moyen de méthodes telles que le PiB ou le TEP-scan Florbetapir), les résultats sont variables selon l'anticorps.

Une réduction significative de la charge amyloïde a été retrouvée pour le bapineuzumab (Rinne et al., 2010 ; Russu et al., 2016 ; Liu et al., 2015), l'aducanumab (Sevigny et al., 2016), le gantenerumab (Ostrowitski et al., 2011 ; Ostrowitski et al., 2017 ; Klein et al., 2019). Ces effets semblent dose- et temps-dépendant, en tout cas pour l'aducanumab et le gantenerumab. Concernant le bapineuzumab, toutes les études n'ont pas montré de résultats significatives (Brody et al., 2016). Il semble en tout cas que la diminution de la charge amyloïde induite par cet anticorps ait été plus importante chez les porteurs de l'allèle ApoE4 (Russu et al., 2016 ; Liu et al., 2015). En revanche, le traitement par solanezumab (Honig et al., 2018 ; Schwarz et al., 2019), crenezumab (Salloway et al., 2018) ou ponezumab (Landen et al., 2017a) n'a pas montré de modification de la charge amyloïde en imagerie chez les patients traités.

Effets biologiques

Concernant la biodisponibilité de l'anticorps au niveau du compartiment central, les différents anticorps ont donné des résultats du même ordre de grandeur. Le ratio des concentrations LCR/plasma était de 0.3% pour le bapineuzumab (Blennow et al., 2012 ; Brody et al., 2016), 0.3% pour le crenezumab (Cummings et al., 2018), et 0.5% pour le ponezumab (Landen et al., 2013). Notons que ces anticorps sont respectivement d'isotype IgG1, IgG4, et IgG2. Par conséquent, le passage au niveau central ne semble pas influencé de façon critique par l'isotype.

Il semble que l'administration de certains anticorps monoclonaux anti-A β augmente les concentrations d'A β , en particulier d'A β 42, dans le LCR. C'est le cas du solanezumab (Siemers et al., 2010 ; Farlow et al., 2012), et du crenezumab (Cummings et al., 2018 ; Salloway et al., 2018). Cela ne semble en revanche pas être le cas du bapineuzumab (Blennow et al., 2012 ; Russu et al., 2016), du gantenerumab (Ostrowitski et al., 2017), ni de l'aducanumab chez la souris (Sevigny et al., 2016). Concernant le ponezumab, une augmentation de l'A β 40, et dans une moindre mesure de l'A β 42 a

été trouvée en phase I (Landen 2013) mais pas confirmée en phase 2 (Landen 2017b, Landen 2017a). L'étude des fractions libres et liées d'A β dans le LCR après traitement par le solanezumab a révélé que, malgré l'augmentation de l'A β 40 et A β 42 totaux, l'A β 40 libre diminuait dans le LCR, tandis que l'A β 42 libre n'était pas diminué (Doody et al., 2014 ; Willis et al., 2018). Le crenezumab diminuerait quant à lui la concentration d'oligomères dans le LCR (Yang et al., 2019).

Il semble également que l'administration de certains anticorps monoclonaux anti-A β diminue les concentrations de Tau ou de p-Tau dans le LCR. De façon paradoxale, nous remarquons que les anticorps concernés sont ceux sans effet probant sur les concentrations d'A β dans le LCR. C'est le cas du bapineuzumab (Blennow et al., 2012 ; Russu et al., 2016), du gantenerumab (Ostrowitski et al., 2017). Ce n'est pas le cas du solanezumab (Doody et al., 2014), du crenezumab (Cummins et al., 2018 ; Yoshida et al., 2020), ni du ponezumab (Landen et al., 2013). Aucune information n'est disponible à notre connaissance sur ce sujet pour l'aducanumab.

Il semble que l'administration d'anticorps monoclonal anti-A β entraîne en règle générale une augmentation dose-dépendante des concentrations plasmatiques d'A β . Cela a été montré pour le bapineuzumab (Arai et al., 2015 ; Black et al., 2010 ; Brody et al., 2016), l'aducanumab (Ferrero et al., 2016), le solanezumab (Farlow et al., 2012 ; Doody et al., 2014), et le crenezumab (Adolfson et al., 2012 ; Salloway et al., 2018). Contrairement aux autres anticorps, l'administration de ponezumab augmenterait les concentrations plasmatiques d'A β ₁₋₄₀, mais pas d'A β ₁₋₄₂ (Landen et al., 2013 ; Landen et al., 2017a). Nous n'avons pas retrouvé d'information à ce sujet concernant le gantenerumab dans la littérature.

Effets cliniques

La plupart des anticorps monoclonaux anti-A β n'ont pas montré d'efficacité clinique.

Le bapineuzumab n'en a montré ni en phase II (Salloway et al., 2009), ni en phase III (Salloway et al., 2014 ; Vandenberghe et al., 2016), ni dans les études d'extension (Salloway et al., 2018 ; Ivanoiu et al., 2016).

Le solanezumab n'a pas montré d'effet sur les fonctions cognitives des sujets avec une MA légère à modérée, ni en phase I (Siemers et al., 2010), ni en phase II (Farlow et al., 2012), ni en phase III (Doody et al., 2014). Bien qu'un bénéfice clinique ait été suspecté dans le sous-groupe des MA légères en phase III (Doody et al., 2014 ; Liu-Seifert et al., 2015), cela n'a pas été confirmé par Expedition 3 portant seulement sur les MA légères (Honig et al., 2018).

Le crenezumab n'a pas non plus montré d'efficacité clinique dans les MA légères à modérées. Toutefois, une analyse en sous-groupes a montré un ralentissement du déclin cognitif pour les formes

très légères (Cummings et al., 2018), ce qui a été confirmé dans une autre étude (Salloway et al., 2018).

Concernant le gantenerumab, l'étude de phase III SCarlet RoAD chez les MCI a été arrêtée suite à une analyse d'interim n'ayant pas montré de bénéfice clinique. Toutefois, l'analyse en sous-groupes suggère un ralentissement du déclin cognitif chez les fast decliners (Ostrowitski et al., 2017).

Quant au ponezumab, il n'a pas non plus montré d'effet cognitif en phase II chez des sujets présentant une MA légère à modérée (Landen 2017b, Landen 2017a).

Seul l'aducanumab a montré un ralentissement de la diminution des performances cognitives dans les sujets avec une MA légère ou un MCI traités (Sevigny et al., 2016). En Mars 2019, une analyse d'interim des études de phase III a d'abord contesté ces résultats positifs, mais ces résultats ont par la suite été contredits en Octobre 2019 par une étude de plus grande ampleur, semblant confirmer l'effet de l'aducanumab aux doses les plus importantes (Alzforum).

3.3.2.3. Effets des anticorps monoclonaux anti-A β sur l'AAC et ses complications

Anticorps anti-A β et AAC

Nous avons vu plus haut que, dans un contexte de pathologie liée à l'A β chez l'animal ou chez l'homme, l'immunisation active vis-à-vis d'A β augmente les dépôts d'A β vasculaires et les manifestations hémorragiques intracérébrales, au moins de façon transitoire (Boche et al., 2008 ; Sakai et al., 2014 ; Patton et al., 2006). Certains éléments neuropathologiques incitent à penser que la présence et la majoration de l'AAC et des vasculopathies, dans un contexte de réponse immune adaptative contre l'A β , pourrait être un élément important dans le déclenchement des méningoencéphalites observées lors de l'essai ANI792. Dans ce contexte d'une réponse adaptative cellulaire et humorale, il est impossible d'évaluer le rôle précis des anticorps anti-A β ni dans la majoration de l'AAC, ni dans le déclenchement de ces complications hémorragiques ou inflammatoires. En revanche, l'immunothérapie humorale passive en fournit pour cela un bon modèle.

Dans les modèles murins de MA présentant également de l'AAC, tels que la souris Tg2576 ou la souris APP23, l'administration périphérique d'anticorps anti-A β réduit les dépôts parenchymateux, améliore les performances cognitives des souris, mais augmente l'importance des dépôts vasculaires et la survenue de microhémorragies dans les vaisseaux contenant des dépôts amyloïdes (Pfeifer et al., 2002 ; Wilcock et al., 2004 ; Racke et al., 2005). De façon intéressante, tandis qu'un anticorps anti-A β administré par voie périphérique peut majorer l'AAC et déclencher des microhémorragies, ce n'est pas le cas lorsqu'il est administré en intracérébroventriculaire (Thakker et al., 2009). La voie

hématogène serait donc particulièrement pathogène. Cependant, certains auteurs ont rapporté le déclenchement des microhémorragies chez la souris suite à l'administration intracérébrale de ScFv (Kou et al., 2011).

Effets neuropathologiques des anticorps monoclonaux anti-A β sur l'AAC

Peu d'études sont disponibles sur le plan neuropathologique. Chez trois patients traités par bapineuzumab, dont deux ayant présenté un œdème vasogénique, l'examen neuropathologique n'a pas montré d'augmentation de la sévérité de l'AAC comparativement aux sujets contrôles. (Roher et al., 2011 ; Roher et al., 2013). L'un des deux sujets ayant présenté un œdème vasogénique présentait des infiltrats épars de lymphocytes T, principalement périvasculaires (Roher et al., 2013).

Un seul patient traité par solanezumab a été étudié sur le plan neuropathologique, et a montré des dépôts vasculaires sévères (avec un score de 12/12), à rapprocher de l'augmentation très importante de l'A β 40 soluble et insoluble dans les lobes frontaux et temporaux, sans modification de l'A β 42 comparativement à des sujets MA non traités. Cela dit, le fait que cet individu avait un génotype ApoE4/4 a vraisemblablement contribué à la sévérité de son AAC (Roher et al., 2016).

Amyloid-Related Imaging Abnormalities

Durant les essais d'immunothérapie passive par anticorps monoclonaux chez les patients atteints de MA, un certain nombre de sujet ont montré à l'IRM certaines anomalies désignées sous le terme d'Amyloid-Related Imaging Abnormalities ou ARIA, accompagnées ou non de signes cliniques. Les ARIA ont été catégorisées en ARIA-E pour edema/effusion, et ARIA-H pour hémorragie. Les ARIA-E incluaient des images évoquant des œdèmes dits vasogéniques dans le parenchyme cérébral, ou bien une fuite de liquide au niveau sulcale. Les ARIA-H incluaient la formation de dépôts d'hémossidérine correspondant à des microhémorragies parenchymateuses ou à l'apparition d'une sidérose superficielle, ce qui rappelle les manifestations hémorragiques de l'AAC (AAC-he). Quant aux ARIA-E, leur mécanisme physiopathologique suppose un passage de liquide d'origine vasculaire dans la substance blanche, grise, ou dans les espaces leptoméningés pour les effusions sulcales, suite à des altérations vasculaires. Elles ont été rapprochées des manifestations inflammatoires spontanées de l'AAC (AAC-ri) en raison de leurs similarités cliniques, neuroradiologiques, biologiques (hyperprotéïnorachie sans ou avec hypercellularité modérée lymphocytaire), de leur association préférentielle à l'allèle ApoE4, et de leur histoire naturelle (résolution spontanée ou sous corticothérapie) (Sperling et al., 2011). Avant les essais d'immunothérapies passives, certains auteurs avaient rapproché les anomalies histopathologiques des méningoencéphalites survenues lors de l'essai AN1792 des manifestations spontanées de AAC-ri (Attems et al., 2005). La possibilité que les ARIA-E

des immunothérapies passives représentent une forme atténuée de méningoencéphalite a été évoquée par certains auteurs (Frisoni et al., 2012, Viswanathan et al., 2011). Il faut cependant garder à l'esprit qu'il n'y a pas de stimulation de la réponse cellulaire antigène-spécifique lors des immunothérapies passives.

Certains anticorps monoclonaux anti-A β ont d'ailleurs été développés pour limiter la survenue des ARIA.

ARIA-E

La prévalence des ARIA-E spontanées chez les sujets atteints de MA est vraisemblablement très faible, vraisemblablement moins de 0.1% (Carlson et al., 2011).

La fréquence d'apparition des ARIA-E semble dépendre de l'anticorps monoclonal et de la dose-administrée. Cela a bien été montré pour le bapineuzumab, où la fréquence des ARIA-E était de 7.1% à 0.15 mg/kg, 9.8% à 0.5 mg/kg, 22.0% à 1 mg/kg, et 30.8% à 2 mg/kg (Sperling et al., 2012 ; Salloway 2014 ; Ketter et al., 2017). C'était également le cas de l'aducanumab, avec des fréquences de 0% (0/38), 3% (1/31), 6% (2/32), 37% (11/30) et 41% (13/32) chez les patients recevant 0, 1, 3, 6 et 10 mg/kg d'aducanumab, respectivement (Sevigny et al., 2016). Cet effet dose a également été décrit avec le gantenerumab (Ostrowitski 2017). Concernant le solanezumab, aucune ARIA n'a été déclarée en Phase I (Siemers 2010) ni en phase II (Farlow 2012). En phase III, 0.9% (9/1027) des sujets traités par 400 mg (soit de l'ordre de 5 mg/kg) ont présenté une ARIA-E, contre 0.4% (4/1025) des sujets traités par placebo. Cette différence n'est pas statistiquement significative (Doody et al., 2014). Dans un autre essai de phase III incluant seulement des MA légères, 1/1054 sujet a présenté une ARIA-E dans le groupe traité, contre 2/1067 dans le groupe contrôle. Là encore, la différence n'était pas significative (Honig et al., 2018). Cela dit, la relecture des données d'EXPEDITION et de son extension a permis de recenser 19 cas d'ARIA-E chez les sujets traités contre 5 cas chez les sujets contrôles, ce qui rend cette différence significative (Carlson et al., 2016). Concernant le crenezumab, aucune ARIA-E n'a été observée en phase I (Adolfson et al., 2012). En phase II, 1 sujet traité (0.3%) homozygote pour l'ApoE4 a développé une ARIA-E, contre 0/144 placebo (Cummings et al., 2018). Dans l'étude BLAZE, aucune ARIA-E n'a été rapportée (Salloway et al., 2018). Concernant le ponezumab, en phase II chez les sujets atteints de MA légère à modérée, 2/178 sujets traités ont présenté des signes d'ARIA-E : un œdème cérébral, une prise de contraste cérébrale et méningée (Landen 2017b). En phase II mais chez des sujets présentant une AAC, 1 ARIA-E s'est déclarée parmi 24 patients traités (Leurent et al., 2019). Cette différence de fréquence entre sujets atteints de MA et d'AAC suggère encore une fois la nécessité des dépôts vasculaire pour le déclenchement des ARIA-E. On peut dans tous les cas conclure que, comparativement au

bapineuzumab, à l'aducanumab et au gantenerumab, le solanezumab, le crenezumab, et le ponezumab possèdent une bien plus faible propension à déclencher des ARIA-E au cours de la MA.

La fréquence d'apparition des ARIA-E semble également dépendre du nombre d'allèle ApoE4 porté par l'individu. Pour le bapineuzumab, la fréquence des ARIA-E était de 6.8% chez les non-porteurs, 17.6% chez les hétérozygotes, et 36,3% chez les homozygotes (Sperling et al., 2012 ; Salloway 2014). Pour l'aducanumab, la fréquence était de 11% (5/44) chez les non-porteurs et de 27% (22/81) chez porteurs de l'ApoE ε4 (Sevigny et al., 2016). Les mêmes tendances ont été constatées pour le solanezumab (Siemers et al., 2016), le gantenerumab (Ostrowitski et al., 2017),

La plupart des sujets présentent seulement des signes radiologiques, qui semblent précéder l'apparition des signes cliniques (si elle a lieu), et continuer après la résolution clinique. C'est le cas de l'aducanumab (Ferrero et al., 2016). La plupart des ARIA semblent toutefois asymptomatiques. Cela a été montré pour le bapineuzumab (Ketter et al., 2017), l'aducanumab (Sevigny et al., 2016), le gantenerumab (Ostrowitski et al., 2017). Il est possible que les ARIA-E soient plus fréquemment symptomatiques chez les porteurs de l'ApoE4 (Ivanoiu et al., 2016)

Il semble que les ARIA-E aient tendance à se développer dans les zones les plus riches en dépôts amyloïdes, *i.e.* celles montrant un signal PiB élevé à l'inclusion. Ces zones montrent une forte diminution du signal PiB après résolution de l'ARIA. Cela a été décrit notamment pour le bapineuzumab (Sperling et al., 2012) et le gantenerumab (Ostrowitski et al., 2011 ; Klein et al., 2019).

Il semble qu'il n'y a pas ou peu de rechute d'une ARIA-E après reprise du traitement à plus faible dose. Cela a été constaté pour le bapineuzumab (Salloway et al., 2009 ; Sperling et al., 2012)

Les ARIA-E surviennent généralement en début de traitement, lors des premières administrations. Cela a été montré pour le bapineuzumab (Sperling et al., 2012), l'aducanumab (Sevigny et al., 2016), le gantenerumab (Ostrowitski et al., 2017),

Dans le LCR d'un patient ayant présenté une ARIA-E, on n'a pas trouvé de modification du ratio LCR:sérum d'albumine et d'IgG, ni de bandes oligoclonales, ni de modification particulière des paramètres du LCR au moment de l'ARIA-E (Blennow et al., 2012).

Concentrations plus basses at baseline d'Aβ42 dans le LCR des sujets non porteurs de l'ApoE4 qui vont développer une ARIA. Les sujets développant une ARIA-E montrent (Liu et al., 2018)

La présence de microsaignements à l'inclusion n'est pas apparu comme un facteur de risque d'ARIA-E pour le bapineuzumab (Salloway et al., 2012), mais pour le solanezumab (Carlson et al., 2016)

ARIA-H

La fréquence des microsaignements chez les sujets traités semble également dépendre de la dose et du génotype de l'ApoE.

L'effet-dose a été montré pour le bapineuzumab (chez les non-porteurs de l'ApoE4, 1% (1/105) des sujets traités par 0.5 mg/kg ont développé des microsaignements, contre 3% (3/93) des sujets traités par 1 mg/kg (Ivanoiu et al., 2016). Le constat est similaire pour l'aducanumab, avec 5% (2/38), 10% (3/31), 12.5% (4/32), 17% (5/30) et 31% (10/32) de microsaignements chez les patients traités par 0, 1, 3, 6 et 10 mg/kg d'aducanumab, respectivement (Sevigny et al., 2016). Concernant le gantenerumab, cet effet dose n'a pas été observé, puisque des ARIA-H sont survenues chez 13.2% (35/266), 22.9% (62/271), et 16.2% (42/260) des sujets traités par placebo, 105 mg, et 225 mg de gantenerumab, respectivement (Ostrowitski et al., 2017). Concernant le solanezumab, comme pour les ARIA-E, il n'a pas été constaté de différence significative de survenue de microsaignements entre sujets traités et contrôles, en phase III. Dans des patients MA légères à modérée, 4.9% (50/1027) des sujets traités ont présenté une ARIA-H contre 5.5% (57/1025) des sujets traités par placebo (Doody et al., 2014). Dans un autre essai de phase III incluant seulement des MA légères, 3.5% (37/1054) des sujets a présenté une ARIA-H dans le groupe traité, contre 2.8% (30/1067) dans le groupe contrôle (Honig et al., 2018). Ces différences ne sont pas significatives. Concernant les ARIA-H sous crenezumab, 10.3% (31/300) des sujets traités ont développé des microsaignements, contre 14.6% (21/144) traités par placebo ; 0.3% (1/300) sujets traités par crenezumab ont développé une cSS, contre 1.4% (2/144) placebo. Un sujet traité par crenezumab a développé une macrohémorragie asymptomatique, contre 0 dans le groupe placebo (Cummings et al., 2018). Dans l'étude BLAZE, aucun cas de macrohémorragie ni de cSS n'a été rapporté dans le groupe traité. Concernant les microhémorragies, 9/62 cas ont été rapportés chez les sujets traités, contre 1/29 parmi le groupe contrôle (Salloway et al., 2018).

Concernant le ponezumab, en phase II dans la MA légère à modérée, l'incidence des microhémorragies était de 13.8% (19/138) dans le groupe traité, et 19.6% (11/56) dans le groupe placebo (Landen et al., 2017b). En revanche, chez des sujets traités pour une AAC par ponezumab en phase II, il n'a pas été observé de changement significatif dans la survenue des microsaignements (Leurent et al., 2019).

Concernant la susceptibilité aux microsaignements induits par le traitement chez les porteurs de l'allèle ApoE4, cela a été montré pour le bapineuzumab administré à 0.5 mg/kg : 1% (1/105) des non-porteurs ont développé des microsaignements, contre 7.1% (35/490) des porteurs (Ivanoiu et al., 2016). Chez les patients traités par aducanumab, 36% (9/25) des patients avec ARIA-H présentaient une cSS (Sevigny et al., 2016).

Pour le bapineuzumab l'incidence des ARIA-H était de 47% (17/36) chez les sujets avec ARIA-E, tandis qu'elle était de seulement 4% (7/177) chez les sujets traités sans ARIA-E. Chez les sujets avec ARIA-E et ARIA-H, la plupart sont survenues au même moment (14/17) et si dans ce cas, souvent de façon colocalisée (8/14) (Sperling et al., 2012).

Pour l'aducanumab, des ARIA-E et ARIA-H étaient concomitants dans 42% (15/36) des patients présentant une ARIA : 55% (15/27) des ARIA-E présentaient une ARIA-H et 62.5% (15/24) des ARIA-H présentaient ARIA-E (Sevigny et al., 2016). Des tendances similaires ont été constatées pour le solanezumab (Carlson et al., 2016).

Bien qu'il s'agisse d'une manifestation fréquente de l'AAC, les hémorragies intracérébrales (hors cSS) ne sont généralement pas incluses dans les ARIA-H. Elles peuvent survenir, quoique rarement, au cours d'une immunothérapie passive par anticorps monoclonaux. C'est le cas avec le bapineuzumab (Arrighi et al., 2015), l'aducanumab (Sevigny et al., 2016), le solanezumab (Doody et al., 2014).

A titre d'illustration, dans l'étude 3003 du bapineuzumab, 6/490 (2,8%) porteurs d'ApoE4 traités ont présenté une hémorragie intracranienne (hématome lobaire, sous-arachnoïdien, ou intraventriculaire) considérée comme liée au traitement, dont 3 sévère et 1 fatale. Chez les non porteurs traités, 5/198 (2.5%) ont présenté une hémorragie intracranienne, dont une sous-arachnoïdienne classée sévère (Ivanou et al., 2016). Même pour le solanezumab, qui aurait une faible propension à déclencher des microsaignements, deux décès ont eu lieu dans le groupe traité : un AVC hémorragique et une hémorragie intracrânienne (Doody et al., 2014).

Concernant les macrohémorragies sous ponezumab, en phase II dans la MA légère à modérée, 1 sujet a présenté un hématome sous-dural, et 1 cas de cSS a été décrit (Landen et al., 2017b). Chez des sujets traités pour une AAC par ponezumab en phase II, 1 patient a présenté une hémorragie cérébrale, et 1 patient un hématome subdural dans le groupe traité (24 patients), contre 1 hémorragie intracérébrale (12 patients) (Leurent et al., 2019).

De façon intéressante, chez les sujets traités par ponezumab, 7 sujets traités ont présenté des ischémies cérébrales, contre 2 dans le groupe placebo, et 9 sujets traités ont présentés des hypersignaux de la substance blanche, contre 4 dans le groupe placebo (Landen et al., 2017b). Il est donc possible que le ponezumab influence également la composante ischémique de l'AAC.

3.3.2. Essais thérapeutiques utilisant des anticorps naturels anti-A β (IVIg)

L'utilisation des IVIg dans les pathologies liées à l'A β est un modèle intéressant de l'effet des anticorps naturels anti-A β dans ces contextes pathologiques. Cependant, en tant que modèle, les IVIg

présentent certaines limites, dont certaines peuvent toutefois se révéler avantageuses sur le plan thérapeutique :

- i) Les IVIg ne contiennent virtuellement que des IgG : l'effet potentiel des autres isotypes est donc éliminé.
- ii) Les IVIg contiennent des anticorps de multiples spécificités, et pas seulement des anticorps anti-A β . Par exemple, ils contiennent des anticorps anti-Tau (Hromadkova 2015 26616881 ; Smith 2014 24859060)
- iii) Une partie des anticorps anti-A β contenus dans les IVIg sont potentiellement sous forme complexée, dont on ignore les effets pharmacologiques (Klaver 2010 19840873)
- iv) les anticorps anti-A β sont présents en bien moindre quantités que dans une préparation d'anticorps monoclonal
- v) les préparations d'IVIg peuvent également contenir de l'A β , potentiellement pathogène.

Etudes précliniques

Des résultats contradictoires ont été obtenus dans des modèles précliniques. Joly-Amado et al., rapportent que, suite à l'administration d'IVIg humaines en intracérébroventriculaire dans un modèle de souris transgénique, les IgG humaines se distribuent dans le cerveau, dont le cortex et l'hippocampe, mais marquent principalement les neurones, sans marquage ni diminution des plaques, ni modifications des tests de comportement (Joly-Amado et al., 2014 25115543). Cependant, Sudduth et al., rapportent qu'une administration intracrânienne unique d'IVIg provoque les mêmes effets que ceux obtenus avec un anticorps monoclonal anti-A β , bien qu'avec un délai d'apparition retardé de quelques jours : une clairance des dépôts d'A β parenchymateux, une diminution de l'A β soluble et insoluble, une activation de la microglie avec des phénotypes préférentiellement M1 et M2b, plutôt que M2a et M2c. De façon intéressante, le phénotype M2b est connu pour être initié par des complexes immuns (Sudduth et al., 2013). De façon concordante, après administration périphérique d'IVIg, Magga et al., ont montré une co-localisation des IgG humaines et des dépôts parenchymateux d'A β , structures entourées par de la microglie activée (Magga 2010). Puli et al., ont également trouvé une diminution de l'A β soluble central chez la souris traitée par IVIg périphérique, mais n'ont pas trouvé de diminution des dépôts parenchymateux et ont montré une diminution du nombre de cellules microgliales activées et du TNFalpha (Puli 2012 22642812). L'A β soluble dans l'hippocampe, le cortex, et le LCR semble en effet diminué chez les souris transgéniques traitées par IVIg périphériques, tandis que l'A β plasmatique est augmenté (Gu 2014). Une seule dose d'anticorps anti-A β purifiés à partir d'IVIg améliorait les performances cognitives des souris (Mengel et al., 2013). Toutefois, l'administration d'IVIg chez les souris 3xTg-AD a montré une amélioration modeste mais significative des troubles cognitifs associée à une diminution du ratio A β 42/40 solubles chez ces

souris avec amélioration fonctionnelle, ainsi que des dodécamères d'A β , sans effet sur l'A β insoluble ni sur l'accumulation de plaques (St-Amour et al., 2014).

Effets des IVIg dans la Maladie d'Alzheimer

L'une des observations qui supporte l'hypothèse de l'efficacité des IVIg dans la MA, est qu'il semble que les patients traités au long cours par IVIg aient un risque de présenter une MA réduit de 42% par rapport à la population générale (Fillit et al., 2009).

Les résultats des premiers essais chez l'homme semblaient montrer que l'administration d'IVIg augmentait l'A β total dans le sérum, parallèlement à sa diminution dans le LCR. Cet effet semblait inconstant en considérant seulement l'A β_{1-42} (Dodel et al., 2002 ; Dodel et al., 2004). D'autres auteurs ont mentionné cette augmentation de l'A β_{40} et de l'A β_{42} sanguins, quoique de façon temporaire après l'injection d'IVIg, tandis que leur diminution dans le LCR semblait progressive tout au long du traitement (Relkin et al., 2009). Dans des essais plus récents, les mêmes auteurs ont montré que les taux d'A β_{40} ou d'A β_{42} plasmatiques tendaient au contraire à être plus bas dans le groupe traité (Dodel et al., 2013, Relkin et al., 2017).

Des premiers résultats encourageants montraient des améliorations de l'ADAS-Cog (Dodel et al., 2004) et du MMSE (Relkin et al., 2009) en phase II. Si ces effets peuvent avoir été réels à court terme (Kile et al., 2015), les résultats en phase III n'ont pas mis en évidence d'efficacité clinique (Relkin et al., 2017), comme le confirme une méta-analyse (Manolopoulos et al., 2019). Parallèlement, il n'a pas été rapporté d'ARIA-E avec les IVIg (Dodel et al., 2013 ; Relkin et al., 2014). Toutefois, des microsaignements sont survenus chez 6/42 (14%) patients traités, comparativement à 0/14 sujets contrôles, un incidence similaire à celle retrouvée chez les patients traités par bapineuzumab (Dodel et al., 2013).

Problématique et Objectifs

Dans l'introduction, nous avons montré que le terme de peptide A β regroupe un ensemble de peptides ayant une origine commune, différentes longueurs, et pouvant subir des modifications post-traductionnelles variées. Chacun de ces peptides possède une propension plus ou moins importante à adopter une conformation anormale riche en feuillets β , et à s'agréger sous forme d'oligomères neurotoxiques et de fibrilles amyloïdes insolubles. Les fibrilles principalement composées d'A β_{1-42} , s'accumulent dans le parenchyme cérébral et les capillaires au cours de la maladie d'Alzheimer. Les fibrilles principalement composées d'A β_{1-40} s'accumulent dans les vaisseaux artériels au cours de l'angiopathie amyloïde cérébrale (AAC), qui peut se présenter cliniquement et radiologiquement par des manifestations hémorragiques (AAC-he), ou inflammatoires (AAC-ri).

De nombreux travaux expérimentaux ont montré que les anticorps réactifs vis-à-vis de l'A β peuvent moduler son accumulation par de nombreux mécanismes : diminution de sa synthèse, diminution de la fibrilloformation, dégradation de fibrilles préformées, stimulation de la phagocytose microgiale, stimulation des voies de clairance actives ou passives hémato-encéphaliques.

Les anticorps anti-A β font partie des autoanticorps naturels : les IgG, IgA, ou IgM anti-A β sont présentes dans le sang de tous les individus, sains ou malades, principalement sous forme de complexes immuns. De nombreuses études corrélatives ont cherché à mettre en évidence des différences sérologiques entre sujets âgés sains et atteints de maladie d'Alzheimer. Les hypothèses, rarement explicites, qui sous-tendent ces études sont les suivantes : ou bien qu'il existe une variabilité du répertoire naturel des anti-A β qui puisse expliquer la survenue d'une pathologie liée à l'A β chez certains sujets et pas chez d'autres ; ou bien qu'il existe au cours du processus pathologique de déposition d'A β un processus d'immunisation active à l'origine d'anticorps néoformés s'ajoutant aux anticorps naturels anti-A β . Quoi qu'il en soit, les résultats de ces études sont remarquablement contradictoires, ce qui peut s'expliquer partiellement d'une part par la variabilité et des difficultés méthodologiques liées à l'étude des anticorps anti-A β , et d'autre part par les facteurs de variabilité interindividuelle de ces anticorps, qui restent pour la plupart ou bien méconnus, ou bien sujets à controverse.

D'autre part, les études précliniques d'immunisation active ou passive ont apporté une preuve de concept que l'immunothérapie anti-A β pouvait diminuer les dépôts amyloïdes parenchymateux et ralentir la baisse des performances cognitives. Les résultats d'essais cliniques d'immunothérapies actives ou passives anti-A β chez l'homme suggèrent pour certains une diminution des dépôts, mais se sont révélés dans l'ensemble assez décevant concernant les aspects cliniques. La survenue de méningoencéphalite suite à l'immunisation active, et d'effets indésirables appelés ARIA suite à l'administration d'anticorps monoclonaux anti-A β a considérablement limité les doses administrées et le développement de cette piste thérapeutique.

Certains arguments expérimentaux et cliniques suggèrent que les immunothérapies anti-A β ont pourtant tendance à augmenter les dépôts vasculaires, c'est-à-dire l'AAC, peut-être comme voie de clairance des dépôts parenchymateux. Plusieurs travaux ont discuté le lien entre l'AAC et les effets indésirables des immunothérapies anti-A β . Plus spécifiquement, les ARIA déclenchées par l'administration d'anticorps anti-A β ont une similarité frappante avec les manifestations hémorragiques ou inflammatoires spontanées de l'AAC. L'une des hypothèses de notre travail est que des espèces particulières d'anticorps anti-A β présents spontanément chez les individus présentant de l'AAC puissent déclencher des manifestations hémorragiques ou inflammatoires spontanées.

Il semble que les patients en phase aiguë de AAC-ri présentent des concentrations augmentées d'IgG anti-A β dans le LCR, comparativement à des sujets contrôles, AAC non inflammatoires, ou AAC-ri en rémission (Piazza et al., 2013 ; Carmona-Iragui et al., 2016). A partir de l'étude d'un cas, il a été suggéré que ces anticorps étaient issus d'une synthèse intrathécale (DiFrancesco et al., 2011). Cependant, des arguments expérimentaux suggèrent que la voie périphérique serait plus pathogène que l'administration centrale (Thakker et al., 2009). Pourtant, jusqu'à présent, les anticorps anti-A β sériques dans le contexte de l'AAC ont suscité peu d'intérêt.

L'objectif de ce travail est triple. Nous avons présenté nos méthodes et nos résultats en trois parties.

La première partie est méthodologique et a pour objectif la mise au point d'une technique fiable pour l'analyse de différentes caractéristiques des anticorps anti-A β sériques : leurs réactivités vis-à-vis de différentes préparations d'A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₄₂ soluble ou fibrillaire, leurs isotypes (IgG, IgA, IgM et sous-classes d'IgG), leurs concentrations et une estimation de leur avidité apparente pour l'antigène et l'isotype considéré. Cette méthode a pris la forme d'une étude de courbes de dilution suite à un ELISA indirect multiparamétrique sur échantillon de sérum pré-traité en milieu acide.

La deuxième partie se présente comme un ensemble d'études corrélatives entre phénotype sérologique et des variables physiologiques (âge, fonds génétique) ou pathologiques (mutations de l'APP, AAC-he ou AAC-ri), dans des études pilotes chez la souris, mais chez l'homme dans une cohorte d'une centaine de sujets dénommée AACAb. L'objectif était d'étudier d'une part l'existence ou non d'anticorps anti-A β naturels chez la souris, et d'autre part les facteurs physiologiques et pathologiques de variabilité de ces anticorps sérique. Plus particulièrement, l'objectif principale de l'étude AACAb était d'étudier les profils sérologiques associés aux phénotypes cliniques hémorragiques ou inflammatoires de l'AAC.

La troisième partie présente les résultats préliminaires d'une étude expérimentale dans le modèle de souris transgénique APP23, qui présente notamment de l'AAC. L'objectif était de caractériser les propriétés des anticorps anti-A β associées à la majoration de l'AAC et au déclenchement de ses complications. Pour cela, nous avons immunisé des souris sauvages avec de l'A β_{1-40} fibrillaire. Après séparation chromatographique, différentes fractions enrichies en IgG ou en IgM de faible, moyenne, ou forte avidité ont été administrées à des souris APP23, avec pour objectif d'associer manifestations hémorragiques ou inflammatoires à un isotype ou à une affinité particulière.

Matériel & Méthodes

I. Partie méthodologique : Mise au point d'une méthode d'analyse des anticorps anti-A β

I.1. Préparations antigénique

Les peptides synthétiques A β_{1-40} et A β_{1-42} (Proteogenix, Schiltigheim, France ; pureté > 95%) sont dissous dans le 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP; Sigma-Aldrich), et des aliquots de 450 μ g sont distribués dans des tubes à faible rétention. Les aliquots sont ensuite évaporés et séchés par centrifugation sous pression réduite (Speedvac), puis conservés à -20°C jusqu'à utilisation. Les aliquots lyophilisés sont dissous dans 10 μ L de diméthylsulfoxyde (DMSO ; Sigma-Aldrich), soniqués pendant 3 minutes à 300 Watts, puis mélangés avec 90 μ L de solution HEPES 30mM NaCl 10mM Cu²⁺ 10eq pH 7.4 ou HEPES 30mM NaCl 160mM Cu²⁺ 10eq pH 7.4, respectivement pour l'A β_{1-42} et l'A β_{1-40} sous forme soluble, juste avant leur utilisation, ou avec 90 μ L HCl 0.01N ou HEPES 30mM NaCl 160mM pH 7.4 et incubés à 37°C pendant 72h ou 15j, respectivement pour l'A β_{1-42} et l'A β_{1-40} sous forme fibrillaire.

I.2. Contrôle des préparations antigéniques par cryoTEM

Nous avons utilisé la cryomicroscopie électronique à transmission (cryoTEM) afin de valider l'absence ou la présence de structures fibrillaires pour les préparations d'A β_{1-42} dites respectivement « soluble » et « fibrillaire ». L'objectif était de confirmer la présence des espèces attendues, et de s'assurer de leur relative pureté. Par rapport à la TEM conventionnelle, la cryoTEM utilise la « vitrification » directe de l'échantillon. Elle présente donc l'avantage d'être une technique sans marquage, permettant de visualiser l'échantillon dans sa conformation native en solution. Ces expériences ont été réalisées avec l'assistance de Ghislaine Frébourg (Service de microscopie électronique, Institut de Biologie Paris-Seine, Sorbonne Université).

Un faible volume de préparation (5 μ L à 1,5 mg/mL) a été déposé sur un support formé d'une grille de cuivre de 300 mesh. Dans ce maillage se trouve un réseau de carbone à trous, servant à retenir l'échantillon. L'excès d'échantillon a été absorbé de façon à ne laisser sur la grille qu'un film aqueux de 100 nm d'épaisseur. La grille a ensuite été plongée de façon extrêmement rapide dans de l'éthane liquide refroidi par un bain d'azote liquide. L'éthane sert de cryofixateur et permet la bonne vitrification de l'échantillon. La grille a alors été montée sur un porte-objet (Gatan Inc., Warrendale, PA) et observée au cryomicroscope électronique à transmission (JEOL 2100HC, 200kV, filament LaB6). La capture d'image a été effectuée en mode « zero-loss » à l'aide d'une caméra CCD équipée d'un filtre d'énergie Gif Tridiem (Gatan Inc., Warrendale, PA), avec une résolution de 2k x 2k pixels. L'acquisition des images a été réalisée avec le logiciel Digital Micrograph (version 1.83.842, Gatan Inc., Warrendale, PA).

I.3. Contrôle des préparations antigéniques par réaction à la Thioflavine T

À l'instar du rouge Congo, les dérivés de la thioflavine sont des ligands spécifiques des structures amyloïdes. La fluorescence de la ThT a été utilisée ici afin de caractériser l'absence de structures amyloïdes dans les préparations d'A β soluble, et leur présence dans les préparations d'A β fibrillaires. D'après Jan et al. (2010), 15 μ L/puits de préparation d'A β (Cf I.1.) ont été distribués dans une plaque de 96 puits à fond noir (Costar), avec 185 μ L de tampon Glycine-NaOH 0,1 M pH 8,5. Une solution de Thioflavine T (ThT) (10 μ L à 100 μ mol/L) a été ajoutée, puis la fluorescence a été mesurée avec une longueur d'onde d'excitation (λ_{exc}) de 450 nm, et une longueur d'onde d'émission ($\lambda_{ém}$) de 485 nm.

I.4. Détection des anticorps anti-A β par ELISA multiparamétrique

Les peptides A β_{1-40} et A β_{1-42} sous formes solubles ou fibrillaires (s40, s42, f40 ou f42) fraîchement préparés sont dilués à 15 μ g/mL dans une solution de HEPES 30mM NaCl 10mM Cu $^{2+}$ 31 μ M pH 7.4, HEPES 30mM NaCl 10mM pH 7.4, HEPES 30mM NaCl 160mM Cu $^{2+}$ 33 μ M pH 7.4 et HEPES 30mM NaCl 160mM pH 7.4, respectivement pour s42, f42, s40 and f40, distribués dans les plaques ELISA (Greiner BioOne) et incubés à 4 °C pendant 18h. Le tampon correspondant sans A β est ajouté dans les puits servant ultérieurement à mesurer le signal non spécifique.

Les échantillons contenant des anticorps subissent une épreuve de dilution (sérums humains : 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:25600 ; sérums murins : 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:12800 ; Ac monoclonal BAM-10 (1 mg/mL): 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560, 1:5120, 1:10240, 1:20480, 1:40960, 1:81920). L'anticorps monoclonal BAM-10 a été directement dilué dans du PBS 1X BSA 2%, tandis que les échantillons biologiques ont subi une étape de dissociation dans un tampon 0.1 M Glycine-HCl buffer pH 3.0 pendant 40 minutes à 20°C afin de dissocier les complexes immuns (Li et al. 2007), puis une étape de neutralisation avec un volume égal de PBS 2X BSA 4% NaOH 0,02N. Les échantillons dilués sont immédiatement distribués en plaque et incubés 1h à 20°C sous agitation légère. Après 8 lavages au PBS Tween-20 0,05%, les IgG, IgA, ou IgM humaines ou murines sont détectées par ajout d'anticorps polyclonaux correspondants conjugués à la peroxydase (dilution 1:5000 dans une solution de PBS Tween-20 0.05%, Jackson ImmunoResearch Inc.) pendant 1h à 20°C sous agitation légère. Pour la révélation des anticorps anti-sous-classes d'IgG humaines, des anticorps monoclonaux de souris anti-IgG1, -IgG3 et IgG4 ont été utilisés (clones NL16, RJ4, ZG4 ; dilution 1:5000 dans une solution de PBS Tween-20 0.05%, gracieusement donné par le Dr Margaret Goodall, Université de Birmingham, UK). Les expériences préliminaires réalisées en utilisant un anti-IgG2 (GOM2) n'ont pas donné de signaux spécifiques suffisants pour être analysés. Après incubation 18h à +4°C et lavages, les plaques sont incubées avec un anticorps polyclonal anti-IgG murines (dilution 1:5000 dans une solution de PBS Tween-20 0.05%, Jackson ImmunoResearch

Inc.). Après lavages, les anticorps sont révélés avec une solution substrat de H₂O₂/o-phenylenediamine dans l'urée 0.15M à pH 5.0. La réaction est stoppée par une solution d'H₂SO₄ 2N. L'absorbance (densité optique, DO) est ensuite mesurée à 492 nm, et le signal du blanc est soustrait au signal total.

1.5. Détection des anticorps anti-A β par résonance plasmonique de surface

La résonance plasmonique de surface (SPR) est une méthode qui permet de mesurer en temps réel et sans marquage une interaction ligand-récepteur. Nous nous sommes servis de cette méthode pour contrôler certains résultats obtenus par ELISA, notamment concernant la dissociation des complexes immuns circulants. Ces expériences ont été réalisées avec l'assistance de Tahar Bouceba (Plateforme Interactions moléculaires, Institut de Biologie Paris Seine, Sorbonne Université).

Les plasmons de surface sont des ondes évanescentes présentes à l'interface entre une couche de métal et un milieu diélectrique. Lorsque l'onde électromagnétique émise par un faisceau laser est réfléchi par la couche de métal, une partie de l'énergie est dissipée sous forme de plasmons de surface. La fixation de molécules de l'autre côté de l'interface va modifier les caractéristiques de ces ondes, en particulier leur amplitude (**Figure 4.A**). Ce phénomène va alors se traduire par une variation de l'intensité du faisceau réfléchi ainsi que par une modification de l'angle de réfraction, paramètres qui peuvent être mesurés en temps réel (**Figure 4.B-D**).

Les analyses de SPR ont été réalisées avec le système BIAcore® 3000 (BIAcore, GE Healthcare). Les groupements carboxyliques des chaînes de dextran présents sur d'une puce CM5 ont été activés pendant 7 mn à 10 μ L/mn par un mélange éthyl(diméthylaminopropyl)carbodiimide 400 mM / N-hydroxysuccinimide 100 mM (EDC/NHS). Une aliquote de 150 μ g peptide A β a été reprise dans 5 μ L de DMSO puis 70 μ L de PBS, diluée à 20 μ M dans un tampon acétate de sodium 10 mM à pH 4.0, puis injecté pendant 10 mn avec un flux de 10 μ L/mn. Les groupements carboxyliques résiduels ont ensuite été inactivés par une solution d'éthanolamine 1M pendant 7 mn à 10 μ L/mn. À la fin de cette étape d'immobilisation, le canal montrait une réponse de 6756 RU (Response Units) correspondant à la fixation du peptide sur la surface de la puce.

Les échantillons de sérums ont été analysés dans des conditions les plus proches possibles de la technique ELISA, à 25°C et un flux de 10 μ L/mn. Après une étape de dissociation en milieu acide en tampon Glycine 0,1 M / HCl, pH 3,0 pendant un temps variable, le milieu a été neutralisé volume à volume par un tampon PBS 2X / Tween20 0.1% / BSA 4% / EDTA 6 mM / NaOH QSP pH final 7.4, ce mélange correspondant également au tampon de course.

Une fois neutralisé, chaque échantillon a été immédiatement injecté dans le système, avec un temps d'association de 5 mn, suivi de 8 mn de dissociation. Après chaque passage d'échantillon, la puce a été régénérée par 5 μ L d'une solution de NaCl 1M / NaOH 0,05N pendant 30sec. L'anticorps

monoclonal anti-A β de souris (BAM-10, ThermoFisher©) et l'anticorps polyclonal anti-A β de lapin (OC, Merck Millipore) ont servi de contrôles positifs, et un anticorps non pertinent (polyclonal anti-IgG humaine, ThermoFisher©) a servi de contrôle négatif.

Les résultats ont été calculés de la manière suivante. Pour chaque échantillon, on a soustrait au signal du canal d'intérêt présentant le peptide A β le signal obtenu avec le même échantillon passé en parallèle sur un canal nu. C'est cette différence de signal exprimé en RU, qui est mesurée en temps réel. Un sensorgramme a ainsi été obtenu, présentant le signal en fonction du temps. La différence de signal entre le début et la fin de l'injection correspondait à la fixation spécifique d'un partenaire sur l'A β . Après la fin de l'injection, la décroissance de la différence de signal au cours du temps correspondait à la dissociation du ligand. Les paramètres cinétiques et l'analyse des données ont été réalisés avec le logiciel BIAEvaluation (version 4.1, GE Healthcare).

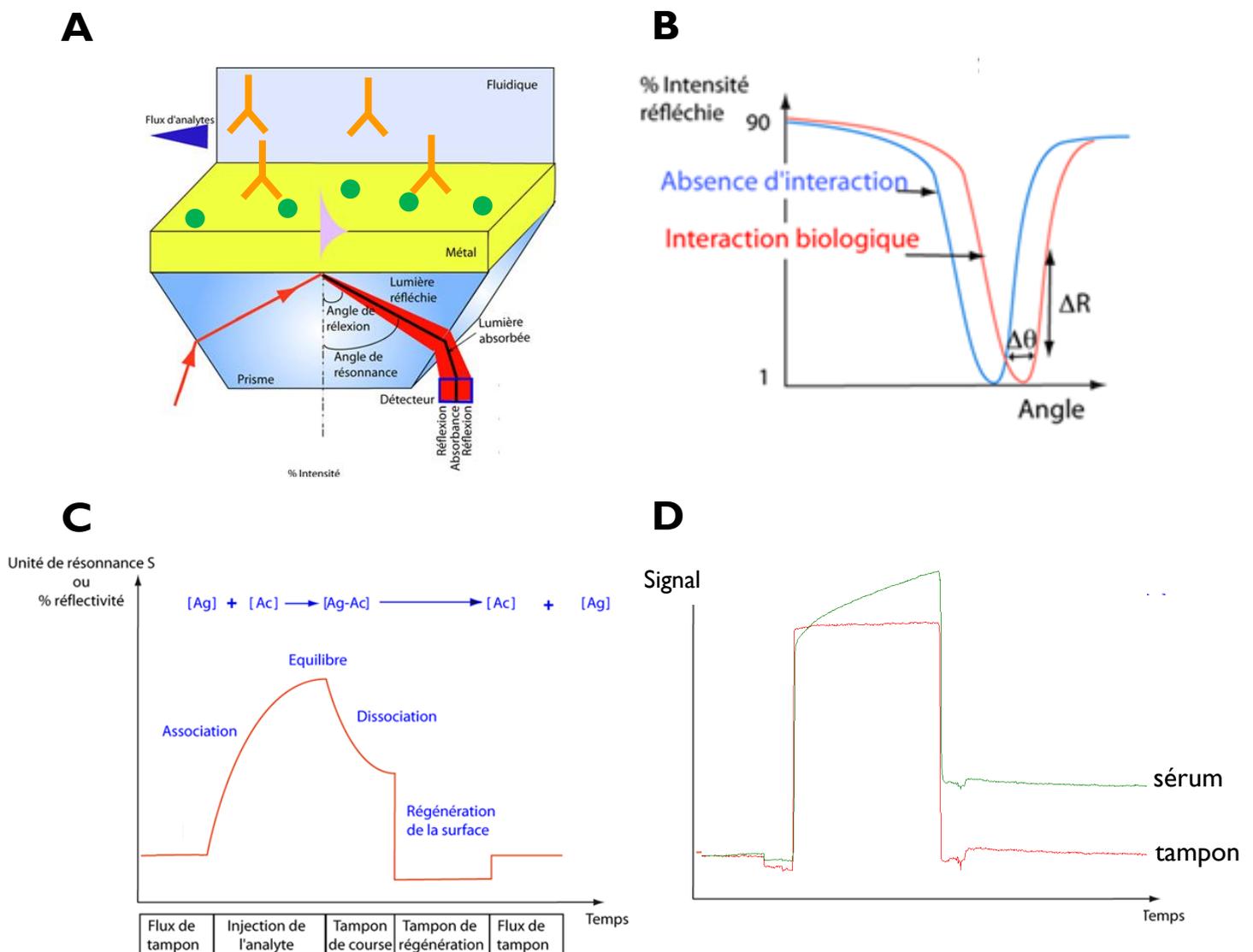


Figure 4. Principe de la Résonance Plasmonique de Surface (SPR). **A.** Lorsque l'onde électromagnétique émise par un faisceau laser est réfléchi par la couche de métal, une partie de l'énergie est dissipée sous forme de plasmons de surface. La fixation de molécules de l'autre côté de l'interface va modifier les caractéristiques de ces ondes, en particulier leur amplitude. **B.** Ce phénomène va alors se traduire par une modification de l'angle de réflexion et, pour un angle donné, par une variation de l'intensité du faisceau réfléchi. **C-D.** La fixation ou la dissociation d'un complexe en surface de la puce peuvent être mesurés en temps réel et représentés par un Sensorgramme.

I.6. Analyse des courbes de dilution obtenues par ELISA

Toutes les analyses des courbes de dilutions ont été faites de façon automatisée sous le logiciel R, au moyen d'un code *ad hoc* présenté en Annexe I. Nous présentons ici la démarche générale de cette analyse :

Une première étape est la modélisation des blancs. Chaque dilution d'échantillon étant passée dans un puits unique, et non en duplicat ou triplicat, il est important de pouvoir d'affranchir de valeurs aberrantes pouvant survenir en ELISA. Les valeurs de DO obtenues sur puits non coâtés sont modélisées par un modèle linéaire (**Figure 5.A**)

$$DO = a \times \frac{1}{\text{Log}_{10}(\text{dilution})} + b$$

Les valeurs expérimentales déviant de plus de 2 sd des valeurs prédites par le modèle sont exclues, et la droite des moindres carrés est recalculée, dans la limite d'exclusion de 2 valeurs expérimentales. Le signal non spécifique théorique calculé pour les différentes dilutions est soustrait aux valeurs expérimentales obtenues sur puits coâtés.

Après soustraction des blancs, le signal obtenu par l'épreuve de dilution de l'échantillon par ELISA a une allure sigmoïde en coordonnées semi-logarithmiques, lorsque l'on représente le logarithme du facteur de dilution en abscisse, et la DO en ordonnées (**Figure 5.B**). Une courbe sigmoïde dans un repère orthonormé est caractérisée par deux asymptotes et un point d'inflexion. Dans le cas présent, l'asymptote de gauche correspond au plafonnement du signal obtenu en excès d'anticorps, donc à faible dilution (Maximum, Max), tandis que l'asymptote de droite correspond à la perte de signal à forte dilution, donc quand la concentration en anticorps tend vers 0. Lorsque la courbe sigmoïde est symétrique, l'ordonnée du point d'inflexion est à Max/2, l'abscisse du point d'inflexion étant une définition possible du « titre ». Dans un échantillon de sérum, le titre dépend donc de la concentration d'anticorps. En effet, la courbe étant modélisée selon un facteur de dilution et non une concentration d'anticorps, si un prélèvement en contient une plus grande quantité pondérale, la courbe est décalée vers les dilutions plus fortes. Une dernière caractéristique de la courbe est la pente de la tangente à la courbe au point d'inflexion, correspondant mathématiquement à sa dérivée. De nombreux modèles d'équations donnent une courbe sigmoïde. Nous nous sommes intéressés à deux de ces équations pour décrire nos données expérimentales, l'une à 4 paramètres :

$$DO \text{ spécifique} = \frac{a}{1 + b \cdot e^{-c \cdot x}} + d$$

l'autre à 5 paramètres :

$$DO\ spécifique = \frac{a}{(1 + b \cdot e^{-c \cdot x})^e} + d$$

Comme expliqué plus loin dans les résultats, c'est finalement le modèle à 4 paramètres qui a été retenu pour l'analyse des courbes de dilutions obtenues par ELISA. La valeur de *Maximum* retenue a été déterminée après linéarisation en représentation de Lineweaver-Burk et extrapolation de l'ordonnée à l'origine de la droite de régression, après exclusion des valeurs expérimentales supérieures à 2 sd. (**Figure 5.C**). La modélisation de la courbe sigmoïde suivant le modèle à 4 paramètres décrit plus haut est celle passant le mieux par les points expérimentaux par la méthode des moindres carrés non linéaire. Comme précédemment, les valeurs aberrantes, i.e. présentant un écart par rapport au modèle > 2 sd des écarts expérimentaux ont été exclus, et les paramètres alors recalculés.

La constante d correspond à l'asymptote de droite, soit 0 dans notre modèle. La constante a correspond à l'asymptote de gauche et donc au *Maximum*. Dans le modèle à 4 paramètres, le *Titre* correspond à $\ln(b)/c$ et correspond au facteur de dilution en unité logarithmique qui correspond à la moitié du Max. La *Pente* au point d'inflexion de la courbe sigmoïde peut être calculée par $-c/4$. Elle est exprimée en perte de DO relative par unité de facteur de dilution (en unités de logarithme décimal). Un dernier paramètre expérimental, la constante apparente d'association $K'A_{App}$, reflétant l'avidité, a été calculé après linéarisation en suivant l'équation suivante (**Figure 5.D**), d'après Orosz et Ovadi, 2012 :

$$\frac{1}{1 - \frac{DO}{a}} = K'A_{App} \times \frac{a \times 10^{-x}}{DO} + d$$

La valeur du Max (en DO) dépend de la durée de révélation de l'enzyme, mais a été normalisée dans la suite afin de s'affranchir de la variabilité inter-plaque, en utilisant un pool de sérums comme étalon interne dans chaque plaque.

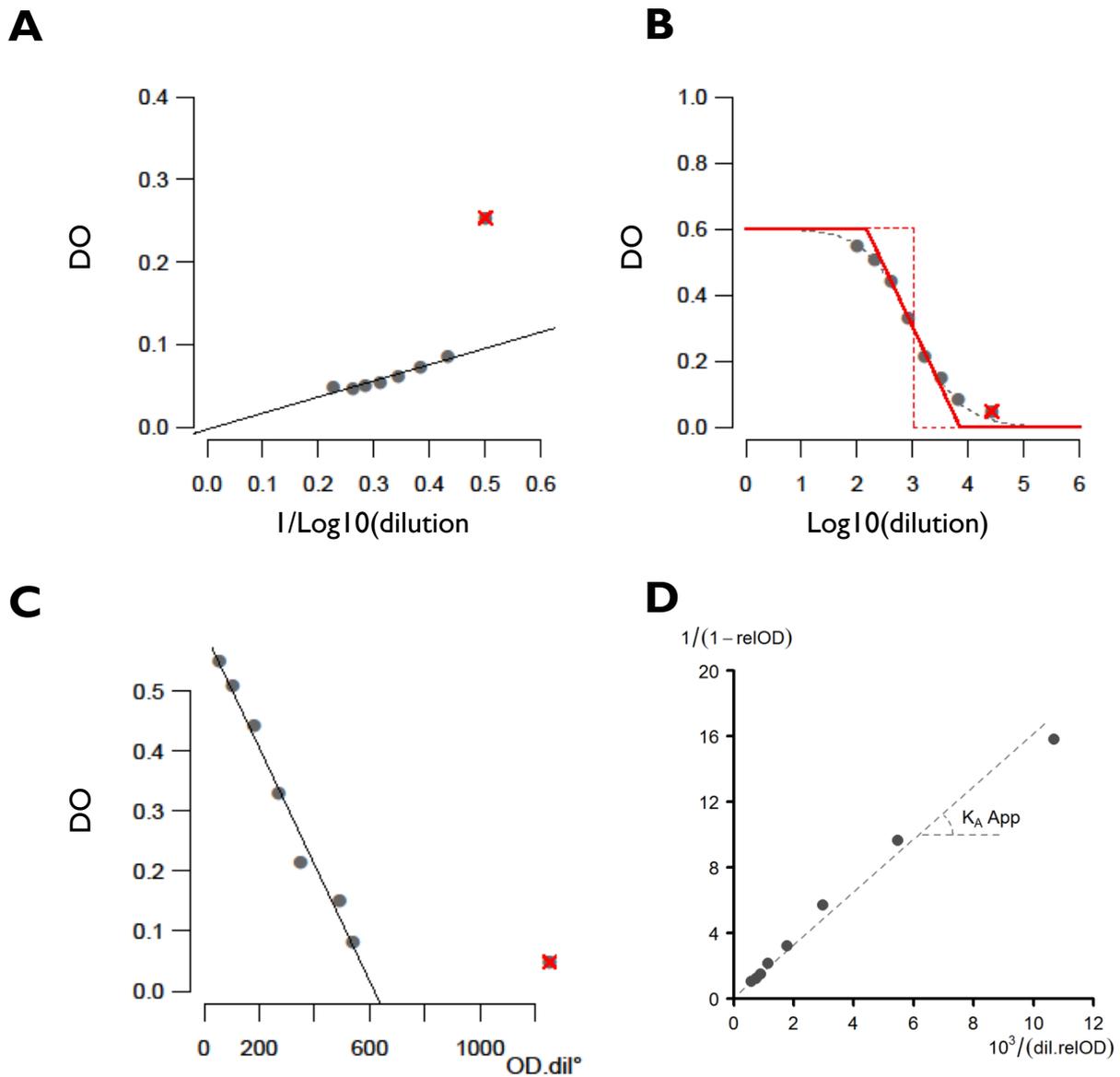


Figure 5. Principales étapes de la modélisation des courbes de dilution des anticorps anti-A β . **A.** Modélisation linéaire du signal non spécifique obtenu sur les puits non coâtés illustré pour un sérum. Les points déviant de ± 2 sd par rapport à la droite de régression sont exclus et biffés en rouge, et le modèle linéaire est recalculé. Les valeurs de DO des blancs théoriques sont alors soustraites aux valeurs de DO obtenues sur A β . **B.** Modélisation de la courbe sigmoïde à 4 paramètres en utilisant la valeur du Maximum modélisé en C. **C.** Représentation de Lineweaver-Burke du signal spécifique servant à modéliser le Maximum théorique obtenu pour le sérum non dilué. Les points déviant de ± 2 sd par rapport à la droite de régression sont exclus, et le modèle linéaire est recalculé. **D.** Estimation de la constante apparente d'association K'A App par la méthode d'Orosz.

2. Etude corrélative – Variations physiologiques et pathologiques des anticorps anti-A β sériques

2.1. Animaux

2.1.1. Variations physiologiques

L'existence d'anticorps anti-A β naturels chez la souris n'avait à notre connaissance jamais été étudiée. Nous avons cherché à détecter ces anticorps dans des échantillons de sérums de différentes lignées syngéniques de souris (C57BL/6, SJL, Balb/c, CBA et DBA). Afin d'étudier si la présence d'anticorps anti-A β chez la souris est dépendante de la présence de lymphocytes T, nous avons comparé la réactivité de sérums de souris CD3 KO, et de souris C57BL/6 du même âge. Tous les prélèvements de sang ont été faits en submandibulaire.

2.1.2. Variations pathologiques

Nous avons cherché à comparer les anticorps anti-A β dans différents modèles murins transgéniques de pathologies liées à l'A β , toujours dans le fond C57BL/6 (7 animaux de 15 mois par souche) : le modèle APP23 (Sturchler-Pierrat et al., 1997) et le modèle APPPS1 (Radde et al., 2006). Les deux modèles présentent la double mutation « suédoise » de l'APP (K670N/M671L), localisée hors de la séquence codant l'A β , et synthétisent donc tous les deux un A β humain non muté. Ce seul transgène, incluant le promoteur neuronal Thy1, est présent dans le modèle APP23, et occasionne des dépôts d'A β et des dépôts vasculaires. Dans le modèle APP-PS1, un transgène supplémentaire exprimant la préséniline-1 avec la mutation L166P est exprimé, et les dépôts d'A β y sont essentiellement parenchymateux.

2.2. Sujets humains

2.2.1. Variation en fonction de l'âge

Nous avons cherché à étudier les variations sérologiques anti-A β chez l'homme en fonction de l'âge. Nous avons analysé les anticorps anti-A β par ELISA dans des échantillons de sérums de sujets de différents âges prélevés pour contrôle de leurs sérologies vaccinales : des jeunes enfants âgés de 14 mois à 4 ans (n=8 ; 14, 16, 19, 24, 24, 34 mois, 4, et 5 ans), des enfants ou adolescents âgés de 9 à 15 ans (n=7 ; 9, 9, 10, 11, 12, 15, et 15 ans), et des adultes âgés de 45 à 82 ans (n=5 ; de 45, 47, 53, 55, 82 ans).

2.2.2. Variations pathologiques : corrélation entre profil sérologique et phénotype clinique de l'angiopathie amyloïde cérébrale (étude AACAb)

L'objectif de cette étude était de corréler différents profils sérologiques concernant les anticorps anti-A β , obtenus par la technique ELISA multiparamétrique présentée dans la partie I, et différentes manifestations de l'AAC entre 3 groupes de sujets : des sujets âgés cognitivement normaux sans signe clinique ou radiologique d'AAC (contrôles), des sujets présentant des manifestations hémorragiques d'AAC (CAA-he), et des sujets présentant une forme inflammatoire d'AAC (CAA-ri).

2.2.2.1. Sujets

Cette étude cas-témoins a recruté ses participants entre le 1^{er} Janvier 2013 et le 1^{er} Juin 2020, au moyen d'un réseau de 9 unités neurovasculaires françaises. Les patients adultes ont été inclus dans 3 groupes : des sujets âgés cognitivement normaux sans signe clinique ou radiologique d'AAC (contrôles), des sujets présentant des manifestations hémorragiques d'AAC (CAA-he), et des sujets présentant une forme inflammatoire d'AAC (CAA-ri). Les patients du groupe CAA-he remplissaient les critères révisés de Boston (Linn et al. 2010) pour une AAC probable ou certaine. Les patients du groupes CAA-ri remplissaient les critères clinico-radiologique proposés par Auriel et al. (2012)

Les critères d'inclusion pour le groupe contrôle étaient : âge > 55 ans, IRM récente réalisé dans le cadre du soin courant avec séquences de diffusion normales, dans un contexte d'accident ischémique transitoire, symptômes neurologiques fonctionnels, ou symptômes d'origine périphérique. Les critères d'exclusions pour le groupe contrôle étaient : un déclin cognitif (version courte de l'Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly (IQCODE-R) > 3.4); hémorragie intracérébrale lobaire à l'IRM ; AVC ischémique récent ; score Fazekas \geq 2 pour les hypersignaux de la substance blanche.

Les données démographiques, l'histoire médicale, et les IRM cérébrales ont été collectées à l'admission. Pour l'AAC inflammatoire, les échantillons de sang ont été collectés durant la phase aiguë, avant tout traitement. Les aliquots de sérums ont été conservés à -80°C avant leur analyse.

Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique "Paris Ile de France V ». Tous les participants ou leur représentant ont reçu une information orale et écrite sur l'objectif de l'étude, et ont donné leur consentement pour y participer. Tous les sujets ayant donné leur consentement et remplissant les critères d'inclusion ont été inclus.

2.2.2.2. Imagerie

La classification des sujets dans les différents groupes diagnostiques a été réalisée par un neurologue confirmé spécialisé en neurologie vasculaire (Jean Capron) et en aveugle des données biologiques. Les microsaignements lobaires ont été définis comme des petits signaux ronds hypointenses en séquence T2*-GRE, profonds de 10 mm ou moins dans le parenchyme cérébral, et évalué suivant l'échelle MARS (MH anatomical rating scale ou MARS ; Gregoire et al., 2009). Le score Fazekas a été utilisé pour l'évaluation des hypersignaux de la substance blanche, de 0 à 3 (0 : aucun ; 1 : ponctué ; 2 : faiblement confluents ; 3 : confluent ; Fazekas et al., 1987). La sidérose corticale superficielle (cSS) était définie comme un signal homogène curvilinéaire dans les couches superficielles du cortex cérébral en séquence T2*-GRE, dans l'espace sous-arachnoïdien, distant d'au moins deux sulci d'un hémisphère, sans hypersignaux correspondant en séquence FLAIR. La cSS a été quantifiée par la cSS multifocality scale (Charidimou et al., 2017).

2.2.2.3. Contrôles qualités de la méthode ELISA

Plusieurs éléments ont été mis en place afin de minimiser la variabilité expérimentale de l'ELISA multiparamétrique.

Tout d'abord, un pool de sérums, conservé en de nombreux aliquots congelés, servant d'étalon interne était analysé dans chaque expérience. La valeur absolue du Max (en DO) dépendant de la durée de révélation, les valeurs du Maximum analysées pour chaque sérum, chaque antigène et chaque isotype étaient normalisées par rapport au *Maximum* de cet étalon interne.

Ensuite, un autre pool de sérums (également conservé en aliquots congelés) servant de contrôle interne était analysé dans chaque expérience : n'ont été prises en compte que les expériences donnant des paramètres de courbe du contrôle interne < 2.5 sd des valeurs moyennes usuelles. De plus, toute modélisation de la sigmoïde donnant un $R < 0.9$ était écartée.

Enfin, la réalisation des ELISA et l'analyse des paramètres des courbes étaient réalisées en aveugle de la classification clinique des sujets. En outre, les expériences étaient organisées de telle façon que chacune inclue des échantillons de chaque groupe clinique, pour que tout biais expérimental sur un essai donné impacte chaque groupe clinique de la même façon.

2.2.2.4. Calcul des coefficients de pondération du MAST-Index

Le principal objectif de la cohorte AACAb était de corrélérer des phénotypes cliniques et sérologiques. Une première stratégie a défini des biomarqueurs appelés « MAST-Index », pour *Maximum*, *Avidity*, *Steepness*, et *Titer*, les 4 paramètres des courbes de dilutions obtenues en ELISA anti-A β pour un antigène et un isotype donné, selon la formule :

$$MAST\ Index = a \times Maximum + b \times Avidité + c \times Pente + d \times Titre$$

La sélection des coefficients de pondération a, b, c et d du modèle s'est faite en sélectionnant les coefficients du premier axe de l'Analyse en Composantes Principales (ACP) réalisée sur l'ensemble des données de la cohorte, en regroupant les données de Maximum, Avidité, Pente et Titre obtenues pour les différents antigènes et les différents isotypes.

3. Partie expérimentale : effets de préparations enrichies en IgG ou IgM anti-A β de faible, moyenne, et forte avidité sur les manifestations de l'AAC dans la souris APP23

3.1. Immunisation de souris sauvages

Des souris sauvages C57BL/6 âgées de 6 semaines ont été immunisées par l'A β ₁₋₄₀ selon une stratégie de « prime/boost ». De l'A β ₁₋₄₀ fibrillaire en suspension dans du PBS et émulsionnée dans un même volume d'adjuvant complet de Freund (CFA) ou d'adjuvant incomplet de Freund (IFA) respectivement pour le priming et le rappel, a été administré aux animaux en sous-cutané (100 μ g/souris, soit 2x20 μ g/coussinet plantaire postérieur + 60 μ g à la base de la queue). Le rappel a été effectué 15j après la première immunisation. L'ensemble de la procédure s'est déroulé sous anesthésie, par inhalation d'un mélange d'isoflurane (Aerane®, Baxter) dans l'air ambiant à 4% avec un débit de 300mL/min en induction puis 2,5% pour le maintien. Les prélèvements de sang périphérique ont été effectués à partir de la veine mandibulaire et ont été collectés à J-1, J6 et J25, respectivement pour les sérums contenant des anticorps supposés naturels, des anticorps induits d'affinité modérée, et des anticorps induits de haute affinité.

3.2. Collection de sérum par ponction intracardiaque

Un prélèvement sanguin en intracardiaque a été effectué sous anesthésie par mélange Xylazine/Kétamine (100 mg/kg et 10 mg/kg) entraînant la mort de l'animal. La profondeur de l'anesthésie est vérifiée par l'absence de reflexe de retrait suite au pincement des coussinets plantaires : la procédure était poursuivie uniquement quand l'animal était sous narcose profonde. Une aiguille était introduite sous le plexus sternal pour atteindre le ventricule gauche, et un volume de 1mL de sang total a été prélevé en moyenne, entraînant la mort de l'animal par exsanguination.

3.3. Fractionnement des protéines sériques par chromatographie d'exclusion de taille

Les sérums de souris sauvages immunisées ont été collectés et poolés par groupe d'immunisation (souris non immunisées, « primées » ou « boostées »). Un volume de 500 μ L de sérum par fractionnement a été injecté dans une colonne de chromatographie d'exclusion de taille (Sephacryl S200 HR 16 mm x 65 cm) au moyen d'une pompe péristaltique à un débit de 0,2 mL/min. Pour chaque échantillon on collecte 20 tubes correspondant aux fractions contenant les IgMs, les IgGs et l'albumine de 150 à 350 minutes (1 tube / 10 minutes). L'absorbance à 280 nm est mesurée en sortie de colonne au moyen d'une lampe au deuterium et permet d'évaluer la quantité de protéines et de tracer le profil d'élution.

3.4. Identification des fractions enrichies en IgM par immuno-empreinte

Les fractions non dissociées ont été analysées par électrophorèse de zone en gel fin d'agarose 0.8% au moyen d'un automate Hydrasis (Sebia). Une fois la migration électrophorétique effectuée, les protéines ont été transférées par simple pression sur une membrane de nitrocellulose (15 g/cm², 10 min). La membrane a été saturée par du lait écrémé à 5% en PBS, lavée par du PBS Tween 20 0.05%, et incubée avec un anticorps polyclonal anti-IgM murines conjugué à la peroxydase (HRP) au 1:5000 dans du PBS Tween 20 0.05% pendant 1h. Après lavages, la révélation a été faite par chimiluminescence.

3.4. Immunisation passive de souris APP23

Des souris transgéniques APP23 âgées de 15 mois ont reçu chacune 2 injections intra-péritonéales de PBS à 3 semaines d'intervalle, de fractions enrichies en IgG ou en IgM de faible, moyenne, ou forte avidité (1,5 mg de protéines par dose), provenant des souris des groupes immunisés (cf. 3.1). Les animaux ont été sacrifiés à 17 mois, soit 2 mois après la première administration, par ponction intracardiaque.

3.5. Sacrifice des souris APP23 immunisées et préparation des cerveaux

Un prélèvement sanguin en intracardiaque a été effectué sous anesthésie (cf. précédemment) entraînant la mort de l'animal. La profondeur de l'anesthésie est vérifiée par l'absence de réflexe de retrait suite au pincement des coussinets plantaires : la procédure était poursuivie uniquement quand l'animal était sous narcose profonde. Une aiguille était introduite sous le plexus sternal pour atteindre le ventricule gauche, et un volume de 1mL de sang total a été prélevé en moyenne, entraînant la mort de l'animal par exsanguination.

L'encéphale des animaux a été extrait et immergé dans du paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 24 heures puis dans du sucrose/PBS 30% pendant 72 heures. Après séparation des deux hémisphères, chaque demi-cerveau a été divisé en deux parties, antérieure et postérieure, par une section coronale au niveau de l'hippocampe, chaque quart de cerveau a été intégré dans de l'Optimal Cutting Temperature (OCT), refroidi par du nitrogène liquide et congelé à -80°C. Des sections de 10 µm d'épaisseur ont ensuite été réalisées au cryostat et montées sur des lames SuperFrost.

3.5. Histochimie et immunohistochimie

Les colorations histologiques ont été réalisées avec de l'hématoxyline/éosine et par la procédure de Perls (bleu de Prusse) selon des protocoles standards (Carson et al., 2009).

Pour le marquage de l'A β et du CD31, les tissus ont d'abord été rincés avec du PBS puis ont subi une étape de saturation par PBS-BSA 3% Triton-X100 1% pendant 1 heure à température ambiante (RT), ont été rincés 3 fois, puis ont été incubés 1 heure RT en présence de l'anticorps monoclonal de souris anti-A β (BAM-10, Thermo Scientific, Rockford, USA) (1/200), rincés 3 fois, puis ont été incubés 30 minutes à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire (goat anti-mouse IgG DyLight 594) (1/1000) ; les tissus ont ensuite subi une étape de démasquage des épitopes, induite par la chaleur (Heat-Induced Epitope Retrieval), puis incubés 24 heures à +4°C en présence de l'anticorps polyclonal de lapin anti-CD31 (1/50) (Abcam ab28364), rincés 3 fois, incubés 2 heures à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire (goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 647) (1/200), rincés 3 fois, puis incubés 3 minutes en présence de DAPI (1/1000) et enfin montés grâce à de l'Immunomount medium. Pour le marquage anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) et anti-ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1), la saturation a été réalisée pendant 1 heure à température ambiante par PBS-BSA 5%-Tween 0,5%, puis les tissus ont été incubés 24 heures à +4° avec un anticorps polyclonal de lapin anti-Iba1 (Wako, Osaka, Japan) (1/200), 30 minutes à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire (goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594) (1/1000), 1 heure à température ambiante en présence de l'anticorps anti-GFAP conjugué (Alexa Fluor 488 mouse anti-GFAP, BD Pharmingen) (1/200), rincés de la même manière 3 fois entre chaque étape, incubés 3 minutes en présence de DAPI (1/1000) et montés.

3.6. Méthode d'analyse

Pour chaque souris, une lame provenant de la région antérieure et une lame provenant de la région hippocampique ont été étudiées. Concernant l'immunohistochimie, deux images au niveau du cortex frontal et quatre images au niveau de l'hippocampe ont été enregistrées à un grossissement x10, selon des paramètres d'acquisition (gain, temps de pause) constants, sur un microscope à épifluorescence. La quantification des événements a ensuite été réalisée, grâce au logiciel Fiji, par binarisation du signal puis par mesure du pourcentage de l'aire marquée par l'anticorps (A β , CD31, GFAP ou Iba1) par rapport à l'aire totale de l'image ; concernant les colorations histologiques, les deux lames par souris ont été observées dans leur totalité en microscopie optique en lumière blanche et les événements comptabilisés de façon non automatisée.

4. Analyses Statistiques

La plupart des analyses statistiques ont été faites avec le logiciel R. Les analyses statistiques des données histologiques ont été faites avec Graphpad Prism. Les tests utilisés étaient non-paramétriques, bilatéraux, au seuil $\alpha=0,05$, à l'exception des tests *post-hoc*, unilatéraux. Les corrélations ont été faites en utilisant le *Tau-b* de Kandall. La correction de Bonferroni pour comparaisons multiples a été utilisée pour la significativité des MAST-Index. Les courbes ROC (Receiver operating characteristic) ont été utilisées pour estimer la sensibilité et la spécificité des marqueurs et définir les seuils optimaux pour un maximum de précision (moyenne de la sensibilité et de la spécificité). Nous avons choisi de limiter notre analyse des MAST-Index à une analyse univariée pour éviter de sélectionner des modèles où un grand nombre de variables permettent d'adapter artificiellement le modèle aux valeurs expérimentales. Concernant les analyses par régressions logistiques, nous avons choisi de ne pas réaliser d'analyse univariée pour éviter les biais liés à des comparaisons multiples. Les variables des modèles de régression logistique multivariée ont été sélectionnées par approche par étapes (régression pas à pas). Les critères pour retenir une variable dans le modèle étaient que toutes les variables soient significativement associées au risque d'appartenir au groupe des « cas » (testé par le test de Wald, avec $p<0.05$) et que l'introduction de cette variable donne une augmentation significative de la variance expliquée par le modèle contre le modèle à k-1 variable (testé par le Likelihood Ratio Test ; $p<0.05$). Les Variance Inflation Factors (VIFs) ont été calculés dans chaque modèle final pour s'assurer de l'absence de colinéarité entre variables. Pour rappel, un VIF de 1 est obtenu en absence de colinéarité, tandis qu'un VIF > 5 signale une grande colinéarité.

Résultats

I. Partie méthodologique : Mise au point d'une méthode d'analyse des anticorps anti-A β

I.1. Préparations de différentes formes agrégées d'A β

Quatre préparations de peptide A β ont été utilisées pour les expériences présentées dans la suite du manuscrit : de l'A β_{1-42} soluble (s-42), de l'A β_{1-42} fibrillaire (f-42), de l'A β_{1-40} soluble (s-40), et de l'A β_{1-40} fibrillaire (f-40). Nous avons contrôlé l'absence ou la présence de structures fibrillaires amyloïdes dans ces préparations par deux méthodes : la cryo-microscopie électronique à transmission (cryoTEM) et la fluorescence de la Thioflavine T (ThT).

L'absence ou la présence de structures fibrillaires dans les préparations d'A β_{1-42} soluble et fibrillaire ont d'abord été évaluées par cryoTEM. La cryoTEM utilise une technique de vitrification instantanée d'un échantillon en solution, qui permet de préserver des structures qui pourraient être modifiées au cours du dépôt sur support solide lors de la TEM conventionnelle. Seules de rares structures punctiformes ont pu être observées par cryoTEM dans la préparation d'A β_{1-42} soluble (**Figure 6.A-B**). Au contraire, de nombreuses structures filamenteuses ont été observées dans la préparation d'A β_{1-42} fibrillaire, compatibles avec des fibrilles amyloïdes (**Figure 6.C-D**).

L'abondance relative en structures amyloïdes dans les préparations d'A β_{1-40} et d'A β_{1-42} solubles et fibrillaires, a ensuite été contrôlée par fluorescence de la Thioflavine. A l'instar du rouge Congo, les thioflavines sont des colorants qui présentent des propriétés particulières lorsqu'elles se lient à de l'amyloïde. Lorsqu'elle est liée à de la substance amyloïde, la ThT émet une fluorescence à 485 nm, pour une longueur d'onde d'excitation à 450 nm. Cette méthode nous a permis de contrôler la cinétique de fibrillation des préparations d'A β_{1-40} et d'A β_{1-42} fibrillaires (**Figure 7.A**). Comme il est décrit dans la littérature, l'A β_{1-42} s'agrège en fibrilles rapidement, en environ 48h dans nos conditions expérimentales, tandis que la cinétique de formation des fibrilles d'A β_{1-40} est beaucoup plus lente (environ 5 jours), et variable entre aliquots. La cinétique de formation des fibrilles d'A β_{1-42} était un obstacle à l'obtention de plaques ELISA sensibilisées avec de l'A β non fibrillaire, car il n'était pas exclu que l'A β_{1-42} ne s'agrège durant l'étape de coating. Des ions Cu²⁺ ont été ajoutés aux préparations d'A β soluble afin d'éviter la formation de fibrilles (Matheou et al., 2015). En effet, à partir de 1 équivalent de Cu²⁺, la formation de fibrilles est inhibée (**Figure 7.B**). De façon intéressante, l'addition de Cu²⁺ est capable de dissocier des fibrilles préformées (**Figure 7.C**). La fluorescence relative de la ThT pour les 4 préparations antigéniques est présentée en **Figure 7.D**. La préparation d'A β_{1-40} présente la même réactivité, faible, à la ThT que la préparation d'A β_{1-42} , qui ne contient pas de structures fibrillaires observables par cryoTEM. En revanche, les deux préparations fibrillaires montrent des intensités de fluorescences élevées en présence de ThT.

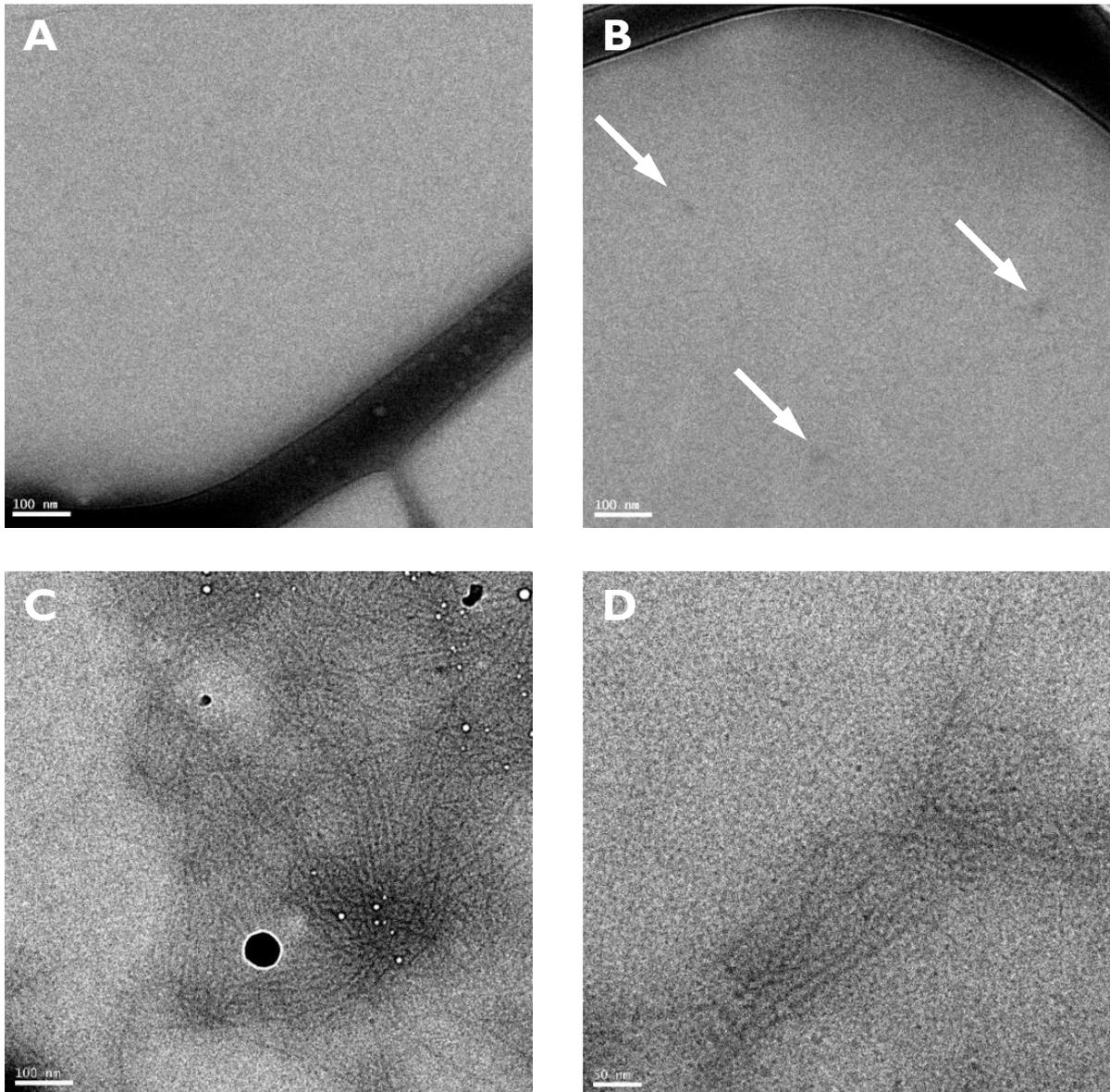


Figure 6. Caractérisation des préparations de peptide $A\beta_{1-42}$ par cryoTEM. **A-B:** Préparation d' $A\beta_{1-42}$ soluble (barres d'échelle : 100 nm), De rares structures ponctiformes ont été observées dans la préparation (**B**, flèches). **C-D:** Préparation d' $A\beta_{1-42}$ fibrillaire (barres d'échelle : 100 nm (**C**) et 50 nm (**D**)). De très nombreuses structures fibrillaires ont été observées dans la préparation.

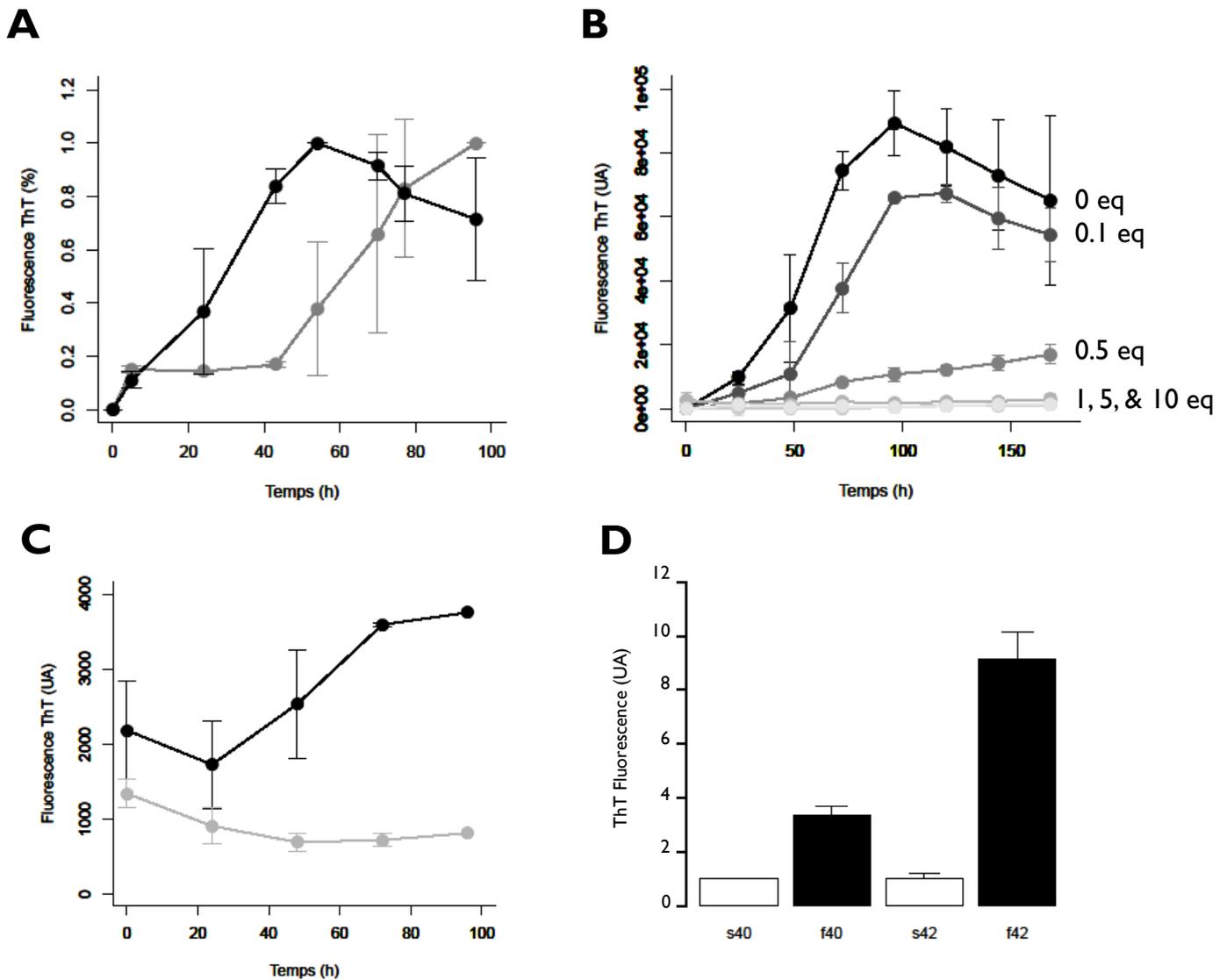


Figure 7. Caractérisation des préparations de peptide Aβ₁₋₄₀ et Aβ₁₋₄₂ par fluorescence de la Thioflavine T (ThT). **A.** Cinétique d'apparition de la fluorescence de la ThT à 485 nm pour les préparations d'Aβ₁₋₄₂ dans une solution d'HCl 0.01 N (courbe noire) et pour l'Aβ₁₋₄₀ dans un tampon HEPES 30mM, NaCl 160 mM, pH 7.4, exprimé en % du signal maximum de chaque peptide (moyenne ± écart-type sur 3 expériences indépendantes). **B.** Cinétique d'apparition de la fluorescence de la ThT à 485 nm pour la préparation d'Aβ₁₋₄₀ en présence de concentrations croissantes de Cu²⁺ (moyenne ± écart-type sur 3 expériences indépendantes). **C.** Cinétique de diminution de la fluorescence de la ThT à 485 nm pour la préparation fibrillaire d'Aβ₁₋₄₂ en absence (courbe noire) et en présence (courbe grise) de Cu²⁺ (1 éq. ; moyenne ± écart-type sur 3 expériences indépendantes). **D.** Fluorescence de la ThT dans les préparations d'Aβ₁₋₄₀ et d'Aβ₁₋₄₂ soluble et fibrillaire rapportée à la fluorescence des préparations d'Aβ₁₋₄₀ soluble. (moyenne ± écart-type sur 3 expériences indépendantes).

1.2. Importance du pré-traitement en phase acide pour la détection des anticorps anti-A β circulants par ELISA

Les préparations antigéniques décrites au paragraphe précédent ont été utilisées comme antigène immobilisé pour la détection des anticorps anti-A β sériques par ELISA. Plusieurs études (Li et al., 2007 ; Gustaw-Rothenberg et al., 2010 ; Britschgi et al., 2009) ont souligné l'importance de démasquer les anticorps anti-A β circulant sous forme complexée par un prétraitement en phase acide. Le pH et le temps de dissociation optimaux dans nos conditions expérimentales était une dissociation des échantillons durant 40 minutes à pH 3.0. Ces conditions permettaient d'obtenir le meilleur compromis entre signal total obtenu sur des puits coatés par l'A β , et le signal non spécifique obtenu sur des puits non coatés (**Figure 8.A-B**).

Nous avons comparé les signaux obtenus pour un même échantillon de sérum avec ou sans dissociation ou neutralisation (**Figure 8.C**). Un sérum dissocié, neutralisé et incubé immédiatement en présence d'A β immobilisé en phase solide donne un signal mesuré important. En revanche, un sérum non dissocié, donc laissé à pH 7.4, donne un signal très proche du bruit de fond. De même, un sérum dissocié mais non neutralisé, donc laissé à pH 3.0, ne donne qu'un signal très faible, indiquant que la liaison antigène-anticorps ne peut se faire qu'à pH physiologique, mais qu'une étape en phase acide est nécessaire à leur détection. De façon intéressante, le même échantillon dissocié, puis neutralisé, mais laissé 24h avant d'être incubé en présence d'A β immobilisé en phase solide, ne donnait qu'un signal faible, indiquant que le démasquage est temporaire et réversible, et ne résulte pas d'une création artificielle de reconnaissance antigénique à la suite de l'incubation en pH acide.

Nous avons confirmé l'importance de l'étape de dissociation pour la détection des anticorps anti-A β circulants par une autre méthode que l'ELISA, en utilisant la Résonance Plasmonique de Surface (SPR). Comme observée par ELISA, la fixation d'un ligand sérique sur l'A β immobilisé était plus faible sans dissociation (13 Response Unit (RU)) qu'après dissociation pendant 20, 40 ou 60 min (47, 52, et 33 RU, respectivement). Le temps optimal de dissociation était 40 min, comme déterminé par ELISA (**Figure 8.D**).

L'étude des courbes de dilution d'échantillons de sérums humains passés avec ou sans dissociation préalable montre qu'une part importante des IgG et des IgM réactives vis-à-vis de l'A β circulent sous forme complexée (**Figure 8.E-F**). De façon intéressante, nous avons observé le même phénomène en étudiant les auto-anticorps réactifs vis-à-vis d'un autre antigène : les IgG et les IgM anti-actine (**Figure 8.G-H**). Le fait que certains auto-anticorps circulent sous forme complexé n'est donc pas restreint aux anticorps anti-A β .

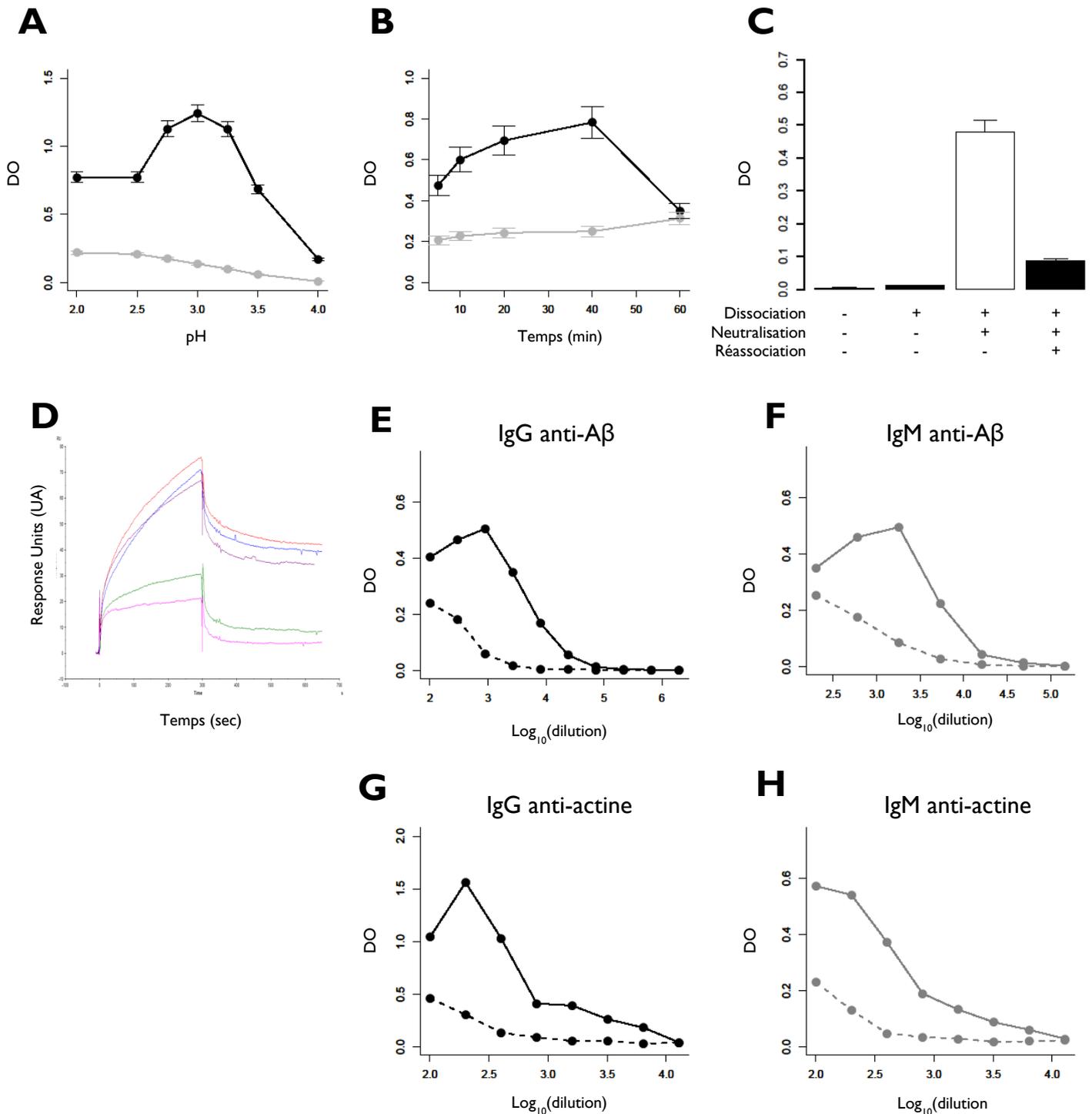


Figure 8. Effet du protocole de prétraitement en milieu acide / neutralisation sur la liaison des anticorps sériques humains au peptide Aβ par ELISA indirect. **A.** Liaison des IgG à l'Aβ (courbe noire) ou aux puits non-coatés (courbe grise ; signal non spécifique) après 40 min de dissociation à différents pH (moyenne ± écart-type pour un sérum représentatif passé au 1:100 en triplicats ; n=8). **B.** Liaison des IgG à l'Aβ (courbe noire) ou aux puits non-coatés (courbe grise ; signal non spécifique) après dissociation à pH 3.0 pour différents temps (moyenne ± écart-type pour un sérum représentatif passé au 1:100 en triplicats ; n=8). **C.** Signal spécifique (différence de signal obtenu entre le puits coaté par l'Aβ et le blanc) pour un sérum représentatif passé au 1:100 en triplicats dans différentes conditions de dissociation et de neutralisation (n=3). **D.** Sensorgramme obtenu sur Aβ par Résonance Plasmonique de Surface avec du tampon (rose) ou un sérum passé au 1:100 dans différentes conditions de dissociation (vert : sans dissociation ; bleu : 20 min ; rouge 40 min ; violet : 60 min). **E-H.** Courbes de dilution d'un sérum humain (dissocié : courbe pleine ; non dissocié : tirets) obtenu en révélant les IgG (E) et IgM (F) anti-Aβ et les IgG (G) et IgM (H) anti-actine.

I.3. Modélisation des courbes de dilution

I.3.1. Modèle sigmoïde et propriétés des anticorps

Afin d'améliorer l'étude de la variabilité des anticorps anti-A β sériques, nous avons modélisé les courbes de dilutions obtenues par ELISA. Le signal obtenu par l'épreuve de dilution de l'échantillon dissocié et neutralisé par ELISA a une allure sigmoïde en coordonnées semi-logarithmiques, lorsque l'on représente le logarithme du facteur de dilution en abscisse, et la DO en ordonnées (**Figure 9.A**).

Une courbe sigmoïde symétrique dans un repère orthonormé est caractérisée par l'ordonnée des deux asymptotes, ainsi que par les valeurs de l'abscisse et de la pente de la courbe au point d'inflexion. Dans le cas présent, l'asymptote de gauche correspond au plafonnement du signal obtenu en excès d'anticorps, donc à faible dilution (*Maximum* ou *Max*). Lorsque la courbe sigmoïde est symétrique, l'ordonnée du point d'inflexion est à $Max/2$, tandis que l'abscisse du point d'inflexion est une définition possible du *Titre* (« concentration ou dilution pour laquelle on obtient la moitié du signal maximal »). Une dernière caractéristique de la courbe est la *Pente* de la tangente à la courbe au point d'inflexion, ce qui correspond mathématiquement à la valeur de la dérivée de la courbe au point d'inflexion.

De nombreux modèles d'équations décrivent des courbes sigmoïdes symétriques. De façon arbitraire, nous nous sommes intéressés au modèle suivant :

$$DO\ spécifique = \frac{a}{1 + b \cdot e^{-c \cdot x}} + d$$

Ce modèle, qui comprend une exponentielle, présente 4 constantes (a , b , c , d). Ces 4 constantes ne sont pas toutes directement équivalentes à la valeur des 4 paramètres qui permettent intuitivement de décrire la sigmoïde (*Maximum*, *Minimum*, *Titre* et *Pente*), mais elles le sont indirectement (**Tableau I**). De la même façon, les paramètres de la sigmoïde sont dépendants, de façon complexes, des propriétés de l'isotype d'anticorps révélé par la technique : la concentration en anticorps ; la constante apparente d'association ($K'A\ App$), qui reflète l'avidité moyenne des anticorps présents dans l'échantillon ; le nombre d'épitopes distincts susceptibles d'être reconnus par les anticorps présents dans l'échantillon (diversité de reconnaissance). D'après Orosz et al., 2002, la constante apparente d'association ($K'A\ App$, ou *Avidité*) peut être évaluée par une méthode de linéarisation de la courbe sigmoïde (**Figure 9.B**), correspondant à la fonction suivante :

$$\frac{1}{1 - \frac{DO}{a}} = K' A_{App} \times \frac{a \times 10^{-x}}{DO} + d$$

Le *Titre* dépend de la *Concentration*, mais aussi de l'*Avidité* et donc de diverses conditions expérimentales susceptibles de faire varier l'affinité de telle ou telle espèce monoclonale vis-à-vis de telle ou telle forme antigénique (température, force ionique, pH,...). Dans nos conditions expérimentales, l'asymptote de droite (*d*) correspond à la perte de signal à forte dilution, donc quand la concentration en anticorps est nulle et que le signal spécifique théorique (différence de signal obtenu entre un puits coaté par l'Aβ et un puits non coaté) tend vers 0, donc *d*=0. Quant au *Maximum*, il correspond au signal obtenu en excès d'anticorps (**Figure 9.C**), et sa valeur (en DO) varie en fonction du temps de révélation, du nombre de sites de liaison coatés et reconnus par les anticorps présents dans l'échantillon (**Figure 9.D**). Dans des conditions d'excès d'anticorps, il existe une compétition entre des espèces monoclonales d'affinités et de concentrations différentes, révélées ou non par l'anticorps anti-isotype conjugué. La valeur du signal (en DO), dépend donc également de ces phénomènes de compétition, et donc indirectement de la concentration et de l'avidité globale des espèces révélées ou non.

Tableau I. Correspondance entre constantes de l'équation, caractéristiques de la sigmoïde, et propriétés des anticorps.

Caractéristiques de la sigmoïde	Définition mathématique	Dépend de
Minimum	$d(=0)$	bruit de fond
Maximum	a	coating diversité de reconnaissance concentrations et avidités relatives des isotypes révélés et non révélés
Titre	$\ln(b)/c$	concentration avidité
Pente (Avidité apparente)	$-a.c/4$ (obtenue après linéarisation)	-

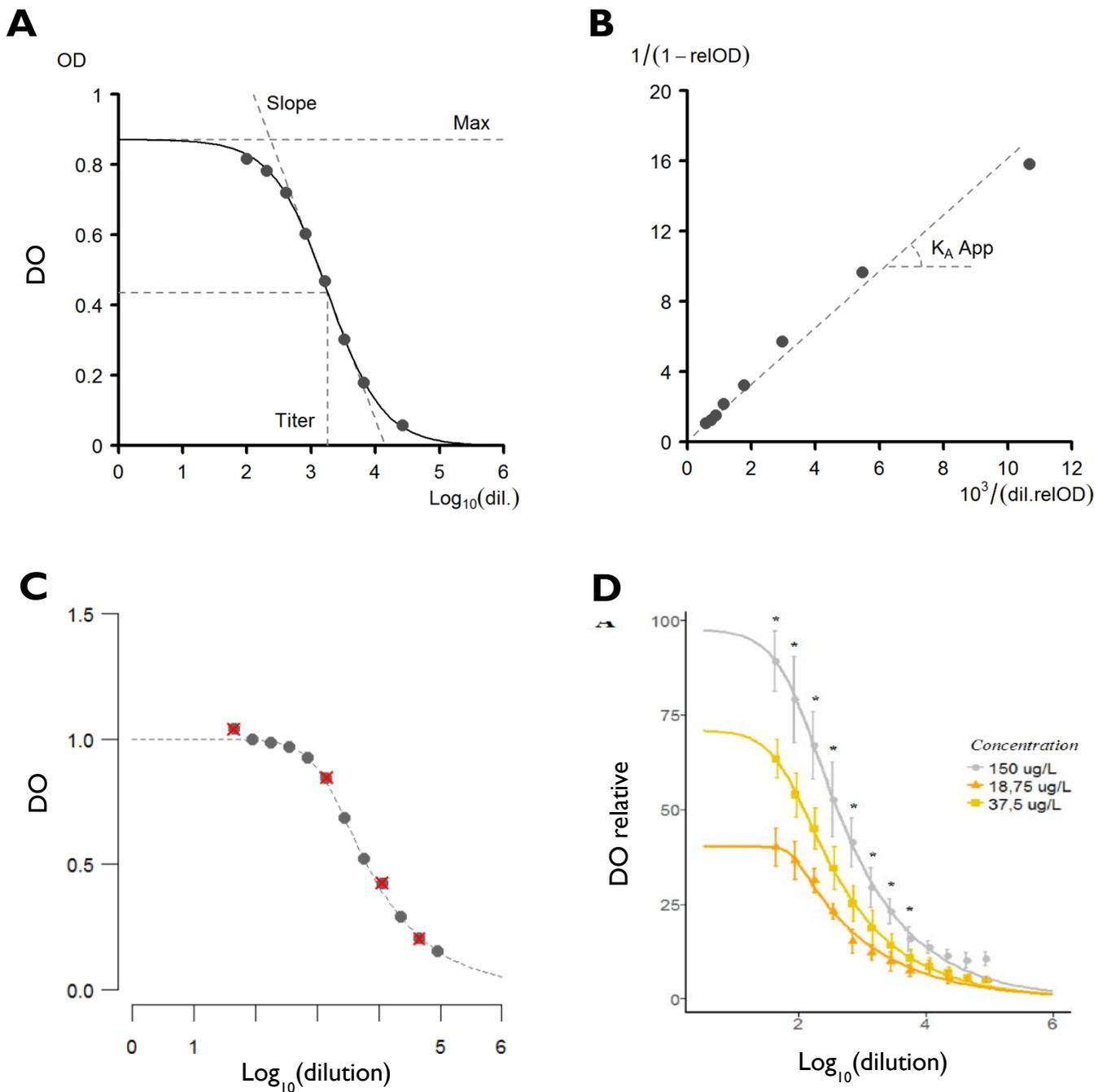


Figure 9. Détermination des paramètres de la courbe de dilution des anticorps anti-A β sériques par modélisation de la sigmoïde et procédure de linéarisation. **A.** Courbe de dilution obtenue à partir d'un sérum humain après dissociation en milieu acide des complexes immuns circulants et neutralisation, incubé sur une plaque sensibilisée à l'A β ₁₋₄₂ soluble et révélée avec un anticorps anti-IgG. Les points sont les valeurs expérimentales. La courbe pleine est la modélisation sigmoïde, qui permet la détermination: i) du Maximum, qui correspond au plateau théorique du sérum non dilué; ii) du *Titre*, qui correspond à la valeur de la dilution au point d'inflexion (soit le Maximum/2); iii) la *Pente* au point d'inflexion. **B.** Procédure de linéarisation des mêmes points expérimentaux, suivant Orosz et al., 2002 pour la détermination de la constante apparente d'avidité (K'_A App). **C.** En excès d'anticorps, ici BAM-10, le signal atteint un plateau car tous les sites de liaison sont saturés. **D.** La hauteur de ce plateau dépend, entre autres, de la quantité d'antigène coâté sur la plaque.

I.3.2. Comparaison de deux modèles sigmoïdes

En plus du modèle d'équation sigmoïde symétrique décrit au point précédent, nous nous sommes intéressés à un modèle de sigmoïde avec une constante supplémentaire traduisant un coefficient d'asymétrie de la courbe sigmoïde, correspondant à l'équation suivante :

$$DO\ spécifique = \frac{a}{(1 + b \cdot e^{-c \cdot x})^e} + d$$

Les R^2 et le nombre de points exclus par les deux modèles sigmoïdes appliqués aux courbes de dilutions obtenues avec l'anticorps monoclonal anti-A β BAM-10 (n=18), et avec des sérums humains (n=30) ont été comparés. Concernant BAM-10, les deux modèles ont montré d'excellentes performances ($R^2=0,949$ et $R^2=0,985$, respectivement pour les modèles à 4 et 5 paramètres ; $p < 0,0001$; test de Mann & Whitney). Cette différence était toujours en faveur du modèle à 5 paramètres en excluant les valeurs aberrantes, c'est-à-dire les points expérimentaux déviant de plus de 2 sd par rapport au modèle. La comparaison des deux modèles est illustrée en **Figure 10.A-B**. Concernant les échantillons de sérum humain, illustrés en **Figure 10.C-D**, la comparaison des deux modèles a également montré des performances favorables au modèle à 5 paramètres, mais très ténues ($R^2=0,990$ et $R^2=0,996$, respectivement pour les modèles à 4 et 5 paramètres ; $p\text{-val.} < 0,0001$; test de Mann & Whitney). Après élimination des valeurs aberrantes, cette différence n'était plus significative ($R^2=0,997$ et $R^2=0,997$, respectivement pour les modèles à 4 et 5 paramètres ; $p\text{-val.} = 0,17$; test de Mann & Whitney).

Il est attendu que le modèle à 5 paramètres, qui possède un degré de liberté supplémentaire, présente des performances supérieures qui se traduisent par de meilleurs R^2 et des valeurs modélisées plus proches des valeurs expérimentales, donc moins de valeurs aberrantes. Nous avons choisi de privilégier le modèle à 4 paramètres, plus parcimonieux, pour l'étude d'échantillons de sérum, car dans notre protocole qui autorise la suppression de valeurs aberrantes, ce modèle n'a pas montré de moins bonnes performances que le modèle à 5 paramètres, malgré le degré de liberté supplémentaire de ce dernier.

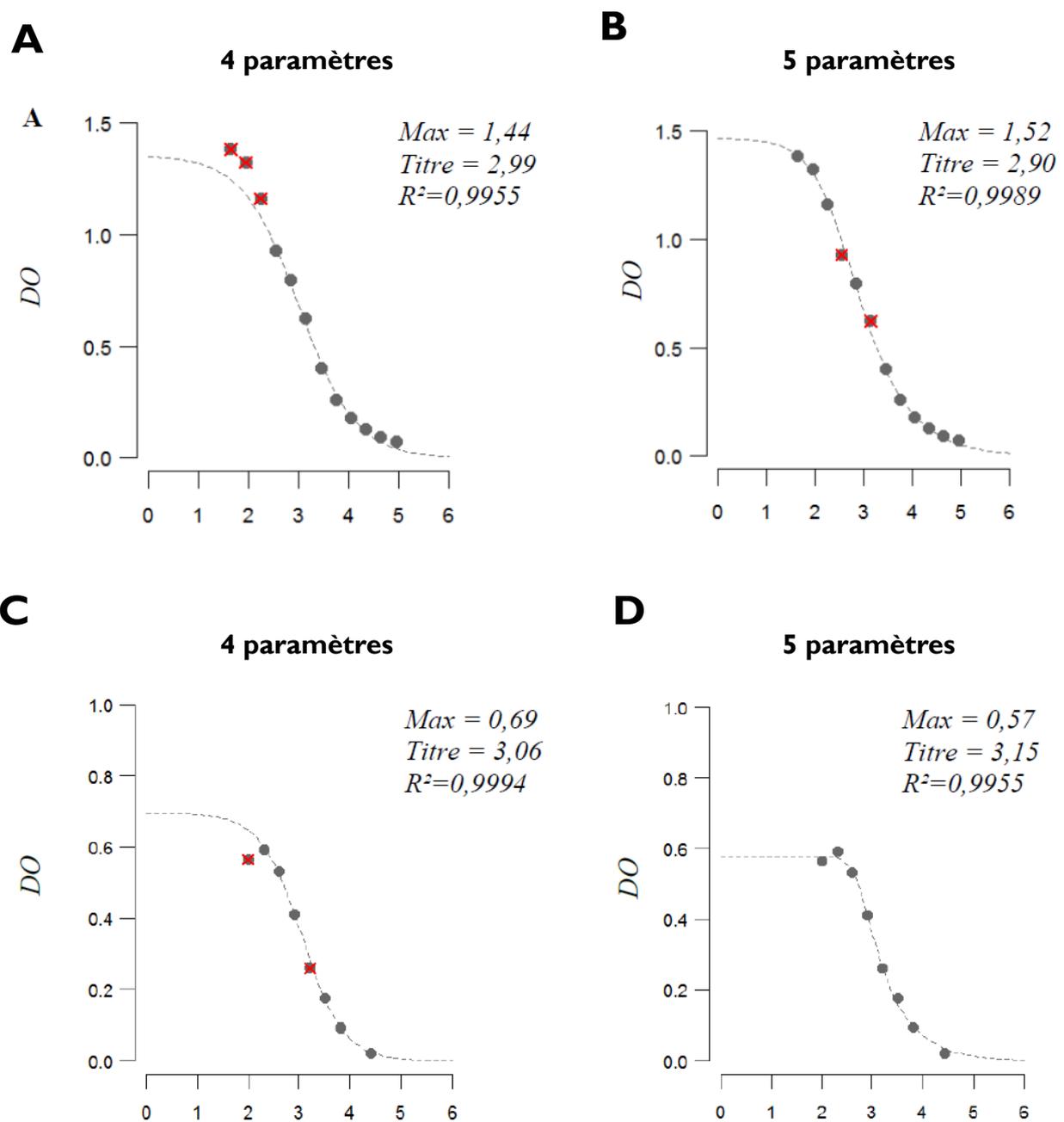


Figure 10. Comparaison de la modélisation du signal spécifique obtenu par un anticorps monoclonal anti-A β (BAM-10) avec le modèle sigmoïde à 4 paramètres (**A**) ou 5 paramètres (**B**). Comparaison de la modélisation du signal spécifique obtenu par un sérum humain représentatif avec le modèle sigmoïde à 4 paramètres (**C**) ou 5 paramètres (**D**). Les points biffés représentent les données expérimentales déviant de plus de 2 sd par rapport au modèle, et exclues de celui-ci.

2. Etude corrélative – Variations physiologiques et pathologiques des anticorps anti-A β sériques

Dans les points 2.1, 2.2., et 2.3, nous présentons les résultats d'études pilotes réalisées sur des effectifs relativement faibles d'animaux. Il s'agit de résultats préliminaires à une publication future sur les anticorps anti-A β naturels chez la souris.

2.1. Anticorps naturels anti-A β chez la souris et développement en fonction de l'âge

A notre connaissance, l'existence d'anticorps naturels anti-A β chez la souris n'a pas été décrite.

Nous avons recherché la présence d'IgG anti-A β_{1-40} murin par ELISA avec prétraitement en milieu acide chez des souris sauvages de différents fonds génétiques âgées de 3 mois : C57BL/6 (n=4) ; SJL (n=4) ; Balb/c (n=3) ; CBA (n=3) et DBA (n=3). Après dissociation du sérum en milieu acide, un signal était détectable dans tous les échantillons testés (**Figure 11.A**). Bien que les effectifs soient faibles, ces résultats suggèrent que le taux d'anticorps naturels anti-A β diffèrent selon le fond génétique.

De façon intéressante, des résultats préliminaires obtenus chez des souris CD3 KO semble indiquer que le développement des IgG anti-A β_{1-40} spontanément présents chez la souris nécessite la présence de lymphocyte T, et donc vraisemblablement d'une coopération T-B pour réaliser la commutation isotypique (**Figure 11.B**).

Nous avons ensuite cherché à analyser l'évolution des anticorps anti-A β en fonction de l'âge des souris. Nous avons mesuré le signal des IgG, IgA, et IgM anti-A β_{1-40} provenant de sérums ; tous testés dilués au 1:100, de souris C57BL/6 âgées de 1.5 à 17 mois (n=46). Il existait une corrélation positive entre l'âge des souris et le signal obtenu pour les IgG (**Figure 11.C**) et les IgM anti-A β_{1-40} (**Figure 11.D**). Les IgA n'ont pas donné de signal différent du bruit de fond, à l'exception d'un animal (**Figure 11.E**). Pour compléter ces tests réalisés à la seule dilution de 1:100, nous avons comparé l'évolution des courbes de dilutions des IgG et IgM anti-A β_{1-40} et anti-actine en fonction de l'âge, chez des souris sauvages âgées de 3, 6 et 15 mois (n=4, 6, et 7, respectivement ; **Figure 11.F-I**). Il faut d'abord reconnaître la grande variabilité inter-individuelle de ces anticorps, chez des souris de même fonds génétique et hébergés dans des conditions identiques. Ensuite, il existe bien une tendance chez les animaux, statistiquement significative à 15 mois, à présenter un plus fort signal des IgG et IgM anti-A β_{1-40} et anti-actine, allant dans le sens d'une augmentation de la production de ces auto-anticorps avec l'âge.

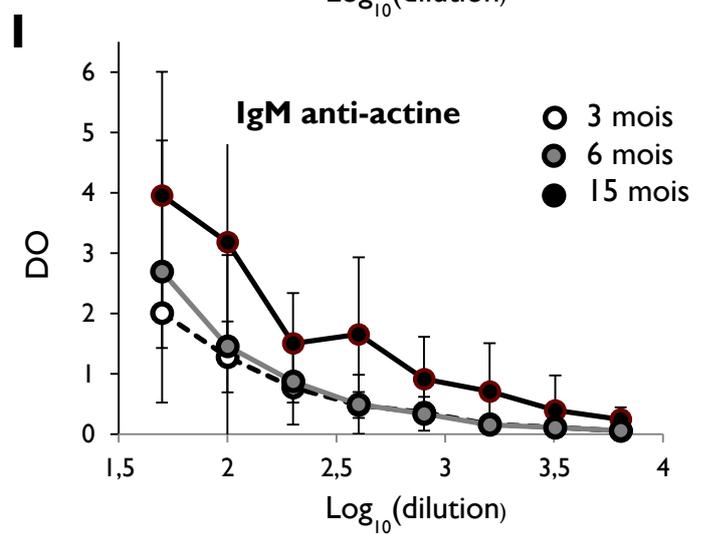
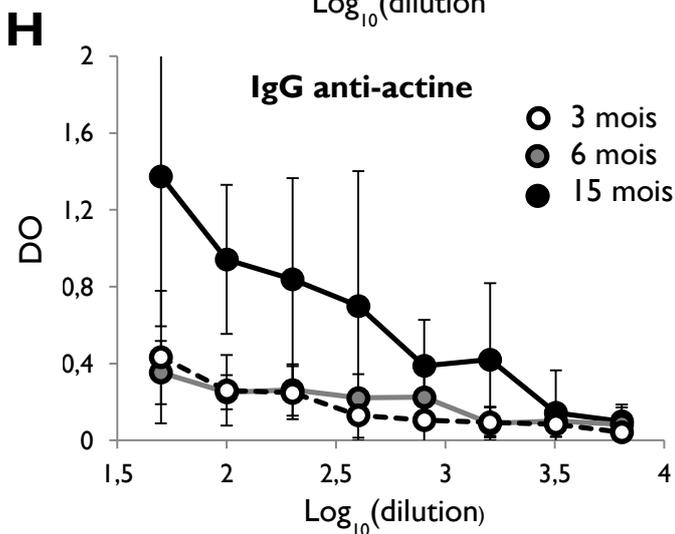
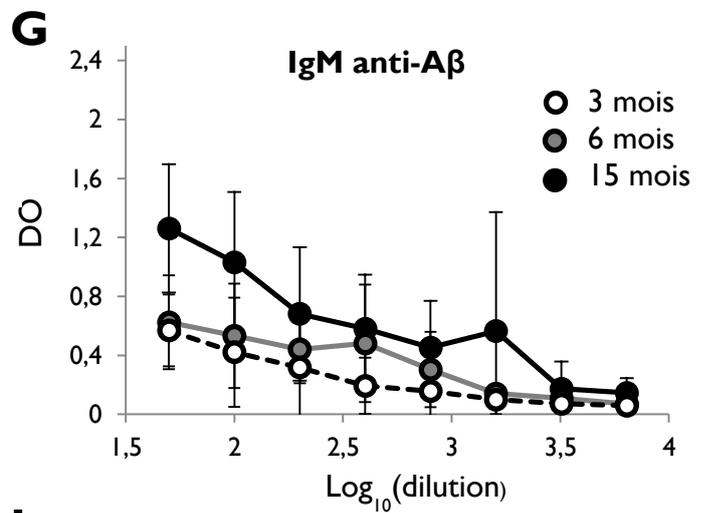
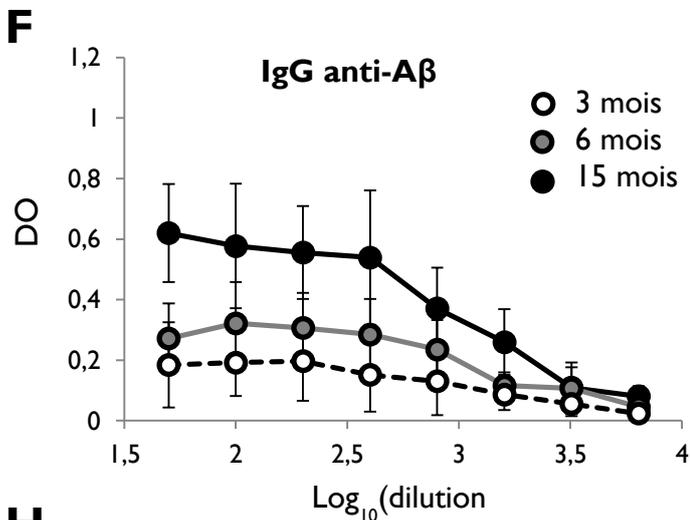
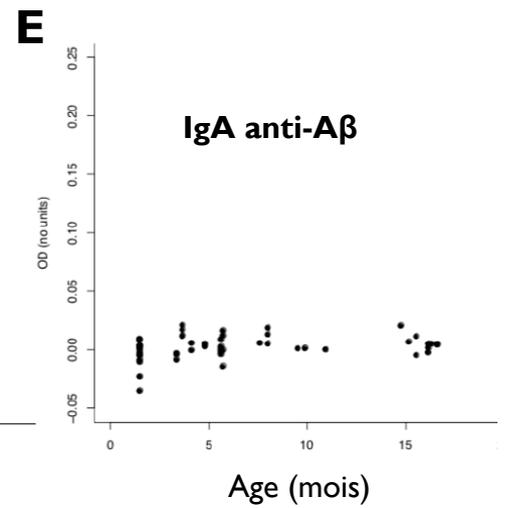
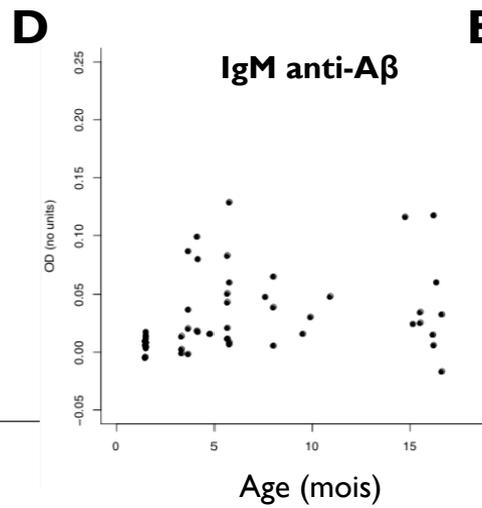
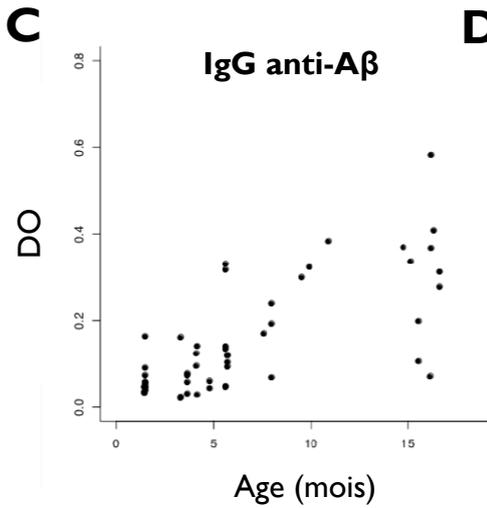
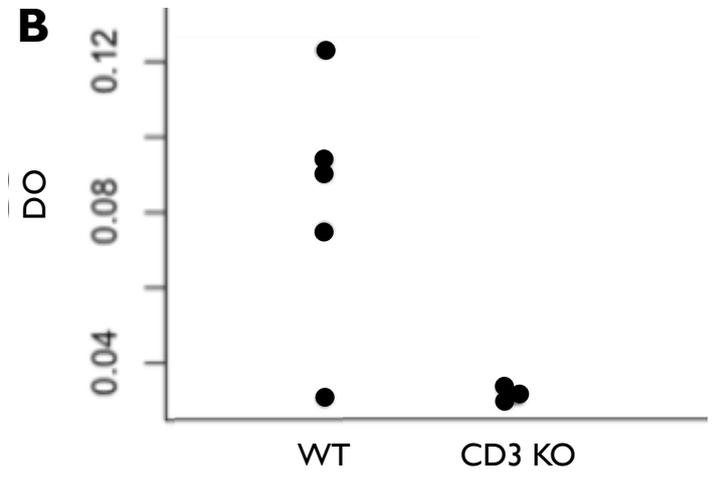
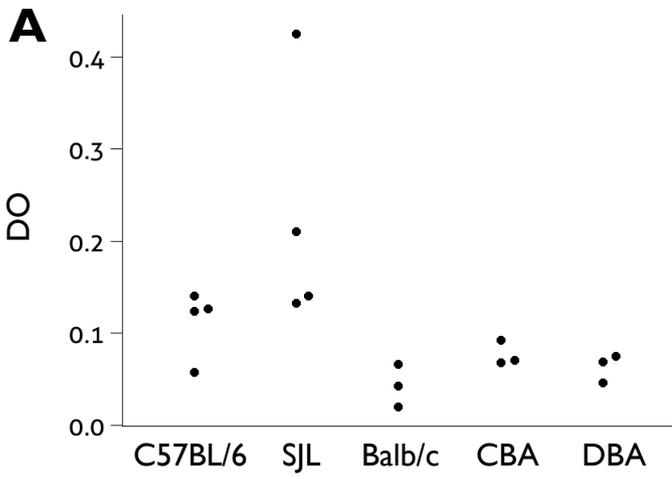


Figure 11. Anticorps naturels anti-A β chez la souris. **A.** DO obtenue par ELISA en révélant les IgG anti-A β sur des sérums au 1:100 de souris âgées de 3 mois, pour différents fonds génétiques. **B.** Comparaison des DO obtenues par ELISA en révélant les IgG anti-A β sur des sérums au 1:100 de souris sauvages ou CD3 KO âgées de 5 mois. **C-E.** DO obtenue par ELISA en révélant les IgG (C), les IgM (D) et les IgA (E) anti-A β sur des sérums au 1:100 de souris sauvages C57BL/6 de différents âges. **F-G.** Courbes de dilutions des IgG (F,H) et IgM (G,I) anti-A β (F,G) et anti-actine (H,I) chez des souris C57BL/6 sauvages âgés de 3, 6 et 15 mois (n=4, 6, et 7, respectivement).

2.2. Développement des anticorps anti-A β en fonction de l'âge chez l'humain

Peu de résultats existent chez l'humain concernant le développement des anticorps anti-A β en fonction de l'âge. Nous avons comparé les courbes de dilutions des anticorps anti-A β_{1-40} soluble entre 3 groupes de sujets de différents âges sans manifestations de pathologie liées à l'A β pour lesquelles avaient été prescrits des sérologies vaccinales : des jeunes enfants âgés de 14 mois à 4 ans (n=8 ; 14, 16, 19, 24, 24, 34 mois, 4, et 5 ans), des enfants ou adolescents âgés de 9 à 15 ans (n=7 ; 9, 9, 10, 11, 12, 15, et 15 ans), et des adultes âgés de 45 à 82 ans (n=5 ; de 45, 47, 53, 55, 82 ans) (**Figure 12.A-F**). Le profil d'évolution sérologique était très similaire aux résultats obtenus chez la souris, avec : i) une grande variabilité interindividuelle ; ii) l'existence d'anticorps réactifs vis-à-vis de l'A β dès le plus jeune âge, de différents isotypes (IgG, dont IgG1, IgG3, et IgG4, IgA, et IgM) et iii) une tendance au développement d'une diversité de reconnaissance de l'A β avec l'âge. De façon intéressante, seules les IgA anti-A β semblent continuer à se développer à l'âge adulte. A la différence des IgG1, IgG3 et IgM, c'est l'isotype dont les concentrations chez l'adulte sont atteintes le plus tardivement.

L'existence d'anticorps anti-A β dès l'enfance est particulièrement intéressant, car les maladies liées à aux dépôts d'A β , qu'il s'agisse de la MA ou de l'AAC, sont des pathologies du sujet âgé. Même si l'existence des dépôts précède de plusieurs années les symptômes de la maladie, on peut considérer qu'il n'existe virtuellement aucun dépôt d'A β parenchymateux ou vasculaire chez l'enfant (en tout cas en absence de duplication du gène de l'APP). Par conséquent, ce n'est vraisemblablement pas l'existence de tels dépôts qui génère la présence d'anticorps circulants réactifs contre l'A β .

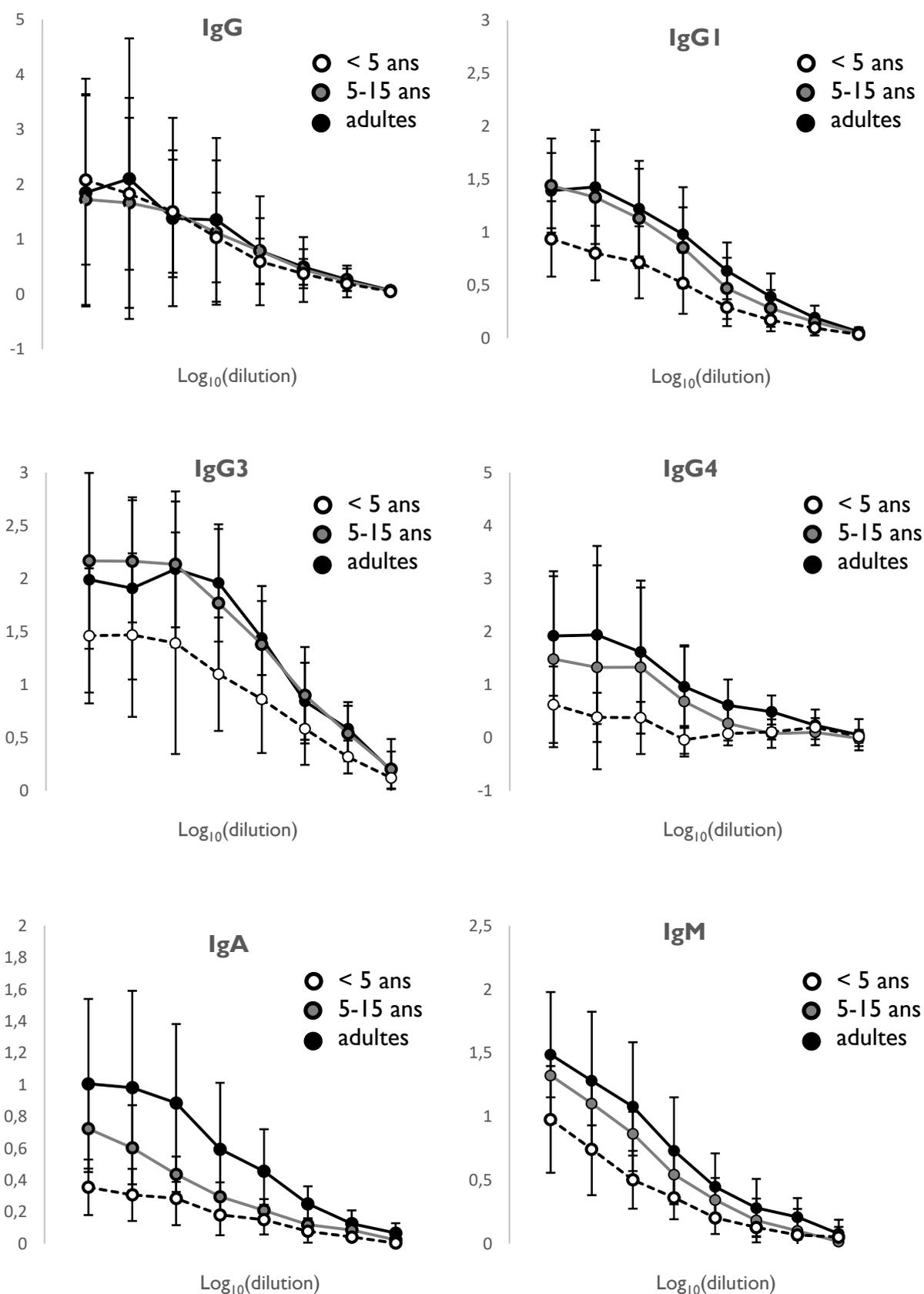


Figure 12. Variation des anticorps anti-A β 40 sériques humains en fonction de l'âge pour différents isotypes (IgG, IgG1, IgG3, IgG4, IgA, et IgM, respectivement de **A**   **F**). Les trois courbes représentent différents groupes d'âges. Courbe noire : adultes dans pathologie li e à l'A β (n=5 ; de 45 à 82 ans) ; Courbe grise : enfants et adolescents (n=8 ; de 5 à 15 ans) ; Courbe blanche : jeunes enfants (n=7 ; de 14 mois à 4 ans).

2.3. Anticorps anti-A β dans des modèles murins de Maladie d'Alzheimer et d'Angiopathie Amyloïde Cérébrale

Nous avons fait l'hypothèse que la présence de dépôts A β , en particulier vasculaires, puisse moduler les caractéristiques des anticorps anti-A β sériques. Nous avons comparé les anticorps anti-A β dans deux modèles murins transgéniques exprimant une APP humaine mutée : le modèle APP-PS1 et le modèle APP23. Les deux modèles expriment une APP humaine avec la double mutation suédoise (K670N/M671L), localisée hors de la séquence codant l'A β , et synthétisent donc tous les deux un A β humain non muté. Ce seul transgène est exprimé sous le promoteur neuronal Thy-1 dans le modèle APP23, il entraîne la production prédominante d'A β ₁₋₄₀ et occasionne des plaques séniles et des dépôts vasculaires. Dans le modèle APP-PS1, un transgène supplémentaire est introduit, codant la préséniline 1 portant la mutation L166P, il entraîne la production prédominante d'A β ₁₋₄₂ et les dépôts y sont essentiellement parenchymateux (Sturchler-Pierrat et al., 1997 ; Radde et al., 2006).

Nous avons comparé les anticorps anti-A β présents spontanément à 15 mois dans ces deux modèles, comparativement aux souris de même fonds génétique (C57BL/6) présentant un APP murin sauvage. Précisons qu'il existe seulement 3 acides aminés de différence entre l'A β murin et l'A β humain, et il existe une importante réactivité croisée selon qu'on utilise de l'A β murin ou humain comme antigène pour détecter les anticorps anti-A β chez la souris (**Figure 13.A**).

La reconnaissance de l'A β par des IgG (**Figure 13.B**) et des IgM (**Figure 13.C**) était significativement plus importante avec les sérums des souris APP-PS1 qu'avec ceux des souris sauvages et des souris APP23. Les souris APP23 présentaient quant à elles une tendance à une moindre reconnaissance de l'A β comparativement aux souris sauvages. Nous avons obtenu des résultats similaires concernant les anticorps anti-actine (**Figure 13.D-E**), indiquant que cette différence entre modèles n'est vraisemblablement pas due à une réponse immune restreinte à l'antigène présent dans les dépôts.

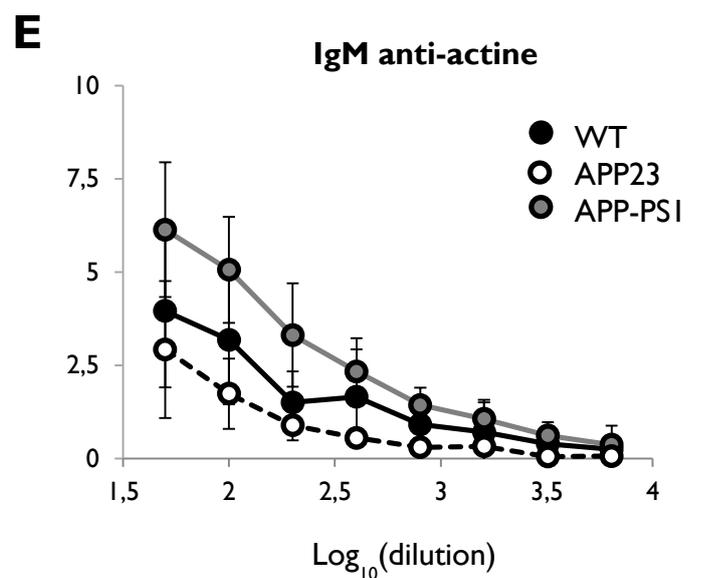
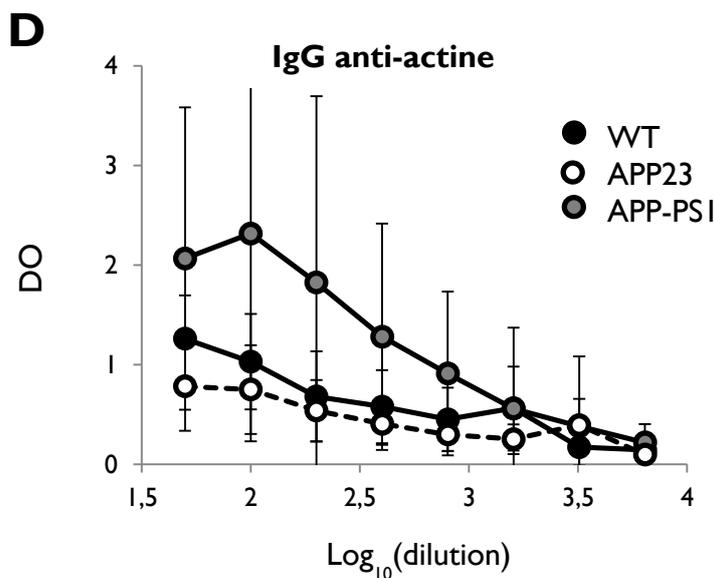
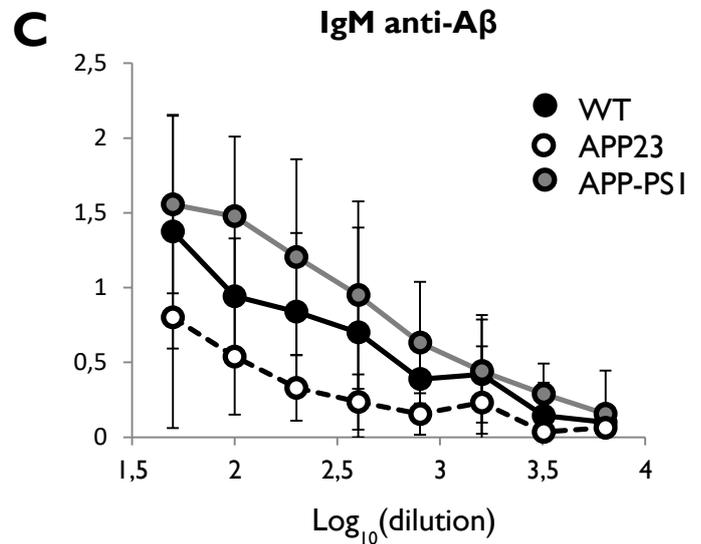
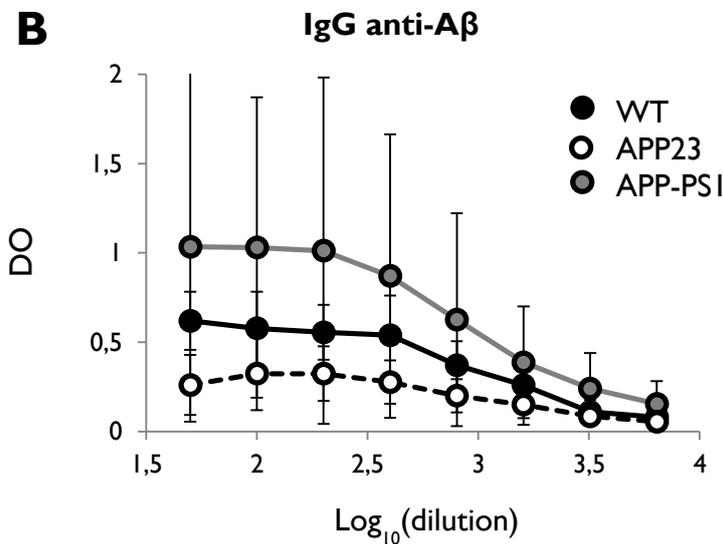
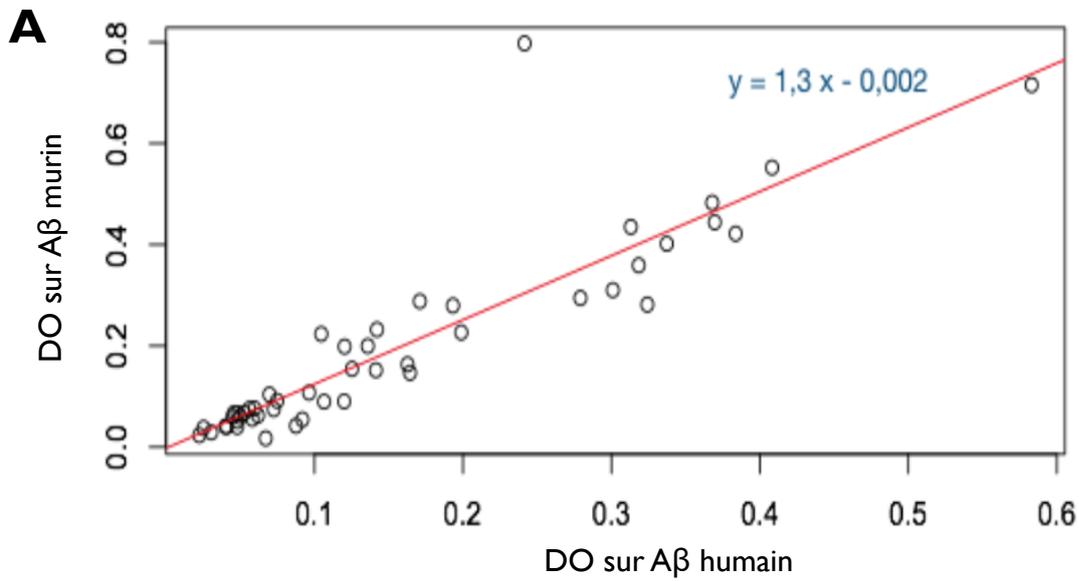


Figure 13. Variation des anticorps anti-A β sériques murins en fonction du génotype. **A** Corrélation entre les IgG anti-A β murines réagissant contre l'A β murin et l'A β humain (n=46). **B-E**. Courbes de dilutions des IgG (B,D) et IgM (C,E) anti-A β (B,C) et anti-actine (D,E) chez des souris WT, APP23, et APP-PS1 à 15 mois (n=7 par groupe). Les résultats sont exprimés en DO rapportées un échantillon contrôlé.

2.4. Corrélacion entre profil sérologique et phénotype clinique de l'angiopathie amyloïde cérébrale chez l'homme : cohorte AACAb

2.4.1. Patients, données démographiques et radiologiques

L'étude a recruté 105 participants : 41 sujets âgés contrôles sans signes cliniques ou radiologiques d'AAC, 46 sujets présentant des manifestations hémorragiques d'AAC (AAC-he), et 18 sujets présentant des manifestations inflammatoires (AAC-ri). Huit sujets du groupe AAC-he présentaient une cSS sans hémorragie intra-cérébrale, et présentaient les symptômes suivants : déclin cognitif isolé (n=3) ; auras amyloïdes (n=4, dont 2 avec hémorragie sous-arachnoïdienne aiguë) ; asymptomatique (n=1). Les âges médians (min-max) étaient de 72 ans (55–89), 79 ans (59–90), et 75 ans (64–87) dans les groupes contrôle, AAC-he et AAC-ri, respectivement. Les proportions Homme/Femme étaient 23/18, 25/21, et 8/10 dans les groupes contrôle, AAC-he et AAC-ri, respectivement. Les principales caractéristiques cliniques et d'imagerie chez les patients présentant une AAC-he ou une AAC-ri sont présentés dans le **Tableau II**.

Tableau II. Caractéristiques cliniques et radiologiques des patients présentant une angiopathie amyloïde cérébrale dans la cohorte AACAb.

AAC-ri (n=18)		N
Début < 1 mois		8
Symptômes: Déclin cognitif		17
Déficit neurologique focal		11
Epilepsie		6
Céphalée		5
Diagnostic histologique		2
IRM	Hypersignaux asymétriques de la substance blanche avec atteinte des fibres en U	17
	Prise de contraste méningée au Gadolinium (n=14 IRM avec Gadolinium)	6
Traitement	Corticothérapie seule	9
	Corticothérapie + Cyclophosphamide	6
	Aucun*	3
Réponse (n=17)**	Amélioration clinique et radiologique	14
	Amélioration radiologique isolée	3
AAC-he (n=46)		
IRM	Microsaignements lobaires	45
	Score de cSS (0-1-2-3-4)	13/15/6/7/5
	Score Fazekas (1-2-3)	9/21/16
Critères de Boston modifiés (AAC certaine/probable)		3/43

Abréviations: AAC, angiopathie amyloïde cérébrale (AAC). AAC-he, formes hémorragiques d'AAC. AAC-ri, formes inflammatoires d'AAC. cSS, sidérose corticale superficielle. *tous avec amélioration radiologique et clinique. **Un patient perdu de vue.

2.4.2. Reproductibilité et contrôles de qualités internes de l'ELISA multiparamétrique

La qualité de la modélisation des points expérimentaux par le modèle sigmoïde à 4 paramètres a été évaluée par le R^2 moyen. Toute modélisation donnant un $R < 0.9$ était systématiquement rejetée. Le taux de rejet global, par antigène et par isotype et présenté de la **Tableau III**. La reproductibilité de la détermination des paramètres de la courbe de dilution était évaluée. Tout paramètre du contrôle interne s'écartant de plus de 2.5 sd de la valeur moyenne attendue entraînait un rejet des résultats des échantillons de la même expérience pour l'isotype considéré.

De façon générale, les R^2 montraient une très bonne modélisation des données expérimentales par la sigmoïde à 4 paramètres (R^2 moyen = 0.97 ; par antigène [max – min] : [0.97 – 0.98] ; par isotype [max – min] : [0.95 – 0.99]). La plupart des paramètres de courbe présentaient un CV < 15%, toujours <20%, pour les 4 paramètres considérés de façon globale (CV moyen à 16%, 7%, 16%, et 12%, pour les Maximum, Titre, Pente et Avidité, respectivement), ou considéré par antigène ou par isotype. Ces valeurs de CV sont tout à fait acceptables pour un protocole manuel avec de nombreuses étapes.

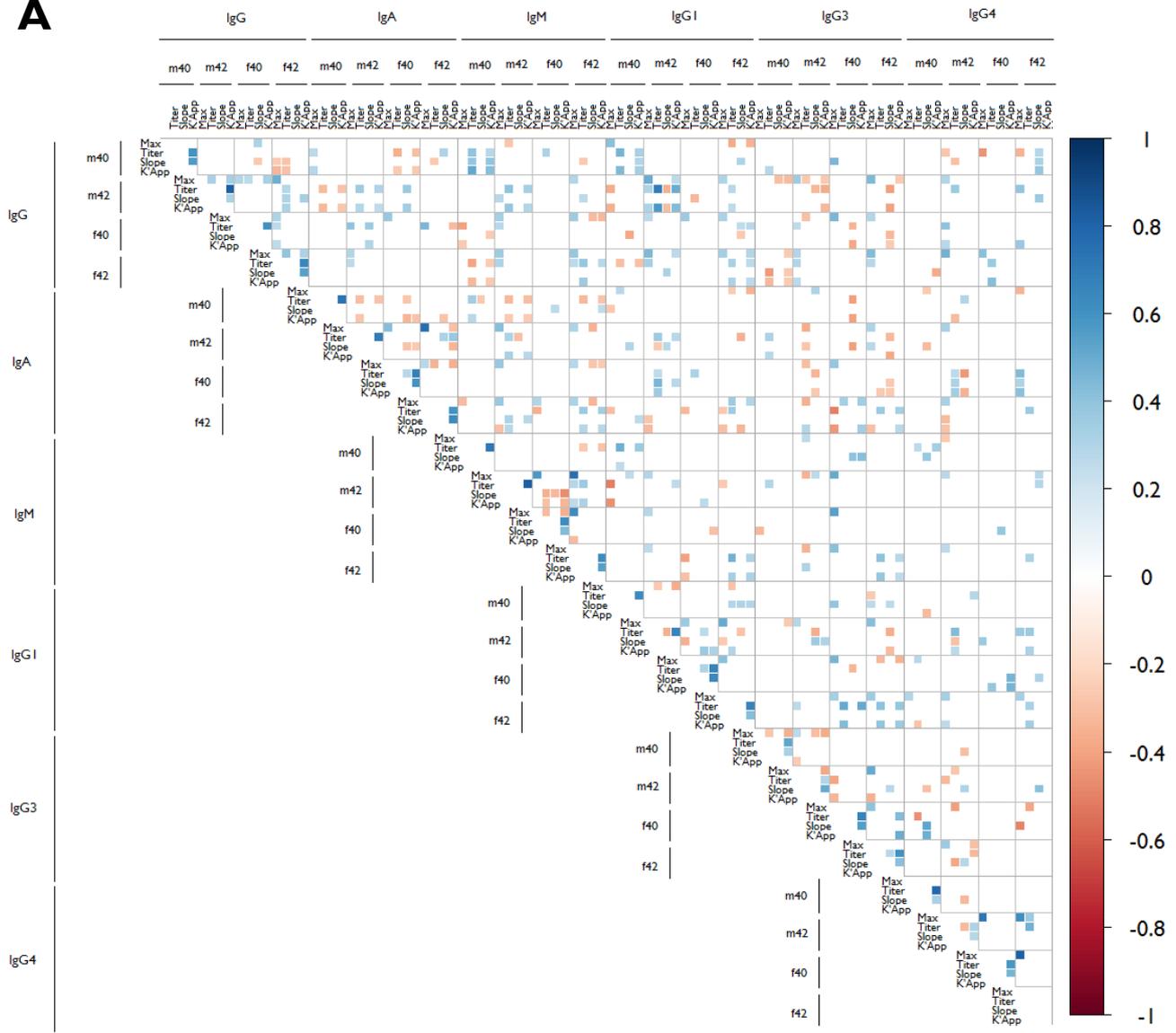
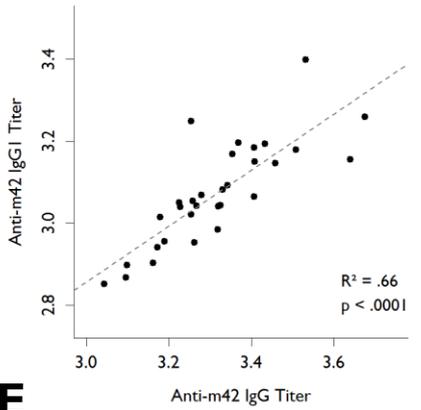
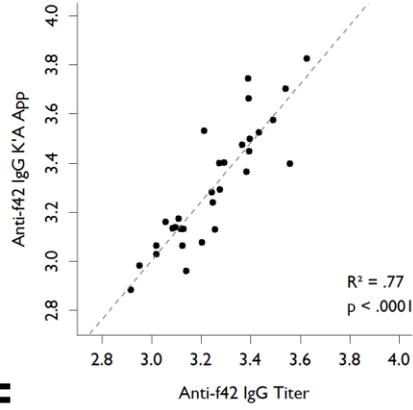
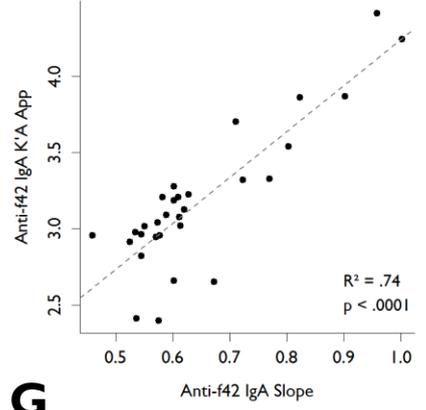
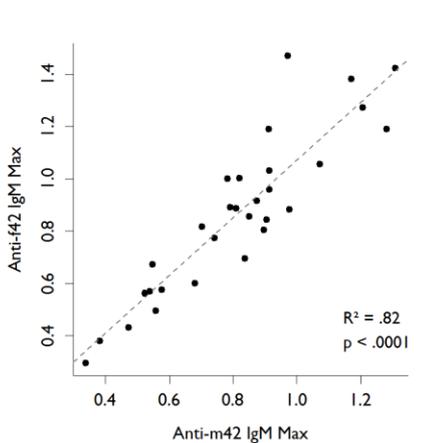
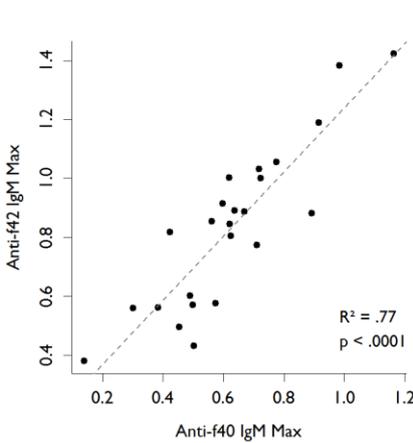
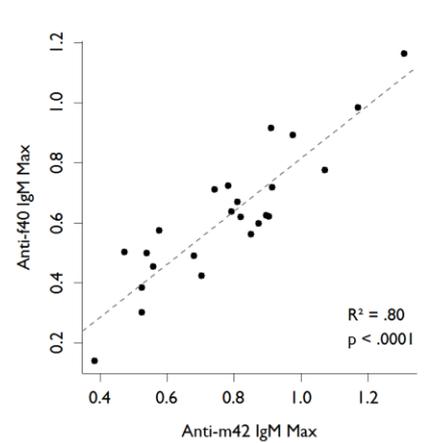
Tableau III. R^2 et Coefficients de Variation (CV) moyens des contrôles internes de l'ELISA multiparamétrique. Les R^2 moyens ont été obtenus à partir des courbes de dilutions des patients, des contrôles internes, et des étalons internes (n=2160, 540, et 360 respectivement pour les données globales, par antigène, et par isotype). Les CV moyens ont été obtenus pour les paramètres des courbes de dilution du contrôle interne (n=360, 90, et 60 respectivement pour les données globales, par antigène, et par isotype).

Variable (CV moyen)	R^2 moyen	Maximum	Titre	Pente	K'A App
Global	0,97	16%	7%	16%	12%
Aβ₁₋₄₀ soluble	0,98	18%	8%	16%	9%
Aβ₁₋₄₂ soluble	0,98	15%	6%	12%	9%
Aβ₁₋₄₀ fibrillaire	0,97	18%	9%	17%	15%
Aβ₁₋₄₂ fibrillaire	0,97	15%	7%	19%	14%
IgG	0,99	13%	5%	14%	8%
IgA	0,98	17%	8%	17%	13%
IgM	0,99	17%	7%	17%	15%
IgG1	0,98	16%	6%	13%	11%
IgG3	0,96	19%	8%	18%	12%
IgG4	0,95	16%	13%	19%	10%

2.4.3. Corrélations entre les différents paramètres de l'ELISA multiparamétrique

Une analyse des corrélations a été réalisée chez les 32 premiers sujets de la cohorte AACAb : 12 sujets contrôles, 11 sujets AAC-he et 8 sujets AAC-ri. La matrice des corrélations est présentée en **Figure 14.A**. De nombreuses corrélations positives ou négatives, entre les différents paramètres sérologiques des anticorps anti-A β sont présentes, indiquant que ces variables ne sont pas indépendantes. Certaines corrélations sont récurrentes entre différents paramètres, isotypes, ou antigènes, et sont illustrées dans les **Figures 14.B-G**. Par exemple, les paramètres des IgG totales et des IgG1, tels que le titre, étaient bien corrélés, suggérant qu'une importante proportion des IgG anti-A β est constituée d'IgG1. Pour un antigène et un isotype donnés, le Titre et l'Avidité, et le Titre et la Pente étaient bien corrélés. De la même façon, pour un isotype donné, les Maximums étaient corrélés pour l'A β 42 soluble, fibrillaire, et l'A β 40 fibrillaire.

Figure 14. Corrélations obtenues pour l'ELISA multiparamétrique sur une cohorte de 31 sujets (12 sujets sains âgés ; 11 sujets AAC-he ; 8 sujets AAC-ri). **A.** Matrice des corrélations pour les 96 paramètres de l'ELISA multiparamétrique. Seules les corrélations statistiquement significatives sont présentées (p-values du test Tau de Kendall < 0.05 ; les corrélations positives sont représentées en bleu, et les corrélations négatives sont représentées en rouge). **B-G.** Illustration des principales corrélations, entre les paramètres des IgG totales et des IgG1 (B) ; entre Titre et Avidité (C) et entre Titre et Pente (D) pour un même antigène et un même isotype ; entre Maximums pour un isotype donné et différents antigènes, principalement A β 42 soluble, fibrillaire, et A β 40 fibrillaire.

A**B****C****D****E****F****G**

2.4.4. Profils sérologiques associés aux phénotypes cliniques de l'angiopathie amyloïde cérébrale

2.4.4.1. Par analyse des MAST-Index

Le principal objectif de l'étude de la cohorte AACAb était de corrélérer des phénotypes cliniques et sérologiques. Une première stratégie, présentée dans le Brevet en Annexe II, a utilisé un type de biomarqueur que nous avons appelé « MAST-Index », pour *Maximum*, *Avidity*, *Steeepness*, et *Titer*, les 4 paramètres des courbes de dilutions obtenues pour un antigène et un isotype donné. Pour ce type de biomarqueur, notre stratégie était d'exploiter un maximum de données pertinentes provenant d'une seule courbe de dilution.

Pour combiner les valeurs numériques obtenues pour les 4 paramètres d'une courbe, nous avons fait le choix d'un modèle additif pondéré :

$$MAST = a \times \text{Maximum} + b \times \text{Avidité} + c \times \text{Pente} + d \times \text{Titre}$$

La sélection des coefficients de pondération du modèle s'est faite en sélectionnant les coefficients du premier axe de l'Analyse en Composantes Principales (ACP) réalisée sur l'ensemble des données de la cohorte, en regroupant les données de Maximum, Avidité, Pente et Titre obtenues pour les différents antigènes et les différents isotypes. Cette méthode permet de choisir l'Index qui va traduire un maximum de variabilité de l'échantillon, sans que cette variabilité ne soit a priori orientée vers une meilleure discrimination des groupes cliniques. Précisons que nous avons d'abord réalisé des ACP par groupe clinique, par préparation antigénique, et par isotype afin de d'assurer de l'absence de différence dans les coefficients de l'ACP.

$$MAST = 0.2316 \times \text{Maximum} + 0.6894 \times \text{Avidité} + 0.1413 \times \text{Pente} + 0.6717 \times \text{Titre}$$

Comme indiqué au §2.4.3., une corrélation partielle est attendue et retrouvée pour les différents paramètres d'une même courbe. Ces corrélations reflètent en partie ce qu'on s'attend à trouver lors d'une réponse immune potentielle : une augmentation concomitante du titre, de l'avidité, et du nombre d'épitopes reconnus. Ceci est indiqué dans le modèle de MAST-Index par le fait que tous les paramètres sont pondérés par un coefficient du même signe, indiquant une corrélation positive entre l'index issu de la première composante et les différents paramètres des courbes de dilution. Les coefficients de pondération étaient du même ordre de grandeur, variant de moins d'un facteur 5, indiquant que le MAST-Index n'est pas surdéterminé par une variable particulière. Enfin, le premier

axe de l'ACP permettait d'expliquer 80% de la variance globale de l'échantillon. Par conséquent, le MAST-Index traduit bien la variabilité globale des données.

Les patients atteints de AAC-he (p -value < 0.001) et de AAC-ri ($p < 0.001$) présentaient des MAST-Index des IgG3 anti-s40 plus élevés que les sujets contrôles (4.35 [4.10–4.44] et 4.46 [4.28–4.53] vs 4.16 [4.01–4.26] ; **Figure 15.A**). Ces résultats étaient inchangés en séparant le groupe AAC-he en fonction du délai entre l'hémorragie et le prélèvement ($p = 0.02$ si prélèvement < 10 jours ; $p = 0.002$ si prélèvement ≥ 10 jours).

Une analyse exploratoire post-hoc des paramètres des courbes de dilution des IgG3 anti-s40 a montré une élévation des maxima ($p=0.02$), des titres ($p=0.002$), et des constantes d'avidité apparente ($p=0.001$) chez les patients atteints d'AAC comparativement aux sujets contrôles. Cela indique une plus grande diversité de reconnaissance antigénique, de plus grandes concentrations sériques et une plus grande avidité des IgG3 anti- $A\beta_{1-40}$ soluble dans l'AAC. Nous concluons qu'un développement des IgG3 anti- $A\beta_{1-40}$ soluble semble associé à l'AAC.

Afin d'évaluer si cette différence est suffisante pour classer les sujets âgés avec ou sans AAC, nous avons analysé les MAST-Index des IgG3 anti- $A\beta_{1-40}$ soluble par régression logistique univariée. Une élévation du MAST-Index des IgG3 anti- $A\beta_{1-40}$ soluble était associée à un plus grand risque d'AAC ($p < 0.001$). Cette association demeurerait vraie en considérant séparément les AAC-he et les AAC-ri ($p=0.002$, et $p=0.003$). Les performances diagnostiques du MAST-Index des IgG3 anti- $A\beta_{1-40}$ soluble ont été estimées par analyse des courbes ROC, avec une valeur seuil de 4.29 (**Figure 15.B**). La sensibilité de ce biomarqueur était de 75% [66%–83%], pour une spécificité de 72% [63%–80%], et un AUC de 0.77 [0.68–0.87]. Ce marqueur donnait des résultats similaires quel que soit le groupe clinique : pour les AAC-he: 75% Se [64%–84%]; 72% Sp [61%–81%]; pour les AAC-ri: 75% Se [63%–84%]; 72% Sp [60%–82%]. Nous concluons que le développement d'une réponse sérique des IgG3 anti- $A\beta_{1-40}$ soluble peut être utilisé comme biomarqueur de l'AAC sporadique.

Les patients atteints de AAC-he ($p=0.002$), mais pas de AAC-ri ($p=0.31$) présentaient des MAST-Index des IgA anti-f40 plus élevés que les sujets contrôles (4.44 [4.05–4.57] et 4.18 [4.10–4.26], vs 4.14 [3.88–4.44] ; **Figure 15.C**). Les patients du groupe AAC-he différaient significativement des AAC-ri ($p=0.03$). Il était possible que, à la suite de l'accident hémorragique, l' $A\beta_{1-40}$ cérébral fibrillaire soit exposé au système immunitaire périphérique, et stimule une réponse humorale anti- $A\beta_{1-40}$ fibrillaire spécifiquement chez les patients AAC-he. Nous avons comparé les MAST-Index des IgA anti- $A\beta_{1-40}$ fibrillaire chez les patients présentant une AAC-he prélevés moins de 10 jours après l'accident hémorragique, de ceux prélevés plus tardivement. Les deux sous-groupes ont montré une augmentation des MAST-Index des IgA anti- $A\beta_{1-40}$ fibrillaire ($p=0.008 < 10$ jours, $p=0.02 > 10$ jours). Chez les AAC-he, les MAST-Index des IgA anti- $A\beta_{1-40}$ fibrillaire ne corrélaient avec aucun marqueur

d'imagerie : ni le nombre de microsaignements lobaires, ni le score Fazekas, ni le score de multifocalité de la sidérose superficielle.

Une analyse exploratoire *post-hoc* des paramètres des courbes de dilution des IgA anti-A β_{1-40} fibrillaire a montré une élévation des titres ($p=0.03$), et des constantes d'avidité apparente ($p=0.002$) chez les patients atteints de AAC-he comparativement aux sujets contrôles. Cela indique de plus grandes concentrations sériques et une plus grande avidité des IgA anti-A β_{1-40} fibrillaire dans l'AAC hémorragique. Nous concluons à un développement des IgA anti-A β_{1-40} fibrillaire associé à l'AAC hémorragique, sans que cette réponse ne semble stimulée par une exposition des antigènes lors de l'accident hémorragique lui-même.

Afin d'évaluer si cette différence est suffisante pour classer les sujets âgés avec ou sans AAC hémorragique, nous avons analysé les MAST-Index des IgA anti-A β_{1-40} fibrillaire par régression logistique univariée. Une élévation du MAST-Index des IgA anti-A β_{1-40} fibrillaire était associée à un plus grand risque d'AAC hémorragique comparativement aux sujets contrôles ($p=0.003$), et de façon tendancielle non significative ($p=0.09$) avec les sujets présentant une AAC-ri.

Les performances diagnostiques du MAST-Index des IgA anti-A β_{1-40} fibrillaire ont été estimées par analyse des courbes ROC, avec une valeur seuil de 4.339 (**Figure 15.D**). La sensibilité de ce biomarqueur était de 67% [57–75] pour une spécificité de 65% [55%–73%], et un AUC de 0.67 [0.55–0.78] pour discriminer les AAC hémorragiques des autres sujets. Ce marqueur donnait des résultats similaires quel que soit le groupe clinique vis-à-vis duquel on cherche à comparer les AAC-he: vis-à-vis des sujets contrôles: 68% Se [57%–78%]; 65% Sp [53%–75%]; vis-à-vis des AAC-ri: 61% Se [47%–73%]; 64% Sp [51%–76%]. Nous concluons que le développement d'une réponse à IgA anti-A β_{1-40} fibrillaire n'est pas à elle seule suffisante pour servir de biomarqueur à l'AAC hémorragique.

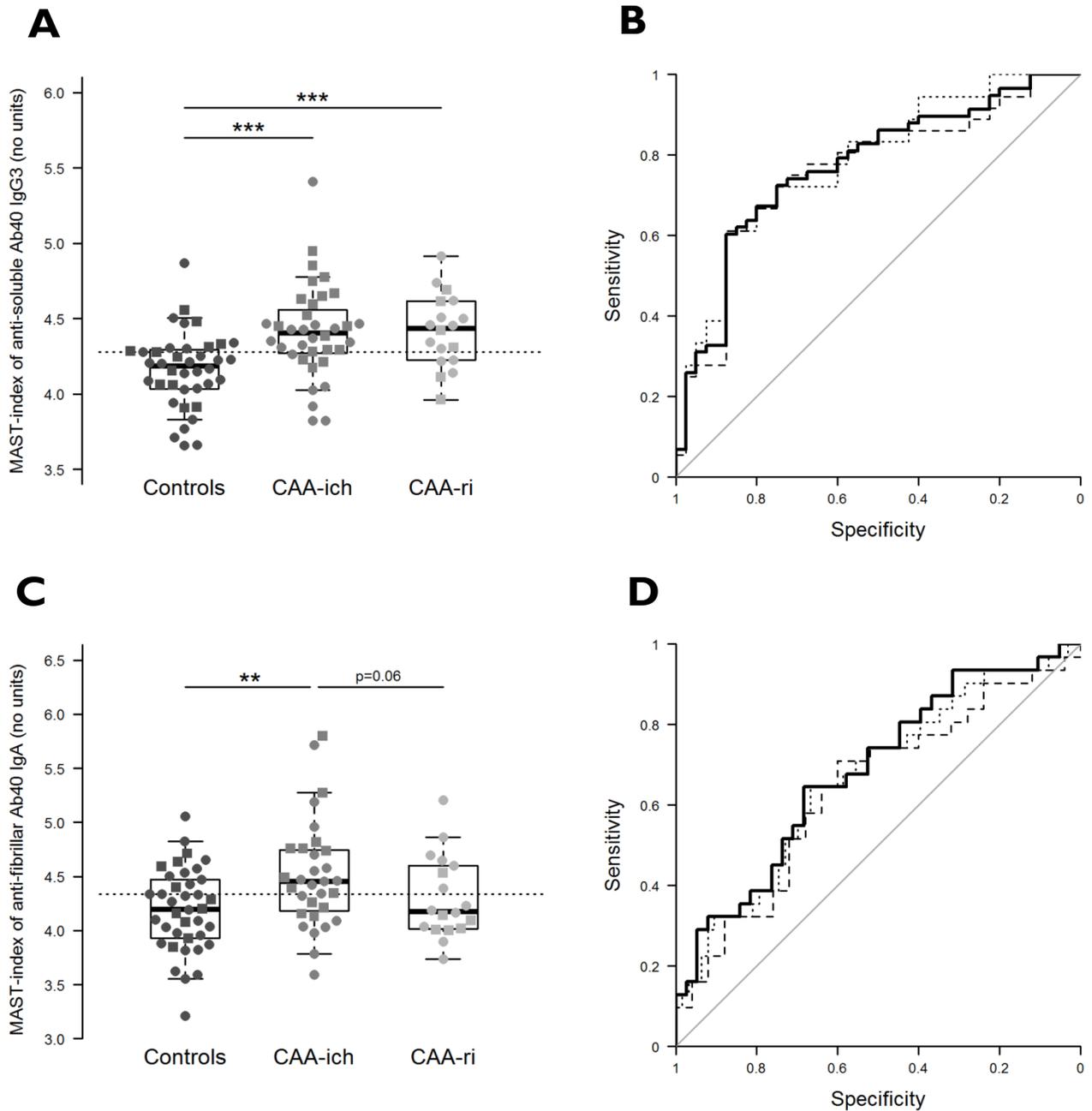


Figure 15. Profils sérologiques associés aux phénotypes cliniques dans l'angiopathie amyloïde cérébrale par analyse des MAST-Index. **A.** Augmentation du MAST-Index des IgG3 anti- $A\beta_{1-40}$ soluble dans l'AAC **B.** Courbes ROC associées au graphe A, comparant aux sujets âgés sains les patients atteints d'AAC (courbe pleine), d'AAC-he (tirets), et d'AAC-ri (pointillés). **C.** Augmentation du MAST-Index des IgA anti- $A\beta_{1-40}$ fibrillaire dans l'AAC hémorragique. **D.** Courbes ROC associées au graphe C, comparant les AAC-he aux autres sujets de la cohorte (courbe pleine), aux sujets âgés sains (tirets), et aux AAC-ri (pointillés).

2.4.4.2. Analyse par régression logistique multivariée

Parallèlement à l'étude des MAST-Index, nous avons cherché à définir des biomarqueurs sérologiques de l'ensemble des AAC, des AAC hémorragiques, et des AAC inflammatoires au moyen d'une stratégie de régression logistique multivariée.

Le **Tableau IV** présente les paramètres sérologiques associés à l'ensemble des AAC, à l'AAC hémorragique et à l'AAC inflammatoire, comparativement aux sujets âgés sans AAC. Ces paramètres sont ceux inclus dans un modèle de régression logistique multivariée après sélection des variables « pas à pas ». La **Figure 16.A** présente les réponses prédites par le modèle de la partie supérieure du Tableau IV, associées à la probabilité de présenter ou non une AAC. Dans ce modèle complexe, une plus grande diversité et concentration des IgG3 anti-A β_{1-40} soluble, une plus grande avidité des IgG4 anti-A β_{1-40} soluble, et une plus grande pente des IgG4 anti-A β_{1-42} fibrillaire étaient associées à une plus grande probabilité de présenter une AAC. Une plus faible diversité des IgM anti-A β_{1-40} soluble, une plus faible avidité des IgA anti-A β_{1-42} soluble, et une plus faible concentration des IgG1 anti-A β_{1-42} fibrillaire étaient également associées à une plus grande probabilité de présenter une AAC. Toutes ces variables contribuaient de façon significative et indépendante au modèle, sans multicolinéarité (tous les Variance Inflation Factors (VIF) étaient < 1.8).

Le profil sérologique des AAC hémorragiques a été comparé à celui des sujets contrôles (**Tableau IV**, partie centrale, et **Figure 16.B**). Comme pour l'AAC en général, ce profil incluait une diminution de la diversité des IgM anti-A β_{1-40} soluble, et une plus faible avidité des IgA anti-A β_{1-42} soluble. Concernant les IgG4, les patients hémorragiques présentaient de plus fortes concentrations d'IgG4 anti-A β_{1-40} soluble, mais de plus faibles concentration et avidité des IgG4 anti-A β_{1-42} fibrillaire. Les patients hémorragiques présentaient également une plus faible avidité des IgG1 anti-A β_{1-42} fibrillaire, comparativement aux sujets contrôles. L'exclusion des 8 sujets présentant seulement de la sidérose superficielle ne changeait pas les variables associées au modèle. Toutes contribuaient au modèle indépendamment et de façon significative, sans multicolinéarité (tous les VIFs < 1.3).

Le profil sérologique des AAC inflammatoires a été comparé à celui des sujets contrôles (**Tableau IV**, partie centrale, et **Figure 16.C**). Comme pour l'AAC en général et l'AAC hémorragique, ce profil incluait une diminution de la diversité des IgM anti-A β_{1-40} soluble. Comme pour les AAC en général, mais pas les AAC-he considérées isolément, l'AAC inflammatoire était associée à une plus grande diversité des IgG3 anti-A β_{1-40} soluble, et une plus forte pente des IgG4 anti-A β_{1-42} fibrillaire. Inversement, les patients inflammatoires montraient de moins fortes pentes des IgG4 anti-A β_{1-42} soluble et des IgA anti-A β_{1-40} soluble. Toutes ces variables contribuaient de façon significative et indépendante au modèle, sans multicolinéarité (tous les VIFs étaient < 1.4).

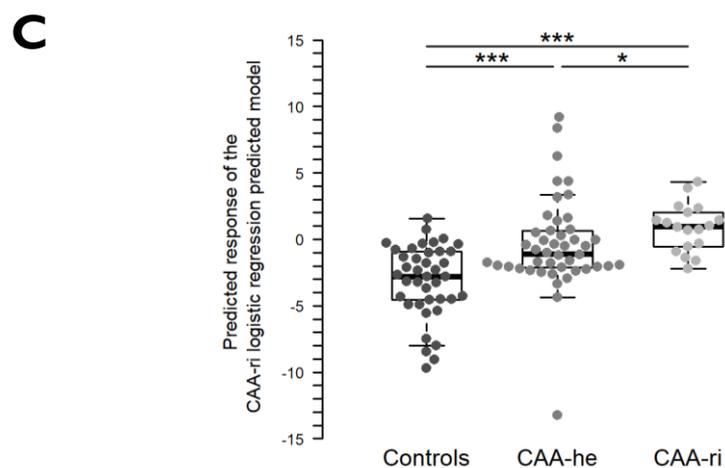
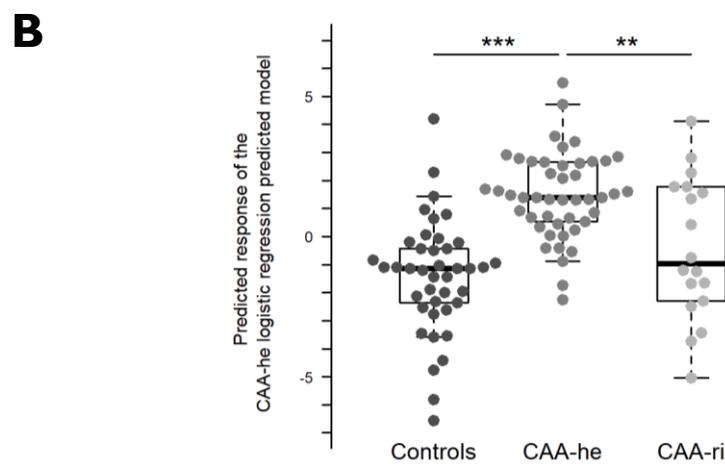
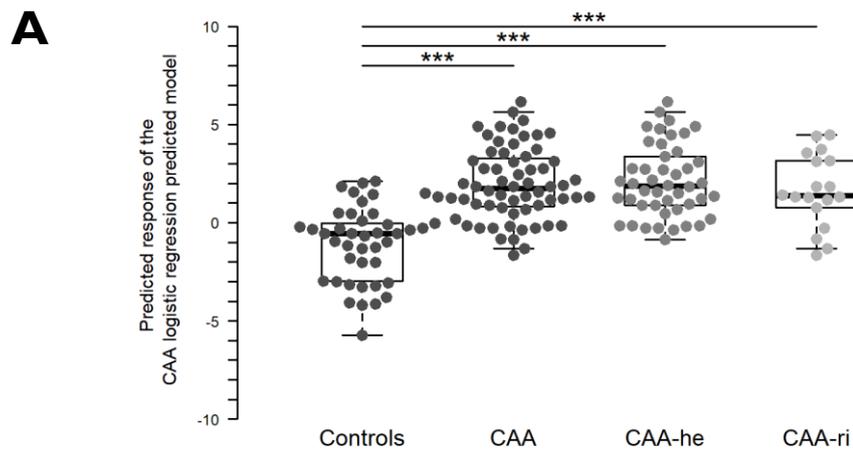


Figure 16. Profils sérologiques associés aux phénotypes cliniques dans l'angiopathie amyloïde cérébrale par régression logistique multivariée. **A.** Valeurs prédictives de l'AAC associées au modèle présenté dans la partie haute du Tableau IV. **B.** Valeurs prédictives de l'AAC associées au modèle présenté dans la partie médiane du Tableau IV. **C.** Valeurs prédictives de l'AAC associées au modèle présenté dans la partie basse du Tableau IV.

Tableau IV. Régression logistique multivariée pour l'AAC, les formes hémorragiques, et les formes inflammatoires, comparativement aux sujets sains âgés

Modèle AAC

Variabiles	Coefficients	Erreurs Standard	Z-values	P-values	Déviations Résiduelles	P-values
	0.13	6.57			140.5	
[£] Anti-s-A β_{40} IgG3 Maximum	2.89	0.92	3.14	0.0017	134.0	0.011
Anti-s-A β_{40} IgG3 Titer	4.03	1.16	3.48	0.0005	123.6	0.0013
Anti-s-A β_{40} IgG4 Avidity	2.29	0.94	2.44	0.015	117.6	0.014
[£] Anti-f-A β_{42} IgG4 Steepness	3.74	1.32	2.84	0.0045	111.5	0.013
*Anti-s-A β_{40} IgM Maximum	-3.10	1.02	-3.05	0.0023	102.5	0.0027
[§] Anti-s-A β_{42} IgA Avidity	-3.48	1.13	-3.07	0.0021	92.9	0.0019
Anti-f-A β_{42} IgG1 Titer	-3.81	1.58	-2.42	0.016	86.5	0.012

Modèle AAC-he

Variabiles	Coefficients	Erreurs Standard	Z-values	P-values	Déviations Résiduelles	P-values
	42.14	11.84			120.32	
Anti-s-A β_{40} IgG4 Titer	3.30	1.11	2.97	0.0030	111.57	0.0031
Anti-f-A β_{42} IgG4 Titer	-6.41	1.95	-3.29	0.0010	98.41	0.0003
Anti-f-A β_{42} IgG1 Avidity	-4.65	2.04	-2.28	0.023	90.72	0.0056
[§] Anti-s-A β_{42} IgA Avidity	-2.77	1.06	-2.61	0.0092	85.59	0.024
*Anti-s-A β_{40} IgM Maximum	-2.09	1.01	-2.06	0.039	80.95	0.031
Anti-s-A β_{42} IgG4 Avidity	-2.87	1.24	-2.32	0.020	74.92	0.014

Modèles AAC-ri

Variabiles	Coefficients	Erreurs Standard	Z-values	P-values	Déviations Résiduelles	P-values
	10.75	5.78			72.58	
[£] Anti-s-A β_{40} IgG3 Maximum	4.15	1.55	2.68	0.007	63.92	0.0032
[£] Anti-f-A β_{42} IgG4 Steepness	4.01	1.70	2.36	0.018	58.38	0.019
Anti-s-A β_{40} IgA Steepness	-18.53	8.23	-2.25	0.024	54.08	0.038
Anti-s-A β_{42} IgG4 Steepness	-12.19	5.25	-2.32	0.020	46.96	0.0076
*Anti-s-A β_{40} IgM Maximum	-2.40	1.21	-1.99	0.047	40.68	0.012

*: Variables partagées entre les 3 modèles; [§]: Variables partagées entre le modèle AAC et le modèle AAC-he; [£]: Variables partagées entre le modèle AAC le modèle AAC-ri modèle.

3. Partie expérimentale : effets de préparations enrichies en IgG ou IgM anti-A β de faible, moyenne, et forte avidité sur les manifestations de l'AAC dans la souris APP23

Nous avons souhaité étudier l'effet de l'administration périphérique d'anticorps anti-A β de différents isotopes et avidité sur un modèle murin transgénique d'angiopathie amyloïde cérébrale : la souris APP23.

3.1. Obtention de préparations enrichies en IgG ou IgM anti-A β de faible, moyenne, et forte avidité

Afin d'obtenir ces différentes préparations d'anticorps anti-A β , des souris sauvages âgées de 6 semaines ont été immunisées avec une préparation d'A β_{1-40} fibrillaire. Différents protocoles d'immunisation ont été pratiqués : un groupe de souris placebo a reçu seulement de l'adjuvant (groupe contrôle présentant des anticorps anti-A β « naturels »), un autre groupe a reçu une administration d'A β en adjuvant complet de Freund (CFA), puis une administration de placebo (groupe prime développant des anticorps anti-A β d'avidité moyenne), tandis qu'un troisième groupe a reçu une administration d'A β en CFA, et un rappel d'A β en adjuvant incomplet de Freund (IFA ; groupe prime/boost développant des anticorps de forte avidité). L'efficacité du protocole vaccinal a été vérifié sur un échantillon des animaux de chaque groupe (n=6, 5, et 7 pour le groupe contrôle, prime, et prime/boost, respectivement). Le prélèvement de sang périphérique réalisé un jour avant la première immunisation n'ont pas permis de détecter d'anticorps anti-A β chez des animaux aussi jeunes. Le prélèvement réalisé une semaine après la première administration a permis de détecter un très faible signal en IgG dans chaque groupe, pour des échantillons analysés au 1:100 (DO moyenne [min-max] = 0.048 [0.036 – 0.064], 0.106 [0.089 – 0.130], et 0.107 [0.088 – 0.127] ; DO non standardisées mesurées sur une seule plaque). Ces DO étaient trop faibles pour une analyse des courbes de dilutions, mais permettent déjà de distinguer complètement le groupe placebo des deux autres groupes ayant reçu la première administration d'A β . Dix jours après le rappel, le signal obtenu en IgG pour des échantillons analysés au 1:100 était de 0.091 [0.080 – 0.106], 0.691 [0.613 – 0.790], et 0.819 [0.737 – 0.909] (DO moyenne [min-max] ; DO non standardisées mesurées sur la même plaque que précédemment) pour les groupes placebo, prime, et prime/boost, respectivement. Ces valeurs soulignent l'efficacité du protocole d'immunisation pour le développement d'une réponse IgG anti-A β chez la souris. Les courbes de dilution du groupe placebo n'étaient pas analysables, mais nous avons souhaité comparer le *Titre* (**Figure 17.A**) et le *K'A App* (**Figure 17.B**) des groupes immunisés ayant reçu une seule administration ou un rappel. Le titre (p=0.03) et l'avidité (p=0.02) étaient significativement plus élevés dans le groupe prime/boost que dans le groupe prime.

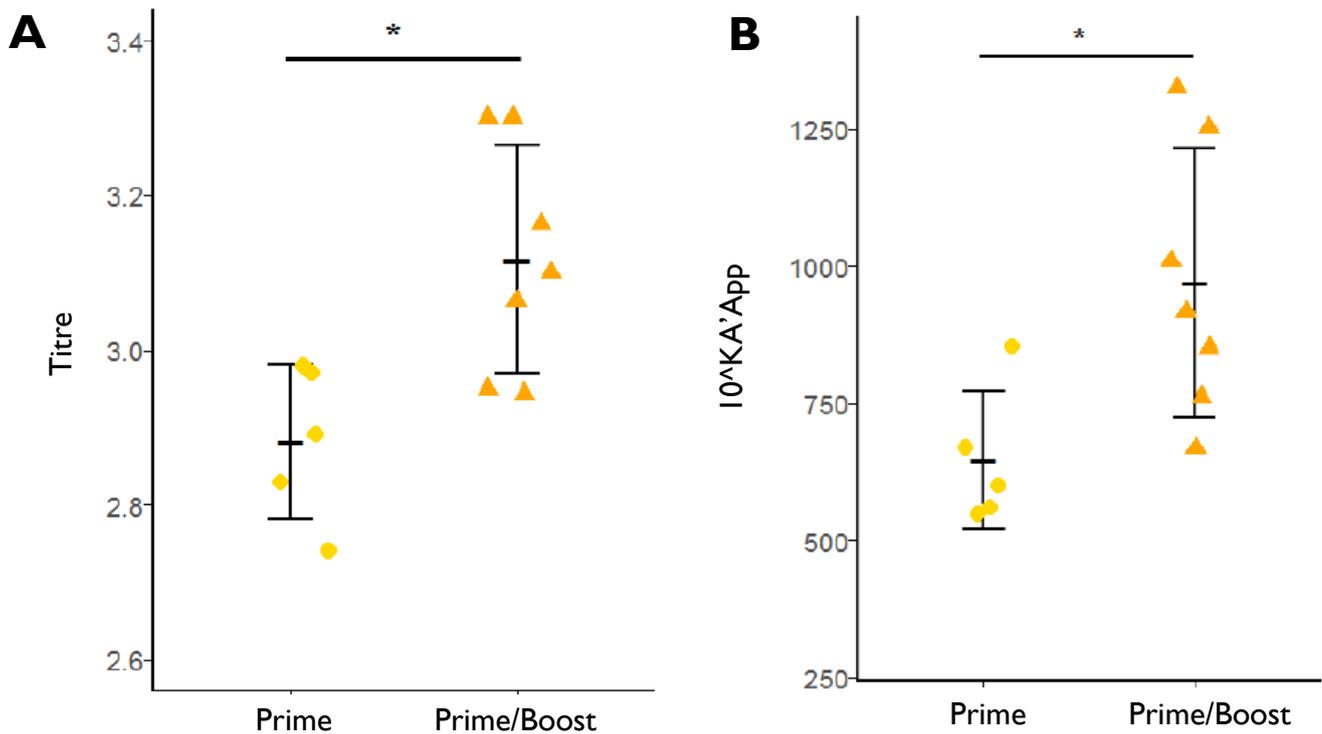


Figure 17. Comparaison des Titres (**A**) et des Avidités apparentes (**B**) entre le groupe de souris ayant reçu une administration d'A β_{1-40} fibrillaire (Prime) et celui ayant également reçu une injection de rappel (Prime/Boost).

Les sérums des souris immunisées ont été collectés au moment du sacrifice par ponction intracardiaque, et ont été poolés par groupe de traitement. Pour séparer les IgG des IgM, nous avons utilisé la chromatographie d'exclusion de taille (Size Exclusion Chromatography ou SEC), qui permet de séparer les protéines d'un mélange en fonction de leur rayon de Stokes (**Figure 18.A**). Les principaux pics du diagramme de fractionnement correspondaient aux volumes d'élution des principales protéines attendues : l'hémoglobine (certains sérums murins étaient hémolysés suite à la ponction intracardiaque), l'albumine, les IgG et les IgM. Nous avons vérifié la présence d'IgG et d'IgM anti-A β dans les fractions attendues, dissociées ou non, par ELISA. Le signal étant très faible en IgM, nous avons confirmé la présence d'IgM dans les fractions les moins retenues par immunoempreinte sur nitrocellulose après électrophorèse de zone (**Figure 18.B**).

On a ainsi pu obtenir 6 fractions différentes, enrichies respectivement en IgG ou IgM anti-A β naturelles, ou de moyenne, ou de forte avidité.

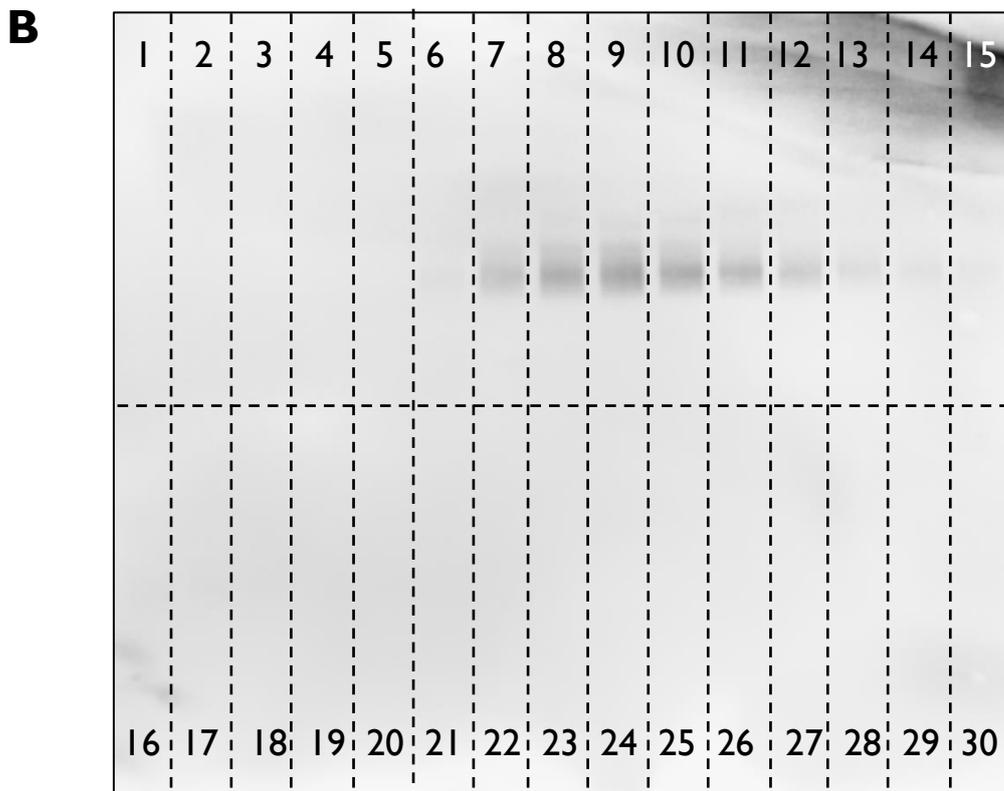
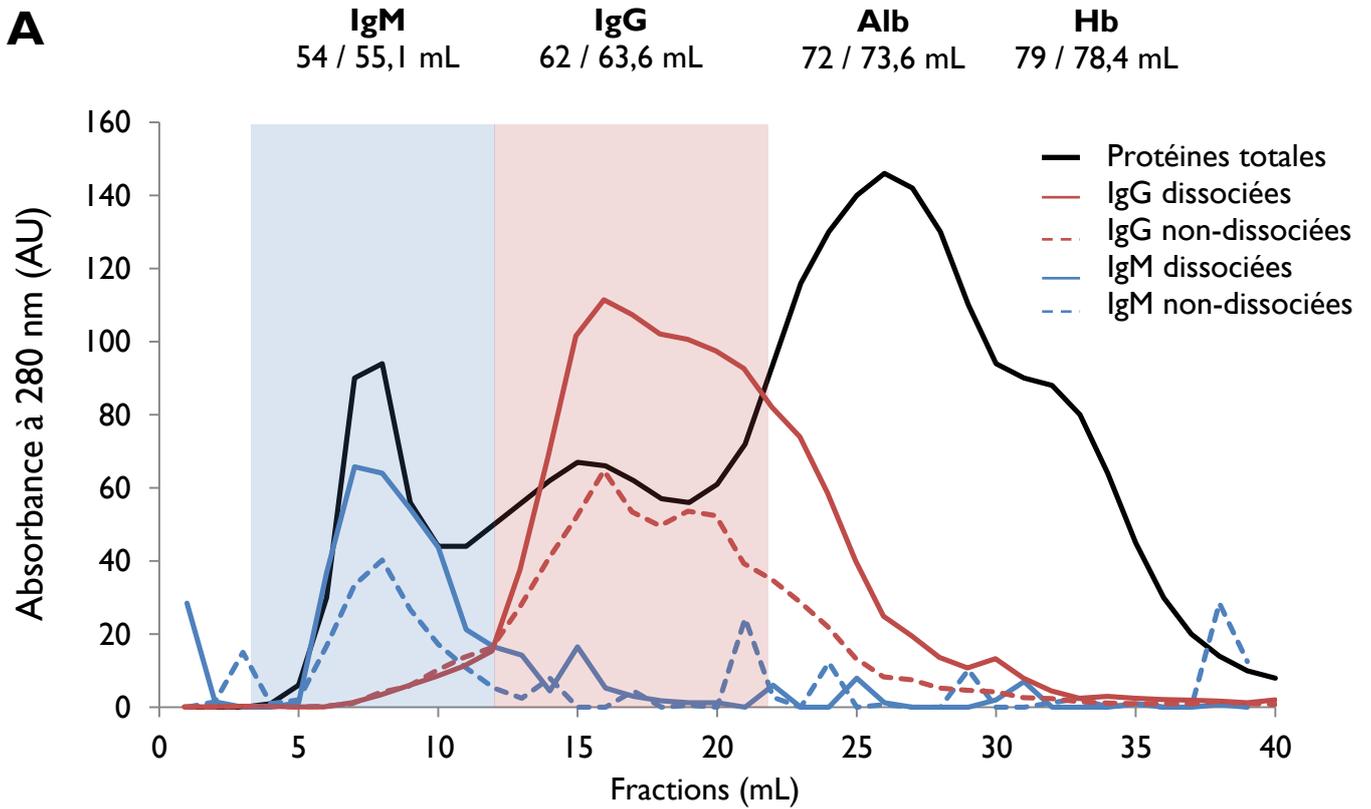


Figure 18. A. Diagramme de fractionnement par chromatographie d'exclusion de taille d'un pool de sérum de souris sauvages immunisées contre l' $A\beta_{1-40}$ fibrillaire (protocole Prime/Boost). Les protéines sont séparées en fonction de leur taille. Les volumes d'éluion expérimentaux des principaux pics correspondent aux volumes d'éluion théoriques (volume observé / volume théorique) pour les IgM, les IgG, l'Albumine (Alb) et l'hémoglobine (Hb). Les courbes en rouge (IgG) et en bleu (IgM) correspondent aux absorbance relatives mesurées par l'ELISA anti- $A\beta_{1-37}$ sur fractions dissociées ou non dissociées. **B.** La présence d'IgM dans les fractions 7 à 13 a été vérifiée par immunoempreinte après électrophorèse de zone en révélant les IgM murines.

3.2. Effets des préparations d'anticorps anti-A β sur les souris APP23

Notre principal objectif était d'étudier les effets de différentes caractéristiques des anticorps anti-A β , ici différents isotypes et différentes affinités, sur l'angiopathie amyloïde cérébrale, et plus particulièrement sur le déclenchement de saignements ou d'angéites cérébrales. Nous montrons ici des résultats préliminaires, car tous les cerveaux de souris n'ont pas encore été analysés.

Plusieurs études ont rapporté une aggravation des dépôts vasculaires après administration d'anticorps anti-A β monoclonaux (Thakker et al., 2009 ; Pfeifer et al., 2002). Nous avons d'abord cherché à savoir si l'administration de nos préparations polyclonales avait un effet similaire. L'immunomarquage de l'A β a permis de distinguer plusieurs types de structures, certaines pouvant correspondre à des dépôts parenchymateux fortement évocateurs de plaques amyloïdes parenchymateuses, d'autres à des dépôts vasculaires (**Figure 19.A**). Afin de quantifier l'A β vasculaire et de le différencier de l'A β parenchymateux, nous avons quantifié le pourcentage d'aire marquée à la fois par l'A β et par CD31, un marqueur endothélial (**Figure 19.B-C**). A ce stade, l'analyse n'a pas montré de différence significative entre les différents groupes traités (**Figure 19.F**).

Nous avons ensuite recherché une différence concernant les cellules gliales entre les différents groupes de souris traités. En particulier, il semble qu'il existe une astrocytose dans le modèle APP23 (Calhoun et al., 1999). Nos résultats suggèrent une augmentation du marquage GFAP spécifique des astrocytes chez les souris APP23 traitées par IgG anti-A β de forte affinité (3,7% de l'aire totale), comparativement aux IgG d'affinité faible (1.1 %) et moyenne (1.2% ; **Figure 19.D et G**). En revanche, nous n'avons pas trouvé de différence significative concernant le % d'aire marquée à Iba1, un marqueur de microglie activée (**Figure 19.E et H**).

Concernant l'effet du traitement sur les manifestations de l'AAC, nous n'avons pas observé d'infiltrats vasculaires ou périvasculaires particuliers. Quant au nombre de microsaignements (**Figure 19.I**), nous n'avons pas observé de différence significative entre les groupes, mais ces résultats préliminaires n'excluent pas qu'il puisse y en avoir, notamment concernant les IgG et IgM de haute avidité, et les IgG naturelles (**Figure 19.J**).

En bref, ces résultats suggèrent qu'il puisse y avoir un effet des anticorps anti-A β dépendant de l'isotype et de l'avidité sur le recrutement astrocytaire et la survenue de microsaignements. Les IgG et les anticorps de haute avidité seraient particulièrement pathogènes, mais ces résultats très préliminaires demandent à être confirmés sur un nombre plus importants d'animaux.

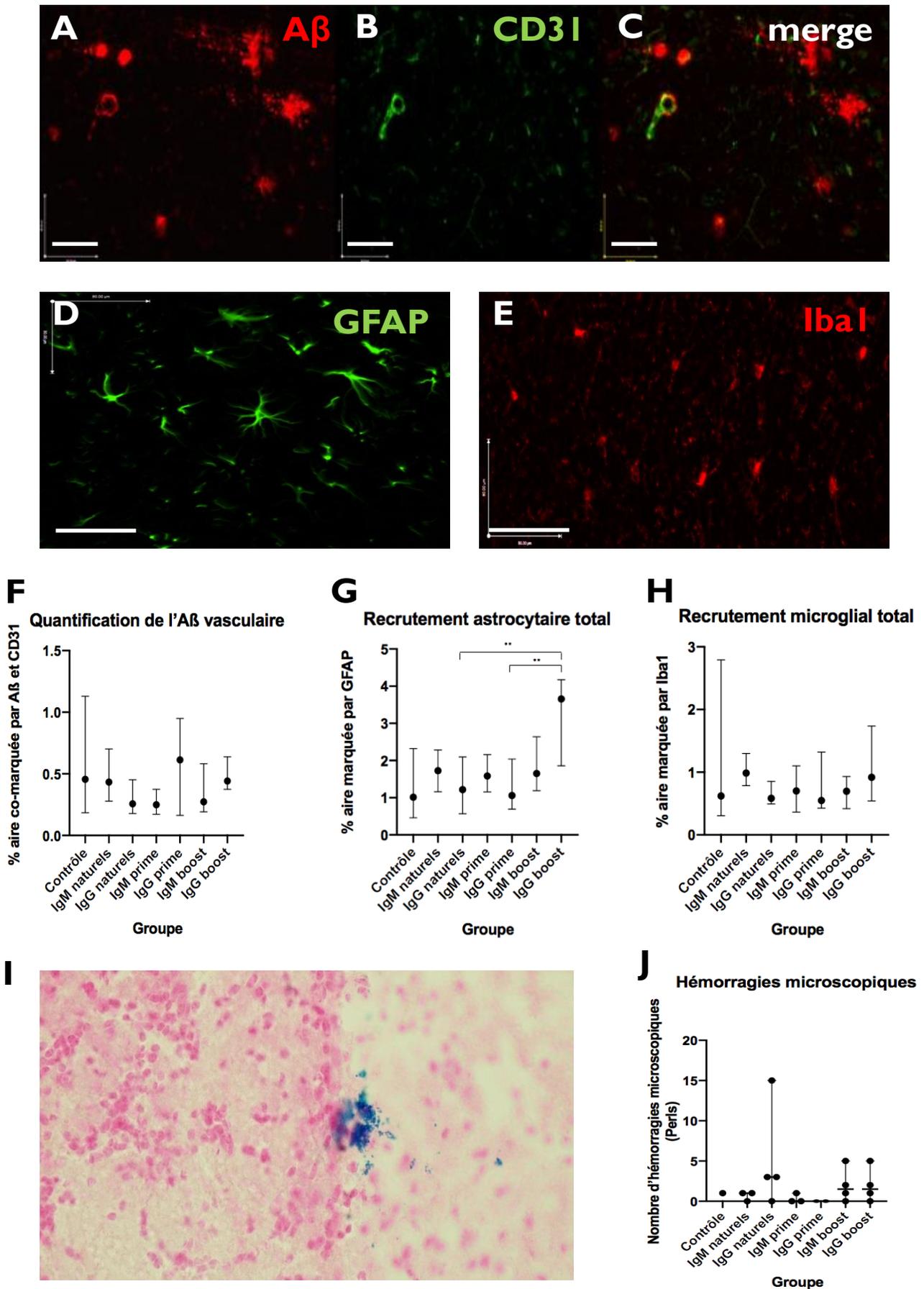


Figure 19. A-E. Marquage de l'A β (A), du CD31 (B), de l'A β et de CD31 (C), de la GFAP (D) et de Iba1 (E) dans un cerveau d'APP23. (barre d'échelle: 100 μ m). **F.** Quantification de l'A β vasculaire dans les différents groupes traités. **G.** Quantification du marquage GFAP dans les différents groupes traités. **H.** Quantification du marquage Iba1 dans les différents groupes traités. **I.** Microhémorragie ancienne : dépôts d'hémossidérine visibles par coloration de Perls. **J.** Quantification des microhémorragies dans les différents groupes traités.

Discussion

I. Partie méthodologique : mise au point d'une méthode d'analyse des anticorps anti-A β

La plupart des études qui ont cherché à détecter les anticorps anti-A β dans des fluides biologiques ont utilisé des méthodes dérivées de l'ELISA. Il s'agit d'une technique éprouvée, peu onéreuse, et facile à mettre en place dans n'importe quel laboratoire. Cependant, les nombreuses études qui se sont intéressées aux anticorps anti-A β dans la MA ont obtenu des résultats contradictoires, certaines équipes trouvant des concentrations augmentées, diminuées, ou identique dans la MA comparativement aux sujets témoins. Ces résultats peuvent s'expliquer dans une certaine mesure par des variations méthodologiques concernant : le peptide utilisé, les protocoles de préparation et d'agrégation du peptide, l'isotype d'immunoglobuline révélateur, la dilution de l'échantillon, les conditions pré-analytiques (notamment le prétraitement ou non en milieu acide), et la prise en compte ou non du signal non-spécifique. De surcroît, les propriétés intrinsèques des anticorps anti-A β compliquent également leur analyse. En effet, ces anticorps font partie des autoanticorps naturels présents chez tous les individus, sains ou malades. Ils sont d'isotype IgG, IgA, et IgM anti-A β , et semblent circuler dans le sang sous forme de complexes immuns, qui nécessitent d'être dissociés préalablement à leur fixation sur l'A β immobilisé sur plaque.

Concernant les préparations antigéniques ayant servi d'antigènes immobilisés sur plaque, nous avons utilisé des peptides A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₄₂ synthétiques à haut degré de pureté (> 95%), et des protocoles de préparation décrits dans la littérature (Stine et al., 2003 ; Jan et al., 2010). Deux techniques ont été utilisées pour caractériser les préparations d'A β dites « soluble » (s-) et « fibrillaire » (f-) : la cryoTEM et la fluorescence de la Thioflavine T. L'avantage de la cryoTEM est qu'elle permet de visualiser des agrégats dans un état très proche de celui en solution, limitant des agrégats artéfactuels liés au dépôt et au séchage sur support de la TEM classique. Elle permet de visualiser de gros agrégats tels que des fibrilles, mais ne permet pas d'appréhender les monomères ou de petits agrégats tels que les oligomères de bas poids moléculaire, qui peuvent être visualisés par d'autres techniques, telles que la microscopie de force atomique. Seules les préparations d'A β ₁₋₄₂ ont été analysées par cryoTEM, car ces expériences ont été faites lorsque nous nous intéressions principalement aux sérologies anti-A β dans la MA. Ces expériences ont donc été complétées par celles de fluorescence à la ThT, réalisées pour toutes les préparations d'A β ₁₋₄₂ et d'A β ₁₋₄₀. Ces expériences ne nécessitent pas de microscope électronique, ni de matériel de cryoTEM, et ont donc pu être réalisées dans notre laboratoire. Elles ont permis de valider la présence de matériel amyloïde réactif à la ThT dans les préparations fibrillaires. Il est difficile d'affirmer l'absence complète de matériel amyloïde dans les préparations d'A β soluble, car d'après notre expérience, il existe toujours une fluorescence résiduelle. Cela dit, cette fluorescence résiduelle était comparable dans les deux

préparations d'A β soluble, et doit être mise en regard de la quasi-absence d'agrégats dans la préparation de s-42 visualisée par cryoTEM. Par conséquent, les préparations d'A β dites « soluble » seraient décrites de façon plus appropriée comme une préparation sans fibrilles amyloïdes, et les préparations d'A β dites « fibrillaires » comme contenant des fibrilles amyloïdes, sans exclure qu'elles contiennent dans une certaine mesure de plus petits agrégats, amyloïdes ou non. Nous avons utilisé l'adjonction de Cu²⁺ dans les préparations d'A β « soluble », selon Matheou et al., (2015) afin d'éviter la formation de fibrilles au cours de l'étape de coating.

Un élément important pour l'analyse des anticorps anti-A β circulants est l'étape préanalytique de traitement en conditions acides (Li et al., 2004 ; Li et al., 2007), censée dissocier des complexes immuns préformés. Nous avons confirmé ce phénomène par une autre technique : la résonance plasmonique de surface. L'étape de dissociation nécessite un compromis de pH : s'il est trop élevé, cette dissociation ne se fait pas, tandis que s'il est trop acide, on risque la création d'un signal artéfactuel, soit par altération des paratopes de certains anticorps sans réactivité préalable vis-à-vis de l'A β , soit par augmentation de la liaison des anticorps au plastique de la plaque (Li et al., 2007). De surcroît, cette liaison au plastique semble médiée par le fragment Fab, et il est difficile de s'en affranchir si le pH a été trop acide (Szabo et al., 2010). Certains auteurs ont discuté le caractère artéfactuel de tout signal de liaison à l'A β obtenu après traitement à pH même modérément acide, mais le fait que la perte de signal par formation de complexes immuns puisse être reproduite expérimentalement (Gustaw et al., 2008) et qu'il s'agisse d'un phénomène réversible comme nous l'avons montré expérimentalement rend selon nous convaincant que le signal mesuré sur les puits coatés par l'A β soit le résultat d'une réactivité authentique démasquée. Plutôt que des puits non-coatés, nous aurions pu utiliser un coating par une protéine non pertinente : de la BSA, ou même un peptide A β 42-I ou scrambled. Toutefois, il n'est pas exclu que nous ayons également obtenu une réactivité vis-à-vis de ces antigènes, comme cela a été le cas pour l'actine, en particulier après dissociation, γ compris venant d'anticorps également réactifs vis-à-vis de l'A β . En effet, les autoanticorps naturels sont décrits comme polyréactifs, et les peptides A β 42-I ou A β scrambled semblent également posséder une propension à l'agrégation et à la formation de fibrilles amyloïdes, ainsi que des propriétés neurotoxiques (Vadukul et al., 2017). Il n'est donc pas exclu qu'il existe des anticorps naturels réactifs vis-à-vis de ces espèces, ni qu'il s'agisse d'anticorps susceptibles de lier l'A β ₁₋₄₂.

L'analyse des courbes de dilutions des anticorps anti-A β a servi à estimer différents paramètres de ces anticorps. Cette modélisation a été faite en utilisant l'équation de la fonction sigmoïde liée à la fonction de répartition de la loi logistique. Bien qu'il existe d'autres fonctions ayant une allure sigmoïde, nous nous sommes restreint à ce modèle logistique, utilisé dans différents domaines de la biologie. Nous avons montré que, pour la modélisation des points expérimentaux, l'utilisation de

fonctions plus complexes n'est pas nécessaire. Quatre paramètres décrivant la sigmoïde (Maximum, Titre, $K'A$ App, Pente) traduisent les propriétés des anticorps (respectivement, pour les 3 premiers, la diversité de reconnaissance antigénique, la concentration, et l'avidité). Concernant la pente, il est difficile d'appréhender intuitivement quelles propriétés des anticorps influencent ce paramètre. Il est possible qu'il soit dépendant des phénomènes de coopérativité entre différents sites de liaison antigénique, mais il n'est pas certain que ces phénomènes puissent intervenir dans ce dispositif expérimental. De plus, il s'agit du paramètre qui présente le moins de variabilité interindividuelles, et qui ne présente pas de grande différence entre les isotypes divalents tels que les IgG ou les IgA, et les IgM décavalentes. Concernant les autres paramètres, il faut également souligner qu'il n'y a pas d'équivalence directe entre les paramètres de la courbe et les propriétés des anticorps. Cette équivalence est en réalité complexe, et peut être influencée par d'autres facteurs. C'est par exemple le cas du Maximum, qui dépend du temps de révélation. Pour cette raison, un pool de sérum a servi d'étalon interne afin de normaliser les valeurs de DO de différentes expériences.

2. Etudes corrélatives

Nous avons utilisé la méthode ELISA d'analyse des anticorps anti-A β pour étudier les facteurs de variabilité physiologiques et pathologiques des anticorps anti-A β , dans des études pilotes chez la souris, et chez l'homme notamment dans le contexte de l'AAC.

A notre connaissance, personne n'a jamais rapporté dans la littérature l'existence d'anticorps anti-A β présents spontanément chez la souris, une espèce qui contrairement à l'homme ou à d'autre animaux ne présente pas spontanément de maladie liée à des dépôts d'A β . Malgré des effectifs restreints, nos résultats suggèrent l'existence d'anticorps anti-A β naturels chez ces rongeurs. A l'instar de l'homme, la réponse interindividuelle anti-A β (Du et al., 2001 ; Jianping et al., 2006 ; Storace et al., 2010, Dorothée et al., 2012) chez la souris est extrêmement variable. Un facteur de variabilité semble être le fond génétique. Compte-tenu des résultats obtenus sur souris CD3 KO, qui ne présente pas de lymphocytes T, il est vraisemblable que réponse humorale dépende au moins partiellement d'une coopération T-B. Le fait que l'on semble observer une augmentation de la production des anticorps anti-A β chez les souris SJL semble également aller dans ce sens, car cette lignée a une plus forte réponse T CMH II-restreinte (Toly-Ndour et al., 2011).

La production d'IgG et d'IgM anti-A β semble également se développer avec l'âge chez l'animal, tandis que la production d'IgA est rarissime. L'augmentation de cette production est parallèle à celle des auto-anticorps anti-actine, aussi il est vraisemblable que ces variations traduisent une augmentation de la production des auto-anticorps naturels, plutôt qu'une réponse spécifique envers l'A β . Bien qu'une fois encore les effectifs soient relativement faibles, ces résultats semblent se confirmer chez

l'homme, par comparaison des courbes de dilutions obtenues chez de jeunes enfants, des enfants, et adultes. A notre connaissance, une seule étude a recherché l'existence des anticorps anti-A β chez l'enfant, et n'a pas montré de variation du titre d'IgG avec l'âge (Baril et al., 2004). Nos résultats ne montrent pas non plus de différence manifeste concernant les IgG. Mais l'analyse par sous-classes, ainsi que celles des IgM et des IgA suggère l'augmentation de la production d'anticorps anti-A β avec l'âge. Ceci est informatif car dans la plupart des études, les groupes contrôles sont des sujets âgés apparemment sains, mais chez qui on ne peut exclure l'existence de dépôts cérébraux d'A β . En revanche, en l'absence de trisomie 21 ou de duplication du gène de l'AAP, les dépôts parenchymateux ou vasculaires d'A β ne surviennent que tardivement à l'âge adulte. Par conséquent, la production d'anticorps anti-A β semble avoir lieu chez la souris, et chez l'homme en absence de dépôts cérébraux d'A β , et augmenter avec l'âge indépendamment de la présence de ces dépôts.

Nous avons souhaité étudier les anticorps anti-A β dans deux modèles de souris transgéniques : APP-PS1 et APP23. La différence neuropathologique principale entre ces deux modèles, qui présentent la même mutation de l'APP, est que la souris APP23 présente plus de dépôts vasculaires que la souris APP-PS1. Nous avons observé une augmentation significative des anticorps anti-A β sériques chez la souris APP-PS1, et une tendance à la diminution chez les souris APP23, comparativement aux souris WT. Cela dit, cette variabilité ne semble pas liée à une réponse spécifique vis-à-vis de l'A β , puisque nous avons obtenu des résultats similaires pour les anticorps anti-actine. Ces trois lignées étaient de même fond génétique (C57BL/6), mais les souris APP-PS1 bien que du même âge, n'étaient pas des littermates des souris WT et APP23, ce qui peut dans une certaine mesure expliquer cette variabilité.

Certains arguments expérimentaux et cliniques suggèrent que les immunothérapies anti-A β ont pourtant tendance à augmenter les dépôts vasculaires, c'est-à-dire l'AAC, peut-être comme voie de clairance des dépôts parenchymateux. Plusieurs travaux ont discuté le lien entre l'AAC et les effets indésirables des immunothérapies anti-A β . Plus spécifiquement, les ARIA déclenchées par l'administration d'anticorps anti-A β ont une similarité frappante avec les manifestations hémorragiques (AAC-he) ou inflammatoires (AAC-ri) spontanées de l'AAC. L'une des hypothèses de notre travail est que des espèces particulières d'anticorps anti-A β présents spontanément chez les individus présentant de l'AAC puissent déclencher ses manifestations hémorragiques ou inflammatoires spontanées.

Certains travaux ont montré que les patients en phase aiguë d'AAC-ri présentent des concentrations augmentées d'IgG anti-A β dans le LCR, comparativement à des sujets contrôles (Piazza et al., 2013 ; Carmona-Iragui et al., 2016). A partir de l'étude d'un cas, il a été suggéré que ces anticorps étaient issus d'une synthèse intrathécale (DiFrancesco et al., 2011). Cependant, des arguments expérimentaux suggèrent que la voie périphérique serait plus pathogène que l'administration centrale (Thakker et al., 2009). Pourtant, jusqu'à présent, les anticorps anti-A β sériques dans le contexte de

l'AAC ont suscité peu d'intérêt. L'objectif principal de l'étude AACAb était d'étudier les profils sérologiques associés aux phénotypes cliniques hémorragiques ou inflammatoires de l'AAC.

Nous avons montré l'existence de profils sérologiques complexes dans l'AAC, distinct entre l'AAC-ri et l'AAC-he, par deux stratégies d'analyse différentes. La première, originale et ayant fait l'objet du brevet en Annexe II, utilise un index, appelé MAST pour *Maximum, Avidity, Steepness, Titer*. Le MAST-Index combine le maximum d'information apporté par une courbe de dilution donnée, c'est-à-dire obtenue pour un isotype donné vis-à-vis d'un antigène donné. Afin de maximiser cette information apportée par le MAST-Index, les coefficients de pondération intégrés dans sa formule sont ceux obtenus par ACP réalisée sur l'ensemble de la base de données AACAb. Par conséquent, la formule du MAST-Index est celle qui décrit un maximum de variabilité de l'échantillon, mais sans orienter *a priori* cette formule vers une meilleure distinction des catégories cliniques. Une autre stratégie d'analyse plus classique par régression logistique multivariée a également été employée. Elle possède l'avantage de pouvoir intégrer plusieurs variables obtenues par différentes courbes de dilutions, et de pouvoir contrôler ces variables vis-à-vis de covariables telles que l'âge ou le genre. En revanche, elle comprend un risque plus élevé de sur-ajustement du modèle car le choix des variables se fait directement sur le critère de discrimination des groupes d'intérêt. Avec 96 variables analysées par sujet, il y a inflation du risque d'erreur de type-I. Ceci étant dit, le raisonnement appliqué en général pour réduire ce risque fait l'hypothèse de l'indépendance des variables étudiées. Nous avons montré que ce n'est pas le cas dans cette cohorte. Par conséquent, la stratégie classique de correction de la p-value qu'est la méthode de Bonferroni est vraisemblablement trop conservatrice. La stratégie d'analyse du MAST-Index permet de diminuer le risque de fausse découverte par réduction du nombre de variables. Le risque de fausse positivité est plus discutable pour l'analyse par régression logistique multivariée et difficile à évaluer, même si les modèles comprennent peu de variables au regard des effectifs.

Quoi qu'il en soit, l'analyse sérologique de la cohorte AACAb est une preuve de concept qui suggère l'association entre certaines espèces d'anticorps anti-A β circulants et des phénotypes clinico-radiologiques de l'AAC. Les manifestations cliniques de l'AAC semblent être liées, dans une certaine mesure, ou bien à un biais dans le répertoire des anticorps anti-A β naturels, ou bien à une réponse humorale adaptative induite dans le contexte de l'AAC. Nous pensons que des différences sérologiques pourront à l'avenir être utilisées comme biomarqueurs diagnostiques et/ou pronostiques dans l'AAC.

A l'exception notable des IgG4 anti-f42, tous les paramètres sérologiques liés à l'A β ₁₋₄₂ étaient corrélés négativement au risque d'AAC. Concernant les anticorps réactifs vis-à-vis de l'A β ₁₋₄₀, nos résultats semblent indiquer un développement préférentiel de la réponse IgG3, IgG4 et IgA. De façon intéressante, une diminution de la diversité des IgM anti-s40 était le seul dénominateur commun au

profil observé dans l'AAC-ri et l'AAC-he. L'interprétation de ce phénomène doit être prudente : cela pourrait indiquer une plus faible réponse IgM, mais aussi une réponse IgM préférentielle envers des épitopes d'A β ₁₋₄₀ préférentiellement exposés dans les dépôts cérébrovasculaires.

3. Partie expérimentale : effets de préparations enrichies en IgG ou IgM anti-A β de faible, moyenne, et forte avidité sur les manifestations de l'AAC dans la souris APP23

Les études corrélatives présentées au paragraphe précédent ne permettent pas d'affirmer le lien de cause à effet entre la présence de certaines espèces d'anticorps anti-A β dans le sérum et l'occurrence de manifestations inflammatoires ou hémorragiques de l'AAC. Il est possible que certaines espèces d'anticorps anti-A β ne soient des facteurs de susceptibilité pour le développement de l'AAC, augmentant alors le risque de présenter l'une ou l'autre de ses manifestations. D'autre part, bien que les résultats préliminaires obtenus dans les modèles de souris transgéniques ne permettent pas de le conclure, il est possible que la présence de dépôts vasculaires d'A β induise une réponse humorale adaptative contre ce peptide, qui s'ajoute alors au répertoire primaire. Ces anticorps induits pourraient alors participer à la majoration de l'AAC, et/ou au déclenchement de ses manifestations hémorragiques ou inflammatoires, comme le suggèrent les résultats expérimentaux obtenus avec des anticorps monoclonaux anti-A β administrés en modèles murins (Pfeifer et al., 2002 ; Thakker et al., 2009) et à des patients atteints de MA. Chez l'homme, le déclenchement de ces complications était dépendant de la dose administrée, mais on ignore quelles autres propriétés de l'anticorps sont liées au déclenchement de ces complications.

L'objectif de cette partie expérimentale était d'identifier si la majoration de l'AAC, ou si le déclenchement de complications hémorragiques et inflammatoires de l'AAC sont liés à l'isotype et à l'affinité des anticorps anti-A β . Pour cela, nous avons immunisé des souris WT par de l'A β ₁₋₄₀ fibrillaire et séparé une fraction enrichie en IgG anti-A β , et l'autre en IgM anti-A β . Trois groupes de souris ont été immunisés : l'un par de l'adjuvant seul, donnant des anticorps anti-A β de faible avidité, un autre avec une seule administration d'A β , donnant des anticorps d'avidité modérée, et un troisième avec un rappel vaccinal, donnant des anticorps d'avidité élevée. La même quantité de protéines a ensuite été administrée à des souris APP23 par voie périphérique. Il n'est cependant pas certain que la même quantité d'anticorps anti-A β ait été administrée. Les cerveaux des souris APP23 après administration des anticorps anti-A β ont été collectés, et quelques uns ont pu être analysés de façon préliminaire avant la fin de ce travail de thèse.

A ce stade, l'analyse n'a pas montré de différence significative entre les différents groupes traités concernant la quantité d'A β vasculaire. Nous n'avons pas trouvé de différence concernant l'activation microgliale, mais une tendance à l'augmentation du marquage astrocytaire dans le groupe traité par

IgG anti-A β de forte avidité, comparativement aux IgG d'avidité faible et moyenne. Concernant l'effet du traitement sur les manifestations de l'AAC, nous n'avons pas observé d'infiltrats vasculaires ou périvasculaires particuliers ni de différence significative entre les groupes, concernant le nombre de microsaignements.

Il est clair qu'un nombre plus important d'animaux doit être étudié pour conclure quant à l'importance de l'isotype ou de l'avidité des anticorps anti-A β pour le déclenchement des complications de l'AAC. Il est également possible que les animaux ne présentent pas suffisamment de dépôts vasculaires à cet âge pour pouvoir conclure. Thakker et al., ont bien traité des souris Tg2576 après 16 mois pour constater la majoration de l'AAC et le déclenchement de microhémorragies (Thakker et al., 2009). Cependant, dans le modèle transgénique que nous avons utilisé, la souris APP23, Pfeifer et al., ont montré des résultats similaires à 21 mois (Pfeifer et al., 2002). Il est également possible que les doses d'anticorps administrées doivent être bien plus élevées pour pouvoir constater une différence d'effet entre IgG et IgM ou entre anticorps de faible ou de forte avidité. Nous avons en cela été limités par les effectifs de souris sauvages immunisées par l'A β fibrillaire.

En conclusion, ce travail se présente comme une contribution à l'étude des anticorps anti-A β en contexte physiologique et pathologique. Une part conséquente de ce travail est méthodologique et a consisté en la mise au point d'une méthode multiparamétrique d'analyse des anticorps anti-A β sériques. Cette méthode a été appliquée dans une série d'études corrélatives pilotes chez la souris, et en particulier dans l'étude d'une cohorte de sujets présentant des complications hémorragiques ou inflammatoires de l'AAC. Cette étude a fait l'objet d'un brevet (**Annexe II**) et d'un article déposé sur MedRxiv et soumis à *Neurology : Neuroimmunology & Neuroinflammation* (**Annexe III**), ainsi que d'un article de revue publié dans *Frontiers in Immunology* (**Annexe IV**). Des résultats préliminaires d'une étude expérimentale chez la souris APP23 ont été obtenus, et seront complétés avant soumission pour publication.

Bibliographie

Adolfsson O, Pihlgren M, Toni N, Varisco Y, Buccarello AL, Antonello K, Lohmann S, Piorkowska K, Gafner V, Atwal JK, Maloney J, Chen M, Gogineni A, Weimer RM, Mortensen DL, Friesenhahn M, Ho C, Paul R, Pfeifer A, Muhs A, Watts RJ. An effector-reduced anti- β -amyloid ($A\beta$) antibody with unique $a\beta$ binding properties promotes neuroprotection and glial engulfment of $A\beta$. *J Neurosci*. **2012** Jul 11;32(28):9677-89.

Agrawal N, Skelton AA. Structure and Function of Alzheimer's Amyloid β Proteins from Monomer to Fibrils: A Mini Review. *Protein J*. **2019** Aug;38(4):425-434.

Agyare EK, Leonard SR, Curran GL, Yu CC, Lowe VJ, Paravastu AK, Poduslo JF, Kandimalla KK. Traffic jam at the blood-brain barrier promotes greater accumulation of Alzheimer's disease amyloid- β proteins in the cerebral vasculature. *Mol Pharm*. **2013** May 6;10(5):1557-65.

Alonzo NC, Hyman BT, Rebeck GW, Greenberg SM. Progression of cerebral amyloid angiopathy: accumulation of amyloid-beta40 in affected vessels. *J Neuropathol Exp Neurol*. **1998** Apr;57(4):353-9.

Arai H, Lee VM, Messinger ML, Greenberg BD, Lowery DE, Trojanowski JQ. Expression patterns of beta-amyloid precursor protein (beta-APP) in neural and nonneural human tissues from Alzheimer's disease and control subjects. *Ann Neurol*. **1991** Nov;30(5):686-93.

Arai H, Umemura K, Ichimiya Y, Iseki E, Eto K, Miyakawa K, Kirino E, Shibata N, Baba H, Tsuchiwata S. Safety and pharmacokinetics of bapineuzumab in a single ascending-dose study in Japanese patients with mild to moderate Alzheimer's disease. *Geriatr Gerontol Int*. **2016** May;16(5):644-50.

Armour KL, van de Winkel JG, Williamson LM, Clark MR. Differential binding to human Fc γ R1a and Fc γ R1b receptors by human IgG wildtype and mutant antibodies. *Mol Immunol*. **2003** Dec;40(9):585-93.

Arndt JW, Qian F, Smith BA, Quan C, Kilambi KP, Bush MW, Walz T, Pepinsky RB, Bussi re T, Hamann S, Cameron TO, Weinreb PH. Structural and kinetic basis for the selectivity of aducanumab for aggregated forms of amyloid- β . *Sci Rep*. **2018** Apr 23;8(1):6412.

Arriagada PV, Marzloff K, Hyman BT. Distribution of Alzheimer-type pathologic changes in nondemented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease. *Neurology*. **1992** Sep;42(9):1681-8.

Arrighi HM, Barakos J, Barkhof F, Tampieri D, Jack C Jr, Melan on D, Morris K, Ketter N, Liu E, Brashear HR. Amyloid-related imaging abnormalities- haemosiderin (ARIA-H) in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a historical, prospective secondary analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. **2016** Jan;87(1):106-12.

Attems J, Jellinger KA, Lintner F. Alzheimer's disease pathology influences severity and topographical distribution of cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol*. **2005** Sep;110(3):222-31.

Attems J, Jellinger KA. Only cerebral capillary amyloid angiopathy correlates with Alzheimer pathology--a pilot study. *Acta Neuropathol*. **2004** Feb;107(2):83-90.

Attems J, Lintner F, Jellinger KA. Amyloid beta peptide₁₋₄₂ highly correlates with capillary cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease pathology. *Acta Neuropathol*. **2004** Apr;107(4):283-91.

Attems J. Sporadic cerebral amyloid angiopathy: pathology, clinical implications, and possible pathomechanisms. *Acta Neuropathol*. **2005** Oct;110(4):345-59.

Auriel E, Charidimou A, Gurol ME, Ni J, Van Etten ES, Martinez-Ramirez S, Boulouis G, Piazza F, DiFrancesco JC, Frosch MP, Pontes-Neto OV, Shoamanesh A, Reijmer Y, Vashkevich A, Ayres AM,

Schwab KM, Viswanathan A, Greenberg SM. Validation of Clinicoradiological Criteria for the Diagnosis of Cerebral Amyloid Angiopathy-Related Inflammation. *JAMA Neurol.* **2016** Feb;73(2):197-202.

Auriel E, Charidimou A, Gurol ME, Ni J, Van Etten ES, Martinez-Ramirez S, Boulouis G, Piazza F, DiFrancesco JC, Frosch MP, Pontes-Neto OV, Shoamanesh A, Reijmer Y, Vashkevich A, Ayres AM, Schwab KM, Viswanathan A, Greenberg SM. Validation of Clinicoradiological Criteria for the Diagnosis of Cerebral Amyloid Angiopathy-Related Inflammation. *JAMA Neurol.* **2016** Feb;73(2):197-202.

Avrameas S, Selmi C. Natural autoantibodies in the physiology and pathophysiology of the immune system. *J Autoimmun.* **2013** Mar;41:46-9.

Baccala R, Quang TV, Gilbert M, Ternynck T, Avrameas S. Two murine natural polyreactive autoantibodies are encoded by nonmutated germ-line genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1989** Jun;86(12):4624-8.

Bahmanyar S, Higgins GA, Goldgaber D, Lewis DA, Morrison JH, Wilson MC, Shankar SK, Gajdusek DC. Localization of amyloid beta protein messenger RNA in brains from patients with Alzheimer's disease. *Science.* **1987** Jul 3;237(4810):77-80.

Balakrishnan K, Andrei-Selmer LC, Selmer T, Bacher M, Dodel R. Comparison of intravenous immunoglobulins for naturally occurring autoantibodies against amyloid-beta. *J Alzheimers Dis.* **2010**;20(1):135-43.

Bales KR, O'Neill SM, Pozdnyakov N, Pan F, Caouette D, Pi Y, Wood KM, Volfson D, Cirrito JR, Han BH, Johnson AW, Zipfel GJ, Samad TA. Passive immunotherapy targeting amyloid- β reduces cerebral amyloid angiopathy and improves vascular reactivity. *Brain.* **2016** Feb;139(Pt 2):563-77.

Banks WA, Farr SA, Morley JE, Wolf KM, Geylis V, Steinitz M. Anti-amyloid beta protein antibody passage across the blood-brain barrier in the SAMP8 mouse model of Alzheimer's disease: an age-related selective uptake with reversal of learning impairment. *Exp Neurol.* **2007** Aug;206(2):248-56.

Bard F, Barbour R, Cannon C, Carretto R, Fox M, Games D, Guido T, Hoening K, Hu K, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee C, Lee M, Motter R, Nguyen M, Reed A, Schenk D, Tang P, Vasquez N, Seubert P, Yednock T. Epitope and isotype specificities of antibodies to beta -amyloid peptide for protection against Alzheimer's disease-like neuropathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2003** Feb 18;100(4):2023-8.

Baril L, Nicolas L, Croisile B, Crozier P, Hessler C, Sassolas A, McCormick JB, Trannoy E. Immune response to A β -peptides in peripheral blood from patients with Alzheimer's disease and control subjects. *Neurosci Lett.* **2004** Jan 30;355(3):226-30.

Bateman RJ, Munsell LY, Morris JC, Swarm R, Yarasheski KE, Holtzman DM. Human amyloid-beta synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid in vivo. *Nat Med.* **2006** Jul;12(7):856-61. doi: 10.1038/nm1438. Epub 2006 Jun 25. PMID: 16799555; PMCID: PMC2983090.

Baum L, Chen L, Ng HK, Pang CP. Apolipoprotein E isoforms in Alzheimer's disease pathology and etiology. *Microsc Res Tech.* **2000** Aug 15;50(4):278-81.

Bayer AJ, Bullock R, Jones RW, Wilkinson D, Paterson KR, Jenkins L, Millais SB, Donoghue S. Evaluation of the safety and immunogenicity of synthetic A β 42 (AN1792) in patients with AD. *Neurology.* **2005** Jan 11;64(1):94-101.

Béjot Y, Cordonnier C, Durier J, Aboa-Eboulé C, Rouaud O, Giroud M. Intracerebral haemorrhage profiles are changing: results from the Dijon population-based study. *Brain.* **2013** Feb;136(Pt 2):658-64.

Beyreuther K, Pollwein P, Multhaup G, Mönning U, König G, Dyrks T, Schubert W, Masters CL. Regulation and expression of the Alzheimer's beta/A4 amyloid protein precursor in health, disease, and Down's syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* **1993** Sep 24;695:91-102

Bibl M, Gallus M, Welge V, Esselmann H, Wiltfang J. Aminoterminaly truncated and oxidized amyloid- β peptides in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis.* **2012**;29(4):809-16.

Biffi A, Halpin A, Towfighi A, Gilson A, Busl K, Rost N, Smith EE, Greenberg MS, Rosand J, Viswanathan A. Aspirin and recurrent intracerebral hemorrhage in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology.* **2010** Aug 24;75(8):693-8.

Black RS, Sperling RA, Safirstein B, Motter RN, Pally A, Nichols A, Grundman M. A single ascending dose study of bapineuzumab in patients with Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* **2010** Apr-Jun;24(2):198-203.

Blennow K, Zetterberg H, Rinne JO, Salloway S, Wei J, Black R, Grundman M, Liu E; AAB-001 201/202 Investigators. Effect of immunotherapy with bapineuzumab on cerebrospinal fluid biomarker levels in patients with mild to moderate Alzheimer disease. *Arch Neurol.* **2012** Aug;69(8):1002-10.

Boche D, Denham N, Holmes C, Nicoll JA. Neuropathology after active Abeta42 immunotherapy: implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *Acta Neuropathol.* **2010** Sep;120(3):369-84.

Bohrmann B, Baumann K, Benz J, Gerber F, Huber W, Knoflach F, Messer J, Oroszlan K, Rauchenberger R, Richter WF, Rothe C, Urban M, Bardroff M, Winter M, Nordstedt C, Loetscher H. gantenerumab: a novel human anti-A β antibody demonstrates sustained cerebral amyloid- β binding and elicits cell-mediated removal of human amyloid- β . *J Alzheimers Dis.* **2012**;28(1):49-69.

Bombois S, Maurage CA, Gompel M, Deramecourt V, Mackowiak-Cordoliani MA, Black RS, Lavielle R, Delacourte A, Pasquier F. Absence of beta-amyloid deposits after immunization in Alzheimer disease with Lewy body dementia. *Arch Neurol.* **2007** Apr;64(4):583-7.

Boulouis G, Charidimou A, Jessel MJ, Xiong L, Roongpiboonsopit D, Fotiadis P, Pasi M, Ayres A, Merrill ME, Schwab KM, Rosand J, Gurol ME, Greenberg SM, Viswanathan A. Small vessel disease burden in cerebral amyloid angiopathy without symptomatic hemorrhage. *Neurology.* **2017** Feb 28;88(9):878-884.

Bouter Y, Lopez Noguerola JS, Tucholla P, Crespi GA, Parker MW, Wiltfang J, Miles LA, Bayer TA. Abeta targets of the biosimilar antibodies of bapineuzumab, crenezumab, solanezumab in comparison to an antibody against N-truncated Abeta in sporadic Alzheimer disease cases and mouse models. *Acta Neuropathol.* **2015** Nov;130(5):713-29.

Brettschneider S, Morgenthaler NG, Teipel SJ, Fischer-Schulz C, Bürger K, Dodel R, Du Y, Möller HJ, Bergmann A, Hampel H. Decreased serum amyloid beta₍₁₋₄₂₎ autoantibody levels in Alzheimer's disease, determined by a newly developed immuno-precipitation assay with radiolabeled amyloid beta₍₁₋₄₂₎ peptide. *Biol Psychiatry.* **2005** Apr 1;57(7):813-6.

Brion JP, Passareiro H, Nunez J, Flament-Durand J. Mise en évidence immunologique de la protéine Tau au niveau des lésions de dégénérescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer. *Arch Biol (Bruxelles)* **1985** ;95 :229-35.

Britschgi M, Olin CE, Johns HT, Takeda-Uchimura Y, LeMieux MC, Rufibach K, Rajadas J, Zhang H, Tomooka B, Robinson WH, Clark CM, Fagan AM, Galasko DR, Holtzman DM, Jutel M, Kaye JA, Lemere CA, Leszek J, Li G, Peskind ER, Quinn JF, Yesavage JA, Ghiso JA, Wyss-Coray T. Neuroprotective natural antibodies to assemblies of amyloidogenic peptides decrease with normal aging and advancing Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2009** Jul 21;106(29):12145-50.

- Brody M**, Liu E, Di J, Lu M, Margolin RA, Werth JL, Booth K, Shadman A, Brashear HR, Novak G. A Phase II, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Safety, Pharmacokinetics, and Biomarker Results of Subcutaneous bapineuzumab in Patients with mild to moderate Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* **2016** Oct 18;54(4):1509-1519.
- Burstein AH**, Zhao Q, Ross J, Styren S, Landen JW, Ma WW, McCush F, Alvey C, Kupiec JW, Bednar MM. Safety and pharmacology of ponezumab (PF-04360365) after a single 10-minute intravenous infusion in subjects with mild to moderate Alzheimer disease. *Clin Neuropharmacol.* **2013** Jan-Feb;36(1):8-13.
- Bush AI**, Martins RN, Rumble B, Moir R, Fuller S, Milward E, Currie J, Ames D, Weidemann A, Fischer P, et al., The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease is released by human platelets. *J Biol Chem.* **1990** Sep 15;265(26):15977-83.
- Cabrejo L**, Guyant-Maréchal L, Laquerrière A, Vercelletto M, De la Fournière F, Thomas-Antérion C, Verny C, Letournel F, Pasquier F, Vital A, Checler F, Frebourg T, Campion D, Hannequin D. Phenotype associated with APP duplication in five families. *Brain.* **2006** Nov;129(Pt 11):2966-76.
- Cadavid D**, Mena H, Koeller K, Frommelt RA. Cerebral beta amyloid angiopathy is a risk factor for cerebral ischemic infarction. A case control study in human brain biopsies. *J Neuropathol Exp Neurol.* **2000** Sep;59(9):768-73.
- Calhoun ME**, Burgermeister P, Phinney AL, Stalder M, Tolnay M, Wiederhold KH, Abramowski D, Sturchler-Pierrat C, Sommer B, Staufenbiel M, Jucker M. Neuronal overexpression of mutant amyloid precursor protein results in prominent deposition of cerebrovascular amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1999** Nov 23;96(24):14088-93.
- Carlson C**, Estergard W, Oh J, Suhy J, Jack CR Jr, Siemers E, Barakos J. Prevalence of asymptomatic vasogenic edema in pretreatment Alzheimer's disease study cohorts from phase 3 trials of semagacestat and solanezumab. *Alzheimers Dement.* **2011** Jul;7(4):396-401.
- Carlson C**, Siemers E, Hake A, Case M, Hayduk R, Suhy J, Oh J, Barakos J. Amyloid-related imaging abnormalities from trials of solanezumab for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (Amst).* **2016** Mar 2;2:75-85.
- Carmona-Iragui M**, Fernández-Arcos A, Alcolea D, Piazza F, Morenas-Rodriguez E, Antón-Aguirre S, Sala I, Clarimon J, Dols-Icardo O, Camacho V, Sampedro F, Munuera J, Nuñez-Marin F, Lleó A, Fortea J, Gómez-Ansón B, Blesa R. Cerebrospinal Fluid Anti-Amyloid- β Autoantibodies and Amyloid PET in Cerebral Amyloid Angiopathy-Related Inflammation. *J Alzheimers Dis.* **2016**;50(1):1-7.
- Carrano A**, Snkhchyan H, Kooij G, van der Pol S, van Horssen J, Veerhuis R, Hoozemans J, Rozemuller A, de Vries HE. ATP-binding cassette transporters P-glycoprotein and breast cancer related protein are reduced in capillary cerebral amyloid angiopathy. *Neurobiol Aging.* **2014** Mar;35(3):565-75.
- Carson, F.L., Hladik, C., 2009.** Histotechnology: A Self-Instructional Text, 3rd Edition edition. ed. American Society for Clinical Pathology, Chicago.
- Carty NC**, Wilcock DM, Rosenthal A, Grimm J, Pons J, Ronan V, Gottschall PE, Gordon MN, Morgan D. Intracranial administration of deglycosylated C-terminal-specific anti-A β antibody efficiently clears amyloid plaques without activating microglia in amyloid-depositing transgenic mice. *J Neuroinflammation.* **2006** May 10;3:11.
- Casali P**, Schettino EW. Structure and function of natural antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol.* **1996**;210:167-79.

Cattepoel S, Schaub A, Ender M, Gaida A, Kropf A, Guggisberg U, Nolte MW, Fabri L, Adlard PA, Finkelstein DI, Bolli R, Miescher SM. Intravenous immunoglobulin binds beta amyloid and modifies its aggregation, neurotoxicity and microglial phagocytosis in vitro. *PLoS One*. **2013** May 16;8(5):e63162.

Charidimou A, Boulouis G, Gurol ME, Ayata C, Bacskai BJ, Frosch MP, Viswanathan A, Greenberg SM. Emerging concepts in sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Brain*. **2017** Jul 1;140(7):1829-1850.

Charidimou A, Boulouis G, Roongpiboonsopit D, Auriel E, Pasi M, Haley K, van Etten ES, Martinez-Ramirez S, Ayres A, Vashkevich A, Schwab KM, Goldstein JN, Rosand J, Viswanathan A, Greenberg SM, Gurol ME. Cortical superficial siderosis multifocality in cerebral amyloid angiopathy: A prospective study. *Neurology*. **2017** Nov 21;89(21):2128-2135.

Charidimou A, Frosch MP, Al-Shahi Salman R, Baron JC, Cordonnier C, Hernandez-Guillamon M, Linn J, Raposo N, Rodrigues M, Romero JR, Schneider JA, Schreiber S, Smith EE, van Buchem MA, Viswanathan A, Wollenweber FA, Werring DJ, Greenberg SM; International AAC Association. Advancing diagnostic criteria for sporadic cerebral amyloid angiopathy: Study protocol for a multicenter MRI-pathology validation of Boston criteria v2.0. *Int J Stroke*. **2019** Dec;14(9):956-971.

Charidimou A, Martinez-Ramirez S, Shoamanesh A, Oliveira-Filho J, Frosch M, Vashkevich A, Ayres A, Rosand J, Gurol ME, Greenberg SM, Viswanathan A. Cerebral amyloid angiopathy with and without hemorrhage: evidence for different disease phenotypes. *Neurology*. **2015** Mar 24;84(12):1206-12.

Charidimou A, Peeters A, Fox Z, Gregoire SM, Vandermeeren Y, Laloux P, Jäger HR, Baron JC, Werring DJ. Spectrum of transient focal neurological episodes in cerebral amyloid angiopathy: multicentre magnetic resonance imaging cohort study and meta-analysis. *Stroke*. **2012** Sep;43(9):2324-30.

Check E. Nerve inflammation halts trial for Alzheimer's drug. *Nature*. **2002** Jan 31;415(6871):462.

Chu S, Xu F, Su Y, Chen H, Cheng X. Cerebral Amyloid Angiopathy (AAC)-Related Inflammation: Comparison of Inflammatory AAC and Amyloid- β -Related Angiitis. *J Alzheimers Dis*. **2016**;51(2):525-32.

Cirrito JR, Deane R, Fagan AM, Spinner ML, Parsadanian M, Finn MB, Jiang H, Prior JL, Sagare A, Bales KR, Paul SM, Zlokovic BV, Piwnicka-Worms D, Holtzman DM. P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest*. **2005** Nov;115(11):3285-90.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. **1993** Aug 13;261(5123):921-3.

Crespi GA, Ascher DB, Parker MW, Miles LA. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the Fab portion of the Alzheimer's disease immunotherapy candidate bapineuzumab complexed with amyloid- β . *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. **2014** Mar;70(Pt 3):374-7.

Cummings JL, Cohen S, van Dyck CH, Brody M, Curtis C, Cho W, Ward M, Friesenhahn M, Rabe C, Brunstein F, Quartino A, Honigberg LA, Fuji RN, Clayton D, Mortensen D, Ho C, Paul R. ABBY: A phase 2 randomized trial of crenezumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology*. **2018** May 22;90(21):e1889-e1897.

Davis PR, Giannini G, Rudolph K, Calloway N, Royer CM, Beckett TL, Murphy MP, Bresch F, Pagani D, Platt T, Wang X, Donovan AS, Sudduth TL, Lou W, Abner E, Kryscio R, Wilcock DM, Barrett EG, Head E. A β vaccination in combination with behavioral enrichment in aged beagles: effects on cognition, A β , and microhemorrhages. *Neurobiol Aging*. **2017** Jan;49:86-99.

Davis-Salinas J, Saporito-Irwin SM, Cotman CW, Van Nostrand WE. Amyloid beta-protein induces its own production in cultured degenerating cerebrovascular smooth muscle cells. *J Neurochem*. **1995** Aug;65(2):931-4.

Dawkins E, Small DH. Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *J Neurochem*. **2014** Jun;129(5):756-69.

De Riva V, Galloni E, Marcon M, Di Dionisio L, Deluca C, Meligrana L, Bolner A, Perini F. Analysis of combined CSF biomarkers in AD diagnosis. *Clin Lab*. **2014**;60(4):629-34.

Deane R, Du Yan S, Subramanian RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, Welch D, Manness L, Lin C, Yu J, Zhu H, Ghiso J, Frangione B, Stern A, Schmidt AM, Armstrong DL, Arnold B, Liliensiek B, Nawroth P, Hofman F, Kindy M, Stern D, Zlokovic B. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med*. **2003** Jul;9(7):907-13.

Deane R, Sagare A, Hamm K, Parisi M, LaRue B, Guo H, Wu Z, Holtzman DM, Zlokovic BV. IgG-assisted age-dependent clearance of Alzheimer's amyloid beta peptide by the blood-brain barrier neonatal Fc receptor. *J Neurosci*. **2005** Dec 14;25(50):11495-503.

Delaère P, Duyckaerts C, He Y, Piette F, Hauw JJ. Subtypes and differential laminar distributions of beta A4 deposits in Alzheimer's disease: relationship with the intellectual status of 26 cases. *Acta Neuropathol*. **1991**;81(3):328-35.

DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM. Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2001** Jul 17;98(15):8850-5.

Deng J, Hou H, Giunta B, Mori T, Wang YJ, Fernandez F, Weggen S, Araki W, Obregon D, Tan J. Autoreactive-A β antibodies promote APP β -secretase processing. *J Neurochem*. **2012** Mar;120(5):732-40.

Dodel R, Hampel H, Depboylu C, Lin S, Gao F, Schock S, Jäckel S, Wei X, Buerger K, Höft C, Hemmer B, Möller HJ, Farlow M, Oertel WH, Sommer N, Du Y. Human antibodies against amyloid beta peptide: a potential treatment for Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. **2002** Aug;52(2):253-6.

Dodel R, Hampel H, Depboylu C, Lin S, Gao F, Schock S, Jäckel S, Wei X, Buerger K, Höft C, Hemmer B, Möller HJ, Farlow M, Oertel WH, Sommer N, Du Y. Human antibodies against amyloid beta peptide: a potential treatment for Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. **2002** Aug;52(2):253-6.

Dodel R, Rominger A, Bartenstein P, Barkhof F, Blennow K, Förster S, Winter Y, Bach JP, Popp J, Alferink J, Wiltfang J, Buerger K, Otto M, Antuono P, Jacoby M, Richter R, Stevens J, Melamed I, Goldstein J, Haag S, Wietek S, Farlow M, Jessen F. Intravenous immunoglobulin for treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-finding trial. *Lancet Neurol*. **2013** Mar;12(3):233-43.

Dodel RC, Du Y, Depboylu C, Hampel H, Frölich L, Haag A, Hemmeter U, Paulsen S, Teipel SJ, Brettschneider S, Spottke A, Nölker C, Möller HJ, Wei X, Farlow M, Sommer N, Oertel WH. Intravenous immunoglobulins containing antibodies against beta-amyloid for the treatment of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. **2004** Oct;75(10):1472-4.

Donahue JE, Khurana JS, Adelman LS. Intracerebral hemorrhage in two patients with Down's syndrome and cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol*. **1998** Feb;95(2):213-6.

Doody RS, Thomas RG, Farlow M, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, Kieburtz K, Raman R, Sun X, Aisen PS, Siemers E, Liu-Seifert H, Mohs R; Alzheimer's Disease Cooperative Study Steering Committee; solanezumab Study Group. Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. **2014** Jan 23;370(4):311-21.

- Dorothee** G, Bottlaender M, Moukari E, de Souza LC, Maroy R, Corlier F, Colliot O, Chupin M, Lamari F, Lehericy S, Dubois B, Sarazin M, Aucouturier P. Distinct patterns of anti-amyloid- β antibodies in typical and atypical Alzheimer disease. *Arch Neurol*. **2012** Sep;69(9):1181-5.
- Du** Y, Dodel R, Hampel H, Buerger K, Lin S, Eastwood B, Bales K, Gao F, Moeller HJ, Oertel W, Farlow M, Paul S. Reduced levels of amyloid beta-peptide antibody in Alzheimer disease. *Neurology*. **2001** Sep 11;57(5):801-5.
- Du** Y, Wei X, Dodel R, Sommer N, Hampel H, Gao F, Ma Z, Zhao L, Oertel WH, Farlow M. Human anti-beta-amyloid antibodies block beta-amyloid fibril formation and prevent beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Brain*. **2003** Sep;126(Pt 9):1935-9.
- Duyckaerts** C, Delatour B, Potier MC. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol*. **2009** Jul;118(1):5-36.
- Eng** JA, Frosch MP, Choi K, Rebeck GW, Greenberg SM. Clinical manifestations of cerebral amyloid angiopathy-related inflammation. *Ann Neurol*. **2004** Feb;55(2):250-6.
- Fang** Q, Kannapell CC, Fu SM, Xu S, Gaskin F. VH and VL gene usage by anti- beta-amyloid autoantibodies in Alzheimer's disease: detection of highly mutated V regions in both heavy and light chains. *Clin Immunol Immunopathol*. **1995** May;75(2):159-67.
- Farlow** M, Arnold SE, van Dyck CH, Aisen PS, Snider BJ, Porsteinsson AP, Friedrich S, Dean RA, Gonzales C, Sethuraman G, DeMattos RB, Mohs R, Paul SM, Siemers ER. Safety and biomarker effects of solanezumab in patients with Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. **2012** Jul;8(4):261-71.
- Fazekas** F, Chawluk JB, Alavi A, Hurtig HI, Zimmerman RA. MR signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer's dementia and normal aging. *AJR Am J Roentgenol*. **1987** Aug;149(2):351-6.
- Ferrer** I, Boada Rovira M, Sánchez Guerra ML, Rey MJ, Costa-Jussá F. Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease. *Brain Pathol*. **2004** Jan;14(1):11-20.
- Ferrero** J, Williams L, Stella H, Leitermann K, Mikulskis A, O'Gorman J, Sevigny J. First-in-human, double-blind, placebo-controlled, single-dose escalation study of aducanumab (BIIB037) in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y)*. **2016** Jun 20;2(3):169-176.
- Fillit** H, Hess G, Hill J, Bonnet P, Toso C. IV immunoglobulin is associated with a reduced risk of Alzheimer disease and related disorders. *Neurology*. **2009** Jul 21;73(3):180-5.
- Forloni** G, Demicheli F, Giorgi S, Bendotti C, Angeretti N. Expression of amyloid precursor protein mRNAs in endothelial, neuronal and glial cells: modulation by interleukin-1. *Brain Res Mol Brain Res*. **1992** Nov;16(1-2):128-34.
- Fox** NC, Black RS, Gilman S, Rossor MN, Griffith SG, Jenkins L, Koller M; AN1792(QS-21)-201 Study. Effects of Abeta immunization (AN1792) on MRI measures of cerebral volume in Alzheimer disease. *Neurology*. **2005** May 10;64(9):1563-72.
- Frankfort** SV, van Campen JP, Tulner LR, Beijnen JH. Serum amyloid beta peptides in patients with dementia and age-matched non-demented controls as detected by surface-enhanced laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS). *Curr Clin Pharmacol*. **2008** Sep;3(3):144-54.
- Frisoni** GB. ARIA from off-key operas? *Lancet Neurol*. **2012** Mar;11(3):207-8.
- Frost** CV, Zacharias M. From monomer to fibril: Abeta-amyloid binding to aducanumab antibody studied by molecular dynamics simulation. *Proteins*. **2020** Jul 14.

Fukuchi K, Ho L, Younkin SG, Kunkel DD, Ogburn CE, LeBoeuf RC, Furlong CE, Deeb SS, Nochlin D, Wegiel J, Wisniewski HM, Martin GM. High levels of circulating beta-amyloid peptide do not cause cerebral beta-amyloidosis in transgenic mice. *Am J Pathol.* **1996** Jul;149(1):219-27.

Fuller JP, Stavenhagen JB, Christensen S, Kartberg F, Glennie MJ, Teeling JL. Comparing the efficacy and neuroinflammatory potential of three anti- β antibodies. *Acta Neuropathol.* **2015** Nov;130(5):699-711.

Gaskin F, Finley J, Fang Q, Xu S, Fu SM. Human antibodies reactive with beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *J Exp Med.* **1993** Apr 1;177(4):1181-6.

Gilman S, Koller M, Black RS, Jenkins L, Griffith SG, Fox NC, Eisner L, Kirby L, Rovira MB, Forette F, Orgogozo JM; AN1792(QS-21)-201 Study Team. Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology.* **2005** May 10;64(9):1553-62.

Glennner GG, **Wong CW**. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* **1984** May 16;120(3):885-90.

Gravina SA, Ho L, Eckman CB, Long KE, Otvos L Jr, Younkin LH, Suzuki N, Younkin SG. Amyloid beta protein (A β) in Alzheimer's disease brain. Biochemical and immunocytochemical analysis with antibodies specific for forms ending at A β 40 or A β 42(43). *J Biol Chem.* **1995** Mar 31;270(13):7013-6.

Greenberg SM, Al-Shahi Salman R, Biessels GJ, van Buchem M, Cordonnier C, Lee JM, Montaner J, Schneider JA, Smith EE, Vernooij M, Werring DJ. Outcome markers for clinical trials in cerebral amyloid angiopathy. *Lancet Neurol.* **2014** Apr;13(4):419-28.

Greenberg SM, Bacskai BJ, Hernandez-Guillamon M, Pruzin J, Sperling R, van Veluw SJ. Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease - one peptide, two pathways. *Nat Rev Neurol.* **2020** Jan;16(1):30-42.

Greenberg SM, Cho HS, O'Donnell HC, Rosand J, Segal AZ, Younkin LH, Younkin SG, Rebeck GW. Plasma beta-amyloid peptide, transforming growth factor- β 1, and risk for cerebral amyloid angiopathy. *Ann N Y Acad Sci.* **2000** Apr;903:144-9.

Greenberg SM, Gurol ME, Rosand J, Smith EE. Amyloid angiopathy-related vascular cognitive impairment. *Stroke.* **2004** Nov;35(11 Suppl 1):2616-9.

Greenberg SM, Vonsattel JP, Segal AZ, Chiu RI, Clatworthy AE, Liao A, Hyman BT, Rebeck GW. Association of apolipoprotein E epsilon2 and vasculopathy in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology.* **1998** Apr;50(4):961-5.

Greenberg SM, Vonsattel JP, Stakes JW, Gruber M, Finklestein SP. The clinical spectrum of cerebral amyloid angiopathy: presentations without lobar hemorrhage. *Neurology.* **1993** Oct;43(10):2073-9.

Gregoire SM, Chaudhary UJ, Brown MM, Yousry TA, Kallis C, Jäger HR, Werring J. The Microbleed Anatomical Rating Scale (MARS): reliability of a tool to map brain microbleeds. *Neurology.* **2009** Nov 24;73(21):1759-66.

Gruden MA, Davidova TB, Malisauskas M, Sewell RD, Voskresenskaya NI, Wilhelm K, Elistratova EI, Sherstnev VV, Morozova-Roche LA. Differential neuroimmune markers to the onset of Alzheimer's disease neurodegeneration and dementia: autoantibodies to A β ((25-35)) oligomers, S100b and neurotransmitters. *J Neuroimmunol.* **2007** May;186(1-2):181-92.

Gruden MA, Davudova TB, Malisauskas M, Zamotin VV, Sewell RD, Voskresenskaya NI, Kostanyan IA, Sherstnev VV, Morozova-Roche LA. Autoimmune responses to amyloid structures of A β (25-

35) peptide and human lysozyme in the serum of patients with progressive Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. **2004**;18(2):165-71.

Gu H, Zhong Z, Jiang W, Du E, Dodel R, Farlow MR, Zheng W, Du Y. The role of choroid plexus in IVIG-induced beta-amyloid clearance. *Neuroscience*. **2014** Jun 13;270:168-176.

Guénette SY. Mechanisms of Aβ clearance and catabolism. *Neuromolecular Med*. **2003**;4(3):147-60.

Güntert A, Döbeli H, Bohrmann B. High sensitivity analysis of amyloid-beta peptide composition in amyloid deposits from human and PS2APP mouse brain. *Neuroscience*. **2006** Dec 1;143(2):461-75.

Guo Q, Li H, Gaddam SS, Justice NJ, Robertson CS, Zheng H. Amyloid precursor protein revisited: neuron-specific expression and highly stable nature of soluble derivatives. *J Biol Chem*. **2012** Jan 20;287(4):2437-45.

Gustaw KA, Garrett MR, Lee HG, Castellani RJ, Zagorski MG, Prakasam A, Siedlak SL, Zhu X, Perry G, Petersen RB, Friedland RP, Smith MA. Antigen- antibody dissociation in Alzheimer disease: a novel approach to diagnosis. *J Neurochem*. **2008** Aug;106(3):1350-6.

Gustaw-Rothenberg KA, Siedlak SL, Bonda DJ, Lerner A, Tabaton M, Perry G, Smith MA. Dissociated amyloid-beta antibody levels as a serum biomarker for the progression of Alzheimer's disease: a population-based study. *Exp Gerontol*. **2010** Jan;45(1):47-52.

Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2007** Feb;8(2):101-12.

Haury M, Sundblad A, Grandien A, Barreau C, Coutinho A, Nobrega A. The repertoire of serum IgM in normal mice is largely independent of external antigenic contact. *Eur J Immunol*. **1997** Jun;27(6):1557-63.

Hawkes CA, McLaurin J. Selective targeting of perivascular macrophages for clearance of beta-amyloid in cerebral amyloid angiopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2009** Jan 27;106(4):1261-6.

Hernandez-Guillamon M, Delgado P, Penalba A, Rodriguez-Luna D, Molina CA, Rovira A, Alvarez-Sabin J, Boada M, Montaner J. Plasma β-amyloid levels in cerebral amyloid angiopathy-associated hemorrhagic stroke. *Neurodegener Dis*. **2012**;10(1-4):320-3.

Hernandez-Guillamon M, Mawhirt S, Blais S, Montaner J, Neubert TA, Rostagno A, Ghiso J. Sequential Amyloid-β Degradation by the Matrix Metalloproteases MMP-2 and MMP-9. *J Biol Chem*. **2015** Jun 12;290(24):15078-91.

Hinz FI, Geschwind DH. *Molecular Genetics of Neurodegenerative Dementias*. Cold Spring Harb Perspect Biol. **2017** Apr 3;9(4):a023705.

Ho L, Fukuchi Ki, Younkin SG. The alternatively spliced Kunitz protease inhibitor domain alters amyloid beta protein precursor processing and amyloid beta protein production in cultured cells. *J Biol Chem*. **1996** Nov 29;271(48):30929-34.

Hock C, Konietzko U, Papassotiropoulos A, Wollmer A, Streffer J, von Rotz RC, Davey G, Moritz E, Nitsch RM. Generation of antibodies specific for beta- amyloid by vaccination of patients with Alzheimer disease. *Nat Med*. **2002** Nov;8(11):1270-5.

Hock C, Konietzko U, Streffer JR, Tracy J, Signorell A, Müller-Tillmanns B, Lemke U, Henke K, Moritz E, Garcia E, Wollmer MA, Umbricht D, de Quervain DJ, Hofmann M, Maddalena A, Papassotiropoulos A, Nitsch RM. Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron*. **2003** May 22;38(4):547-54.

Hock C, Nitsch RM. Clinical observations with AN-1792 using TAPIR analyses. *Neurodegener Dis.* **2005**;2(5):273-6.

Holmes C, Boche D, Wilkinson D, Yadegarfar G, Hopkins V, Bayer A, Jones RW, Bullock R, Love S, Neal JW, Zotova E, Nicoll JA. Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet.* **2008** Jul 19;372(9634):216-23.

Hong W, Wang Z, Liu W, O'Malley TT, Jin M, Willem M, Haass C, Frosch MP, Walsh DM. Diffusible, highly bioactive oligomers represent a critical minority of soluble A β in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol.* **2018** Jul;136(1):19-40.

Honig LS, Vellas B, Woodward M, Boada M, Bullock R, Borrie M, Hager K, Andreasen N, Scarpini E, Liu-Seifert H, Case M, Dean RA, Hake A, Sundell K, Poole Hoffmann V, Carlson C, Khanna R, Mintun M, DeMattos R, Selzler KJ, Siemers E. Trial of solanezumab for Mild Dementia Due to Alzheimer's Disease. *N Engl J Med.* **2018** Jan 25;378(4):321-330.

Hooijkaas H, Benner R, Pleasants JR, Wostmann BS. Isotypes and specificities of immunoglobulins produced by germ-free mice fed chemically defined ultrafiltered "antigen-free" diet. *Eur J Immunol.* **1984** Dec;14(12):1127-30.

Hromadkova L, Kolarova M, Jankovicova B, Bartos A, Ricny J, Bilkova Z, Ripova D. Identification and characterization of natural antibodies against tau protein in an intravenous immunoglobulin product. *J Neuroimmunol.* **2015** Dec 15;289:121-9.

Hunter S, Brayne C. Understanding the roles of mutations in the amyloid precursor protein in Alzheimer disease. *Mol Psychiatry.* **2018** Jan;23(1):81-93.

Hyman BT, Smith C, Buldyrev I, Whelan C, Brown H, Tang MX, Mayeux R. Autoantibodies to amyloid-beta and Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* **2001** Jun;49(6):808-10.

Istrin G, Bosis E, Solomon B. Intravenous immunoglobulin enhances the clearance of fibrillar amyloid-beta peptide. *J Neurosci Res.* **2006** Aug 1;84(2):434-43.

Ivanoiu A, Pariente J, Booth K, Lobello K, Luscan G, Hua L, Lucas P, Styren S, Yang L, Li D, Black RS, Brashear HR, McRae T. Long-term safety and tolerability of bapineuzumab in patients with Alzheimer's disease in two phase 3 extension studies. *Alzheimers Res Ther.* **2016** Jun 23;8(1):24.

Jan A, Hartley DM, Lashuel HA. Preparation and characterization of toxic Abeta aggregates for structural and functional studies in Alzheimer's disease research. *Nat Protoc.* **2010** Jun;5(6):1186-209.

Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Chishti MA, Horne P, Heslin D, French J, Mount HT, Nixon RA, Mercken M, Bergeron C, Fraser PE, St George-Hyslop P, Westaway D. A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature.* **2000** Dec 21-28;408(6815):979-82.

Jellinger KA, Lauda F, Attems J. Sporadic cerebral amyloid angiopathy is not a frequent cause of spontaneous brain hemorrhage. *Eur J Neurol.* **2007** Aug;14(8):923-8.

Jianping L, Zhibing Y, Wei Q, Zhikai C, Jie X, Jinbiao L. Low avidity and level of serum anti-Abeta antibodies in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* **2006** Jul-Sep;20(3):127-32.

Joachim CL, Duffy LK, Morris JH, Selkoe DJ. Protein chemical and immunocytochemical studies of meningeovascular beta-amyloid protein in Alzheimer's disease and normal aging. *Brain Res.* **1988** Nov 22;474(1):100-11.

Johnson-Wood K, Lee M, Motter R, Hu K, Gordon G, Barbour R, Khan K, Gordon M, Tan H, Games D, Lieberburg I, Schenk D, Seubert P, McConlogue L. Amyloid precursor protein processing

and A beta₄₂ deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1997** Feb 18;94(4):1550-5.

Joly-Amado A, Brownlow M, Pierce J, Ravipati A, Showalter E, Li Q, Gordon MN, Morgan D. Intraventricular human immunoglobulin distributes extensively but fails to modify amyloid in a mouse model of amyloid deposition. *Curr Alzheimer Res*. **2014**;11(7):664-71.

Joseph-Mathurin N, Dorieux O, Trouche SG, Boutajangout A, Kraska A, Fontès P, Verdier JM, Sigurdsson EM, Mestre-Francés N, Dhenain M. Amyloid beta immunization worsens iron deposits in the choroid plexus and cerebral microbleeds. *Neurobiol Aging*. **2013** Nov;34(11):2613-22.

Kakuda N, Miyasaka T, Iwasaki N, Nirasawa T, Wada-Kakuda S, Takahashi-Fujigasaki J, Murayama S, Ihara Y, Ikegawa M. Distinct deposition of amyloid- β species in brains with Alzheimer's disease pathology visualized with MALDI imaging mass spectrometry. *Acta Neuropathol Commun*. **2017** Oct 16;5(1):73.

Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A₄ protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*. **1987** Feb 19-25;325(6106):733-6.

Karch CM, Goate AM. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biol Psychiatry*. **2015** Jan 1;77(1):43-51.

Kawai M, Kalaria RN, Cras P, Siedlak SL, Velasco ME, Shelton ER, Chan HW, Greenberg BD, Perry G. Degeneration of vascular muscle cells in cerebral amyloid angiopathy of Alzheimer disease. *Brain Res*. **1993** Sep 24;623(1):142-6.

Keage HA, Carare RO, Friedland RP, Ince PG, Love S, Nicoll JA, Wharton SB, Weller RO, Brayne C. Population studies of sporadic cerebral amyloid angiopathy and dementia: a systematic review. *BMC Neurol*. **2009** Jan 13;9:3.

Kellner A, Matschke J, Bernreuther C, Moch H, Ferrer I, Glatzel M. Autoantibodies against beta-amyloid are common in Alzheimer's disease and help control plaque burden. *Ann Neurol*. **2009** Jan;65(1):24-31.

Ketter N, Brashear HR, Bogert J, Di J, Miaux Y, Gass A, Purcell DD, Barkhof F, Arrighi HM. Central Review of Amyloid-Related Imaging Abnormalities in Two Phase III Clinical Trials of bapineuzumab in Mild-To-Moderate Alzheimer's Disease Patients. *J Alzheimers Dis*. **2017**;57(2):557-573.

Kile S, Au W, Parise C, Rose K, Donnel T, Hankins A, Chan M, Ghassemi A. IVIG treatment of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: a randomised double-blinded exploratory study of the effect on brain atrophy, cognition and conversion to dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. **2017** Feb;88(2):106-112.

Kimura A, Takemura M, Saito K, Yoshikura N, Hayashi Y, Inuzuka T. Association between naturally occurring anti-amyloid β autoantibodies and medial temporal lobe atrophy in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. **2017** Feb;88(2):126-131.

Klaver AC, Coffey MP, Smith LM, Bennett DA, Finke JM, Dang L, Loeffler DA. ELISA measurement of specific non-antigen-bound antibodies to A β ₁₋₄₂ monomer and soluble oligomers in sera from Alzheimer's disease, mild cognitively impaired, and noncognitively impaired subjects. *J Neuroinflammation*. **2011** Aug 9;8:93.

Klaver AC, Finke JM, Digambaranath J, Balasubramaniam M, Loeffler DA. Antibody concentrations to A β ₁₋₄₂ monomer and soluble oligomers in untreated and antibody-antigen-dissociated intravenous immunoglobulin preparations. *Int Immunopharmacol*. **2010** Jan;10(1):115-9.

Klaver AC, Finke JM, Digambaranath J, Balasubramaniam M, Loeffler DA. Antibody concentrations to Aβ₁₋₄₂ monomer and soluble oligomers in untreated and antibody-antigen-dissociated intravenous immunoglobulin preparations. *Int Immunopharmacol.* **2010** Jan;10(1):115-9.

Klaver AC, Patrias LM, Coffey MP, Finke JM, Loeffler DA. Measurement of anti-Aβ₁₋₄₂ antibodies in intravenous immunoglobulin with indirect ELISA: the problem of nonspecific binding. *J Neurosci Methods.* **2010** Mar 30;187(2):263-9.

Klein G, Delmar P, Voyle N, Rehal S, Hofmann C, Abi-Saab D, Andjelkovic M, Ristic S, Wang G, Bateman R, Kerchner GA, Baudler M, Fontoura P, Doody R. gantenerumab reduces amyloid-β plaques in patients with prodromal to moderate Alzheimer's disease: a PET substudy interim analysis. *Alzheimers Res Ther.* **2019** Dec 12;11(1):101.

Knudsen KA, Rosand J, Karluk D, Greenberg SM. Clinical diagnosis of cerebral amyloid angiopathy: validation of the Boston criteria. *Neurology.* **2001** Feb 27;56(4):537-9.

Kokjohn TA, Roher AE. Antibody responses, amyloid-beta peptide remnants and clinical effects of AN-1792 immunization in patients with AD in an interrupted trial. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* **2009** Apr;8(2):88-97.

Kou J, Kim H, Pattanayak A, Song M, Lim JE, Taguchi H, Paul S, Cirrito JR, Ponnazhagan S, Fukuchi K. Anti-Amyloid-β Single-Chain Antibody Brain Delivery Via AAV Reduces Amyloid Load But May Increase Cerebral Hemorrhages in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *J Alzheimers Dis.* **2011**;27(1):23-38.

Kumar-Singh S. Cerebral amyloid angiopathy: pathogenetic mechanisms and link to dense amyloid plaques. *Genes Brain Behav.* **2008** Feb;7 Suppl 1:67-82.

Kummer MP, Heneka MT. Truncated and modified amyloid-beta species. *Alzheimers Res Ther.* **2014** May 26;6(3):28.

Kunkle BW, Grenier-Boley B, Sims R, Bis JC, Damotte V, Naj AC, et al.; Alzheimer Disease Genetics Consortium (ADGC); European Alzheimer's Disease Initiative (EADI); Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology Consortium (CHARGE); Genetic and Environmental Risk in AD/Defining Genetic, Polygenic and Environmental Risk for Alzheimer's Disease Consortium (GERAD/PERADES). Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates Aβ, tau, immunity and lipid processing. *Nat Genet.* **2019** Mar;51(3):414-430.

La Porte SL, Bollini SS, Lanz TA, Abdiche YN, Rusnak AS, Ho WH, Kobayashi D, Harrabi O, Pappas D, Mina EW, Milici AJ, Kawabe TT, Bales K, Lin JC, Pons J. Structural basis of C-terminal β-amyloid peptide binding by the antibody ponezumab for the treatment of Alzheimer's disease. *J Mol Biol.* **2012** Aug 24;421(4-5):525-36.

Lacroix-Desmazes S, Mouthon L, Coutinho A, Kazatchkine MD. Analysis of the natural human IgG antibody repertoire: life-long stability of reactivities towards self antigens contrasts with age-dependent diversification of reactivities against bacterial antigens. *Eur J Immunol.* **1995** Sep;25(9):2598-604.

Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet.* **2013** Dec;45(12):1452-8.

Landen JW, Andreasen N, Cronenberger CL, Schwartz PF, Börjesson-Hanson A, Östlund H, Sattler CA, Binneman B, Bednar MM. ponezumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease: Randomized phase II PET-PIB study. *Alzheimers Dement (N Y).* **2017** Jun 8;3(3):393-401.

Landen JW, Cohen S, Billing CB Jr, Cronenberger C, Styren S, Burstein AH, Sattler C, Lee JH, Jack CR Jr, Kantarci K, Schwartz PF, Duggan WT, Zhao Q, Sprenger K, Bednar MM, Binneman B. Multiple-dose ponesumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease: Safety and efficacy. *Alzheimers Dement (N Y)*. **2017** May 10;3(3):339-347.

Landen JW, Zhao Q, Cohen S, Borrie M, Woodward M, Billing CB Jr, Bales K, Alvey C, McCush F, Yang J, Kupiec JW, Bednar MM. Safety and pharmacology of a single intravenous dose of ponesumab in subjects with mild-to-moderate Alzheimer disease: a phase I, randomized, placebo-controlled, double-blind, dose- escalation study. *Clin Neuropharmacol*. **2013** Jan-Feb;36(1):14-23.

Lannfelt L, Möller C, Basun H, Osswald G, Sehlin D, Satlin A, Logovinsky V, Gellerfors P. Perspectives on future Alzheimer therapies: amyloid- β protofibrils - a new target for immunotherapy with BAN2401 in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. **2014** Mar 24;6(2):16.

Lawrence JL, Tong M, Alfulajj N, Sherrin T, Contarino M, White MM, Bellinger FP, Todorovic C, Nichols RA. Regulation of presynaptic Ca²⁺, synaptic plasticity and contextual fear conditioning by a N-terminal β -amyloid fragment. *J Neurosci*. **2014** Oct 22;34(43):14210-8.

LeBlanc AC, Chen HY, Autilio-Gambetti L, Gambetti P. Differential APP gene expression in rat cerebral cortex, meninges, and primary astroglial, microglial and neuronal cultures. *FEBS Lett*. **1991** Nov 4;292(1-2):171-8.

Lee M, Bard F, Johnson-Wood K, Lee C, Hu K, Griffith SG, Black RS, Schenk D, Seubert P. Abeta42 immunization in Alzheimer's disease generates Abeta N-terminal antibodies. *Ann Neurol*. **2005** Sep;58(3):430-5.

Legleiter J, Czilli DL, Gitter B, DeMattos RB, Holtzman DM, Kowalewski T. Effect of different anti-Abeta antibodies on Abeta fibrillogenesis as assessed by atomic force microscopy. *J Mol Biol*. **2004** Jan 23;335(4):997-1006.

Leurent C, Goodman JA, Zhang Y, He P, Polimeni JR, Gurol ME, Lindsay M, Frattura L, Sohur US, Viswanathan A, Bednar MM, Smith EE; ponesumab Trial Study Group, Greenberg SM. Immunotherapy with ponesumab for probable cerebral amyloid angiopathy. *Ann Clin Transl Neurol*. **2019** Mar 18;6(4):795-806.

Li Q, Cao C, Chackerian B, Schiller J, Gordon M, Ugen KE, Morgan D. Overcoming antigen masking of anti-amyloidbeta antibodies reveals breaking of B cell tolerance by virus-like particles in amyloidbeta immunized amyloid precursor protein transgenic mice. *BMC Neurosci*. **2004** Jun 8;5:21.

Li Q, Gordon M, Cao C, Ugen KE, Morgan D. Improvement of a low pH antigen- antibody dissociation procedure for ELISA measurement of circulating anti-Abeta antibodies. *BMC Neurosci*. **2007** Mar 20;8:22.

Li QX, Fuller SJ, Beyreuther K, Masters CL. The amyloid precursor protein of Alzheimer disease in human brain and blood. *J Leukoc Biol*. **1999** Oct;66(4):567-74.

Linn J, Halpin A, Demaerel P, Ruhlmann J, Giese AD, Dichgans M, van Buchem MA, Bruckmann H, Greenberg SM. Prevalence of superficial siderosis in patients with cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. **2010** Apr 27;74(17):1346-50.

Liu B, Rasool S, Yang Z, Glabe CG, Schreiber SS, Ge J, Tan Z. Amyloid- peptide vaccinations reduce {beta}-amyloid plaques but exacerbate vascular deposition and inflammation in the retina of Alzheimer's transgenic mice. *Am J Pathol*. **2009** Nov;175(5):2099-110.

Liu E, Schmidt ME, Margolin R, Sperling R, Koeppe R, Mason NS, Klunk WE, Mathis CA, Salloway S, Fox NC, Hill DL, Les AS, Collins P, Gregg KM, Di J, Lu Y, Tudor IC, Wyman BT, Booth K, Broome S, Yuen E, Grundman M, Brashear HR; bapineuzumab 301 and 302 Clinical Trial Investigators. Amyloid-

β IIC-PiB-PET imaging results from 2 randomized bapineuzumab phase 3 AD trials. *Neurology*. **2015** Aug 25;85(8):692-700.

Liu E, Wang D, Sperling R, Salloway S, Fox NC, Blennow K, Scheltens P, Schmidt ME, Streffer J, Novak G, Einstein S, Booth K, Ketter N, Brashear HR; ELN115727-301/302 Investigator Group. Biomarker pattern of ARIA-E participants in phase 3 randomized clinical trials with bapineuzumab. *Neurology*. **2018** Mar 6;90(10):e877-e886.

Liu YH, Wang YR, Xiang Y, Zhou HD, Giunta B, Mañucat-Tan NB, Tan J, Zhou XF, Wang YJ. Clearance of amyloid-beta in Alzheimer's disease: shifting the action site from center to periphery. *Mol Neurobiol*. **2015** Feb;51(1):1-7.

Liu YH, Wang YR, Xiang Y, Zhou HD, Giunta B, Mañucat-Tan NB, Tan J, Zhou XF, Wang YJ. Clearance of amyloid-beta in Alzheimer's disease: shifting the action site from center to periphery. *Mol Neurobiol*. **2015** Feb;51(1):1-7.

Liu-Seifert H, Siemers E, Holdridge KC, Andersen SW, Lipkovich I, Carlson C, Sethuraman G, Hoog S, Hayduk R, Doody R, Aisen P. Delayed-start analysis: Mild Alzheimer's disease patients in solanezumab trials, 3.5 years. *Alzheimers Dement (N Y)*. **2015** Jul 26;1(2):111-121.

Loeffler DA, Klaver AC, Coffey MP. A β anti-idiotypic antibodies are present in intravenous immunoglobulin and are produced in mice following its administration. *Autoimmunity*. **2015** Jun;48(4):196-200.

Lucey BP, Mawuenyega KG, Patterson BW, Elbert DL, Ovod V, Kasten T, Morris JC, Bateman RJ. Associations Between β -Amyloid Kinetics and the β -Amyloid Diurnal Pattern in the Central Nervous System. *JAMA Neurol*. **2017** Feb 1;74(2):207-215.

Lutz HU. Homeostatic roles of naturally occurring antibodies: an overview. *J Autoimmun*. **2007** Dec;29(4):287-94.

Maarouf CL, Daus ID, Kokjohn TA, Kalback WM, Patton RL, Luehrs DC, Masliah E, Nicoll JA, Sabbagh MN, Beach TG, Castaño EM, Roher AE. The biochemical aftermath of anti-amyloid immunotherapy. *Mol Neurodegener*. **2010** Oct 7;5:39.

Maftei M, Thurm F, Leirer VM, von Arnim CA, Elbert T, Przybylski M, Kolassa IT, Manea M. Antigen-bound and free β -amyloid autoantibodies in serum of healthy adults. *PLoS One*. **2012**;7(9):e44516.

Maftei M, Thurm F, Schnack C, Tumani H, Otto M, Elbert T, Kolassa IT, Przybylski M, Manea M, von Arnim CA. Increased levels of antigen-bound β -amyloid autoantibodies in serum and cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *PLoS One*. **2013** Jul 18;8(7):e68996.

Magga J, Puli L, Pihlaja R, Kanninen K, Neulamaa S, Malm T, Härtig W, Grosche J, Goldsteins G, Tanila H, Koistinaho J, Koistinaho M. Human intravenous immunoglobulin provides protection against A β toxicity by multiple mechanisms in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. **2010** Dec 7;7:90.

Malanchère E, Marcos MA, Nobrega A, Coutinho A. Studies on the T cell dependence of natural IgM and IgG antibody repertoires in adult mice. *Eur J Immunol*. **1995** May;25(5):1358-65.

Manolopoulos A, Andreadis P, Malandris K, Avgerinos I, Karagiannis T, Kapogiannis D, Tsolaki M, Tsapas A, Bekiari E. Intravenous Immunoglobulin for Patients With Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Alzheimers Dis Other Dement*. **2019** Aug;34(5):281-289.

Martinez-Ramirez S, Romero JR, Shoamanesh A, McKee AC, Van Etten E, Pontes-Neto O, Macklin EA, Ayres A, Auriel E, Himali JJ, Beiser AS, DeCarli C, Stein TD, Alvarez VE, Frosch MP,

Rosand J, Greenberg SM, Gurol ME, Seshadri S, Viswanathan A. Diagnostic value of lobar microbleeds in individuals without intracerebral hemorrhage. *Alzheimers Dement*. **2015** Dec;11(12):1480-1488.

Masliah E, Hansen L, Adame A, Crews L, Bard F, Lee C, Seubert P, Games D, Kirby L, Schenk D. Abeta vaccination effects on plaque pathology in the absence of encephalitis in Alzheimer disease. *Neurology*. **2005** Jan 11;64(1):129-31.

Masliah E, Hansen L, Adame A, Crews L, Bard F, Lee C, Seubert P, Games D, Kirby L, Schenk D. Abeta vaccination effects on plaque pathology in the absence of encephalitis in Alzheimer disease. *Neurology*. **2005** Jan 11;64(1):129-31.

Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1985** Jun;82(12):4245-9.

Matheou CJ, Younan ND, Viles JH. Cu²⁺ accentuates distinct misfolding of A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ peptides, and potentiates membrane disruption. *Biochem J*. **2015** Mar 1;466(2):233-42.

Matheou CJ, Younan ND, Viles JH. The Rapid Exchange of Zinc(2+) Enables Trace Levels to Profoundly Influence Amyloid- β Misfolding and Dominates Assembly outcomes in Cu(2+)/Zn(2+) Mixtures. *J Mol Biol*. **2016** Jul 17;428(14):2832-46.

Matsuzaki K. How do membranes initiate Alzheimer's Disease? Formation of toxic amyloid fibrils by the amyloid β -protein on ganglioside clusters. *Acc Chem Res*. **2014** Aug 19;47(8):2397-404.

Meilandt WJ, Maloney JA, Imperio J, Lalezadeh G, Earr T, Crowell S, Bainbridge TW, Lu Y, Ernst JA, Fuji RN, Atwal JK. Characterization of the selective in vitro and in vivo binding properties of crenezumab to oligomeric A β . *Alzheimers Res Ther*. **2019** Dec 1;11(1):97.

Mengel D, Röska S, Neff F, Balakrishnan K, Deuster O, Gold M, Oertel WH, Bacher M, Bach JP, Dodel R. Naturally occurring autoantibodies interfere with β -amyloid metabolism and improve cognition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease 24 h after single treatment. *Transl Psychiatry*. **2013** Mar 5;3(3):e236.

Mengel D, Röska S, Neff F, Balakrishnan K, Deuster O, Gold M, Oertel WH, Bacher M, Bach JP, Dodel R. Naturally occurring autoantibodies interfere with β -amyloid metabolism and improve cognition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease 24 h after single treatment. *Transl Psychiatry*. **2013** Mar 5;3(3):e236.

Meyer-Luehmann M, Stalder M, Herzig MC, Kaeser SA, Kohler E, Pfeifer M, Boncristiano S, Mathews PM, Mercken M, Abramowski D, Staufenbiel M, Jucker M. Extracellular amyloid formation and associated pathology in neural grafts. *Nat Neurosci*. **2003** Apr;6(4):370-7.

Michno W, Wehrli P, Meier SR, Sehlin D, Syvänen S, Zetterberg H, Blennow K, Hanrieder J. Chemical imaging of evolving amyloid plaque pathology and associated A β peptide aggregation in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. **2020** Mar;152(5):602-616.

Miles LA, Crespi GA, Doughty L, Parker MW. bapineuzumab captures the N-terminus of the Alzheimer's disease amyloid-beta peptide in a helical conformation. *Sci Rep*. **2013**;3:1302.

Miller DL, Currie JR, Mehta PD, Potempska A, Hwang YW, Wegiel J. Humoral immune response to fibrillar beta-amyloid peptide. *Biochemistry*. **2003** Oct 14;42(40):11682-92.

Miller DL, Papayannopoulos IA, Styles J, Bobin SA, Lin YY, Biemann K, Iqbal K. Peptide compositions of the cerebrovascular and senile plaque core amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys*. **1993** Feb 15;301(1):41-52.

Moir RD, Lynch T, Bush AI, Whyte S, Henry A, Portbury S, Multhaup G, Small DH, Tanzi RE, Beyreuther K, Masters CL. Relative increase in Alzheimer's disease of soluble forms of cerebral Abeta amyloid protein precursor containing the Kunitz protease inhibitory domain. *J Biol Chem.* **1998** Feb 27;273(9):5013-9.

Moir RD, Tseitlin KA, Soscia S, Hyman BT, Irizarry MC, Tanzi RE. Autoantibodies to redox-modified oligomeric Abeta are attenuated in the plasma of Alzheimer's disease patients. *J Biol Chem.* **2005** Apr 29;280(17):17458-63.

Mönning U, König G, Banati RB, Mechler H, Czech C, Gehrman J, Schreiter- Gasser U, Masters CL, Beyreuther K. Alzheimer beta A4-amyloid protein precursor in immunocompetent cells. *J Biol Chem.* **1992** Nov 25;267(33):23950-6.

Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. B-1 B cell development in the fetus and adult. *Immunity.* **2012** Jan 27;36(1):13-21.

Morelli L, Llovera R, Ibandahl S, Castaño EM. The degradation of amyloid beta as a therapeutic strategy in Alzheimer's disease and cerebrovascular amyloidoses. *Neurochem Res.* **2002** Nov;27(11):1387-99.

Morelli L, Llovera RE, Mathov I, Lue LF, Frangione B, Ghiso J, Castaño EM. Insulin-degrading enzyme in brain microvessels: proteolysis of amyloid {beta} vasculotropic variants and reduced activity in cerebral amyloid angiopathy. *J Biol Chem.* **2004** Dec 31;279(53):56004-13.

Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature.* **2000** Dec 21-28;408(6815):982-5.

Morkuniene R, Zvirbliene A, Dalgediene I, Cizas P, Jankeviciute S, Baliutyte G, Jokubka R, Jankunec M, Valincius G, Borutaite V. Antibodies bound to A β oligomers potentiate the neurotoxicity of A β by activating microglia. *J Neurochem.* **2013** Sep;126(5):604-15.

Motter R, Vigo-Pelfrey C, Kholodenko D, Barbour R, Johnson-Wood K, Galasko D, Chang L, Miller B, Clark C, Green R, et al., Reduction of beta-amyloid peptide42 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* **1995** Oct;38(4):643-8.

Mouthon L, Haury M, Lacroix-Desmazes S, Barreau C, Coutinho A, Kazatchkine MD. Analysis of the normal human IgG antibody repertoire. Evidence that IgG autoantibodies of healthy adults recognize a limited and conserved set of protein antigens in homologous tissues. *J Immunol.* **1995** Jun 1;154(11):5769-78.

Mouthon L, Nobrega A, Nicolas N, Kaveri SV, Barreau C, Coutinho A, Kazatchkine MD. Invariance and restriction toward a limited set of self-antigens characterize neonatal IgM antibody repertoires and prevail in autoreactive repertoires of healthy adults. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1995** Apr 25;92(9):3839-43.

Mruthinti S, Buccafusco JJ, Hill WD, Waller JL, Jackson TW, Zamrini EY, Schade RF. Autoimmunity in Alzheimer's disease: increased levels of circulating IgGs binding Abeta and RAGE peptides. *Neurobiol Aging.* **2004** Sep;25(8):1023-32.

Müller UC, Deller T, Korte M. Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nat Rev Neurosci.* **2017** May;18(5):281-298.

Nagele EP, Han M, Acharya NK, DeMarshall C, Kosciuk MC, Nagele RG. Natural IgG autoantibodies are abundant and ubiquitous in human sera, and their number is influenced by age, gender, and disease. *PLoS One.* **2013** Apr 2;8(4):e60726.

Nath A, Hall E, Tuzova M, Dobbs M, Jons M, Anderson C, Woodward J, Guo Z, Fu W, Kryscio R, Wekstein D, Smith C, Markesbery WR, Mattson MP. Autoantibodies to amyloid beta-peptide (A β) are increased in Alzheimer's disease patients and A β antibodies can enhance A β neurotoxicity: implications for disease pathogenesis and vaccine development. *Neuromolecular Med.* **2003**;3(1):29-39.

Natté R, de Boer WI, Maat-Schieman ML, Baelde HJ, Vinters HV, Roos RA, van Duinen SG. Amyloid beta precursor protein-mRNA is expressed throughout cerebral vessel walls. *Brain Res.* **1999** May 15;828(1-2):179-83.

Natté R, Yamaguchi H, Maat-Schieman ML, Prins FA, Neeskens P, Roos RA, van Duinen SG. Ultrastructural evidence of early non-fibrillar A β ₄₂ in the capillary basement membrane of patients with hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis, Dutch type. *Acta Neuropathol.* **1999** Dec;98(6):577-82.

Neuropathology Group. Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study. Pathological correlates of late-onset dementia in a multicentre, community-based population in England and Wales. Neuropathology Group of the Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study (MRC CFAS). *Lancet.* **2001** Jan 20;357(9251):169-75.

Nicoll JA, Burnett C, Love S, Graham DI, Dewar D, Ironside JW, Stewart J, Vinters HV. High frequency of apolipoprotein E epsilon 2 allele in hemorrhage due to cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol.* **1997** Jun;41(6):716-21.

Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med.* **2003** Apr;9(4):448-52.

Nicoll JAR, Buckland GR, Harrison CH, Page A, Harris S, Love S, Neal JW, Holmes C, Boche D. Persistent neuropathological effects 14 years following amyloid- β immunization in Alzheimer's disease. *Brain.* **2019** Jul 1;142(7):2113-2126.

Nordstedt C, Näslund J, Thyberg J, Messamore E, Gandy SE, Terenius L. Human neutrophil phagocytic granules contain a truncated soluble form of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein (APP). *J Biol Chem.* **1994** Apr 1;269(13):9805-10.

Olichney JM, Ellis RJ, Katzman R, Sabbagh MN, Hansen L. Types of cerebrovascular lesions associated with severe cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* **1997** Sep 26;826:493-7.

O'Nuallain B, Acero L, Williams AD, Koeppen HP, Weber A, Schwarz HP, Wall JS, Weiss DT, Solomon A. Human plasma contains cross-reactive A β conformer-specific IgG antibodies. *Biochemistry.* **2008** Nov 25;47(47):12254-6.

O'Nuallain B, Hrcic R, Wall JS, Weiss DT, Solomon A. Diagnostic and therapeutic potential of amyloid-reactive IgG antibodies contained in human sera. *J Immunol.* **2006** Jun 1;176(11):7071-8.

O'Nuallain B, Williams AD, McWilliams-Koeppen HP, Acero L, Weber A, Ehrlich H, Schwarz HP, Solomon A. Anti-amyloidogenic activity of IgGs contained in normal plasma. *J Clin Immunol.* **2010** May;30 Suppl 1(Suppl 1):S37-42.

Orogozo JM, Gilman S, Dartigues JF, Laurent B, Puel M, Kirby LC, Jouanny P, Dubois B, Eisner L, Flitman S, Michel BF, Boada M, Frank A, Hock C. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after A β ₄₂ immunization. *Neurology.* **2003** Jul 8;61(1):46-54.

Orosz F, Ovádi J. A simple method for the determination of dissociation constants by displacement ELISA. *J Immunol Methods.* **2002** Dec 15;270(2):155-62.

Ostrowitzki S, Deptula D, Thurffjell L, Barkhof F, Bohrmann B, Brooks DJ, Klunk WE, Ashford E, Yoo K, Xu ZX, Loetscher H, Santarelli L. Mechanism of amyloid removal in patients with Alzheimer disease treated with gantenerumab. *Arch Neurol*. **2012** Feb;69(2):198-207.

Ostrowitzki S, Lasser RA, Dorflinger E, Scheltens P, Barkhof F, Nikolcheva T, Ashford E, Retout S, Hofmann C, Delmar P, Klein G, Andjelkovic M, Dubois B, Boada M, Blennow K, Santarelli L, Fontoura P; SCarlet RoAD Investigators. A phase III randomized trial of gantenerumab in prodromal Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. **2017** Dec 8;9(1):95.

Ovod V, Ramsey KN, Mawuenyega KG, Bollinger JG, Hicks T, Schneider T, Sullivan M, Paumier K, Holtzman DM, Morris JC, Benzinger T, Fagan AM, Patterson BW, Bateman RJ. Amyloid β concentrations and stable isotope labeling kinetics of human plasma specific to central nervous system amyloidosis. *Alzheimers Dement*. **2017** Aug;13(8):841-849.

Panda S, Ding JL. Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity. *J Immunol*. **2015** Jan 1;194(1):13-20.

Panza F, Logroscino G, Imbimbo BP, Solfrizzi V. Is there still any hope for amyloid-based immunotherapy for Alzheimer's disease? *Curr Opin Psychiatry*. **2014** Mar;27(2):128-37.

Panza F, Solfrizzi V, Imbimbo BP, Giannini M, Santamato A, Seripa D, Logroscino G. Efficacy and safety studies of gantenerumab in patients with Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother*. **2014** Sep;14(9):973-86.

Paquet C, Amin J, Mouton-Liger F, Nasser M, Love S, Gray F, Pickering RM, Nicoll JA, Holmes C, Hugon J, Boche D. Effect of active A β immunotherapy on neurons in human Alzheimer's disease. *J Pathol*. **2015** Apr;235(5):721-30.

Paquet C, Nicoll JA, Love S, Mouton-Liger F, Holmes C, Hugon J, Boche D. Downregulated apoptosis and autophagy after anti-A β immunotherapy in Alzheimer's disease. *Brain Pathol*. **2018** Sep;28(5):603-610.

Patton RL, Kalback WM, Esh CL, Kokjohn TA, Van Vickle GD, Luehrs DC, Kuo YM, Lopez J, Brune D, Ferrer I, Masliah E, Newel AJ, Beach TG, Castaño EM, Roher AE. Amyloid-beta peptide remnants in AN-1792-immunized Alzheimer's disease patients: a biochemical analysis. *Am J Pathol*. **2006** Sep;169(3):1048-63.

Paul S, Planque S, Nishiyama Y. Immunological origin and functional properties of catalytic autoantibodies to amyloid beta peptide. *J Clin Immunol*. **2010** May;30 Suppl 1(Suppl 1):S43-9.

Petrushina I, Ghochikyan A, Mkrtichyan M, Mamikonyan G, Movsesyan N, Ajdari R, Vasilevko V, Karapetyan A, Lees A, Agadjanyan MG, Cribbs DH. Mannan-Abeta28 conjugate prevents Abeta-plaque deposition, but increases microhemorrhages in the brains of vaccinated Tg2576 (APPsw) mice. *J Neuroinflammation*. **2008** Sep 29;5:42.

Petrushina I, Ghochikyan A, Mkrtichyan M, Mamikonyan G, Movsesyan N, Davtyan H, Patel A, Head E, Cribbs DH, Agadjanyan MG. Alzheimer's disease peptide epitope vaccine reduces insoluble but not soluble/oligomeric Abeta species in amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci*. **2007** Nov 14;27(46):12721-31.

Pfeifer M, Boncristiano S, Bondolfi L, Stalder A, Deller T, Staufenbiel M, Mathews PM, Jucker M. Cerebral hemorrhage after passive anti-Abeta immunotherapy. *Science*. **2002** Nov 15;298(5597):1379.

Piazza F, Greenberg SM, Savoiano M, Gardinetti M, Chiapparini L, Raicher I, Nitrini R, Sakaguchi H, Brioschi M, Billo G, Colombo A, Lanzani F, Piscosquito G, Carriero MR, Giaccone G, Tagliavini F,

Ferrarese C, DiFrancesco JC. Anti- amyloid β autoantibodies in cerebral amyloid angiopathy-related inflammation: implications for amyloid-modifying therapies. *Ann Neurol*. **2013** Apr;73(4):449-58.

Preston SD, Steart PV, Wilkinson A, Nicoll JA, Weller RO. Capillary and arterial cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease: defining the perivascular route for the elimination of amyloid beta from the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*. **2003** Apr;29(2):106-17.

Pride M, Seubert P, Grundman M, Hagen M, Eldridge J, Black RS. Progress in the active immunotherapeutic approach to Alzheimer's disease: clinical investigations into AN1792-associated meningoencephalitis. *Neurodegener Dis*. **2008**;5(3-4):194-6.

Puli L, Pomeschchik Y, Olas K, Malm T, Koistinaho J, Tanila H. Effects of human intravenous immunoglobulin on amyloid pathology and neuroinflammation in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. **2012** May 29;9:105.

Puzzo D, Privitera L, Fa' M, Staniszewski A, Hashimoto G, Aziz F, Sakurai M, Ribe EM, Troy CM, Mercken M, Jung SS, Palmeri A, Arancio O. Endogenous amyloid- β is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Ann Neurol*. **2011** May;69(5):819-30.

Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fà M, Staniszewski A, Palmeri A, Arancio O. Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci*. **2008** Dec 31;28(53):14537-45.

Rábano A, Jiménez-Huete A, Acevedo B, Calero M, Ghiso J, Valdés I, Gavilondo J, Frangione B, Méndez E. Diversity of senile plaques in Alzheimer's disease as revealed by a new monoclonal antibody that recognizes an internal sequence of the A β peptide. *Curr Alzheimer Res*. **2005** Oct;2(4):409-17.

Racke MM, Boone LI, Hepburn DL, Parsadainian M, Bryan MT, Ness DK, Piroozzi KS, Jordan WH, Brown DD, Hoffman WP, Holtzman DM, Bales KR, Gitter BD, May PC, Paul SM, DeMattos RB. Exacerbation of cerebral amyloid angiopathy-associated microhemorrhage in amyloid precursor protein transgenic mice by immunotherapy is dependent on antibody recognition of deposited forms of amyloid beta. *J Neurosci*. **2005** Jan 19;25(3):629-36.

Radde R, Bolmont T, Kaeser SA, Coomaraswamy J, Lindau D, Stoltze L, Calhoun ME, Jäggi F, Wolburg H, Gengler S, Haass C, Ghetti B, Czech C, Hölscher C, Mathews PM, Jucker M. A β 42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep*. **2006** Sep;7(9):940-6.

Rakover I, Arbel M, Solomon B. Immunotherapy against APP beta-secretase cleavage site improves cognitive function and reduces neuroinflammation in Tg2576 mice without a significant effect on brain A β levels. *Neurodegener Dis*. **2007**;4(5):392-402.

Raposo N, Viguier A, Cuvinciuc V, Calviere L, Cognard C, Bonneville F, Larrue V. Cortical subarachnoid haemorrhage in the elderly: a recurrent event probably related to cerebral amyloid angiopathy. *Eur J Neurol*. **2011** Apr;18(4):597-603.

Relkin N. Intravenous immunoglobulin for Alzheimer's disease. *Clin Exp Immunol*. **2014** Dec;178 Suppl 1(Suppl 1):27-9.

Relkin NR, Szabo P, Adamiak B, Burgut T, Monthe C, Lent RW, Younkin S, Younkin L, Schiff R, Weksler ME. 18-Month study of intravenous immunoglobulin for treatment of mild Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*. **2009** Nov;30(11):1728-36.

Relkin NR, Thomas RG, Rissman RA, Brewer JB, Rafii MS, van Dyck CH, Jack CR, Sano M, Knopman DS, Raman R, Szabo P, Gelmont DM, Fritsch S, Aisen PS; Alzheimer's Disease Cooperative Study. A phase 3 trial of IV immunoglobulin for Alzheimer disease. *Neurology*. **2017** May 2;88(18):1768-1775.

Renard D, Castelnovo G, Wacogne A, Le Floch A, Thouvenot E, Mas J, Gabelle A, Labauge P, Lehmann S. Interest of CSF biomarker analysis in possible cerebral amyloid angiopathy cases defined by the modified Boston criteria. *J Neurol*. **2012** Nov;259(11):2429-33.

Revesz T, Holton JL, Lashley T, Plant G, Frangione B, Rostagno A, Ghiso J. Genetics and molecular pathogenesis of sporadic and hereditary cerebral amyloid angiopathies. *Acta Neuropathol*. **2009** Jul;118(1):115-30.

Rinne JO, Brooks DJ, Rossor MN, Fox NC, Bullock R, Klunk WE, Mathis CA, Blennow K, Barakos J, Okello AA, Rodriguez Martinez de Liano S, Liu E, Koller M, Gregg KM, Schenk D, Black R, Grundman M. IIC-PiB PET assessment of change in fibrillar amyloid-beta load in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a phase 2, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study. *Lancet Neurol*. **2010** Apr;9(4):363-72.

Rohan de Silva HA, Jen A, Wickenden C, Jen LS, Wilkinson SL, Patel AJ. Cell-specific expression of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs and proteins in neurons and astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res*. **1997** Jul;47(1-2):147-56.

Roher AE, Cribbs DH, Kim RC, Maarouf CL, Whiteside CM, Kokjohn TA, Dausgs ID, Head E, Liebsack C, Serrano G, Belden C, Sabbagh MN, Beach TG. bapineuzumab alters a β composition: implications for the amyloid cascade hypothesis and anti- amyloid immunotherapy. *PLoS One*. **2013**;8(3):e59735.

Roher AE, Kokjohn TA, Clarke SG, Sierks MR, Maarouf CL, Serrano GE, Sabbagh MS, Beach TG. APP/A β structural diversity and Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurochem Int*. **2017** Nov;110:1-13.

Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, Woods AS, Cotter RJ, Gowing E, Ball MJ. beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1993** Nov 15;90(22):10836-40.

Roher AE, Maarouf CL, Dausgs ID, Kokjohn TA, Hunter JM, Sabbagh MN, Beach TG. Neuropathology and amyloid- β spectrum in a bapineuzumab immunotherapy recipient. *Alzheimers Dis*. **2011**;24(2):315-25.

Roher AE, Maarouf CL, Kokjohn TA, Belden C, Serrano G, Sabbagh MS, Beach TG. Chemical and neuropathological analyses of an Alzheimer's disease patient treated with solanezumab. *Am J Neurodegener Dis*. **2016** Aug 26;5(4):158-170.

Rosand J, Muzikansky A, Kumar A, Wisco JJ, Smith EE, Betensky RA, Greenberg SM. Spatial clustering of hemorrhages in probable cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol*. **2005** Sep;58(3):459-62.

Rosenthal SL, Kamboh MI. Late-Onset alzheimer's Disease Genes and the Potentially Implicated Pathways. *Curr Genet Med Rep*. **2014** Mar 22;2(2):85-101.

Rothstein TL. Natural Antibodies as Rheostats for Susceptibility to Chronic Diseases in the Aged. *Front Immunol*. **2016** Apr 7;7:127.

Russu A, Samtani MN, Xu S, Adedokun OJ, Lu M, Ito K, Corrigan B, Raje S, Liu E, Brashear HR, Styren S, Hu C. Biomarker Exposure-Response Analysis in Mild-To- Moderate Alzheimer's Disease Trials of bapineuzumab. *J Alzheimers Dis*. **2016** May 3;53(2):535-46.

Sakai K, Boche D, Carare R, Johnston D, Holmes C, Love S, Nicoll JA. A β immunotherapy for Alzheimer's disease: effects on apoE and cerebral vasculopathy. *Acta Neuropathol*. **2014** Dec;128(6):777-89.

Salloway S, Honigberg LA, Cho W, Ward M, Friesenhahn M, Brunstein F, Quartino A, Clayton D, Mortensen D, Bittner T, Ho C, Rabe C, Schauer SP, Wildsmith KR, Fuji RN, Suliman S, Reiman EM, Chen K, Paul R. Amyloid positron emission tomography and cerebrospinal fluid results from a crenezumab anti-amyloid-beta antibody double-blind, placebo-controlled, randomized phase II study in mild-to-moderate Alzheimer's disease (BLAZE). *Alzheimers Res Ther.* **2018** Sep 19;10(1):96.

Salloway S, Marshall GA, Lu M, Brashear HR. Long-Term Safety and Efficacy of bapineuzumab in Patients with Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease: A Phase 2, Open-Label Extension Study. *Curr Alzheimer Res.* **2018**;15(13):1231-1243.

Salloway S, Sperling R, Fox NC, Blennow K, Klunk W, Raskind M, Sabbagh M, Honig LS, Porsteinsson AP, Ferris S, Reichert M, Ketter N, Nejadnik B, Guenzler V, Miloslavsky M, Wang D, Lu Y, Lull J, Tudor IC, Liu E, Grundman M, Yuen E, Black R, Brashear HR; bapineuzumab 301 and 302 Clinical Trial Investigators. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* **2014** Jan 23;370(4):322-33.

Salloway S, Sperling R, Gilman S, Fox NC, Blennow K, Raskind M, Sabbagh M, Honig LS, Doody R, van Dyck CH, Mulnard R, Barakos J, Gregg KM, Liu E, Lieberburg I, Schenk D, Black R, Grundman M; bapineuzumab 201 Clinical Trial Investigators. A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology.* **2009** Dec 15;73(24):2061-70.

Salloway SP, Sperling R, Fox NC, Sabbagh MN, Honig LS, Porsteinsson AP, Rofael H, Ketter N, Wang D, Liu E, Carr S, Black RS, Brashear HR. Long-Term Follow Up of Patients with Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease Treated with bapineuzumab in a Phase III, Open-Label, Extension Study. *J Alzheimers Dis.* **2018**;64(3):689-707.

Salvarani C, Hunder GG, Morris JM, Brown RD Jr, Christianson T, Giannini C. A β -related angiitis: comparison with AAC without inflammation and primary CNS vasculitis. *Neurology.* **2013** Oct 29;81(18):1596-603.

Salvarani C, Hunder GG, Morris JM, Brown RD Jr, Christianson T, Giannini C. A β -related angiitis: comparison with AAC without inflammation and primary CNS vasculitis. *Neurology.* **2013** Oct 29;81(18):1596-603.

Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandeventer C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature.* **1999** Jul 8;400(6740):173-7.

Schenk D, Basi GS, Pangalos MN. Treatment strategies targeting amyloid β -protein. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Sep 1;2(9):a006387.

Schröder R, Linke RP. Cerebrovascular involvement in systemic AA and AL amyloidosis: a clear haematogenic pattern. *Virchows Arch.* **1999** Jun;434(6):551-60.

Schwarz AJ, Sundell KL, Charil A, Case MG, Jaeger RK, Scott D, Bracoud L, Oh J, Suhy J, Pontecorvo MJ, Dickerson BC, Siemers ER. Magnetic resonance imaging measures of brain atrophy from the EXPEDITION3 trial in mild Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y).* **2019** Jul 30;5:328-337.

Selkoe DJ, Podlisny MB, Joachim CL, Vickers EA, Lee G, Fritz LC, Oltersdorf T. Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1988** Oct;85(19):7341-5.

Serrano-Pozo A, William CM, Ferrer I, Uro-Coste E, Delisle MB, Maurage CA, Hock C, Nitsch RM, Masliah E, Growdon JH, Frosch MP, Hyman BT. Beneficial effect of human anti-amyloid-beta active immunization on neurite morphology and tau pathology. *Brain*. **2010** May;133(Pt 5):1312-27.

Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C, et al., Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature*. **1992** Sep 24;359(6393):325-7.

Sevigny J, Chiao P, Bussière T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, Dunstan R, Salloway S, Chen T, Ling Y, O'Gorman J, Qian F, Arastu M, Li M, Chollate S, Brennan MS, Quintero-Monzon O, Scannevin RH, Arnold HM, Engber T, Rhodes K, Ferrero J, Hang Y, Mikulskis A, Grimm J, Hock C, Nitsch RM, Sandrock A. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature*. **2016** Sep 1;537(7618):50-6.

Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B, Holtzman DM, Miller CA, Strickland DK, Ghiso J, Zlokovic BV. Clearance of Alzheimer's amyloid-ss₍₁₋₄₀₎ peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest*. **2000** Dec;106(12):1489-99.

Siemers ER, Friedrich S, Dean RA, Gonzales CR, Farlow MR, Paul SM, Demattos RB. Safety and changes in plasma and cerebrospinal fluid amyloid beta after a single administration of an amyloid beta monoclonal antibody in subjects with Alzheimer disease. *Clin Neuropharmacol*. **2010** Mar-Apr;33(2):67-73.

Siemers ER, Sundell KL, Carlson C, Case M, Sethuraman G, Liu-Seifert H, Dowsett SA, Pontecorvo MJ, Dean RA, Demattos R. Phase 3 solanezumab trials: Secondary outcomes in mild Alzheimer's disease patients. *Alzheimers Dement*. **2016** Feb;12(2):110-120.

Simpson J, Boyd JE, Yates CM, Christie JE, Fink G, James K, Gordon A. Autoantibodies to Alzheimer and normal brain structures from virus-transformed lymphocytes. *J Neuroimmunol*. **1986** Nov;13(1):1-8.

Smith LM, Coffey MP, Loeffler DA. Specific binding of intravenous immunoglobulin products to tau peptide fragments. *Int Immunopharmacol*. **2014** Aug;21(2):279-82.

Sohn JH, So JO, Hong HJ, Kim JW, Na DR, Kim M, Kim H, Nam E, Ha HJ, Kim YH, Mook-Jung I. Identification of autoantibody against beta-amyloid peptide in the serum of elderly. *Front Biosci (Landmark Ed)*. **2009** Jan 1;14:3879-83.

Solomon B, Koppel R, Frankel D, Hanan-Aharon E. Disaggregation of Alzheimer beta-amyloid by site-directed mAb. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1997** Apr 15;94(8):4109-12.

Solomon B, Koppel R, Hanan E, Katzav T. Monoclonal antibodies inhibit in vitro fibrillar aggregation of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1996** Jan 9;93(1):452-5.

Song MS, Mook-Jung I, Lee HJ, Min JY, Park MH. Serum anti-amyloid-beta antibodies and Alzheimer's disease in elderly Korean patients. *J Int Med Res*. **2007** May-Jun;35(3):301-6.

Soria Lopez JA, González HM, Léger GC. Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol*. **2019**;167:231-255.

Sperling R, Salloway S, Brooks DJ, Tampieri D, Barakos J, Fox NC, Raskind M, Sabbagh M, Honig LS, Porsteinsson AP, Lieberburg I, Arrighi HM, Morris KA, Lu Y, Liu E, Gregg KM, Brashear HR, Kinney GG, Black R, Grundman M. Amyloid-related imaging abnormalities in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a retrospective analysis. *Lancet Neurol*. **2012** Mar;11(3):241-9.

Sperling RA, Jack CR Jr, Black SE, Frosch MP, Greenberg SM, Hyman BT, Scheltens P, Carrillo MC, Thies W, Bednar MM, Black RS, Brashear HR, Grundman M, Siemers ER, Feldman HH, Schindler RJ.

Amyloid-related imaging abnormalities in amyloid-modifying therapeutic trials: recommendations from the Alzheimer's Association Research Roundtable Workgroup. *Alzheimers Dement.* **2011** Jul;7(4):367-85.

St-Amour I, Paré I, Alata W, Coulombe K, Ringuette-Goulet C, Drouin-Ouellet J, Vandal M, Soulet D, Bazin R, Calon F. Brain bioavailability of human intravenous immunoglobulin and its transport through the murine blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab.* **2013** Dec;33(12):1983-92.

St-Amour I, Paré I, Tremblay C, Coulombe K, Bazin R, Calon F. IVIg protects the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease from memory deficit and A β pathology. *J Neuroinflammation.* **2014** Mar 22;11:54.

Stine WB Jr, Dahlgren KN, Krafft GA, LaDu MJ. In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J Biol Chem.* **2003** Mar 28;278(13):11612-22.

Storace D, Cammarata S, Borghi R, Sanguineti R, Giliberto L, Piccini A, Pollero V, Novello C, Caltagirone C, Smith MA, Bossù P, Perry G, Odetti P, Tabaton M. Elevation of {beta}-amyloid₁₋₄₂ autoantibodies in the blood of amnesic patients with mild cognitive impairment. *Arch Neurol.* **2010** Jul;67(7):867-72.

Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Bürki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1997** Nov 25;94(24):13287-92.

Sudduth TL, Greenstein A, Wilcock DM. Intracranial injection of Gammagard, a human IVIg, modulates the inflammatory response of the brain and lowers A β in APP/PS1 mice along a different time course than anti-A β antibodies. *J Neurosci.* **2013** Jun 5;33(23):9684-92.

Sunderland T, Linker G, Mirza N, Putnam KT, Friedman DL, Kimmel LH, Bergeson J, Manetti GJ, Zimmermann M, Tang B, Bartko JJ, Cohen RM. Decreased beta-amyloid₁₋₄₂ and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *JAMA.* **2003** Apr 23-30;289(16):2094-103.

Szabo P, Mujalli DM, Rotondi ML, Sharma R, Weber A, Schwarz HP, Weksler ME, Relkin N. Measurement of anti-beta amyloid antibodies in human blood. *J Neuroimmunol.* **2010** Oct 8;227(1-2):167-74.

Szabo P, Relkin N, Weksler ME. Natural human antibodies to amyloid beta peptide. *Autoimmun Rev.* **2008** Jun;7(6):415-20.

Takata K, Hirata-Fukae C, Becker AG, Chishiro S, Gray AJ, Nishitomi K, Franz AH, Sakaguchi G, Kato A, Mattson MP, Laferla FM, Aisen PS, Kitamura Y, Matsuoka Y. Deglycosylated anti-amyloid beta antibodies reduce microglial phagocytosis and cytokine production while retaining the capacity to induce amyloid beta sequestration. *Eur J Neurosci.* **2007** Nov;26(9):2458-68.

Taniguchi T, Suzuki T, Miake S, Nomoto K, Hashimoto K, Goda A, Takeya K. Difference in antibody production to heterologous erythrocytes in conventional, specific-pathogen-free (SPF), germfree and antigen-free mice. *Microbiol Immunol.* **1978**;22(12):793-802.

Tanzi RE, Moir RD, Wagner SL. Clearance of Alzheimer's A β peptide: the many roads to perdition. *Neuron.* **2004** Sep 2;43(5):605-8.

Tarasoff-Conway JM, Carare RO, Osorio RS, Glodzik L, Butler T, Fieremans E, Axel L, Rusinek H, Nicholson C, Zlokovic BV, Frangione B, Blennow K, Ménard J, Zetterberg H, Wisniewski T, de Leon MJ. Clearance systems in the brain- implications for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* **2015** Aug;11(8):457-70.

- Thakker DR**, Weatherspoon MR, Harrison J, Keene TE, Lane DS, Kaemmerer WF, Stewart GR, Shafer LL. Intracerebroventricular amyloid-beta antibodies reduce cerebral amyloid angiopathy and associated micro-hemorrhages in aged Tg2576 mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2009** Mar 17;106(11):4501-6.
- Thal DR**, Capetillo-Zarate E, Del Tredici K, Braak H. The development of amyloid beta protein deposits in the aged brain. *Sci Aging Knowledge Environ*. **2006** Mar 8;2006(6):rel.
- Thal DR**, Ghebremedhin E, Rüb U, Yamaguchi H, Del Tredici K, Braak H. Two types of sporadic cerebral amyloid angiopathy. *J Neuropathol Exp Neurol*. **2002** Mar;61(3):282-93.
- Thal DR**, Griffin WS, de Vos RA, Ghebremedhin E. Cerebral amyloid angiopathy and its relationship to Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. **2008** Jun;115(6):599-609.
- Thal DR**, Rüb U, Orantes M, Braak H. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*. **2002** Jun 25;58(12):1791-800.
- Thal DR**, Walter J, Saido TC, Fändrich M. Neuropathology and biochemistry of A β and its aggregates in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. **2015** Feb;129(2):167-82.
- Thomas RS**, Hvoslef-Eide M, Good MA, Kidd EJ. Inhibition of amyloid- β production by anti-amyloid precursor protein antibodies in primary mouse cortical neurones. *Neuroreport*. **2013** Dec 18;24(18):1058-61.
- Thomas RS**, Liddell JE, Kidd EJ. Anti-amyloid precursor protein immunoglobulins inhibit amyloid- β production by steric hindrance. *FEBS J*. **2011** Jan;278(1):167-78.
- Tian J**, Shi J, Bailey K, Lendon CL, Pickering-Brown SM, Mann DM. Association between apolipoprotein E e4 allele and arteriosclerosis, cerebral amyloid angiopathy, and cerebral white matter damage in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. **2004** May;75(5):696-9.
- Toly-Ndour C**, Lui G, Nunes MM, Bruley-Rosset M, Aucouturier P, Dorothée G. MHC-independent genetic factors control the magnitude of CD4⁺ T cell responses to amyloid- β peptide in mice through regulatory T cell-mediated inhibition. *J Immunol*. **2011** Nov 1;187(9):4492-500.
- Toyama BH**, Weissman JS. Amyloid structure: conformational diversity and consequences. *Annu Rev Biochem*. **2011**;80:557-85.
- Uitsch M**, Li B, Maurer T, Mathieu M, Adolfsson O, Muhs A, Pfeifer A, Pihlgren M, Bainbridge TW, Reichelt M, Ernst JA, Eigenbrot C, Fuh G, Atwal JK, Watts RJ, Wang W. Structure of crenezumab Complex with A β Shows Loss of β -Hairpin. *Sci Rep*. **2016** Dec 20;6:39374.
- Uro-Coste E**, Russano de Paiva G, Guilbeau-Frugier C, Sastre N, Ousset PJ, da Silva NA, Lavielle-Guillotreau V, Vellas B, Delisle MB. Cerebral amyloid angiopathy and microhemorrhages after amyloid beta vaccination: case report and brief review. *Clin Neuropathol*. **2010** Jul-Aug;29(4):209-16.
- Vadukul DM**, Gbajumo O, Marshall KE, Serpell LC. Amyloidogenicity and toxicity of the reverse and scrambled variants of amyloid- β ₁₋₄₂. *FEBS Lett*. **2017** Mar;591(5):822-830.
- Vales-Montero M**, García-Pastor A, Iglesias-Mohedano AM, Esteban-de Antonio E, Salgado-Cámara P, García-Domínguez JM, Vázquez-Alén P, Díaz-Otero F, Fernández-Bullido Y, Gil-Núñez A. Cerebral amyloid angiopathy-related transient focal neurological episodes: A transient ischemic attack mimic with an increased risk of intracranial hemorrhage. *J Neurol Sci*. **2019** Nov 15;406:116452.
- Valls-Comamala V**, Guivernau B, Bonet J, Puig M, Perálvarez-Marín A, Palomer E, Fernández-Busquets X, Altafaj X, Tajés M, Puig-Pijoan A, Vicente R, Oliva B, Muñoz FJ. The antigen-binding fragment of human gamma immunoglobulin prevents amyloid β -peptide folding into β -sheet to form oligomers. *Oncotarget*. **2017** Jun 20;8(25):41154-41165.

Van Nostrand WE, Schmaier AH, Farrow JS, Cines DB, Cunningham DD. Protease nexin-2/amyloid beta-protein precursor in blood is a platelet-specific protein. *Biochem Biophys Res Commun.* **1991** Feb 28;175(1):15-21.

Vandenbergh R, Rinne JO, Boada M, Katayama S, Scheltens P, Vellas B, Tuchman M, Gass A, Fiebach JB, Hill D, Lobello K, Li D, McRae T, Lucas P, Evans I, Booth K, Luscan G, Wyman BT, Hua L, Yang L, Brashear HR, Black RS; bapineuzumab 3000 and 3001 Clinical Study Investigators. bapineuzumab for mild to moderate Alzheimer's disease in two global, randomized, phase 3 trials. *Alzheimers Res Ther.* **2016** May 12;8(1):18.

Vandermeeren M, Mercken M, Vanmechelen E, Six J, van de Voorde A, Martin JJ, Cras P. Detection of tau proteins in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Neurochem.* **1993** Nov;61(5):1828-34.

Vellas B, Black R, Thal LJ, Fox NC, Daniels M, McLennan G, Tompkins C, Leibman C, Pomfret M, Grundman M; AN1792 (QS-21)-251 Study Team. Long-term follow-up of patients immunized with AN1792: reduced functional decline in antibody responders. *Curr Alzheimer Res.* **2009** Apr;6(2):144-51.

Verbeek MM, De Jong D, Kremer HP. Brain-specific proteins in cerebrospinal fluid for the diagnosis of neurodegenerative diseases. *Ann Clin Biochem.* **2003** Jan;40(Pt 1):25-40.

Verbeek MM, de Waal RM, Schipper JJ, Van Nostrand WE. Rapid degeneration of cultured human brain pericytes by amyloid beta protein. *J Neurochem.* **1997** Mar;68(3):1135-41.

Verbeek MM, Kremer BP, Rikkert MO, Van Domburg PH, Skehan ME, Greenberg SM. Cerebrospinal fluid amyloid beta(40) is decreased in cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol.* **2009** Aug;66(2):245-9.

Villain N, Dubois B. Alzheimer's Disease Including Focal Presentations. *Semin Neurol.* **2019** Apr;39(2):213-226.

Vinters HV. Cerebral amyloid angiopathy. A critical review. *Stroke.* **1987** Mar-Apr;18(2):311-24.

Viswanathan A, Greenberg SM. Cerebral amyloid angiopathy in the elderly. *Ann Neurol.* **2011** Dec;70(6):871-80.

Vonsattel JP, Myers RH, Hedley-Whyte ET, Ropper AH, Bird ED, Richardson EP Jr. Cerebral amyloid angiopathy without and with cerebral hemorrhages: a comparative histological study. *Ann Neurol.* **1991** Nov;30(5):637-49.

Wang S, Yu Y, Geng S, Wang D, Zhang L, Xie X, Wu B, Li C, Xu H, Li X, Hu Y, Zhang L, Kaether C, Wang B. A coimmunization vaccine of A β 42 ameliorates cognitive deficits without brain inflammation in an Alzheimer's disease model. *Alzheimers Res Ther.* **2014** May 12;6(3):26.

Wang T, Xie XX, Ji M, Wang SW, Zha J, Zhou WW, Yu XL, Wei C, Ma S, Xi ZY, Pang GL, Liu RT. Naturally occurring autoantibodies against A β oligomers exhibited more beneficial effects in the treatment of mouse model of Alzheimer's disease than intravenous immunoglobulin. *Neuropharmacology.* **2016** Jun;105:561-576.

Watt AD, Crespi GA, Down RA, Ascher DB, Gunn A, Perez KA, McLean CA, Villemagne VL, Parker MW, Barnham KJ, Miles LA. Do current therapeutic anti-A β antibodies for Alzheimer's disease engage the target? *Acta Neuropathol.* **2014**;127(6):803-10.

Weksler ME, Relkin N, Turkenich R, LaRusse S, Zhou L, Szabo P. Patients with Alzheimer disease have lower levels of serum anti-amyloid peptide antibodies than healthy elderly individuals. *Exp Gerontol.* **2002** Jul;37(7):943-8.

Weller RO, Massey A, Newman TA, Hutchings M, Kuo YM, Roher AE. Cerebral amyloid angiopathy: amyloid beta accumulates in putative interstitial fluid drainage pathways in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* **1998** Sep;153(3):725-33.

Welzel AT, Williams AD, McWilliams-Koeppen HP, Acero L, Weber A, Blinder V, Mably A, Bunk S, Hermann C, Farrell MA, Ehrlich HJ, Schwarz HP, Walsh DM, Solomon A, O'Nuallain B. Human anti-A β IgGs target conformational epitopes on synthetic dimer assemblies and the AD brain-derived peptide. *PLoS One.* **2012**;7(11):e50317.

Widiapradja A, Vegh V, Lok KZ, Manzanero S, Thundiyil J, Gelderblom M, Cheng YL, Pavlovski D, Tang SC, Jo DG, Magnus T, Chan SL, Sobey CG, Reutens D, Basta M, Mattson MP, Arumugam TV. Intravenous immunoglobulin protects neurons against amyloid beta-peptide toxicity and ischemic stroke by attenuating multiple cell death pathways. *J Neurochem.* **2012** Jul;122(2):321-32.

Wilcock DM, Rojiani A, Rosenthal A, Subbarao S, Freeman MJ, Gordon MN, Morgan D. Passive immunotherapy against A β in aged APP-transgenic mice reverses cognitive deficits and depletes parenchymal amyloid deposits in spite of increased vascular amyloid and microhemorrhage. *J Neuroinflammation.* **2004** Dec 8;1(1):24.

Wilcock DM, Rojiani A, Rosenthal A, Subbarao S, Freeman MJ, Gordon MN, Morgan D. Passive immunotherapy against A β in aged APP-transgenic mice reverses cognitive deficits and depletes parenchymal amyloid deposits in spite of increased vascular amyloid and microhemorrhage. *J Neuroinflammation.* **2004** Dec 8;1(1):24.

Willis BA, Sundell K, Lachno DR, Ferguson-Sells LR, Case MG, Holdridge K, DeMattos RB, Raskin J, Siemers ER, Dean RA. Central pharmacodynamic activity of solanezumab in mild Alzheimer's disease dementia. *Alzheimers Dement (N Y).* **2018** Nov 9;4:652-660.

Wiltfang J, Esselmann H, Cupers P, Neumann M, Kretzschmar H, Beyermann M, Schleuder D, Jahn H, Rütger E, Kornhuber J, Annaert W, De Strooper B, Saftig P. Elevation of beta-amyloid peptide 2-42 in sporadic and familial Alzheimer's disease and its generation in PSI knockout cells. *J Biol Chem.* **2001** Nov 16;276(46):42645-57.

Winblad B, Graf A, Riviere ME, Andreasen N, Ryan JM. Active immunotherapy options for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* **2014** Jan 30;6(1):7.

Wisniewski HM, Wegiel J. Beta-amyloid formation by myocytes of leptomeningeal vessels. *Acta Neuropathol.* **1994**;87(3):233-41.

Wong CW, Quaranta V, Glenner GG. Neuritic plaques and cerebrovascular amyloid in Alzheimer disease are antigenically related. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1985** Dec;82(24):8729-32.

Wostmann BS, Pleasants JR, Bealmear P, Kincade PW. Serum proteins and lymphoid tissues in germ-free mice fed a chemically defined, water soluble, low molecular weight diet. *Immunology.* **1970** Sep;19(3):443-8.

Xu S, Gaskin F. Increased incidence of anti-beta-amyloid autoantibodies secreted by Epstein-Barr virus transformed B cell lines from patients with Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev.* **1997** Mar;94(1-3):213-22.

Yagi H, Ban T, Morigaki K, Naiki H, Goto Y. Visualization and classification of amyloid beta supramolecular assemblies. *Biochemistry.* **2007** Dec 25;46(51):15009-17.

Yamaguchi H, Yamazaki T, Lemere CA, Frosch MP, Selkoe DJ. Beta amyloid is focally deposited within the outer basement membrane in the amyloid angiopathy of Alzheimer's disease. An immunoelectron microscopic study. *Am J Pathol.* **1992** Jul;141(1):249-59.

- Yang T**, Dang Y, Ostaszewski B, Mengel D, Steffen V, Rabe C, et al. Target engagement in an alzheimer trial: Crenezumab lowers amyloid beta oligomers in cerebrospinal fluid. *Ann Neurol*. **2019** Aug;86(2):215-224.
- Yoshida K**, Moein A, Bittner T, Ostrowitzki S, Lin H, Honigberg L, Jin JY, Quartino A. Pharmacokinetics and pharmacodynamic effect of crenezumab on plasma and cerebrospinal fluid beta-amyloid in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. **2020** Jan 22;12(1):16.
- Yoshikai S**, Sasaki H, Doh-ura K, Furuya H, Sakaki Y. Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene*. **1990** Mar 15;87(2):257-63.
- Yu L**, Boyle PA, Nag S, Leurgans S, Buchman AS, Wilson RS, Arvanitakis Z, Farfel JM, De Jager PL, Bennett DA, Schneider JA. APOE and cerebral amyloid angiopathy in community-dwelling older persons. *Neurobiol Aging*. **2015** Nov;36(11):2946-2953.
- Zampar S**, Klafki HW, Sritharen K, Bayer TA, Wiltfang J, Rostagno A, Ghiso J, Miles LA, Wirths O. N-terminal heterogeneity of parenchymal and vascular amyloid- β deposits in Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*. **2020** Jun 4.
- Zhang W**, Xiong H, Callaghan D, Liu H, Jones A, Pei K, Fatehi D, Brunette E, Stanimirovic D. Blood-brain barrier transport of amyloid beta peptides in efflux pump knock-out animals evaluated by in vivo optical imaging. *Fluids Barriers CNS*. **2013** Feb 25;10(1):13.
- Zhao J**, Nussinov R, Ma B. Mechanisms of recognition of amyloid- β (A β) monomer, oligomer, and fibril by homologous antibodies. *J Biol Chem*. **2017** Nov 3;292(44):18325-18343.
- Zhou ZH**, Tzioufas AG, Notkins AL. Properties and function of polyreactive antibodies and polyreactive antigen-binding B cells. *J Autoimmun*. **2007** Dec;29(4):219-28.
- Zlokovic BV**, Deane R, Sallstrom J, Chow N, Miano JM. Neurovascular pathways and Alzheimer amyloid beta-peptide. *Brain Pathol*. **2005** Jan;15(1):78-83.
- Zlokovic BV**, Ghiso J, Mackic JB, McComb JG, Weiss MH, Frangione B. Blood-brain barrier transport of circulating Alzheimer's amyloid beta. *Biochem Biophys Res Commun*. **1993** Dec 30;197(3):1034-40.
- Zlokovic BV**, Skundric DS, Segal MB, Lipovac MN, Mackic JB, Davson H. A saturable mechanism for transport of immunoglobulin G across the blood-brain barrier of the guinea pig. *Exp Neurol*. **1990** Mar;107(3):263-70.
- Zotova E**, Bharambe V, Cheaveau M, Morgan W, Holmes C, Harris S, Neal JW, Love S, Nicoll JA, Boche D. Inflammatory components in human Alzheimer's disease and after active amyloid- β 42 immunization. *Brain*. **2013** Sep;136(Pt 9):2677-96.
- Zotova E**, Bharambe V, Cheaveau M, Morgan W, Holmes C, Harris S, Neal JW, Love S, Nicoll JA, Boche D. Inflammatory components in human Alzheimer's disease and after active amyloid- β 42 immunization. *Brain*. **2013** Sep;136(Pt 9):2677-96.
- Zotova E**, Holmes C, Johnston D, Neal JW, Nicoll JA, Boche D. Microglial alterations in human Alzheimer's disease following A β 42 immunization. *Neuropathol Appl Neurobiol*. **2011** Aug;37(5):513-24.

Annexes

Annexe I : Script R pour l'analyse des courbes de dilution des anticorps anti-A β par ELISA multiparamétrique

```
### INPUT ###

rm(list=ls())
library(XLConnect) # load XLConnect package
wk = loadWorkbook(file.choose()) # choisir le fichier excel
sh = readWorksheet(wk, sheet="IgM") # choisir le nom de la page
library(readxl)
sh = read_excel(file.choose(), sheet = "IgG")

# fitting non spé

zdelmodel<-function(p,q) {
  a<-p # valeurs expérimentales
  b<-lm(p ~ x_) # modèle linéaire sur les valeurs
  expérimentales
  c<-coef(b) [2]*x_+coef(b) [1] # valeurs modélisées
  d<-(a-c)^2 # carré des écarts
  if(d[which(d == max(d,na.rm=T))]) # Si le plus grand
  écart expérimental-modèle...
  > mean(d,na.rm=T)+q*sd(d,na.rm=T)) # ...est plus grand
  que la moyenne+ q*sd des écarts...
  repeat{a[which(d == max(d,na.rm=T))] <- NA # ...alors on
  supprime cette valeur
  b<-lm(a ~ x_)
  c<-coef(b) [2]*x_+coef(b) [1]
  d<-(a-c)^2
  if(d[which(d == max(d,na.rm=T))]) # ...jusqu'au break
  <= mean(d,na.rm=T)+q*sd(d,na.rm=T))
  {break}
  }
  print(list(p,a,c))
}

plot_nonspe <- function(r) {
  par(pty="m",bty="l",cex=1.5,cex.axis=0.75,las=1,
  mar=c(4,4,3,3),mgp=c(2, 0.75, 0))#,family="gsmt",)
  plot(x_,r,
  pch=16,col="grey40",
  xlim=c(0,0.6),ylim=c(0,0.4),
  xlab="",ylab="",axes=FALSE);axis(2,las=2);axis(1,las=0)
  mtext("OD", 2, adj=2.5, las=1, padj=-16,cex=1.25)
  mtext(expression('1/log' [10]*'(dil°)'), 4, adj=0.75, las=1,
  padj=15,cex=1.25)
  abline(lm(zdelmodel(r,q) [[2]]~x_))
  par(new=T)
  plot(x_[which(is.na(zdelmodel(r,q) [[2]]) )],r[which(is.na(zdelmo
  del(r,q) [[2]]) )],
  pch=4,lwd=2,col=2,
  xlim=c(0,0.6),ylim=c(0,0.4),
  xlab="",ylab="",axes=FALSE)
}
```

```

# LWBmodel

LWBmodel <- function(x,q) {
  absci<-x*dil
  m<-lm(x~absci)
  c<- absci*m$coefficients[2]+m$coefficients[1]
  d<-(absci-c)^2 # carré des écarts
  if(d[which(d == max(d,na.rm=T))]) # Si le plus grand
écart expérimental-modèle...
  > mean(d,na.rm=T)+q*sd(d,na.rm=T)) # ...est plus grand
que la moyenne+2sd des écarts...
  repeat{absci[which(d == max(d,na.rm=T))] <- NA
    b1_[which(d == max(d,na.rm=T))] <- NA # ...alors on
supprime cette valeur
    m<-lm(x~absci)
    c<- absci*m$coefficients[2]+m$coefficients[1]
    d<-(absci-c)^2
    if(d[which(d == max(d,na.rm=T))]) # ...jusqu'au break
    <= mean(d,na.rm=T)+q*sd(d,na.rm=T))
      {break}
  }

  max<-m$coefficients[1];max
  titre<--log10(-m$coefficients[2])
  print(list(c(max,titre), absci,b1_))
}

plot_lwb <- function(x,q) {
  par(pty="m",bty="l",cex=1.5,cex.axis=0.75,las=1,
  mar=c(4,4,3,3),mgp=c(2, 0.75, 0))#,family="gsmt",)
  plot(x*dil,x,
  pch=16,col="grey40",
  xlim=c(0,max(x*dil,na.rm=T)),ylim=c(0,max(x,na.rm=T)),
  xlab="",ylab="",axes=FALSE);axis(2,las=2);axis(1,las=0)
  mtext("OD", 2, adj=2.5, las=1, padj=-16,cex=1.25)
  mtext("OD.dil°", 4, adj=0.75, las=1, padj=15,cex=1.25)

  absci<-x*dil
  m<-lm(x~absci)
  c<- absci*m$coefficients[2]+m$coefficients[1]
  d<-(absci-c)^2 # carré des écarts
  if(d[which(d == max(d,na.rm=T))]) # Si le plus grand
écart expérimental-modèle...
  > mean(d,na.rm=T)+q*sd(d,na.rm=T)) # ...est plus grand
que la moyenne+2sd des écarts...
  repeat{absci[which(d == max(d,na.rm=T))] <- NA
    b1_[which(d == max(d,na.rm=T))] <- NA # ...alors on
supprime cette valeur
    m<-lm(x~absci)
    c<- absci*m$coefficients[2]+m$coefficients[1]
    d<-(absci-c)^2
    if(d[which(d == max(d,na.rm=T))]) # ...jusqu'au break
    <= mean(d,na.rm=T)+q*sd(d,na.rm=T))
      {break}
  }

```

```

    }
abline(m)

par(new=T)
  plot(x[which(is.na(absci))] * dil[which(is.na(absci))], x[which(is
.na(absci))],
      xlim=c(0, max(x*dil, na.rm=T)), ylim=c(0, max(x, na.rm=T)),
      pch=4, lwd=2, col=2,
      xlab="", ylab="", axes=FALSE)
}

fitsigmoid <- function(t,m) {
  nls(t ~ m/(1+r*exp(-x*s)), start=list(r=2e-04,s=-3))}

y__delmodel<-function(p,q,r) {
  a<- p # valeurs expérimentales - non
spé fitté
  b<- fitsigmoid(p,r) # modèle linéaire sur les
valeurs expérimentales
  c<- r/(1+coef(b)[1]*exp(-x*coef(b)[2]))
  d<- (a-c)^2 # carré des écarts
  if(d[which(d == max(d,na.rm=T))]) # Si le plus grand
écart expérimental-modèle...
  > mean(d,na.rm=T)+q*sd(d,na.rm=T) # ...est plus grand
que la moyenne+2sd des écarts...
  repeat{a[which(d == max(d,na.rm=T))] <- NA # ...alors on
supprime cette valeur
  b<- fitsigmoid(a,r)
  c<- r/(1+coef(b)[1]*exp(-x*coef(b)[2]))
  d<- (a-c)^2
  if(d[which(d == max(d,na.rm=T))]) # ...jusqu'au break
  <= mean(d,na.rm=T)+q*sd(d,na.rm=T))
  {break}
}
  print(list(p, fitsigmoid(p,r), a,b))
}

coeflinmodel2 <- function(p,w,m) {
  sigmoid <-
function(x){m/(1+coef(y__delmodel(w,q,m)[[4]])[1]*exp(-
x*coef(y__delmodel(w,q,m)[[4]])[2]))}
  a<-10^-p/(sigmoid(p)/m)
  b<-1/(1-(sigmoid(p)/m))
  b[which(b==Inf)]<-NA;b
  print(lm(b~a))
}

plot_spe <- function(w,m) {
par(pty="m", bty="l", cex=1.5, cex.axis=0.75, las=1,
  mar=c(4,4,3,3), mgp=c(2, 0.75, 0))#, family="gsmt",)
plot(x,w,
  pch=16, col="grey40",
  xlim=c(0,6), ylim=c(0,1),
  xlab="", ylab="", axes=FALSE); axis(2, las=2); axis(1, las=0)

```

```

mtext("OD", 2, adj=2.5, las=1, padj=-16, cex=1.25)
mtext(expression('log' [10]*'(dil°)'), 4, adj=0.75, las=1,
padj=15, cex=1.25)

sigmoid <- function(x){m/(1+coef(y__delmodel(w,q,m)[[4]])[1]*exp(-
x*coef(y__delmodel(w,q,m)[[4]])[2]))}

curve(sigmoid(x), 0, 6, add=T, xlim=c(0,6), ylim=c(0,1), type = "l", lty
= "dashed", col="grey40", lwd=1)

par(new=T)
plot(x[which(is.na(y__delmodel(w,q,m)[[3]]))], w[which(is.na(y__
delmodel(w,q,m)[[3]]))],
pch=4, lwd=2, col=2,
xlim=c(0,6), ylim=c(0,1),
xlab="", ylab="", axes=FALSE)

segments(0,m, (log(coef(y__delmodel(w,q,m)[[4]])[1])+2)/coef(y__delmo
del(w,q,m)[[4]])[2], m, lwd=2, col='red2')
segments((log(coef(y__delmodel(w,q,m)[[4]])[1])+2)/coef(y__delmodel(
w,q,m)[[4]])[2], m, (log(coef(y__delmodel(w,q,m)[[4]])[1]) -
2)/coef(y__delmodel(w,q,m)[[4]])[2], 0, lwd=2, col='red2')
segments((log(coef(y__delmodel(w,q,m)[[4]])[1]) -
2)/coef(y__delmodel(w,q,m)[[4]])[2], 0, 6, 0, lwd=2, col='red2')

segments((log(coef(y__delmodel(w,q,m)[[4]])[1])+2)/coef(y__delmodel(
w,q,m)[[4]])[2], m, log(coef(y__delmodel(w,q,m)[[4]])[1])/coef(y__delm
odel(w,q,m)[[4]])[2], lwd=1, lty = "dashed", col='red2')
segments(log(coef(y__delmodel(w,q,m)[[4]])[1])/coef(y__delmodel(w,q,
m)[[4]])[2], m, log(coef(y__delmodel(w,q,m)[[4]])[1])/coef(y__delmodel
(w,q,m)[[4]])[2], 0, lwd=1, lty = "dashed", col='red2')
segments(log(coef(y__delmodel(w,q,m)[[4]])[1])/coef(y__delmodel(w,q,
m)[[4]])[2], 0, (log(coef(y__delmodel(w,q,m)[[4]])[1]) -
2)/coef(y__delmodel(w,q,m)[[4]])[2], 0, lwd=1, lty =
"dashed", col='red2')
}

# fitting spé
## signal spécifique

sh1<-as.matrix(sh[c(24:31),2:13])
a0<-as.numeric(sh1[,1])
a1<-as.numeric(sh1[,2])
b0<-as.numeric(sh1[,3])
b1<-as.numeric(sh1[,4])
c0<-as.numeric(sh1[,5])
c1<-as.numeric(sh1[,6])
d0<-as.numeric(sh1[,7])
d1<-as.numeric(sh1[,8])
ctrl0<-as.numeric(sh1[,9])
ctrl1<-as.numeric(sh1[,10])
ei0<-as.numeric(sh1[,11])
eil<-as.numeric(sh1[,12])

```

```

dil<-c(26112,6528,3264,1632,816,408,204,100)
x<-log10(dil);x
x_<-1/x;x_

q<-2
#Exécuter d'office

#Verifier la linearité
zdelmodel(a0,q);plot_nonspe(a0)      #zdelmodel[[1]] == data
expérimentales
zdelmodel(b0,q);plot_nonspe(b0)      #zdelmodel[[2]] == data
expérimentales sans celles qui dévient > 2sd du modéèle linéaire
zdelmodel(c0,q);plot_nonspe(c0)      #zdelmodel[[3]] == modèle
liénaire après exclusion des valeurs aberrantes
zdelmodel(d0,q);plot_nonspe(d0)
zdelmodel(ei0,q);plot_nonspe(ei0)
zdelmodel(ctrl0,q);plot_nonspe(ctrl0)

#a0[c(8)]<-NA

#A executer ensuite
a1_<-a1-zdelmodel(a0,q)[[3]]          # calcul de la différence
entre le signal sur puits coatés et le modèle linéaire des puits non
coatés
b1_<-b1-zdelmodel(b0,q)[[3]]
c1_<-c1-zdelmodel(c0,q)[[3]]
d1_<-d1-zdelmodel(d0,q)[[3]]
ei1_<-ei1-zdelmodel(ei0,q)[[3]]
ctrl1_<-ctrl1-zdelmodel(ctrl0,q)[[3]]

#Verifier linearité
max.ei1_<-LWBmodel(ei1_,q)[[1]][1];plot_lwb(ei1_,q)
max.ctrl1_<-LWBmodel(ctrl1_,q)[[1]][1];plot_lwb(ctrl1_,q)
max.a1_<-LWBmodel(a1_,q)[[1]][1];plot_lwb(a1_,q)
max.b1_<-LWBmodel(b1_,q)[[1]][1];plot_lwb(b1_,q)
max.c1_<-LWBmodel(c1_,q)[[1]][1];plot_lwb(c1_,q)
max.d1_<-LWBmodel(d1_,q)[[1]][1];plot_lwb(d1_,q)

#max.ei1_<-ei1_[8]
#max.ctrl1_<-ctrl1_[8]
#max.a1_<-a1_[8]
#max.b1_<-b1_[8]
#max.c1_<-c1_[8]
#max.d1_<-d1_[8]

#En cas de points à exclure, numero x point (-x) a remplacer dans le
plot correspondant
#dil<-dil[-c(1)]
#max.c1_<-LWBmodel(c1_[-c(1)],q)[[1]][1];plot_lwb(c1_[-c(1)],q)
#dil<-c(26112,6528,3264,1632,816,408,204,100)

#Exécuter
y__delmodel(ei1_,q,max.ei1_[[1]][1]);plot_spe(ei1_,max.ei1_[[1]][1])

```

```

y__delmodel(ctrl11_,q,max.ctrl11_);plot_spe(ctrl11_,max.ctrl11_)
y__delmodel(a1_,q,max.a1_);plot_spe(a1_,max.a1_)
y__delmodel(b1_,q,max.b1_);plot_spe(b1_,max.b1_)
y__delmodel(c1_,q,max.c1_);plot_spe(c1_,max.c1_)
y__delmodel(d1_,q,max.d1_);plot_spe(d1_,max.d1_)

#max.a1_<-a1_[8]
#Verifier la sigmoide, suppression de points ci dessous (ligne
respective + x)
#x<-x[-3];x_<-x_[-3]
#a1<-a1[-c(7)];a0<-a0[-c(7)]
#b1<-b1[-6];b0<-b0[-6]
#c1<-c1[-8];c0<-c0[-8]
#d1<-d1[-7];d0<-d0[-7]
#ei1<-ei1[-8];ei0<-ei0[-8]
#ctrl11<-ctrl11[-8];ctrl10<-ctrl10[-8]

#BORN SUP EXE (A FAIRE AVANT AJUSTEMENT SIGMOIDE)
ei<-c(1-
(sum(resid(y__delmodel(ei1_,q,max.ei1_) [[4]])^2)/sum((y__delmodel(ei
1_,q,max.ei1_) [[3]]-
mean(y__delmodel(ei1_,q,max.ei1_) [[3]],na.rm=T))^2,na.rm=T)),
max.ei1_,
log(coef(y__delmodel(ei1_,q,max.ei1_) [[4]]) [1])/coef(y__delmode
l(ei1_,q,max.ei1_) [[4]]) [2],
-coef(y__delmodel(ei1_,q,max.ei1_) [[4]]) [2]/4,
coef(coeflinmodel2(x,ei1_,max.ei1_)) [1:2])
ctrl<-c(1-
(sum(resid(y__delmodel(ctrl11_,q,max.ctrl11_) [[4]])^2)/sum((y__delmode
l(ctrl11_,q,max.ctrl11_) [[3]]-
mean(y__delmodel(ctrl11_,q,max.ctrl11_) [[3]],na.rm=T))^2,na.rm=T)),
max.ctrl11_,
log(coef(y__delmodel(ctrl11_,q,max.ctrl11_) [[4]]) [1])/coef(y__del
model(ctrl11_,q,max.ctrl11_) [[4]]) [2],
-coef(y__delmodel(ctrl11_,q,max.ctrl11_) [[4]]) [2]/4,
coef(coeflinmodel2(x,ctrl11_,max.ctrl11_)) [1:2])
ech1<-c(1-
(sum(resid(y__delmodel(a1_,q,max.a1_) [[4]])^2)/sum((y__delmodel(a1_,
q,max.a1_) [[3]]-
mean(y__delmodel(a1_,q,max.a1_) [[3]],na.rm=T))^2,na.rm=T)),
max.a1_,
log(coef(y__delmodel(a1_,q,max.a1_) [[4]]) [1])/coef(y__delmodel(
a1_,q,max.a1_) [[4]]) [2],
-coef(y__delmodel(a1_,q,max.a1_) [[4]]) [2]/4,
coef(coeflinmodel2(x,a1_,max.a1_)) [1:2])
ech2<-c(1-
(sum(resid(y__delmodel(b1_,q,max.b1_) [[4]])^2)/sum((y__delmodel(b1_,
q,max.b1_) [[3]]-
mean(y__delmodel(b1_,q,max.b1_) [[3]],na.rm=T))^2,na.rm=T)),
max.b1_,
log(coef(y__delmodel(b1_,q,max.b1_) [[4]]) [1])/coef(y__delmodel(
b1_,q,max.b1_) [[4]]) [2],
-coef(y__delmodel(b1_,q,max.b1_) [[4]]) [2]/4,
coef(coeflinmodel2(x,b1_,max.b1_)) [1:2])
ech3<-c(1-
(sum(resid(y__delmodel(c1_,q,max.c1_) [[4]])^2)/sum((y__delmodel(c1_,

```

```

q,max.c1_)[[3]]-
mean(y__delmodel(c1_,q,max.c1_)[[3]],na.rm=T))^2,na.rm=T)),
  max.c1_,
  log(coef(y__delmodel(c1_,q,max.c1_)[[4]])[1])/coef(y__delmodel(
c1_,q,max.c1_)[[4]])[2],
  -coef(y__delmodel(c1_,q,max.c1_)[[4]])[2]/4,
  coef(coeflinmodel2(x,c1_,max.c1_))[1:2])
ech4<-c(1-
(sum(resid(y__delmodel(d1_,q,max.d1_)[[4]])^2)/sum((y__delmodel(d1_,
q,max.d1_)[[3]]-
mean(y__delmodel(d1_,q,max.d1_)[[3]],na.rm=T))^2,na.rm=T)),
  max.d1_,
  log(coef(y__delmodel(d1_,q,max.d1_)[[4]])[1])/coef(y__delmodel(
d1_,q,max.d1_)[[4]])[2],
  -coef(y__delmodel(d1_,q,max.d1_)[[4]])[2]/4,
  coef(coeflinmodel2(x,d1_,max.d1_))[1:2])
#BORNE INF EXE

output<-
data.frame(ei,ctrl,ech1,ech2,ech3,ech4,row.names=c("r^2","max","titre
","pente","blin","Ka"))
output
output[2,3:6]<-output[2,3:6]/output[2,1]
output[6,3:6]<-log10(output[6,3:6])
output

library(xlsx)
write.xlsx(output, "c:/users/yanni/desktop/f42 S7 M.xlsx")

```




Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for grant of a European patent as follows:

Submission number	1000473357	
Application number	EP18306003.7	
File No. to be used for priority declarations	EP18306003	
Date of receipt	23 July 2018	
Your reference	B2796EP00	
Applicant	SORBONNE UNIVERSITE	
Country	FR	
Title	METHODS FOR DIAGNOSING A CEREBRAL AMYLOID ANGIOPATHY	
Documents submitted	package-data.xml application-body.xml SPECEPO-1.pdfB2796EP TEXT.pdf (21 p.)	ep-request.xml ep-request.pdf (5 p.) SPECEPO-2.pdfB2796EP figures.pdf (3 p.)
Submitted by	CN=Marion Chajmowicz 9853	
Method of submission	Online	
Date and time receipt generated	23 July 2018, 17:30:59 (CEST)	
Official Digest of Submission	F5:58:07:64:CE:A9:B5:BA:53:B2:98:AE:DA:95:B4:4F:95:17:B4:27	

/INPI, section dépôt/

The present invention relates to methods for diagnosing or determining the risk of developing clinical manifestations of cerebral amyloid angiopathy (CAA) in a human subject, which is frequent in elderly.

Background of the invention

5 Cerebral amyloid angiopathy results from deposits of amyloid material inside blood vessel walls of the cortex and/or leptomeninges. The prevailing form of sporadic CAA is due to progressive, age-dependent accumulation of aggregated amyloid- β peptide ($A\beta$), mainly the 40-aminoacid form ($A\beta_{1-40}$). The incidence of CAA is elevated in the elderly (over 35%, 45% and 70% during the 6th, 7th and 8th decades, respectively) and even higher in patients with
10 Alzheimer's disease (AD). Lobar hemorrhage (LH) is the main complication of sporadic CAA and a major health concern due to frequent short-term mortality and growing incidence linked to increasing prescription of antithrombotic drugs in aged people (Béjot et al., 2013). Besides hemorrhagic features (CAA-he), CAA-related inflammation (CAA-ri) is a rare but severe complication that manifests as a corticosensitive $A\beta$ -related angiitis (ABRA) and/or
15 perivascular cerebral inflammation (Salvarani et al., 2013).

Pathophysiological mechanisms triggering CAA-he and CAA-ri manifestations remain obscure. However, it is worth noting that AD patients receiving monoclonal anti- $A\beta$ antibody infusions frequently develop dose-dependent severe adverse events, in connection with amyloid-related imaging abnormalities (ARIA) analogous to magnetic resonance imaging
20 (MRI) features of CAA-he (ARIA-H for hemorrhagic) and CAA-ri (ARIA-E for effusion) (Sperling et al., 2011).

Definite pathological diagnosis of CAA is either post-mortem or requires invasive cerebral biopsy, and therefore it is seldom achieved. At present, neuroimaging markers are the basic tools for identifying probable CAA on the basis of the Boston criteria (Knudsen et al., 2001;
25 Linn et al., 2010). There is thus an acute need for early diagnosis of CAA with circulating biomarkers that would allow discriminating or predicting the occurrence of CAA-he and CAA-ri. Especially, early diagnosis of CAA-he may allow prevention, including avoidance of thrombolytic and anti-thrombotic therapies (Wilson et al 2018). Indeed a particular issue is presently the screening for asymptomatic CAA in patients who are being prescribed long term
30 anticoagulation, for instance in atrial fibrillation. Asymptomatic CAA causes a higher risk of iatrogenic cerebral hemorrhage (Wilson et al. 2018). The only reliable test to date is cerebral

MRI, which cannot be performed as a screening test in such a large population of patients. The availability of a blood biomarker would stratify subjects who need an MRI.

A blood biomarker of CAA-ri may shorten what remains a challenging diagnosis, prevent cerebral biopsy and therapeutic testing with potentially iatrogenic immunosuppressant drugs, and provide a biomarker of disease progression under treatment; thus reducing the high mortality rate of this disease.

Summary of the invention

The invention provides an *in vitro* method for diagnosing cerebral amyloid angiopathy (CAA), or for diagnosing or determining the risk of developing a complication of CAA, in a human subject, which method comprises analyzing serial dilutions of a plasma or serum sample of the subject, for determining at least one binding parameter of antibodies present therein, wherein said antibodies are anti-A β amyloid peptide(s) antibodies.

Preferably the method distinguishes the class and/or subclass of such antibodies.

In preferred embodiments, the complication may be hemorrhagic CAA or inflammatory CAA.

In preferred embodiments, the A β peptide is A β ₁₋₄₀ or A β ₁₋₄₂ peptide.

In a particular embodiment, the A β peptide is soluble A β ₁₋₄₀ and the anti-soluble A β ₁₋₄₀ antibodies to monitor preferably are IgG antibodies, preferably IgG3, IgG1 or IgG4 antibodies, still preferably IgG3 antibodies.

In another embodiment, the A β peptide is fibrillar A β ₁₋₄₀, and the anti-fibrillar A β ₁₋₄₀ antibodies preferably are IgM antibodies.

In a particular embodiment, the antibodies are detected by means of a chromogenic or fluorescent labelling, preferably the antibodies are detected by means of an indirect immunoassay on immobilized antigen using a secondary anti-human immunoglobulin antibody that carries a chromogenic enzyme or fluorescent label.

The binding parameter may typically be i) the titer of said antibodies as determined at 50% maximum binding, ii) the affinity or avidity constant, iii) the steepness of the dilution curve, and/or iv) the maximum optical density observed, preferably normalized with an internal standard.

In a most preferred embodiment, the method comprises determining an index (designated “MAST-index”) that is a weighted summation of the following binding parameters: i) the titer of said antibodies as determined at 50% maximum binding, ii) the affinity or avidity constant, iii) the maximum optical density, preferably normalized with an internal standard, and iv) the steepness of the dilution curve.

The method may particularly comprise determining the MAST-index of anti-soluble $A\beta_{1-40}$ IgG antibodies, wherein a higher MAST-index of anti-soluble $A\beta_{1-40}$ IgG antibodies compared to control is indicative of a subject with a CAA complication of the inflammatory (CAA-ri) type, or of a higher risk for the subject to develop a CAA-ri, preferably wherein the anti-soluble $A\beta_{1-40}$ IgG antibodies are anti-soluble $A\beta_{1-40}$ IgG3 antibodies.

The method may also, or alternatively, comprise determining the MAST-index of anti-fibrillar $A\beta_{1-40}$ IgM antibodies, wherein a higher MAST-index of anti-fibrillar $A\beta_{1-40}$ IgM antibodies compared to control is indicative of a subject with a CAA complication of the haemorrhagic (CAA-he) type, or of a higher risk for the subject to develop a CAA-he.

In a particular embodiment the method comprises determining at least one binding parameter of anti-soluble $A\beta_{1-40}$ IgG antibodies and at least one binding parameter of anti-fibrillar $A\beta_{1-40}$ IgM antibodies in a plasma or serum sample of the subject.

Such method may comprise conducting a multiplex immunoassay.

The method of the invention makes it possible to detect and monitor cerebral amyloid angiopathy manifestations that are either spontaneous or induced by anti- $A\beta$ immunotherapy.

It further helps stratifying subjects who require an MRI.

Legends to the Figures

Figure 1. MRI findings of hemorrhagic features of CAA. A, cerebral MRI in magnetic susceptibility sequence (T2 *) shows acute right frontal lobar hemorrhage, a left parietal lobar microbleed and diffuse cortical superficial siderosis. B, cerebral MRI in fluid attenuation sequence (FLAIR) shows the lobar hemorrhage but the microbleed and the superficial siderosis are not visible on that MRI sequence.

Figure 2. Clinical and MRI findings of an illustrative case of CAA-related inflammation. A 81-year-old patient (patient no. 1), presents with subacute onset of confusion and progressive aphasia over 2 months. A) cerebral MRI in fluid attenuation sequence (FLAIR) shows left

temporo-occipital hypersignal responsible for a mass effect. B) cerebral MRI in magnetic susceptibility sequence (T2*) shows multiple bilateral lobar cortical microhemorrhages. C) cerebral MRI in FLAIR sequence shows hypersignal regression after 6 weeks of corticosteroid therapy associated with clinical improvement.

5 **Figure 3.** Determination of dilution curve parameters by sigmoid modeling and linearization procedure. The left-side panel illustrates the dilution curve obtained from a human serum sample following acidic dissociation of circulating immune complexes and neutralization, incubated on coated m42 antigen and revealed with HRP-conjugated anti-IgG secondary antibody. The dashed thick line represents the sigmoid modeling of the curve, accurately
10 described by i) the y value of the left-sided plateau (Max), which reflects the antigen recognition diversity; ii) the x value at the inflexion point (Titer), which depends on the concentration of antibodies in the sample; iii) the steepness at the inflexion point (Steepness), which reflects cooperativity phenomena involved in the binding of the antibody. The right-side panel shows the linearization of the same experimental points and sigmoid model, and
15 allows the determination of an apparent constant of avidity ($K'a_{App}$), which reflects the mean affinity of the diverse antibody binding sites.

Figure 4. Discriminant anti-A β serological features in CAA-he and CAA-ri. A, circulating anti-soluble A β 1-40 IgG3 MAST-index in the 3 study groups; B, circulating anti-fibrillar A β 1-40 IgM MAST-index in the 3 study groups; C, ROC curve of anti-soluble A β 1-40 IgG3
20 MAST-index for discriminating CAA-ri from controls; D, ROC curve of anti-fibrillar A β 1-40 IgM MAST-index for discriminating CAA-he from controls. Boxes indicate IQR. Central bars indicate median. Error bars indicate last extreme value below 1.5 times the 2nd or 3rd quartile. AU, arbitrary units. CAA-he, hemorrhagic acute complication of cerebral amyloid angiopathy. CAA-ri, cerebral amyloid angiopathy-related inflammation. Se, sensitivity. Sp,
25 specificity. AUC, area under the curve.

Detailed Description of the invention

Definitions

The **subject** may be any human patient, regardless of the gender or age, suspected of having a
30 cerebral amyloid angiopathy or being at risk of, or predisposed to, developing cerebral amyloid angiopathy. In a particular embodiment, the subject is more than 50 years old. In a

particular embodiment, the subject may be afflicted with Alzheimer's disease (AD). Asymptomatic subjects are included.

Subjects at risk of developing a cerebral amyloid angiopathy include every subject over 50 years old, patients diagnosed with typical sporadic AD, 'atypical' sporadic focal forms of AD such as posterior cortical atrophy and primary progressive aphasia, patients with hereditary forms of AD, patients with Down's syndrome as well as patients treated with anti-A β immunotherapy. Other risk factors include aging, genetic risk factors, such as mutations of the amyloid precursor protein (APP) or presenilin genes, or the ϵ 2 or ϵ 4 alleles of the ApoE gene, or non-genetic risk factors, such as hypertension, or thrombolytic, anticoagulation, and antiplatelet therapies.

Patients who are being prescribed long term anticoagulation therapy, for instance in atrial fibrillation, are particular candidates for the present test.

The amyloid beta peptide (**A β peptide**) may be considered the main product of the proteolytic processing of the Amyloid Precursor Protein (APP). There are various isoforms of A β that differ by the number of amino acid residues at the C-terminal end of the peptide. The isoform A β 40 has 40 residues. A β 42 is less soluble than A β 40 and is more prone to aggregation. The A β peptides have a specific type of β -sheet arrangement that favors the polymerization and aggregation, leading to the formation of oligomeric species that diffuse through the interstitial fluids. A β monomers tend to aggregate and polymerize, forming oligomers, protofibrils and fibrils.

An **anti-A β immunotherapy** typically refers either to passive immunization by injecting monoclonal antibodies (mAb) directed against the A β peptide, such as e.g. bapineuzumab, ponezumab, solanezumab, gantenerumab, aducanumab, crenezumab or BAN-2401, or to active immunization by using antigens generating a B-cell elective response without anti-A β T-cell response, thus generating solely anti-A β antibodies, e.g. CAD-106.

The term "**CAA-he**" refers to a hemorrhagic acute complication of cerebral amyloid angiopathy. **Figure 1** shows MRI findings of hemorrhagic features of CAA.

"**CAA-ri**" means cerebral amyloid angiopathy-related inflammation. It manifests as a corticosensitive A β -related angiitis (ABRA) and/or perivascular cerebral inflammation. CAA-ri manifests as acute or subacute symptoms with headache, decrease in consciousness, behavioral change, or focal neurological signs and seizures. MRI shows unifocal or

multifocal, corticosubcortical or deep white matter hyperintensities (WMH) lesions that are asymmetric and extend to the immediately subcortical white matter, associated to corticosubcortical hemorrhagic lesions characteristic of CAA (**Figure 2**).

5 The biological **sample** is derived from blood. It may be any plasma or serum sample. The biological sample can be used directly, or it can be subjected to a processing step before being tested.

10 The term “control” (or “control value”) typically refers to a value yielded upon analysis of a serum from a healthy individual (“control subject”) who is not affected with CAA-he nor CAA-ri as assessed using clinical and imaging studies, as described below. These control values represent reference data for comparing CAA-he and CAA-ri values.

In order to evaluate the progression of the pathological condition, it may be useful to test a patient and to verify the effect of a treatment or the progression of the pathological condition by testing the patient again, for example with a gap of several months. In this case, the results of the second test are compared with the results of the first test.

15 In the context of the present invention, a “binding parameter” is a quantitative figure that can be determined upon measurement of antibody binding to immobilized A β peptide using serial dilutions of a given serum or plasma sample. Four distinct binding parameters may typically be defined, i.e. i) the titer of said antibodies as determined at 50% maximum binding, ii) the affinity or avidity constant, iii) the steepness of the dilution curve, and/or iv) the maximum
20 optical density observed, preferably normalized with an internal standard. Such parameters are described in the Experimental section as well.

The term “**capture antigen**” is intended to mean an antigen, preferably attached to a solid phase, which is capable of retaining said at least one antibody present in a biological sample, by affinity binding. The capture antigen may be labeled. In the present invention, an example
25 of capture antigen is a A β peptide, such as a A β 40 peptide, a A β 42, or fragments thereof, e.g a A β peptide of 38 or 39 or 41 amino acids only.

The term “**labeled**” refers both to a direct labeling (by means of enzymes, radioisotopes, fluorochromes, luminescent compounds, etc.) and to an indirect labeling (for example by means of antibodies which are themselves directly labeled or using reagents of a labeled
30 “affinity pair”, such as, but nonexclusively, the labeled avidin-biotin pair, etc.).

Assaying the auto-antibodies

The methods of the invention encompass analyzing biological samples that may contain circulating auto-antibodies that recognize several possible forms of A β peptides, including soluble A β_{1-40} peptide or fibrillar A β_{1-40} peptide, or soluble A β_{1-42} peptide or fibrillar A β_{1-42} peptide.

In preferred embodiments, the methods of the invention comprise determining the MAST-index of anti-soluble A β_{1-40} IgG3 antibodies or anti-fibrillar A β_{1-40} IgM antibodies in a plasma or serum sample of the subject.

The biological sample is a plasma or serum sample, preferably a serum sample, at several dilutions, preferably between 1/20th and 1/50000th, in order to obtain a dilution curve.

Advantageously, the binding parameters can be determined by an immunoassay.

The biological sample can be optionally treated in a prior step, or brought directly into contact with at least one capture antigen.

The method according to the invention can be carried out according to various formats well known to those skilled in the art: in solid phase or in homogeneous phase; in one step or in two steps, or more; in a competition method, by way of nonlimiting examples.

According to one preferred embodiment, the capture antigen is immobilized on a solid phase. By way of nonlimiting examples of a solid phase, use may be made of microplates, in particular polystyrene microplates. Use may also be made of solid particles or beads, paramagnetic beads, or else polystyrene or polypropylene test tubes, etc.

An immunoassay format for detecting antibodies by competition is also possible. Other immunoassay modes can also be envisioned and are well known to those skilled in the art.

ELISA assays, radioimmunoassays, immunofluorimetric assays, or any other detection technique can be used for revealing the presence of the antigen-antibody complexes formed.

According to one particular preferred embodiment, the capture antigen is a soluble A β_{1-40} peptide or a fibrillar A β_{1-40} peptide.

By way of illustration, A β peptides, such as soluble or fibrillar A β_{1-40} can be used as antigens in an indirect immunoassay such as an indirect ELISA. Serum samples can be pretreated for acidic dissociation of immune complexes prior to incubation in plates sensitized with each A β antigenic preparation. Bound antibodies belonging to IgM class, IgA class, and IgG class and

subclasses are revealed using appropriate specific antibody reagents. For instance, conjugated anti-mouse IgG for anti-human IgG subclasses, or anti-human IgG, IgA, and IgM, preferably conjugated with peroxidase or alkaline phosphatase, may be used.

5 In another example, the capture antigen may be labelled, e.g. by being coupled to a glutathione S transferase (GST), before being deposited on a microplate.

In a particular embodiment, the method comprises determining both the MAST-index of anti-soluble A β ₁₋₄₀ IgG3 antibodies and the MAST-index of anti-fibrillar A β ₁₋₄₀ IgM antibodies in a blood or serum sample of the subject. In that embodiment, the method can comprise conducting a multiplex immunoassay, namely combining detection of anti-soluble β ₁₋₄₀ IgG3
10 antibodies and detection of anti-fibrillar A β ₁₋₄₀ IgM antibodies in a single reaction volume.

The diagnosis methods described herein allows prevention of CAA manifestations, more particularly CAA-he or CAA-ri, e.g. by avoiding additional risk factor(s) such as anti-A β immunotherapy, hypertension, or thrombolytic, anticoagulation, and antiplatelet therapies.

15 An immunosuppressive treatment could also be envisioned, as subacute leukoencephalopathy associated with CAA-related inflammation or angiitis was reported to respond.

Evaluation of the efficacy of a treatment

Another aspect of the invention is an in vitro method for evaluating the efficacy of a treatment for CAA manifestations, which comprises determining the presence and/or the amount of at
20 least one antibody as defined above in a biological sample originating from a patient, at various times before, during or after the treatment, a decrease in the amount of said at least one antibody over time being indicative of an improvement in the CAA complications.

The Figures and Example below illustrate the invention without limiting its scope.

25

EXAMPLE: Distinctive serum anti-A β antibodies features during haemorrhagic and inflammatory complications of cerebral amyloid angiopathy

Material & Methods

5 Study design and participants

All patients and control subjects underwent a complete set of clinical, biological and imaging analyses. Medical files and MRI from 9 centers were all reviewed by one trained neurologist (JC) to insure that diagnosis criteria were evenly met. Diagnosis of CAA-he was made according to the revised Boston's criteria (Linn et al., 2010). Since controversy exists about the diagnostic value of microbleeds (MB) in the absence of LH (Martinez-Ramirez et al., 2015), a history of LH or a high number of MB (>50) were required to insure a diagnosis of CAA. Diagnosis of CAA-ri was made according to Auriel et al. (Auriel et al., 2016). Control subjects were selected on the following criteria: age \geq 60 years; clinically: transient ischemic attack, seizure or differential diagnoses (vertigo or hypotension for instance), and absence of known cognitive deficit; on MRI: absence of spontaneous hemorrhage, MB or cSS, and absence of acute cerebral lesion.

MB count was rated according to the microbleed anatomical rating scale (MARS) (Gregoire et al., 2009). Leukoencephalopathy was graded according to the Fazekas's scale (Fazekas et al., 1987). Hippocampal atrophy was graded according to the Scheltens' criteria (Scheltens et al., 1992). Blood samples were collected in the acute phase, prior to corticosteroid administration for CAA-ri. Serum aliquots were kept frozen at -80°C until use. The study protocol was approved by the Ethic Committee "Paris Ile de France V".

Table 1. Characteristics of the Study Groups

Clinical group	Control	CAA-he	CAA-ri
Number of subjects	28	20	12
Age, median (range), years	71 (62 – 89)	74 (60 – 90)	72.5 (64 – 86)
Male/Female	15/13	11/9	5/7
Serum storing time, median (range), months	19 (3 – 42)	16 (3 – 50)	27 (4 – 55)

Abbreviations: CAA-he, cerebral amyloid angiopathy-related hemorrhage; CAA-ri, cerebral amyloid angiopathy-related inflammation.

A β preparations

This protocol has been extensively described elsewhere (Charidimou et al., 2017; Yamada et al., 2015). Purified (>95%) synthetic A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ peptides (Proteogenix, Schiltigheim, France) were dissolved in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP; Sigma-Aldrich), and 150 or 450 μ g aliquots were transferred to low retention tubes. Aliquots were evaporated, dried in a SpeedVac, and stored at -20 °C until use. For peptide soluble preparations, aliquots of lyophilized A β were dissolved in 10 μ L dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich), sonicated for 3 min at 300 Watts, mixed just before use with 90 μ L of HEPES 30mM NaCl 10mM Cu²⁺ 10eq pH 7.4 buffer, or HEPES 30mM NaCl 160mM Cu²⁺ 10eq pH 7.4 buffer, respectively for A β ₁₋₄₂ and A β ₁₋₄₀. For fibril preparations, lyophilized A β was dissolved in 10 μ L DMSO, sonicated 3 min at 300 Watts, mixed with 90 μ L HCl 0.01N or HEPES 30mM NaCl 160mM pH 7.4 buffer, and incubated at 37°C during 72h or 15 days, respectively for A β ₁₋₄₂ and A β ₁₋₄₀.

Anti-A β antibodies detection by multiplex ELISA

Freshly prepared soluble or fibrillar A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ (hereafter termed m40, m42, f40 or f42, respectively) were used as antigens in an indirect ELISA.

Freshly prepared soluble or fibrillar A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ (hereafter termed m40, m42, f40 or f42) were diluted to 15 μ g/mL in coating buffer (HEPES 30mM NaCl 160mM or 10 mM (for A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂, respectively) Cu²⁺ 10eq (for monomers) pH 7.4), distributed at 100 μ L per well into flat-bottomed ELISA plates (Greiner BioOne) and incubated 16 hours at 4°C. Blank control wells were filled with same volumes of corresponding buffer.

Serial dilutions of serum samples at 1:50 to 1:12800 in 0.1 M Glycine-HCl buffer pH 3.0, were left 40 minutes at 20°C for dissociation of immune complexes, neutralized to pH 7.4 by adding the same volume of 2xPBS BSA 4% NaOH 0.02N, then 100 μ L were immediately deposited into m40-, m42-, f40- or f42-coated ELISA plates and incubated 1h at 20°C.

After 8 washes with PBS Tween-20 0.05%, bound antibodies of each IgG subclass were detected by 16h incubation at 4°C of monoclonal anti-human IgG1, IgG2, IgG3, or IgG4 antibodies (clones NL16, GOM2, ZG4 and RJ4, respectively, courtesy of Dr Margaret Goodall, University of Birmingham, UK). After 8 washes with PBS Tween-20 0.05%, antibodies belonging to IgG, IgA and IgM classes and IgG subclasses were revealed after 1h incubation at 20°C with peroxidase (HRP)-conjugated antisera (anti-mouse IgG for IgG

subclasses, or anti-human IgG, IgA, and IgM, 1:5000 in washing buffer, Jackson ImmunoResearch Inc).

Washed plates were revealed with H₂O₂/o-phenylene-diamine substrate in urea buffer pH 5.0, the reaction stopped with 2N H₂SO₄, and optical densities (OD) measured at 492 nm.

5 Determination of dilution curve parameters

Non-specific signals were subtracted from corresponding overall signals in order to retain values relating to specific binding of anti-A β antibodies. The best fitting curve for modeling serum dilutions followed a sigmoid model and was calculated using a non-linear least square approach to link specific OD with sample dilution as follows:

$$10 \quad \text{specific OD} = \frac{a}{1 + b \cdot e^{-c \cdot x}}$$

where x corresponds to the dilution factor expressed in logarithmic units. For a given curve, constants a , b and c were used in the following analysis.

The a constant represents the asymptotic maximum of the curve on the y-axis (OD units) that reflects the maximum amount of antigenic determinants bound by tested anti-A β antibodies.

15 In order to obliterate its inter-assay variance, this parameter was expressed as a ratio with the maximum given by the curve of a reference serum pool included in all assays, i.e. serving as internal standard. Hence, what is hereafter termed *Max* has no unit and directly reflects the amount of coated binding sites, i.e. the epitopic diversity of anti-A β antibodies. The x-axis coordinate at the inflexion point of the sigmoid dilution curve can be calculated as $\ln(b)/c$
20 (where $\ln(b)$ is the napierian logarithm of b), and represents the dilution factor in logarithmic units that yields 50% of the *Max* signal. For a monoclonal antibody, this parameter depends on its concentration and on the affinity of the epitope-binding site. For polyclonal antibodies, this parameter reflects partially the overall concentration of anti-A β antibodies of a given isotype, and partially their overall avidity. This parameter will be hereafter termed *Titer*, and
25 is expressed as an absolute number that represents a dilution factor in decimal logarithmic units. The steepness of the sigmoid curve at the inflexion point can be calculated as $-c/4$. It depends on the a constant and on cooperativity phenomena that can occur between distinct antibody binding sites. What will be hereafter termed *Steepness* corresponds to $-c/4a$ and expresses the loss of relative OD units per dilution factor (in decimal logarithmic units), at the
30 inflexion point of the curve.

A 4th experimental parameter, hereafter referred to as $K_A'_{App}$, corresponds to the apparent affinity of anti-A β antibodies of a given isotype. It was calculated through a linearization procedure of the sigmoid curve³ following the equation:

$$\frac{1}{1 - OD/a} = K'_{A App} \times \frac{10^{-x}}{OD/a} + d$$

This parameter is expressed in dilution factor units and translates the overall avidity of anti-A β antibodies of a given isotype. Therefore, it is not independent from values of *Steepness* and *Titer*, because cooperativity phenomena influence apparent avidity, and apparent titer directly depends on avidity. However, these 3 parameters are not strictly equivalent, and each reflects in a subtle manner different aspects of antigen/antibody binding.

Determination of the MAST index

A single index was calculated from the 4 parameters described above, yielded by analyses of each antibody isotype on each A β antigenic isoform. In order to reduce the number of variables of interest, and thus the family-wise error rate, we used the first principal component of PCA performed on overall parameters to summarize the maximum information given by the 4 redundant variables of each curve. It is worth noting that these coefficients did not differ significantly between clinical groups, antigenic preparations or antibody isotypes. The first component of PCA determined the weight coefficients of the index formula, as follows: Index = 0.2316**Max* + 0.6717**Titer* + 0.1413**Steepness* + 0.6894**K'A App*.

Quality management of multiplex ELISA

In order to minimize bias due to manipulator and inter-assay variability, samples were randomized and analyzed blindly. Nevertheless, each experiment included samples from all clinical groups, in such a way that any experimental bias would comparably affect results of all groups. In each experiment, an internal standard made of pooled human sera was used in order to normalize OD between experiments, standardize *Max* results, and thus reduce inter-assay variability due for instance to enzymatic revelation. Another pool of human sera served as an internal control in order to assess variability between experiments. ELISA plates that gave internal control results over 2.5 x standard deviation (sd) from mean values on one or more parameters were discarded. Goodness-of-fit of the sigmoid curve modeling was assessed by square-deviation, and only assays with R > 0.9 were validated.

Sigmoid dilution curve parameters and definition of a summary index

The best fitting curve for modeling serum dilutions followed a sigmoid model which, in addition with a linearization procedure, led to the measurement of 4 experimental parameters per curve: the *maximum*, the *titer*, the *steepness*, and the apparent avidity constant (*K'A App*), which account for the number of bound epitopes, the serum concentration, and the overall apparent binding strength of the revealed antibody isotype. Besides inter-individual variability

of naturally occurring antibodies, these parameters are not independent, reflecting different aspects of the anti-A β humoral immune response, such as clonal expansion and affinity maturation. Since they provide redundant information, we defined an index called MAST for Maximum, Avidity, Steepness, Titer, as a linear combination of the 4 parameters, weighted using first component factors from principal component analysis (PCA). This summary index quantifies concomitant variations in anti-A β antibodies diversity, concentration and avidity. It was determined for the 6 studied isotypes (IgG, IgA, IgM, IgG1, IgG3 and IgG4; IgG2 assays yielded insignificant signals in all tested cases) detected on 4 different antigenic preparations (m40, m42, f40 and f42 isoforms of A β).

10 **Statistical analysis**

Differences in anti-A β antibodies indexes between CAA, CAA-he or CAA-ri patients and controls were assessed using Mann-Whitney test with Bonferroni correction procedure for multiple comparison (two-sided, $\alpha=.05$). Exploratory analysis of the raw dilution curve parameters affecting the index was performed *post-hoc* using one-sided tests, according to the sign of the corresponding coefficient within the index formula. The performances of the statistically significant indexes were assessed using ANOVA to test univariate logistic regression models against the null model, and using receiver operating characteristic (ROC) curves to determine overall sensitivity, specificity and area under the curve (AUCs). Optimal cutoff values were selected as corresponding to maximum accuracy (i.e. $0.5*(\text{sensitivity} + \text{specificity})$). We limited our analysis to univariate models to avoid the selection of over-fitted models, and the robustness of each selected model was assessed by 10-fold stratified cross-validation procedure, with a critical lower limit of the 95% confidence interval below 50% of specificity, sensitivity or AUC. R version 3.3.2 was used for analyses (R Core Team, 2016). The ROCR package was used for performances analysis (Sing et al., 2005).

25 **Results**

The study included 60 subjects whose main characteristics are presented in Table 1 above. Nineteen out of the 20 patients with CAA-he met the diagnosis criteria for probable CAA with LH. The remaining patient had 2 thalamic MB but he also had more than 200 lobar MB along with typical amyloid spells (transient aphasia and visual flashes) and was therefore included in the CAA-he group. The other 19 patients had probable CAA with LH, and were studied in the acute setting of the LH. All CAA-ri patients but one (patient 5), met the diagnostic criteria of probable CAA-ri. In patient 5, although MRI diagnostic criteria were not

met due to the absence of typical white matter hyperintensities (WMH), diagnosis was made upon cerebral biopsy. When the patient relapsed 10 months after treatment cessation, typical WMH and growth of MB count were typical of CAA-ri. Serum samples were stored during 19, 16, and 27 months (medians), respectively for the control, CAA-he and CAA-ri groups.

5 The reliability of the multiplex ELISA was assessed considering the goodness-of-fit of the sigmoid modeling, and the inter-assay variability, and showed performances within the acceptability limits. A single index was calculated from the parameters of each sigmoid dilution curve.

10 We expected correlations to be found between the four parameters of the dilution curves, as they reflect different aspects of antibodies (concentration, avidity and diversity of epitope recognition) that vary together during humoral responses. As expected, all 4 parameters were same-signed in the first-component, which implies positive correlation between the first component index and each raw parameter. Of note, the 4 coefficients associated to corresponding parameters for building the first component were within the same order of magnitude, i.e. below 5-fold fluctuation. This means that the index is not drastically over-
15 determined by one parameter alone. The first-component explains over 80% of the variance, and hence translates efficiently into one index the overall variability of the 4 dilution curve parameters.

See Figure 3 and Table 2.

20 **Table 2 Sigmoid modeling goodness-of-fit and internal control mean CV, by antigenic preparations and antibody isotypes.**

	Overall	m4 0	m4 2	f40	f42	IgG	IgA	Ig M	IgG 1	IgG 3	IgG 4
R² (mean)	0,97	0,98	0,98	0,97	0,97	0,99	0,98	0,99	0,98	0,96	0,95
Max (mean CV)	16%	18 %	15 %	18 %	15 %	13 %	17 %	17 %	16%	19%	16%
Titre (mean CV)	7%	8%	6%	9%	7%	5%	8%	7%	6%	8%	13%
Steepness (mean CV)	16%	16 %	12 %	17 %	19 %	14 %	17 %	17 %	13%	18%	19%
K'A App (mean CV)	12%	9%	9%	15 %	14 %	8%	13 %	15 %	11%	12%	10%

Goodness-of-fit was evaluated by mean R² with an arbitrary acceptance limit of R = 0.9.

Reproducibility of each parameter was expressed with mean coefficient of variation (CV) for the corresponding parameter. Mean R² were obtained from dilution curves of patients, internal standard
25 and internal controls (n=2160, 540, and 360 for overall, by antigen, and by isotype R², respectively).

Mean CV were obtained from dilution curves obtained with pooled sera serving as internal control (n=360, 90 and 60 for overall, by antigen, and by isotype CV, respectively).

The anti-m40 IgG3 antibody MAST-index was higher in overall CAA (median, [interquartile range (IQR)], 4.36 [4.26–4.46]; $P=0.001$) and in CAA-ri (median [IQR], 4.46 [4.33–4.56]; $P=0.002$) compared with the control group (median [IQR], 4.11 [3.87–4.22]). The difference for CAA-he patients compared with the control group did not remain statistically significant after Bonferroni's correction (median [IQR], 4.34 [4.00–4.43]; $P=0.08$), although two distinct subgroups within CAA-he seem to emerge (**Figure 4A**). Exploratory analysis of observed differences in the raw dilution curve parameters of anti-m40 IgG3 was performed *post-hoc*. *Max* (median [IQR], 1.23 [1.09–1.76] vs 0.96 [0.81–1.17]; $P=0.02$), *titer* (median [IQR], 3.00 [2.86–3.14] vs 2.78 [2.62–2.92]; $P=0.004$) and *K'A App* (median [IQR], 2.91 [2.80–3.15] vs 2.75 [2.59–2.91]; $P=0.03$) of anti-m40 IgG3 antibodies were higher in CAA-ri compared with controls, which may correspond to higher diversity of epitope binding, higher serum concentration, and higher avidity.

The anti-f40 IgM MAST-index was higher in overall CAA (median [IQR], 4.18 [3.99–4.39]; $P=0.04$) and in CAA-he (median [IQR], 4.29 [4.18–4.42]; $P=0.002$) compared with the control group (median [IQR], 4.04 [3.91–4.15]). No statistically significant difference appeared for CAA-ri patients compared with the control group (median [IQR], 3.99 [3.88–4.24]; $P=0.96$) (see **Figure 4B**). *Post-hoc* analysis of the raw dilution curve parameters suggested higher *titer* (median [IQR], 2.82 [2.78–2.97] vs 2.71 [2.68–2.80]; $P=0.02$) and *K'A App* (median [IQR], 3.00 [2.82–3.06] vs 2.76 [2.70–2.95]; $P=0.006$) of anti-f40 IgM antibodies in CAA-he compared with controls, suggesting higher serum concentration, and higher avidity.

To evaluate the performances of anti-m40 IgG3 and anti-f40 IgM MAST-indexes as potential biomarkers of CAA-ri and CAA-he, respectively, we performed logistic regression and ROC curve analyses. The univariate models using anti-m40 IgG3 and anti-f40 IgM performed significantly better against the null model to discriminate CAA-ri ($P<0.001$), and CAA-he ($P=0.03$), respectively. An anti-m40 IgG3 MAST-index cutoff of 0.6026 provided the optimal discrimination between patients CAA-ri and controls at a sensitivity of 85.0% (95% CI, 83.7%–>100%) and a specificity of 83.3% (95% CI, 67.7%–>100%), with an AUC of 0.89 (95% CI, 0.75–1.00) (**Figure 4C**). An anti-f40 IgM MAST-index cutoff of 0.5239 provided the optimal discrimination between patients CAA-he and controls at a sensitivity of 82.4%

(95% CI, 61.5%–98.5%) and a specificity of 81.3% (95% CI, 51.5%–88.5%), with an AUC of 0.82 (95% CI, 0.53–0.82) (**Figure 4D**).

Conclusion

5 This case-control study demonstrates an association between serum anti-A β antibody features and subtypes of CAA manifestations. Higher titer, avidity and diversity of circulating anti-soluble A β ₁₋₄₀ IgG3 antibodies were associated with CAA-ri, while higher titer and avidity circulating anti-fibrillar A β ₁₋₄₀ IgM were associated with CAA-he.

References

- Auriel E, Charidimou A, Gurol ME, et al. Validation of Clinicoradiological Criteria for the Diagnosis of Cerebral Amyloid Angiopathy-Related Inflammation. *JAMA Neurol.* 2016;73(2):197-202.
- 5
- Béjot Y, Cordonnier C, Durier J, Aboa-Eboulé C, Rouaud O, Giroud M. Intracerebral haemorrhage profiles are changing: results from the Dijon population-based study. *Brain.* 2013;136(2):658-64.
- Charidimou A, Boulouis G, Gurol ME, et al. Emerging concepts in sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Brain.* 2017;140(7):1829-1850.
- 10
- Fazekas F, Chawluk JB, Alavi A, Hurtig HI, Zimmerman RA. MR signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer's dementia and normal aging. *AJR Am J Roentgenol.* 1987;149(2):351-6.
- Gregoire SM, Chaudhary UJ, Brown MM, et al. The Microbleed Anatomical Rating Scale (MARS): reliability of a tool to map brain microbleeds. *Neurology.* 2009;73(21):1759-66.
- 15
- Knudsen KA, Rosand J, Karluk D, Greenberg SM. Clinical diagnosis of cerebral amyloid angiopathy: validation of the Boston criteria. *Neurology.* 2001;56(4):537-9.
- Linn J, Halpin A, Demaerel P, et al. Prevalence of superficial siderosis in patients with cerebral amyloid angiopathy. *Neurology.* 2010;74(17):1346-50.
- Martinez-Ramirez S, Romero JR, Shoamanesh A, et al. Diagnostic value of lobar microbleeds in individuals without intracerebral hemorrhage. *Alzheimers Dement.* 2015;11(12):1480-1488.
- 20
- R Core Team (2016). *R: A language and environment for statistical computing.* R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Salvarani C, Hunder GG, Morris JM, Brown RD Jr, Christianson T, Giannini C. A β -related angiitis: comparison with CAA without inflammation and primary CNS vasculitis. *Neurology.* 2013;81(18):1596-603.
- 25
- Scheltens P, Leys D, Barkhof F, et al. Atrophy of medial temporal lobes on MRI in "probable" Alzheimer's disease and normal ageing: diagnostic value and neuropsychological correlates. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1992;55(10):967-72.

Sing T, Sander O, Beerenwinkel N and Lengauer T (2005). "ROCR:visualizing classifier performance in R." *Bioinformatics*, 21(20),pp. 7881. <http://rocr.bioinf.mpi-sb.mpg.de>.

5 Sperling RA, Jack CR Jr, Black SE, et al. Amyloid-related imaging abnormalities in amyloid-modifying therapeutic trials: recommendations from the Alzheimer's Association Research Roundtable Workgroup. *Alzheimers Dement*. 2011;7(4):367-85.

Wilson, Ambler, Shakeshaft, et al. Cerebral microbleeds and intracranial haemorrhage risk in patients anticoagulated for atrial fibrillation after acute ischaemic stroke or transient ischaemic attack (CROMIS-2): a multicentre observational cohort study. *Lancet Neurol*. 2018;17(6):539-47

10 Yamada M. Cerebral amyloid angiopathy: emerging concepts. *J Stroke*. 2015;17(1):17-30.

CLAIMS

- 5 1. An *in vitro* method for diagnosing cerebral amyloid angiopathy (CAA), or for
diagnosing or determining the risk of developing a complication of CAA, in a
human subject,
which method comprises analyzing serial dilutions of a plasma or serum sample of
the subject, for determining at least one binding parameter of antibodies present
10 therein, wherein said antibodies are anti-A β amyloid peptide(s) antibodies.
2. The method of claim 1, wherein the complication is hemorrhagic CAA or
inflammatory CAA.
- 15 3. The method of claim 1 or 2, wherein the A β peptide is A β ₁₋₄₀ or A β ₁₋₄₂ peptide.
4. The method of claim 3, wherein the A β peptide is soluble A β ₁₋₄₀.
5. The method of claim 4, wherein the anti-soluble A β ₁₋₄₀ antibodies are IgG
20 antibodies, preferably IgG3, IgG1 or IgG4 antibodies, still preferably IgG3
antibodies.
6. The method of claim 3, wherein the A β peptide is fibrillar A β ₁₋₄₀.
- 25 7. The method of claim 6, wherein the anti-fibrillar A β ₁₋₄₀ antibodies are IgM
antibodies.
8. The method of any of claims 1 to 7, wherein the binding parameter is i) the titer of
said antibodies as determined at 50% maximum binding, ii) the affinity or avidity
30 constant, and/or iii) the steepness of the dilution curve.
9. The method of any of claims 1 to 7, comprising the antibodies are detected by
means of a chromogenic or fluorescent labelling, preferably wherein the antibodies
are detected by means of an indirect immunoassay on immobilized antigen using a

secondary anti-human immunoglobulin antibody that carries a chromogenic enzyme or fluorescent label;

and wherein the binding parameter is preferably the maximum optical density observed, preferably normalized with an internal standard.

5

10. The method of claim 9, comprising determining an index (designated “MAST-index”) that is a weighted summation of the following binding parameters: i) the titer of said antibodies as determined at 50% maximum binding, ii) the affinity or avidity constant, iii) the maximum optical density, preferably normalized with an internal standard, and iv) the steepness of the dilution curve.

10

11. The method of claim 10, comprising determining the MAST-index of anti-soluble $A\beta_{1-40}$ IgG antibodies, wherein a higher MAST-index of anti-soluble $A\beta_{1-40}$ IgG antibodies compared to control is indicative of a subject with a CAA complication of the inflammatory (CAA-ri) type, or of a higher risk for the subject to develop a CAA-ri, preferably wherein the anti-soluble $A\beta_{1-40}$ IgG antibodies are anti-soluble $A\beta_{1-40}$ IgG3 antibodies.

15

12. The method of claim 10, comprising determining the MAST-index of anti-fibrillar $A\beta_{1-40}$ IgM antibodies, wherein a higher MAST-index of anti-fibrillar $A\beta_{1-40}$ IgM antibodies compared to control is indicative of a subject with a CAA complication of the haemorrhagic (CAA-he) type, or of a higher risk for the subject to develop a CAA-he.

20

13. The method of any of claims 1 to 11, which comprises determining at least one binding parameter of anti-soluble $A\beta_{1-40}$ IgG antibodies and at least one binding parameter of anti-fibrillar $A\beta_{1-40}$ IgM antibodies in a plasma or serum sample of the subject.

25

14. The method of claim 13, which comprises conducting a multiplex immunoassay.

30

15. The method of any of claims 1 to 14, wherein the subject is afflicted with Alzheimer’s disease, cortical posterior atrophy, primary progressive aphasia, or Down’s syndrome.

Methods for diagnosing a cerebral amyloid angiopathy

5

ABSTRACT

10

The invention provides an *in vitro* method for diagnosing cerebral amyloid angiopathy (CAA), or for diagnosing or determining the risk of developing a complication of CAA, in a human subject, which method comprises analyzing serial dilutions of a plasma or serum sample of the subject, for determining at least one binding parameter of antibodies present therein, wherein said antibodies are anti-A β amyloid peptide(s) antibodies.

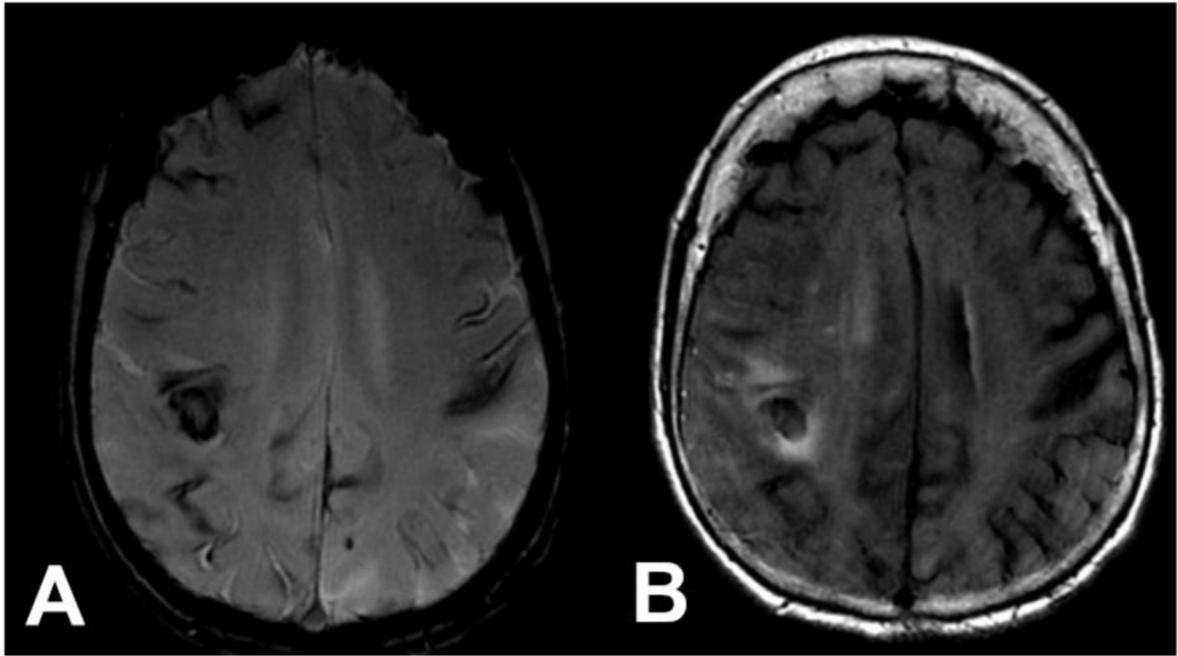


Figure 1

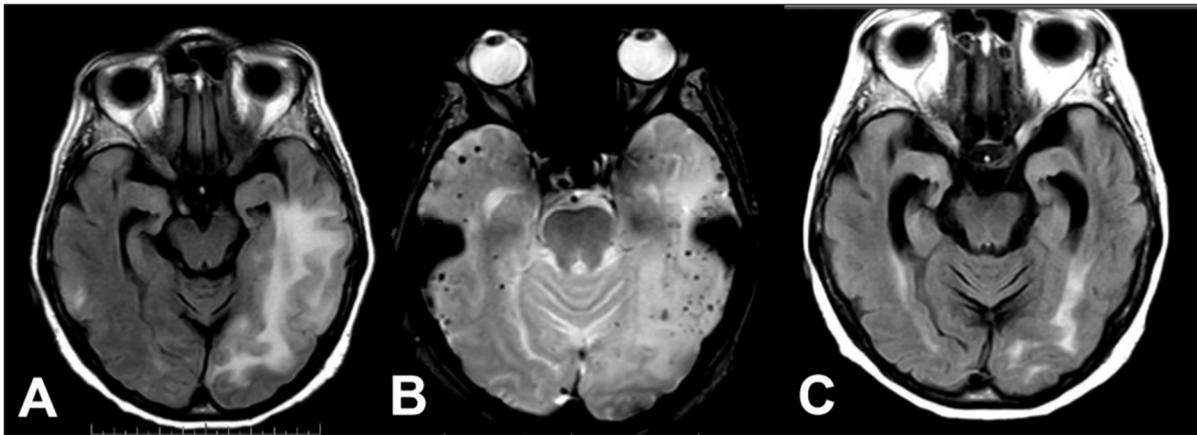


Figure 2

2/3

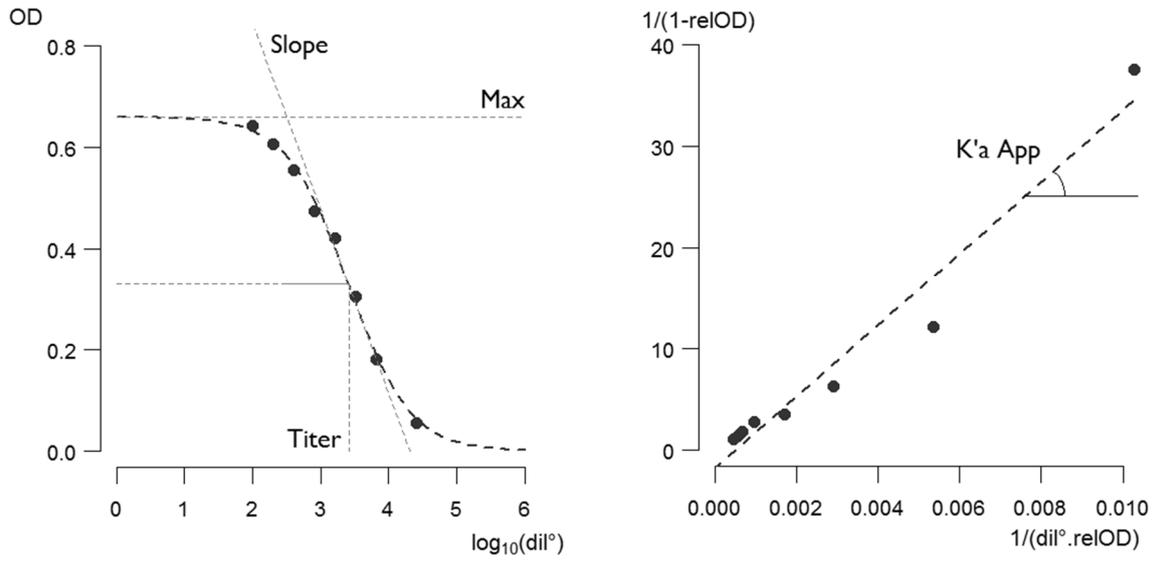


Figure 3

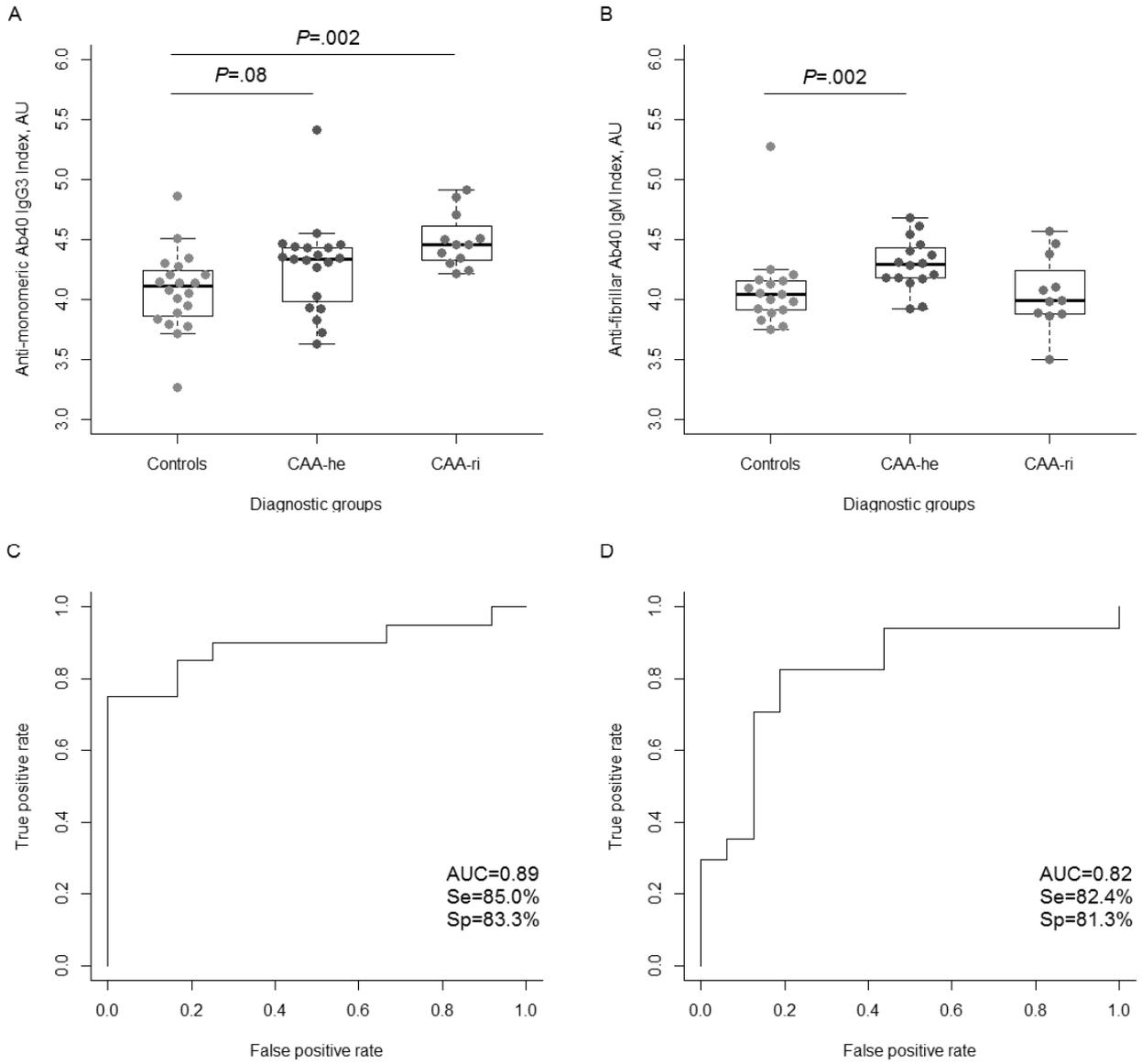


Figure 4

Distinct serum anti-A β antibody patterns in hemorrhagic and inflammatory cerebral amyloid angiopathy manifestations

Yannick Chantran, PharmD^{1,2}, Jean Capron, MD^{1,3}, Diana Doukhi, MD¹, Johanna Felix¹, Mélanie Férout¹, Florian Kruse¹, Thomas Chaigneau¹, Guillaume Dorothee, PhD¹, Thibault Allou, MD⁴, Xavier Ayrignac, MD,⁵ Zina Barrou, MD,⁶ Thomas de Broucker, MD,⁷ Corina Cret, MD,⁸ Guillaume Turc, MD, PhD,⁹ Roxane Peres, MD,¹⁰ Anne Wacogne, MD,¹¹ Marie Sarazin, MD PhD,¹² Dimitri Renard, MD,¹¹ Charlotte Cordonnier, MD PhD,¹³ Sonia Alamowitch, MD PhD^{1,3}, Pierre Aucouturier, PhD^{1,2*}

¹UMRS 938, Hôpital St-Antoine, Sorbonne Université, Inserm, Paris, France

²Département d'Immunologie Biologique, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris, France

³Service de Neurologie et d'Urgences Neurovasculaires, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris, France

⁴Service de Neurologie, CH Perpignan, Perpignan, France

⁵Service de Neurologie, CHU Montpellier, Hôpital Guy de Chauliac, Montpellier, France

⁶Service de Gériatrie, Hôpital Pitié Salpêtrière, AP-HP, Paris, France

⁷Service de Neurologie, Centre Hospitalier de Saint-Denis, Saint-Denis, France

⁸Service de Neurologie, Centre Hospitalier de Meaux, Meaux, France

⁹Service de Neurologie, GHU Paris Psychiatrie et Neurosciences, Université de Paris, INSERM U1266, FHU NeuroVasc, Paris, France

¹⁰Service de Neurologie, Hôpital Lariboisière, AP-HP, Paris, France

¹¹Service de Neurologie, CHU Nîmes, Hôpital Caremeau, Nîmes, France

¹²Service de Neurologie de la Mémoire et du Langage, Centre Hospitalier Sainte-Anne, Université Sorbonne Paris Cité, Paris, France

¹³U1172 - LilNCog - Lille Neuroscience & Cognition, Inserm, CHU Lille, Univ. Lille, Lille, France

*** Correspondence:**

Pierre Aucouturier

pierre.aucouturier@inserm.fr

Keywords: anti-A β antibodies, natural antibodies, cerebral amyloid angiopathy, stroke, A β related angiitis.

Study funding : supported by the SATT Lutech

Abstract

Objective: To study blood anti-A β antibodies in the context of spontaneous inflammatory or hemorrhagic CAA manifestations, which are similar to complications occurring after monoclonal anti-A β antibody immunotherapies.

Methods: In this case-control study, serum anti-A β antibody isotype, concentration, avidity, and reactivity toward soluble or fibrillary A β_{1-40} and A β_{1-42} isoforms were assessed using an ELISA-based multiplex analysis. Anti-A β serologic patterns were defined in CAA and CAA subgroups using multivariable logistic regression analyses.

Results: Forty-one healthy aged controls and 64 CAA patients were recruited: 46 with hemorrhagic features (CAA-he) and 18 with CAA-related inflammation (CAA-ri). As compared to controls, the most striking features of CAA-related serological profiles were the following: i) both CAA-he and CAA-ri patients displayed lower binding diversity of anti-soluble A β_{1-40} IgM; ii) CAA-he patients displayed higher anti-soluble A β_{1-40} / fibrillary A β_{1-42} IgG4 concentrations ratio and higher anti-soluble A β_{1-42} IgG4 and IgA avidity; iii) CAA-ri patients displayed higher binding diversity of anti-soluble A β_{1-40} IgG3 and higher anti-fibrillary/soluble A β_{1-42} IgG4 dilution curve steepness ratio.

Conclusion: This proof-of-concept study revealed anti-A β antibody variations in CAA patients, some of which were associated to CAA clinical phenotypes, unveiling pathophysiological insights regarding CAA-hemorrhagic and inflammatory related events.

Introduction

Cerebral amyloid angiopathy (CAA) relates to cortical and leptomeningeal vessel microangiopathy with accumulation of vascular amyloid fibrils made of amyloid- β peptide (A β).¹ CAA is frequent in both Alzheimer's disease (AD) and non-AD aged participants. Intracerebral hemorrhage (ICH) related to CAA (CAA-he) is a major health concern.² CAA-related inflammation (CAA-ri) is a rare but treatable A β -related CNS vasculitis.³

Dose-dependent adverse events similar to CAA-he and CAA-ri were observed upon anti-A β immunotherapy in AD,⁴ suggesting a role of anti-A β antibodies in CAA manifestations. Subsequent investigations revealed elevated CSF levels of anti-A β IgG during CAA-ri.^{5,6} However, it was shown experimentally that blood-borne more than CSF-borne anti-A β antibodies can aggravate CAA manifestations in mouse models.^{7,8}

As well as other auto-antibodies involved in neurodegenerative disorders, including anti-Tau protein⁹ and anti-alpha synuclein antibodies,¹⁰ anti-A β antibodies belonging to the “natural” auto-antibody repertoire: they are present in both diseased and healthy individuals, displaying low-avidity and multi-reactivity, and circulating mostly as immune complexes.¹¹ These complexes require dissociation prior to analysis, in order to reveal serological specificities in AD.^{11,12} These features have likely hindered consistent analyses regarding anti-A β antibodies, which was also the case for anti-alpha synuclein antibodies.¹⁰ In AD, anti-A β antibodies measurement led to inconsistent conclusions.¹¹⁻¹⁴ Circulating anti-A β antibodies were scarcely studied in CAA.

Our working hypothesis was that CAA and related clinical manifestations would relate to particular characteristics of serum anti-A β antibodies, including concentration, avidity, specific reactivity towards A β isoforms, and class and subclass diversity.

Materials and methods

Study design and participants

This case-control study enrolled participants from Jan. 2013 to Jun. 2019, through nine French medical centers: CAA patients, and healthy aged controls lacking clinical and MRI features of CAA. Patients with CAA were classified into: CAA-he inpatients with probable or definite CAA according to the modified Boston criteria;^{15,16} CAA-ri inpatients fulfilling the criteria for non-invasive diagnosis of CAA-ri.¹⁷ Demographics, medical history, and cerebral MRI were recorded at admission.

For the control group, inclusion criteria were: age > 55 years; recent MRI with normal diffusion sequences (transient ischemic stroke, functional neurological symptoms, or symptoms of peripheral origin); exclusion criteria were: cognitive decline (short Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly (IQCODE-R) > 3.4); MRI-proven lobar ICH, recent ischemic stroke, or Fazekas grading ≥ 2 for white matter hyperintensities.

All eligible patients who gave their consent to participate in the study were included. All serum aliquots were kept at -20°C until use, with a median storage duration of 19 (3–42), 16 (3–50), and 27 (4–55) months (range) for the control, CAA-he, and CAA-ri groups, respectively.

Standard Protocol Approvals, Registrations, and Patient Consents

The study protocol was approved by the ethics committee “Paris Ile de France V”. All participants representative were provided oral and written information, and gave oral or written consent to participate.

Imaging assessment

Diagnoses were adjudicated by one board-certified neurologist (JC) specialized in stroke, blind to biological information. Cerebral lobar microhemorrhages were defined as small round foci of hypo-intense signal in T2*-GRE-weighted images, 10 mm or less in brain parenchyma and rated according to the microhemorrhages anatomical rating scale.¹⁸ Cortical superficial siderosis (cSS) was assessed according to the cSS multifocality scale.¹⁹

A β preparations

Synthetic (>95%) A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ peptides (Proteogenix, Schiltigheim, France) were dissolved in hexafluoroisopropanol, and 450 μ g aliquots were evaporated in low retention tubes and stored at -20 °C until use. Before use, lyophilized A β was dissolved in 10 μ L dimethylsulfoxide (DMSO), sonicated for 3 min at 300 Watts. For soluble preparations, aliquots were then mixed with 90 μ L 30mM HEPES 10eq Cu²⁺ pH 7.4 buffer with 10mM or 160mM NaCl for A β ₁₋₄₂ and A β ₁₋₄₀, respectively. For fibril preparations, aliquots were then mixed with 90 μ L 0.01N HCl or A β ₁₋₄₀ coating buffer, incubated at 37°C during 72h or 15 days, for A β ₁₋₄₂ and A β ₁₋₄₀, respectively.

Multiplex ELISA for anti-A β antibody analyses

Freshly prepared soluble or fibrillar A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ (hereafter termed s-A β ₄₀, s-A β ₄₂, f-A β ₄₀ or f-A β ₄₂) were diluted to 15 μ g/mL in coating buffer (30mM HEPES 160mM or 10mM NaCl (for A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂, respectively) 10eq Cu²⁺ (for monomers) pH 7.4), distributed at 100 μ L per well into ELISA plates (Greiner BioOne) and incubated 16 hours at 4°C. Serial dilutions of serum samples at 1:50 to 1:12800 in 0.1M Glycine-HCl buffer pH 3.0, were left 40 minutes at 20°C for dissociation of immune complexes, neutralized to pH 7.4 by adding the same volume of 2xPBS 4% BSA 0.02N NaOH, then 100 μ L were immediately deposited into s-A β ₄₀, s-A β ₄₂, f-A β ₄₀ or f-A β ₄₂-coated ELISA plates and incubated 1h at 20°C. After eight washes with PBS 0.05% Tween-20, bound antibodies of each IgG subclass were detected by 16h incubation at 4°C of monoclonal anti-human IgG1, IgG2,

IgG3, or IgG4 antibodies (clones NL16, GOM2, ZG4 and RJ4, respectively). After eight washes with PBS 0.05% Tween-20, antibodies belonging to IgG, IgA and IgM classes and IgG subclasses were revealed after 1h incubation at 20°C with peroxidase-conjugated antisera (anti-mouse IgG for IgG subclasses, or anti-human IgG, IgA, and IgM, 1:5000 in washing buffer, Jackson ImmunoResearch Inc.). Washed plates were revealed with H₂O₂/o-phenylene-diamine substrate in 0.15 M urea buffer pH 5.0, the reaction stopped with 2N H₂SO₄, and optical densities (OD) measured at 492 nm. Non-specific signals obtained in uncoated wells were subtracted from overall signals retain OD relating to specific anti-A β binding. Of note, IgG2 antibodies yielded low binding to A β and unusable dilution curves as previously found in 33 AD and controls.¹²

Quality management of multiplex ELISA

Samples were randomized and analyzed blindly to minimize bias due to manipulator and inter-assay variability. Randomization was stratified in order to include samples from all clinical groups, so any experimental bias would affect all groups comparably. Pools of human sera were used as internal standard for inter-experiment normalization, and internal control to assess inter-assay variability. Results over 2.5 standard deviation (sd) for one curve parameter were considered invalid.

Determination of dilution curve parameters

Serum serial dilution curves follow a sigmoid-shaped signal in semi-logarithmic units, as illustrated on Fig 1A.²⁰ The best fitting sigmoid curve parameters were determined by non-linear least square approach, following the equation:

$$\textit{specific OD} = \frac{a}{1 + b \cdot e^{-c \cdot x}}$$

The values of *a*, *b*, and *c* directly relate to sigmoid curve parameters, hence to antibody properties. *Maximum (a)* signal obtained in antibody excess relate to the number of antigen binding sites, hence

on the diversity of epitope recognition by polyclonal anti-A β antibodies. *Titer* ($\ln(b)/c$) reflects the x-axis position of the curve, and depends on both concentration and avidity of the antibodies. The *Steepness* or *Slope* of the curve at the inflexion point ($-c/4a$) can vary with cooperativity phenomena occurring between distinct antibody binding sites. The apparent *Avidity* constant was calculated through a linearization procedure of the sigmoid curve (Fig 1B).²¹ In order to ensure appropriate goodness-of-fit of experimental data, only curves with $R > 0.9$ were taken into account.

Statistical analysis

For each individual, 96 serological variables were analyzed (*Maximum*, *Titer*, *Steepness* and *Avidity* for anti-soluble and fibrillar A β 40 and A β 42 IgG, IgA, IgM, IgG1, IgG3, and IgG4). In order to limit multiple comparison bias, we chose not to perform univariate analysis. Multiple logistic regression models were computed using stepwise variable selection. The criteria for retaining a variable into the model were that all variables were significantly associated with the risk of belonging to the diseased group (tested by the Wald's test; $p < 0.05$) and that introducing this variable allowed a significant improvement of the model against the (k-1) model, as measured by a significant drop of the residual variance (tested by a Likelihood Ratio test; p -value < 0.05). Variance Inflation Factors (VIFs) were computed for each final model to ensure the absence of collinearity between variables. A VIF value of 1 is obtained when there is no collinearity between variables, while a VIF value > 5 witnesses high multicollinearity in the model. Wilcoxon's test was used to compare the predicted response of the models between clinical groups. All statistical analyses were done with R version 3.6.1. The MASS package was used for model selection, and the beeswarm package for plots.

Data Availability Statement

Data are available upon reasonable request.

Results

Patient demographics and clinico-radiological data

The study enrolled 105 participants: 41 healthy aged controls, 46 CAA-he patients, and 18 CAA-ri patients. Of note, eight patients from the CAA-he group had cSS but no ICH ; their symptoms were : isolated cognitive decline in 3, transient focal episodes in 4 (2 with acute subarachnoidal hemorrhage); asymptomatic in one. Median (range) ages were 72 (55–89), 79 (59–90), 75 (64–87) years old in the control, CAA-he and CAA-ri groups, respectively. Male/Female ratios were 22/18, 24/21, and 8/9 in the control, CAA-he and CAA-ri groups, respectively. The main clinical and imaging findings in CAA-he and CAA-ri patients are presented in Table I.

Quality assessment of the multiplex ELISA

The sigmoid modeling of experimental dilution curves showed excellent overall goodness-of-fit (mean $R^2 = 0.97$; range stratified by antigen isoform: [0.97–0.98]; range stratified by antibody isotype: [0.95–0.99]). This confirmed that experimental dilution curves are appropriately described by the sigmoid model. Internal control mean coefficients of variation (CV) were inferior to 20% for all four parameters of all antibody isotypes and all A β isoforms (mean CV: 16%, 7%, 16%, and 12%, for *maxima*, *titer*, *steepness*, and *avidity*, respectively). This validated the multiplex ELISA as a reliable and reproducible method for assessing anti-A β antibody features.

Serum anti-A β antibody patterns associated with CAA

Table II presents the anti-A β serologic parameters associated with CAA against controls. These parameters are those included in the multivariable logistic regression model after stepwise variable selection. Fig 2A presents the predicted response resulting from this CAA-model applied to each individual. This predicted response is associated with the probability of presenting CAA or not, and

is modeled using the individual anti-A β profile regarding parameters presented in Table 2. In this complex profile, a higher diversity and concentration of anti-s-A β_{40} IgG3, a higher avidity of anti-s-A β_{40} IgG4 and a higher steepness of anti-f-A β_{42} IgG4 were associated with an increased probability of belonging to the CAA group. A lower diversity of anti-s-A β_{40} IgM, a lower avidity of anti-s-A β_{42} IgA, and a lower concentration of anti-f-A β_{42} IgG1 were also associated with an increased probability of belonging to the CAA group. All these variables, contributed independently to the model, without multicollinearity (all Variance Inflation Factors (VIFs) < 1.8).

The serological anti-A β antibody profile associated with CAA-he as compared to healthy aged controls (Table 2 and Fig 2B) also included lower diversity of anti-s-A β_{40} IgM and lower avidity of anti-s-A β_{42} IgA. Regarding the IgG4 isotype, CAA-he patients displayed higher concentrations of anti-s-A β_{40} IgG4, and lower concentrations and avidity of anti-A β_{42} IgG4, respectively. CAA-he patients also displayed lower avidity of anti-f-A β_{42} IgG1 as compared with healthy aged controls. Of note, excluding the 8 CAA-he patients that presented cSS without ICH did not change variables present in this model. All these variables and independently contributed to the model, without multicollinearity (all VIFs < 1.3).

As found in the CAA model, CAA-ri patients (Table 2 and Fig 2C) displayed lower diversity of anti-s-A β_{40} IgM, as also found for CAA-he patients, but also a higher diversity of anti-s-A β_{40} IgG3, and a higher steepness of anti-fibrillar A β_{42} IgG4 dilution curve. Conversely, CAA-ri patients displayed a lower steepness of anti-s-A β_{42} IgG4 and anti-s-A β_{40} IgA. All these variables contributed independently to the model, without multicollinearity (all VIFs < 1.4).

Discussion

Analyses of blood anti-A β antibodies demonstrate complex serological profiles in CAA, displaying distinctive features in CAA-he and CAA-ri patients. This proof-of-concept study suggests: i)

evidence of a link between anti-A β antibody responses and CAA; ii) existence of defined circulating anti-A β antibody species associated with distinct pathological phenotypes. In brief, clinical manifestations of CAA appear to relate, at least in part, to a biased natural antibody repertoire or abnormal responses to pathological A β peptide. However, at this stage, these serological profiles may not be used as biomarkers.

The causal relevance of these observations remains to be elucidated. Different naturally occurring anti-A β repertoires could be susceptibility factors for developing CAA, possibly by interfering with the clearance of cerebral A β . Cerebrovascular A β deposits may also induce anti-A β auto-immune responses emerging from the natural antibody repertoire. Finally, such induced anti-A β antibody species might enhance CAA and/or trigger hemorrhagic or inflammatory manifestations, as suggested in experimental mouse models.^{7,8}

Although this multivariable modeling approach does not allow pathophysiological conclusions about the role of given anti-A β species in CAA, it suggests hypotheses and drives attention towards potentially relevant anti-A β features. With the notable exception of anti-fibrillar A β_{1-42} IgG4, all serologic parameters relating to A β_{1-42} were lower in CAA. Regarding antibodies reacting with A β_{1-40} , our results show preferential developments of IgG3 and IgG4 antibody responses. Interestingly, lower diversity of anti-soluble A β_{1-40} IgM was the only common feature of CAA-he and CAA-ri patients. This could indicate an IgM response preferentially directed toward some particular pathogenic A β_{1-40} epitopes in response to A β_{1-40} cerebrovascular deposits.

The role of antibody isotypes in anti-A β antibodies related CAA manifestations is elusive. In AD patients treated with monoclonal anti-A β antibodies, amyloid related imaging abnormalities with vasogenic edema (ARIA-E) or with hemorrhagic features (ARIA-H) were initially reported with antibodies of IgG1 subclass.²²⁻²⁴ No ARIA-E but ARIA-H were yet reported in patients receiving

anti-A β IgG4 (Crenezumab),²⁵ while the existence of both remains uncertain for IgG2 (Ponezumab)^{26,27} None of the monoclonal anti-A β antibodies used in AD immunotherapy trials was of the IgG3 subclass. Like IgG1, IgG3 antibodies display potent effector functions including complement classical pathway activation and phagocytic and cytotoxic cell activation. IgG3 were thought to be more pathogenic than other IgG subclasses in anti-neutrophil cytoplasm antibody (ANCA)-associated vasculitis.²⁸

Lobar ICH, MH and cSS were also reported in active immunotherapy trial CAD106, designed for eliciting A β -specific antibodies without T-cell response. Lobar ICH occurred in a patient without anti-A β IgG response to CAD106, but his anti-A β IgM status was not reported.²⁹ It is worth noting that in ANCA-associated vasculitis, the presence of transient but recurrent IgM-ANCA is associated with a higher severity mainly due to acute hemorrhagic pulmonary manifestations.³⁰

The main risks factors for CAA are age, coincidental Alzheimer's disease, and ApoE genotypes, with controversy regarding the respective roles of ϵ 2 and ϵ 4 alleles.³¹ We accounted for age and cognitive decline by selecting aged healthy controls without cognitive decline, and CAA patients with normal MMSE. One potential limitation is that, due to unavailable material, ApoE genotypes could not be evaluated in this study. However, used diagnostic criteria for CAA-he and CAA-ri are independent of the ApoE genotype. Part of the serologic diversity might relate to ApoE genotypes, since both ϵ 2^{32,33} and ϵ 4³⁴ alleles have been linked to more severe CAA, with vasculopathies and hemorrhagic phenotypes. This question should be addressed in further studies.

In previous studies, serum anti-A β antibodies were mostly analyzed in the context of Alzheimer's disease, with various results reported by different authors using distinct methods.¹²⁻¹⁴ Neuropathological CAA is virtually present in all patients with AD pathology.³⁵ However, lobar microbleeds evoking CAA are present in only about 20% AD patients³⁶ while lobar ICH and

spontaneous manifestations similar to CAA-ri are rare in AD. This may be explained by the distinct CAA neuropathological phenotypes in AD and in patients with CAA clinical manifestations.³⁷ Whether AD patients with and without cerebral microbleed would present with different anti-A β serological signatures as compared to CAA-he and CAA-ri patients is thus likely and will be addressed in further studies.

Anti-A β antibodies circulate mostly as immune complexes,¹¹ but whether these complexes include circulating A β , cross-reactive proteins, and/or anti-idiotypic antibodies is not known. As previously performed by others,^{11-12,38} we used acidic dissociation of serum samples followed by extemporaneous neutralization to analyze all circulating anti-A β antibodies regardless of their free or bound state. We used high purity synthetic A β preparations and appropriate blank controls to ensure binding specificity. Of note, given the low specific signal obtained with non-dissociated samples once the background is subtracted, dilution curve analysis could not have been performed on non-dissociated samples. That anti-A β antibodies circulate mostly as immune complexes also raises questions regarding plasma A β levels measurements. Contradictory results exist on circulating A β levels in CAA.^{39,40} The circulating levels of free A β should depend on the concentrations and affinities of circulating anti-A β antibodies, and it is possible that the experimental conditions in which A β measurements are performed cannot fully circumvent A β masking by circulating anti-A β antibodies.

In conclusion, this correlative proof-of-concept study demonstrates distinct serum anti-A β antibody patterns in CAA and its hemorrhagic and inflammatory manifestations. Larger prospective and experimental studies could elucidate the triggering role of anti-A β antibodies in spontaneous or immunotherapy-induced CAA manifestations, and provide appropriate biomarkers.

Acknowledgments

We thank Dr Margaret Goodall (Birmingham, UK) for providing anti-IgG subclass antibodies.

Author contributions

Study concept and design: YC, JC, SA, PA. Data acquisition and analysis: YC, JC, DD, JF, MF, FK, TC, TA, XA, ZB, TdB, CC, GT, RP, AW, MS, DR, CC. Drafting the manuscript and figures: YC, JC, GD, CC, SA, PA.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Charidimou A, Boulouis G, Gurol ME, Ayata C, Bacskai BJ, Frosch MP, et al. Emerging concepts in sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Brain* 2017a; 140: 1829–50.
2. Béjot Y, Cordonnier C, Durier J, Aboa-Eboulé C, Rouaud O, Giroud M. Intracerebral haemorrhage profiles are changing: results from the Dijon population-based study. *Brain* 2013; 136: 658–64.
3. Salvarani C, Hunder GG, Morris JM, Brown RD Jr, Christianson T, Giannini C. A β -related angiitis: comparison with CAA without inflammation and primary CNS vasculitis. *Neurology* 2013; 81: 1596–603.
4. Sperling RA, Jack CR Jr, Black SE, Frosch MP, Greenberg SM, Hyman BT et al. Amyloid-related imaging abnormalities in amyloid-modifying therapeutic trials: recommendations from the Alzheimer's Association Research Roundtable Workgroup. *Alzheimers Dement* 2011; 7:367–85.
5. Piazza F, Greenberg SM, Savoirdo M, Gardinetti M, Chiapparini L, Raicher I, et al. Anti-amyloid β autoantibodies in cerebral amyloid angiopathy-related inflammation: implications for amyloid-modifying therapies. *Ann Neurol* 2013; 73: 449–58.
6. DiFrancesco JC, Longoni M, Piazza F. Anti-A β Autoantibodies in Amyloid Related Imaging Abnormalities (ARIA): Candidate Biomarker for Immunotherapy in Alzheimer's Disease and Cerebral Amyloid Angiopathy. *Front Neurol* 2015; 6: 207.
7. Pfeifer M, Boncristiano S, Bondolfi L, Stalder A, Deller T, Staufenbiel M et al. Cerebral hemorrhage after passive anti-Abeta immunotherapy. *Science*. 2002; 298: 1379.
8. Thakker DR, Weatherspoon MR, Harrison J, Keene TE, Lane DS, Kaemmerer WF, et al. Intracerebroventricular amyloid-beta antibodies reduce cerebral amyloid angiopathy and associated micro-hemorrhages in aged Tg2576 mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 4501–06.
9. Krestova M, Hromadkova L, Ricny J. Purification of Natural Antibodies Against Tau Protein by Affinity Chromatography. *Methods Mol Biol* 2017; 1643: 33-44.
10. Folke J, Rydbirk R, Løkkegaard A, et al. Distinct Autoimmune Anti- α -Synuclein Antibody Patterns in Multiple System Atrophy and Parkinson's Disease. *Front Immunol* 2019; 10: 2253.
11. Britschgi M, Olin CE, Johns HT, Takeda-Uchimura Y, LeMieux MC, Rufibach K et al. Neuroprotective natural antibodies to assemblies of amyloidogenic peptides decrease with normal aging and advancing Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106: 12145–50.
12. Dorothée G, Bottlaender M, Moukari E, de Souza LC, Maroy R, Corlier F et al. Distinct patterns of anti-amyloid- β antibodies in typical and atypical Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2012; 69: 1181–5.
13. Du Y, Dodel R, Hampel H, Buerger K, Lin S, Eastwood B et al. Reduced levels of amyloid beta-peptide antibody in Alzheimer disease. *Neurology* 2001; 57: 801–5.

14. Maftei M, Thurm F, Schnack C, Tumani H, Otto M, Elbert T et al. Increased levels of antigen-bound β -amyloid autoantibodies in serum and cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *PLoS One* 2013; 8:e68996.
15. Knudsen KA, Rosand J, Karluk D, Greenberg SM. Clinical diagnosis of cerebral amyloid angiopathy: validation of the Boston criteria. *Neurology* 2001; 56: 537–9.
16. Linn J, Halpin A, Demaerel P, Ruhland J, Giese AD, Dichgans M et al. Prevalence of superficial siderosis in patients with cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* 2010; 74: 1346–50.
17. Auriel E, Charidimou A, Gurol ME, Ni J, Van Etten ES, Martinez-Ramirez S, et al. Validation of Clinicoradiological Criteria for the Diagnosis of Cerebral Amyloid Angiopathy-Related Inflammation. *JAMA Neurol* 2016; 73: 197–202.
18. Gregoire SM, Chaudhary UJ, Brown MM, Yousry TA, Kallis C, Jäger HR et al. The Microbleed Anatomical Rating Scale (MARS): reliability of a tool to map brain microbleeds. *Neurology* 2009; 73: 1759–66.
19. Charidimou A, Boulouis G, Roongpiboonsopit D, Auriel E, Pasi M, Haley K et al. Cortical superficial siderosis multifocality in cerebral amyloid angiopathy: A prospective study. *Neurology* 2017b; 89: 2128–35.
20. Cheung YB, Xu Y, Remarque EJ, Milligan P. Statistical estimation of antibody concentration using multiple dilutions. *J Immunol Methods* 2015; 417: 115–23.
21. Orosz F, Ovádi J. A simple method for the determination of dissociation constants by displacement ELISA. *J Immunol Methods* 2002; 270: 155–62.
22. Ostrowitzki S, Deptula D, Thurfjell L, Scheltens P, Barkhof F, Nikolcheva T et al. Mechanism of amyloid removal in patients with Alzheimer disease treated with gantenerumab. *Arch Neurol* 2012; 69: 198–207.
23. Salloway S, Sperling R, Fox NC, Blennow K, Klunk W, Raskind M et al. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2014; 370: 322–33.
24. Sevigny J, Chiao P, Bussière T, Weinreb PH, Williams L, Maier M et al. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature* 2016; 537: 50–6.
25. Cummings JL, Cohen S, van Dyck CH, Brody M, Curtis C, Cho W et al. ABBY: A phase 2 randomized trial of crenezumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* 2018; 90:e1889-97.
26. Leurent C, Goodman JA, Zhang Y, He P, Polimeni JR, Gurol ME, et al. Immunotherapy with ponezumab for probable cerebral amyloid angiopathy. *Ann Clin Transl Neurol* 2019; 6: 795-806.
27. Chantran Y, Capron J, Alamowitch S, Aucouturier P. Anti-A β antibodies and cerebral amyloid angiopathy complications. *Front Immunol* 2019; 10: 1534.
28. Mulder AH, Stegeman CA, Kallenberg CG. Activation of granulocytes by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in Wegener's granulomatosis: a predominant role for the IgG3 subclass of ANCA. *Clin Exp Immunol* 1995; 101: 227–32.

29. Farlow MR, Andreasen N, Riviere ME, Vostiar I, Vitaliti A, Sovago J, et al. Long-term treatment with active A β immunotherapy with CAD106 in mild Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 2015; 7: 23.
30. Clain JM, Hummel AM, Stone JH, Ferverza FC, Hoffmann GS, Kallenberg CGM, et al. Immunoglobulin (Ig)M antibodies to proteinase 3 in granulomatosis with polyangiitis and microscopic polyangiitis. *Clin Exp Immunol* 2017; 188: 174–81.
31. Charidimou A, Martinez-Ramirez S, Shoamanesh A, Oliveira-Filho J, Frosch M, Vashkevich A, et al. Cerebral amyloid angiopathy with and without hemorrhage: evidence for different disease phenotypes. *Neurology* 2015; 84: 1206-12.
32. Nicoll JA, Burnett C, Love S, Graham DI, Dewar D, Ironside JW, et al. High frequency of apolipoprotein E epsilon 2 allele in hemorrhage due to cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 1997; 41: 716-21.
33. Greenberg SM, Vonsattel JP, Segal AZ, Chiu RI, Clatworthy AE, Liao A, et al. Association of apolipoprotein E epsilon2 and vasculopathy in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* 1998; 50: 961-5.
34. Alonzo NC, Hyman BT, Rebeck GW, Greenberg SM. Progression of cerebral amyloid angiopathy: accumulation of amyloid-beta40 in affected vessels. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57: 353-9.
35. Jellinger KA, Lauda F, Attems J. Sporadic cerebral amyloid angiopathy is not a frequent cause of spontaneous brain hemorrhage. *Eur J Neurol* 2007; 14: 923-8.
36. Cordonnier C, van der Flier WM, Sluimer JD, Leys D, Barkhof F, Scheltens P. Prevalence and severity of microbleeds in a memory clinic setting. *Neurology* 2006; 66: 1356-60.
37. Thal DR, Ghebremedhin E, Rüb U, Yamaguchi H, Del Tredici K, Braak H. Two types of sporadic cerebral amyloid angiopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; 61: 282-93.
38. Li Q, Gordon M, Cao C, Ugen KE, Morgan D. Improvement of a low pH antigen-antibody dissociation procedure for ELISA measurement of circulating anti-A β antibodies. *BMC Neurosci* 2007; 8: 22.
39. Greenberg SM, Cho HS, O'Donnell HC, Rosand J, Segal AZ, Younkin LH, et al. Plasma beta-amyloid peptide, transforming growth factor-beta 1, and risk for cerebral amyloid angiopathy. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 903: 144-9.
40. Hernandez-Guillamon M, Delgado P, Penalba A, Rodriguez-Luna D, Molina CA, Rovira A, et al. Plasma β -amyloid levels in cerebral amyloid angiopathy-associated hemorrhagic stroke. *Neurodegener Dis* 2012; 10: 320-3.

Figure legends

Figure 1. Determination of dilution curve parameters by sigmoid modeling and linearization

procedure. A. Dilution curve obtained from a human serum sample following acidic dissociation of circulating immune complexes and neutralization, incubated on coated soluble A β 1-42 and revealed with anti-IgG secondary antibody. The dashed thick line represents the sigmoid modeling of the curve, accurately described by i) the y-axis value of the left-sided plateau (*Maximum*); ii) the x-axis value at the inflexion point (*Titer*); iii) the slope at the inflexion point (*Steepness*). B. Linearization of the same experimental points and sigmoid model, which allows the determination of the apparent constant of avidity.

Figure 2. Serological differences associated with CAA clinical phenotypes.

A, CAA-model predicted value using the logistic multivariable regression model presented in Table 2, upper part. B, CAA-he model predicted values using the logistic multivariable regression model presented in Table 2, middle part. C, CAA-ri model predicted values using the logistic multivariable regression model presented in Table 2, lower part. *:p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001. Wilcoxon's test.

Table I. Clinical and radiological characteristics of patients with cerebral amyloid angiopathy

CAA-ri patients (n=18)	
<i>Onset < 1 month</i>	8
<i>Symptoms</i>	
Cognitive decline	17
Neurologic deficit	11
Epilepsy	6
Headache	5
<i>Histological diagnosis</i>	2
<i>MRI findings</i>	
Asymetric white matter hypersignal reaching U fibers	17
Meningeal gadolinium enhancement (n=14 injected MRIs)	6
<i>Treatment</i>	
Steroid alone	11
Steroid + Cyclophosphamid	6
None ^a	3
<i>Outcome (n=17)^b</i>	
Clinical and radiological improvement	13
Radiological improvement alone	3
CAA-he patients (n=46)	
<i>MRI findings</i>	
lobar micro-hemorrhages	45
cSS score (0-1-2-3-4)	13/15/6/7/5

Fazekas score (1-2-3)	9/21/16
<i>Modified Boston criteria for CAA</i> (definite/probable)	3/43

Abbreviations: CAA, cerebral amyloid angiopathy. CAA-he, cerebral amyloid angiopathy related intracerebral hemorrhage. CAA-ri, cerebral amyloid angiopathy-related inflammation. ICH, intracerebral hemorrhage. cSS, cortical superficial siderosis. ^aall with clinical and radiological improvement. ^bone patient was lost during follow-up

Table II. Multivariable logistic regression models for CAA, CAA-he, and CAA-ri against healthy aged controls

CAA model

Variables	Estimates	Standard errors	Z-val.	P-val.	Residual deviances	P-val.
	0.13	6.57			140.5	
^a Anti-s-A β_{40} IgG3 Maximum	2.89	0.92	3.14	0.0017	134.0	0.011
Anti-s-A β_{40} IgG3 Titer	4.03	1.16	3.48	0.0005	123.6	0.0013
Anti-s-A β_{40} IgG4 Avidity	2.29	0.94	2.44	0.015	117.6	0.014
^a Anti-f-A β_{42} IgG4 Steepness	3.74	1.32	2.84	0.0045	111.5	0.013
^b Anti-s-A β_{40} IgM Maximum	-3.10	1.02	-3.05	0.0023	102.5	0.0027
^c Anti-s-A β_{42} IgA Avidity	-3.48	1.13	-3.07	0.0021	92.9	0.0019
Anti-f-A β_{42} IgG1 Titer	-3.81	1.58	-2.42	0.016	86.5	0.012

CAA-he model

Variables	Estimates	Standard errors	Z-val.	P-val.	Residual deviances	P-val.
	42.14	11.84			120.32	
Anti-s-A β_{40} IgG4 Titer	3.30	1.11	2.97	0.0030	111.57	0.0031
Anti-f-A β_{42} IgG4 Titer	-6.41	1.95	-3.29	0.0010	98.41	0.0003
Anti-f-A β_{42} IgG1 Avidity	-4.65	2.04	-2.28	0.023	90.72	0.0056
^c Anti-s-A β_{42} IgA Avidity	-2.77	1.06	-2.61	0.0092	85.59	0.024
^b Anti-s-A β_{40} IgM Maximum	-2.09	1.01	-2.06	0.039	80.95	0.031
Anti-s-A β_{42} IgG4 Avidity	-2.87	1.24	-2.32	0.020	74.92	0.014

CAA-ri model

Variables	Estimates	Standard		Residual		
		errors	Z-val.	P-val.	deviances	P-val.
	10.75	5.78			72.58	
^a Anti-s-A β_{40} IgG3 Maximum	4.15	1.55	2.68	0.007	63.92	0.0032
^a Anti-f-A β_{42} IgG4 Steepness	4.01	1.70	2.36	0.018	58.38	0.019
Anti-s-A β_{40} IgA Steepness	-18.53	8.23	-2.25	0.024	54.08	0.038
Anti-s-A β_{42} IgG4 Steepness	-12.19	5.25	-2.32	0.020	46.96	0.0076
^b Anti-s-A β_{40} IgM Maximum	-2.40	1.21	-1.99	0.047	40.68	0.012

^a: Variables shared between the CAA and the CAA-ri models. ^b: Variables shared between the CAA, the CAA-he and the CAA-ri models; ^c: Variables shared between the CAA and the CAA-he models.

Figure 1

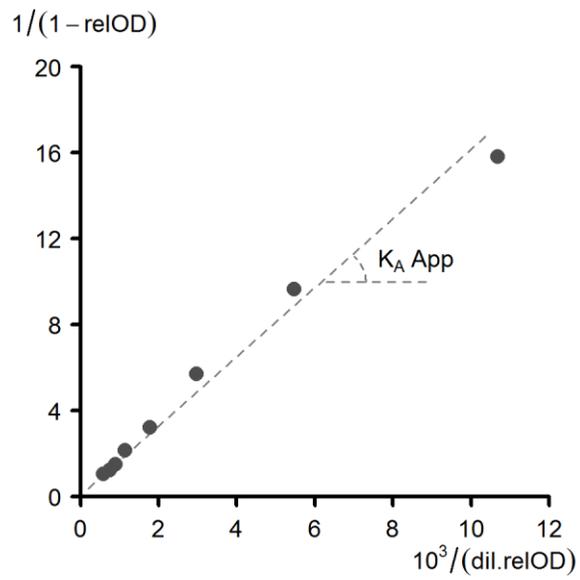
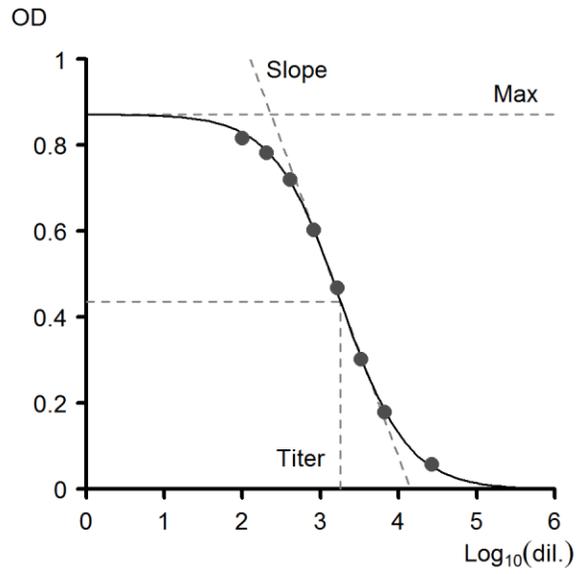
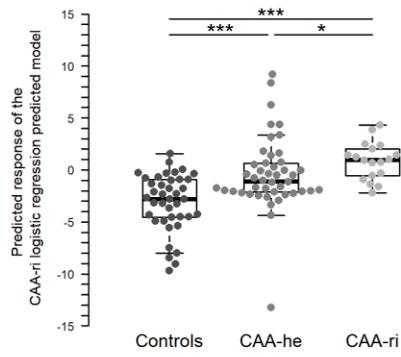
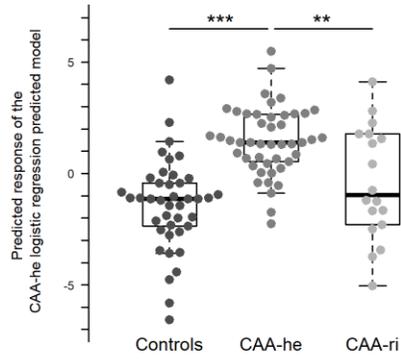
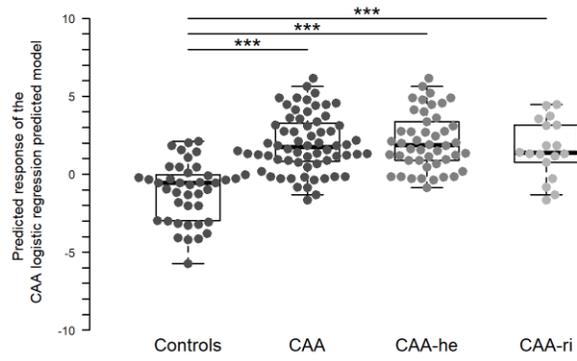


Figure 2





Anti-A β Antibodies and Cerebral Amyloid Angiopathy Complications

Yannick Chantran^{1,2}, Jean Capron^{1,3}, Sonia Alamowitch^{1,3} and Pierre Aucouturier^{1,2*}

¹ Sorbonne Université, Inserm, UMRS 938, Hôpital St-Antoine, AP-HP, Paris, France, ² Département d'Immunologie Biologique, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris, France, ³ Département de Neurologie, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris, France

Cerebral amyloid angiopathy (CAA) corresponds to the deposition of amyloid material in the cerebral vasculature, leading to structural modifications of blood vessel walls. The most frequent form of sporadic CAA involves fibrillar β -amyloid peptide (A β) deposits, mainly the 40 amino acid form (A β _{1–40}), which are commonly found in the elderly with or without Alzheimer's disease. Sporadic CAA usually remains clinically silent. However, in some cases, acute complications either hemorrhagic or inflammatory can occur. Similar complications occurred after active or passive immunization against A β in experimental animal models exhibiting CAA, and in subjects with Alzheimer's disease during clinical trials. The triggering of these adverse events by active immunization and monoclonal antibody administration in CAA-bearing individuals suggests that analogous mechanisms could be involved during spontaneous CAA complications, drawing particular attention to the role of anti-A β antibodies. However, antibodies that react with several monomeric and aggregated forms of A β spontaneously occur in virtually all human individuals, hence being part of the “natural antibody” repertoire. Natural antibodies are usually described as having low-affinity and high cross-reactivity toward microbial components and autoantigens. Although frequently of the IgM class, they also belong to IgG and IgA isotypes. They likely display homeostatic functions and protective roles in aging. Until recently, the peculiar properties of these natural antibodies have hindered proper analysis of the A β -reactive antibody repertoire and the study of their implication in CAA complications. Herein, we review and comment the evidences of an auto-immune nature of spontaneous CAA complications, and discuss implications for forthcoming research and clinical practice.

Keywords: cerebral amyloid angiopathy, autoimmunity, anti-A β antibodies, immunotherapy, natural antibodies

INTRODUCTION

Adaptive immunity in neurodegenerative conditions has recently become of major interest in neurodegenerative conditions, especially in Alzheimer's disease (AD), because of its ability to modulate cerebral inflammation, and also following observations that immunotherapeutic approaches might impair pathological events. However, the nature of immune effectors and their mechanisms remain quite obscure. In this article we will focus mainly on antibodies that bind the β -amyloid peptide (A β), which has long been considered a key therapeutic target. Evident difficulties are due to the presence of blood anti-A β antibodies in healthy and diseased individuals, implying that most quantitative studies provided little or no information on their pathological implication.

OPEN ACCESS

Edited by:

Serge Nataf,
Université Claude Bernard
Lyon 1, France

Reviewed by:

Ana Lloret,
University of Valencia, Spain
Clara Ballerini,
University of Florence, Italy

*Correspondence:

Pierre Aucouturier
pierre.aucouturier@inserm.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Multiple Sclerosis and
Neuroimmunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 26 April 2019

Accepted: 19 June 2019

Published: 04 July 2019

Citation:

Chantran Y, Capron J, Alamowitch S
and Aucouturier P (2019) Anti-A β
Antibodies and Cerebral Amyloid
Angiopathy Complications.
Front. Immunol. 10:1534.
doi: 10.3389/fimmu.2019.01534

Another key point is that effector functions of these antibodies frequently are suggested to result in complications of cerebral amyloid angiopathy (CAA).

SPONTANEOUSLY OCCURRING ANTI-A β ANTIBODIES IN HEALTH AND DISEASE

Natural Antibodies: Origin, Distinctive Properties and Functions

Natural antibodies were defined as occurring in all normal individuals in the absence of overt antigenic stimulation (1). In spite of many controversies, it is now clear that natural antibodies represent a distinct entity that arises from separate B-cell lineages. Most natural antibodies are produced by a distinct B-cell lineage termed B1 cells, but also in part by marginal zone B cells that belong to the conventional B2 lineage. B1 cells originate very early from precursors of the yolk sac and then from hematopoietic stem cells of the fetal liver, but they also differentiate from bone marrow precursors during the adult life (2).

Classical adaptive B-cell responses to T-dependent antigens feature germinal center reactions that include affinity maturation and isotype switching, resulting in high affinity specific antibodies of IgG, IgA and/or IgE classes. These mechanisms allow improvement of effector efficiency as a function of antigen exposure. At variance with classical antibodies, natural antibodies likely arise from processes that involve no or little B-T cell cooperation and affinity maturation, as suggested by frequent absence or paucity of somatic hypermutations and nucleotide N-additions in the antibody variable regions. Thus, they display quite specific phenotypic properties as compared with conventional antibodies raised by immunization, including low binding affinities and multi-reactivity toward homologous antigens. Interestingly however, they may belong to IgG or IgA, as well as IgM classes (1, 3, 4).

In relation with these peculiar properties, it is thought that natural antibodies display specific functions. They likely protect from infection at early stages of development. In addition to supposed protective roles in the newborn, the ongoing production of natural antibodies has been proposed to interfere with pathological events of adults, such as tumors, atherosclerosis, and neurodegenerative disorders in elderly (5).

Natural IgM antibodies have long been studied in both mice and humans. They display a variety of functions, including pathogen neutralization and killing, and clearance of apoptotic cells and debris that participate in preventing inflammation in several pathological contexts. They also participate in maturation of adaptive responses, especially through antigen recruitment in secondary lymphoid tissues. Other well-known examples of IgM natural antibodies are isohemagglutinins.

Natural IgG and IgA antibodies are also abundant in the blood and mucosal secretions, in spite of the supposed absence of T cell help. Like IgM natural antibodies, they seem to play protective roles, especially in partnership with lectins such as Mannose-Binding Lectin and ficolins, against microbial pathogens and by controlling inflammation (3).

The repertoire of natural antibodies is clearly skewed, as they mostly recognize conserved self-structures (6, 7). Thus, they seem to undergo a selection process (8), suggesting physiological roles (9) including clearance of noxious molecules and cell debris, regulation of immune responses, and shaping of a primary repertoire that allows appropriate induced humoral responses. Numerous observations suggest that natural antibodies are protective against certain pathological conditions of aging, such as atherosclerosis, cancer and neurodegenerative disorders, and that the age-associated decreased expression of these antibodies could be responsible for proneness to these diseases (5). Indeed, circulating anti-alpha-synuclein antibody levels were found to be low in patients with Parkinson's disease (10). However, in AD, anti-Tau natural antibodies expression appears higher than in aged subjects (11). As discussed in the next section, the case of anti-A β antibodies and their expression in AD as compared to aged subjects remains controversial.

Natural Anti-A β Antibodies in Healthy Subjects, AD Patients and Related Conditions

Natural antibodies that react with A β peptide have long been suggested by the finding of specific B-cells (12), and their invariable presence was confirmed by studies comparing AD patients and healthy subjects (see below). As also found for other natural autoantibodies, aging results in progressive decrease of circulating anti-A β levels (13). They belong to both IgM and IgG classes, and predominant IgG subclasses appear to be IgG1 and IgG3 in both healthy and diseased subjects (14). They display a large panel of specificities for both linear and conformational epitopes of the A β molecules, oligomers, and fibrillar aggregates, and most interestingly, *in vitro* studies suggested that some natural anti-A β antibodies could protect neurons from toxic A β oligomers (15).

Analyses performed on serum or plasma from AD patients yielded remarkably incoherent results, as some of them revealed lower anti-A β antibody levels as compared with healthy controls (16–19), while others found higher levels in Alzheimer's disease patients (20–22) or no significant difference (13, 14, 23). Analyses performed on cerebrospinal fluid (CSF) led to similar discrepancies, displaying either lower (13, 16) or higher (20, 22) levels of anti-A β antibody in AD patients as compared with healthy controls. A common observation of those studies was the striking heterogeneity of antibody titers in healthy as well as in diseased individuals.

A first explanation for inconsistent results may be the diversity of methods used for antibody analysis: coated reactive antigens were A β _{1–40} (16, 18, 19) or A β _{1–42} (13, 17, 21, 23) in either oligomeric (13, 14, 18), fibrillar (20) or undefined isoforms (16, 17, 19, 21), at extremely variable concentrations; serum or plasma samples were tested either directly (17–20) or after dissociation of immune complexes (13, 14, 21); revealed antibodies were either IgG only (19) or all immunoglobulin isotypes (23); finally, a variety of different quantitation formulas were used. The only methodological agreement between recent studies is the requirement of an initial immune complex dissociation step for

a reliable analysis of anti-A β antibodies (13, 14, 21), using a mild acidic buffer in order to avoid artifacts (24). Indeed, a large part of circulating anti-A β antibodies appears to be associated with a variety of undefined ligands, likely due to polyreactivity and the presence of anti-idiotypic antibodies (15). A possible additional bias is that IgM antibodies have been demonstrated to potentially block natural IgG reactivity (25).

In addition to methodological matters, the other explanations of differences in anti-A β titers found between healthy and AD people relied on quite eclectic hypotheses: favored pathology due to decreasing antibody levels in aging (16), sequestering of antibodies by amyloid deposits (16), partial tolerization of B-cell responses (19) or decreased T-cell help (17), onset of an anti-A β autoimmune reaction (21, 22), or failure of immune complex clearance (22).

Natural Antibodies in Therapeutic Trials

That age-related decline of natural autoantibodies favors the onset of pathological conditions related to antigenic targets is supported by strong arguments (3). The hypothesis that natural anti-A β antibodies bear a strong protective potential (13, 26) has been the rationale for therapeutic trials in AD using human intravenous immunoglobulins (IVIg). Indeed, IVIg include natural antibodies to A β (27, 28) as well as to protein Tau (29). IVIg infusions appeared to increase the levels of circulating anti-A β (30), but while preliminary results on mild and moderate stages of AD had proven encouraging, more powerful trials failed to show a significant effect on cognitive decline (31–33). The reason of the lack of clinical efficacy of the natural anti-A β antibodies contained in IVIg is a matter of debate. It has been shown that IgG levels were elevated in the CSF of treated subjects. Thus, anti-A β antibodies penetrate into the CNS after infusion. Like other A β -modifying therapies, IVIg might be more effective in early stages of the disease. In addition, in these trials, IVIg were administered at low dose, similar to antibody replacement therapies. Immunomodulatory effects of IVIg are generally obtained in other neurological disease up to 2 g/kg (33).

ADAPTIVE IMMUNITY AGAINST A β : THE AN1792 TRIAL

Histological response and cognitive improvement after A β vaccination in transgenic mouse models of AD have been received enthusiastically in the late 1990's (34, 35). Elan/Wyeth-Ayerst Pharmaceuticals set up the AN1792 trial in human (NCT00021723), the phase I study of safety and immunogenicity began in 1999, Dec., vaccinating mild-to-moderate AD subjects with pre-aggregated A β _{1–42} with adjuvant QS-21, and later on with QS-21 plus polysorbate-80 0.4%. After no major safety issue, phase IIa (Study 201) began in 2001, Oct., and was halted in 2002, Jan., when some patients presented with meningoencephalitis (36). Other adverse events other than meningoencephalitis occurred in the AN1792 study: two cases of encephalopathy including one without meningoencephalitis, two cases of convulsion, one thrombosis of the retina, one hemiplegia, and, interestingly, one case of intracerebral hemorrhage (ICH) related

to CAA. However, confronted with the striking manifestations of brain inflammation, these post-immunization hemorrhagic or ischemic events have been overlooked (37).

Overall, 18 out of 300 (6%) subjects treated with AN1792 in phase II developed meningoencephalitis, along with 1 subject from the extended phase I study (37–40). Clinically, these patients presented with subacute aseptic meningoencephalitis with confusion, lethargy, and headaches. Other symptoms were nausea, seizures, drowsiness, ataxia, aphasia, hemiparesia, with inconstant fever. As in aseptic meningoencephalitis, CSF analysis showed mild to moderate hyperlymphocytosis (3–130 cells/mm³), often with mild hyperproteinorachia (39). Since none of the placebo-treated group developed such serious adverse events, it was obvious that these cases of meningoencephalitis related to the active immunization against A β .

Only 2 patients with post-A β immunization meningoencephalitis were investigated at the histological level. The first patient (40) presented with fever, drowsiness, and unstable gait. At neuroimaging, MRI found white matter hyperintensities (WMH) and a more focal lesion, possibly associated with edema and inflammatory process. Post-mortem tissue sampling showed cortical areas without senile plaques, but still with CAA, and lymphocytic infiltration of leptomeningeal A β -laden blood vessels, or in perivascular space around cortical vessels, with sparse cellular infiltration of the parenchyma. Cellular infiltrates were mainly composed of CD4+ CD45RO+ T-cells, with few CD8+ T-cells, and without CD79a+ CD20+ B-cells. The second patient (41) presented similar plaque-devoid cortical areas and CD8+ T-cell-enriched perivascular lymphocytic infiltrates. In addition, the authors describe multiple macroscopic cortical hemorrhages that were not detected radiologically despite 3 MRI studies, and microscopic vasculopathy, namely lipohyalinosis. Interestingly, a third case (42) reported pathological findings in an AN1792-treated patient without clinical meningoencephalitis, which also presented perivascular cellular infiltrates in the leptomeningeal spaces, though to a lower extent as compared with the meningoencephalitis cases, and composed mainly of CD20+ B-cells and few CD3+ T-cells.

The immune mechanism, underlying these cases of meningoencephalitis has been debated, though it seemed obvious that adaptive immunity against A β was at stake.

In the AN1792 trial, treated-patients were considered either antibody responder or non-responder with respect to the circulating anti-A β antibody titer supposed to confer clinical benefit (38). While 20% treated patients were considered antibody responders, most patients (at least 90%) seemed to have produced detectable levels of circulating IgM and/or IgG anti-A β after immunization (37). Among treated-patients with meningoencephalitis, 13 out of 18 belonged to the responder group, and 5 out of 18 to the non-responder group. Among these 5 non-responders, all of them had a measurable anti-A β IgM response, and 4 a measurable anti-A β IgG response in the blood (38).

If almost all treated patients developed an anti-A β antibody response, one could question whether the antibody response was qualitatively different in patients with meningoencephalitis.

However, it was shown by epitope-mapping that all immunized patients recognized a linear B-cell epitope in the N-terminus of the A β peptide (A β _{1–8}), independently of the occurrence of meningoencephalitis (43), and that their serum antibodies bound to parenchymal as well as vascular A β aggregates, and not to cellular APP (44).

Out of 57 studied cases, 9 (15%) had measurable CSF IgG or IgM anti-A β antibody levels and 4 presented with meningoencephalitis (3 responders and 1 non-responder) (38). However, CSF antibodies from both patients with or without meningoencephalitis bound to senile plaques and vascular A β aggregates (44).

T-cell responses during the AN1792 trial have been poorly studied. One paper reports on the higher occurrence of IFN γ producing cells after A β _{1–42} stimulation in phase IIa treated-patients as compared to phase I treated-patients, which was not significantly different from the placebo-treated group (45).

Confronted to the absence of noticeable differences in the anti-A β antibody responses in AN1792-treated patients with and without meningoencephalitis, and considering the presence of lymphocytic infiltrates during such cases, it was assumed that the adaptive anti-A β cellular T-cell response was detrimental when oriented toward cellular immunity through Th1 CD4+ and cytotoxic CD8+ T-cells, while anti-A β B-cell response would remain innocuous and potentially beneficial for AD pathology. Thus, subsequent anti-A β immunotherapy trials were based on anti-A β antibodies either by selective “humoral” vaccines or, most frequently, by passive immunization using repeated humanized monoclonal antibody infusions, the complications of which have been linked to CAA.

CEREBRAL AMYLOID ANGIOPATHY AND RELATED CLINICAL MANIFESTATIONS

Definition, Epidemiology, and Neuropathological Features of Cerebral Amyloid Angiopathy

Deposited amyloid material in the blood vessel walls of the cerebral vasculature is made up of insoluble fibrils resulting from the polymerization of peptidic subunits with a “crossed β -sheet”-rich conformation. Mutations of several proteins have been described in familial forms of CAA, such as A β precursor protein (APP) and other proteins (46). In addition to mutations, duplications of the wild-type APP gene are also associated with CAA, as found in Down syndrome and in autosomal dominant early onset Alzheimer’s disease (47). Sporadic CAA, which is an A β -related disease without any mutation or duplication of the APP gene, represents the most common form of CAA and will be the main focus of this review.

The main risk factors of sporadic CAA are advancing age and the co-occurrence of AD (48, 49). Both frequency and severity of CAA increase with age, affecting 35, 50, and 75% of individuals in the 7th, 8th and 9th decades of life, respectively, regardless of CAA severity (49). Population-based studies show that in age-matched groups, demented individuals have higher risk to present CAA than non-demented individuals, regardless of CAA

severity or considering solely severe CAA (50). Other genetic risk factors have been described, some of them overlapping with sporadic AD risk factors, making it difficult to distinguish which ones are independently related to sporadic CAA. The main genetic risk factor is ApoE polymorphism: the ϵ 4 allele is associated with the occurrence of AD and CAA, while the ϵ 2 allele appears protective against AD but associated with the risk of CAA-related intra-cerebral hemorrhage (ICH) (51). To explain these controversial findings, Greenberg et al. hypothesized that the APOE2 allele might be related to CAA vasculopathy but not vascular deposits, which they evidenced by showing that the APOE2 allele is more frequent in patients with grade 3-4 CAA (cracking of the vessel wall and paravascular leaking of blood) but that it is not over-represented in grade 2 CAA (complete amyloid replacement of vessels) (52). Hence, APOE4 might promote a higher risk of CAA-related hemorrhage by enhancing amyloid deposition, while APOE2 might cause amyloid-laden vessels to undergo vasculopathic changes that lead to their rupture.

It is indeed important to stress that, from a pathological point of view, CAA does not stand for the mere presence of fibrillary A β deposition in blood vessel walls. More severe vascular deposits are associated with vasculopathies, such as fibrinoid necrosis, thrombosis, microhemorrhages, or “double-barreling,” which is the concentric splitting of the vessel walls (53). Associated with smooth muscles cell degeneration and amyloid replacement of the whole vessel wall structure, these pathological features provide the histologic ground for clinical and paraclinical features of the manifestations of CAA. Cerebrovascular amyloid deposition in sporadic CAA involves the leptomeningeal and cortical medium- and small-sized arteries/arterioles, with or without involvement of the capillaries, and usually sparing the veins. The topography of CAA is not homogenous through the brain. The most affected areas being the occipital, parietal, frontal, then temporal lobes. In most advanced cases, other structures than the neocortex can be affected. It is now thought that some CAA features, such as capillary involvement, dyschoric angiopathy hence small vessel disease occurring by capillary occlusion, are associated with AD pathology, while leptomeningeal and arteriolar involvement is mainly independent from parenchymal amyloidosis of AD pathology (49). This could lead to a reappraisal of ApoE polymorphism in CAA: the ϵ 4 allele would be associated with AD capillary CAA, while the ϵ 2 allele would be associated with arterial CAA and its specific manifestations, such as lobar ICH (51).

CAA Manifestations

Cerebrovascular impairment in sporadic CAA may result in 3 subsets of manifestations: ischemia, bleeding, and inflammation (54).

Ischemic manifestations of CAA are cortical infarcts and WMH appearing on the MRI. They predominate in posterior regions of the brain where CAA accumulates, and relate to hypoperfusion or vessel occlusion (55–57).

Hemorrhagic manifestations of CAA are symptomatic ICH that differentiates from hypertensive ICH by strictly lobar localization, corresponding to the leptomeningeal and cortical

topography of CAA (58). Besides symptomatic ICH, cortical microbleeds (59) and superficial cortical siderosis are other hemorrhagic features of CAA that can be displayed on MRI (60). Both ischemic and hemorrhagic features of CAA contribute to chronic vascular dementia.

Inflammatory manifestations of CAA involve a protean clinical presentation of corticosensitive encephalopathy, e.g., with subacute cognitive decline, seizures, headaches, and asymmetric T2 WMH. Histopathologically, different inflammatory subtypes have been described associated with CAA: (i) A β -related angiitis, which corresponds to destructive transmural infiltrates with granulomatous features; (ii) CAA-related inflammation (CAA-ri), which corresponds to non-destructive perivascular lymphocytic infiltrates. However, besides histopathological phenotypes, clinical features, imaging and outcome largely overlap, making these entities likely part of the same spectrum (61, 62). These pathologies represent up to 30% of primary CNS vasculitis, making it part of single-organ vasculitis in the Chappell-Hill revised nomenclature (63, 64), and introducing the hypothesis of an auto-immune mechanism of these manifestations.

With the noticeable exception of extremely rare CAA-ri cases, the potential auto-immune mechanisms at stake in CAA manifestations have been neglected. Clinical and imaging features of CAA-related hemorrhages or ischemia have been conceived as the consequence of mechanical constrains, blood wall weakening, mural degeneration and or vessel occlusion related to vascular A β deposition.

However, it has been convincingly shown that CAA was increased in patients immunized with AN1792. In a post-mortem study of 9 treated-patients, Boche et al. found a worsening of CAA in AN1792 patients, with cerebrovascular deposits containing not only A β ₁₋₄₀, which is classically found in CAA, but also higher cerebrovascular levels of A β ₁₋₄₂, the main component of senile plaques. These patients also had a higher rate of vasculopathies and microhemorrhages (65). In our opinion, and as suggested by some authors (66, 67), the possibility cannot be discarded that detrimental adaptive immunity raised against A β during the AN1792, whether humoral or cellular, was at least partly related to cerebrovascular deposits, given: (i) the predominant leptomeningeal and perivascular location of cellular infiltrates in meningoencephalitis cases during the AN1792 trial, (ii) the occurrence of some post-immunization hemorrhagic or ischemic severe adverse events, including one case of CAA-related ICH, and (iii) the multiple cortical hemorrhages and associated lipohyalinosis described by Ferrer et al. in one meningoencephalitis case (41).

Whether meningoencephalitis and other adverse events were related to adaptive immune reaction against parenchymal or against vascular A β deposits, it was assumed that T-cell anti-A β response was detrimental, while humoral adaptive anti-A β response was thought to be innocuous and potentially beneficial. However, adverse events also occurred in the course of passive immunotherapies with anti-A β antibodies, which shed a new light on the pathophysiology of induced and spontaneously-occurring CAA manifestations.

MONOCLONAL ANTI-A β ANTIBODIES AND THEIR RELATIONSHIP TO CAA MANIFESTATIONS

The Illustrative Case of Bapineuzumab

Bapineuzumab is a monoclonal humanized IgG1 antibody corresponding to the murine clone 3D6, targeting the N-terminus of the A β peptide (A β ₁₋₅). However, unlike circulating antibodies arising in AN1792 patients, Bapineuzumab does not recognize a linear epitope but a conformational one (68). While patients treated by Bapineuzumab showed a decrease of the cerebral amyloid load by 11C-PiB TEP-scan (69, 70), they did not show clinical improvement (71).

During the phase I trial, 3 out of 10 patients treated with a single infusion of the highest dose of Bapineuzumab (5 mg/kg) developed transient signal abnormalities on T2*/fluid attenuation inversion recovery (FLAIR) sequences, interpreted as a sign of vasogenic cerebral edema (72). Additional cases were reported during phase II (73) and phase III (74). First referred as vasogenic edema, these amyloid-related imaging abnormalities (ARIA) were included in a spectrum of so-called ARIA-E (E standing for effusion), that encompasses increased MR signal intensity on FLAIR or other T2-weighted sequences in the parenchyma gray or white matter and/or leptomeninges, sometimes in the cerebellum or brainstem. Interestingly, this radiological presentation appears similar to MRI presentation of spontaneous inflammatory manifestations of CAA (66, 74). ARIA-E was found in 17% (36/210) Bapineuzumab-treated subjects, appearing after the first or second infusion, in a dose-dependent manner, with an increased risk in ApoE ϵ 4 carriers (7% among non-carriers, 18% among heterozygous, 36% among homozygous) (71). ARIA-E was associated with clinical manifestations during Bapineuzumab trials in about 20% subjects. If acute clinical worsening prompted off-protocol MRI in some cases, most patients were detected by per-protocol MRI. However, some were retrospectively found to present clinical signs, similar to inflammatory manifestations of CAA. Another type of ARIA, namely ARIA-H (H standing for hemorrhages) appeared during the Bapineuzumab studies in 12% patients, and featured either microbleeds or cortical superficial siderosis similar to spontaneous hemorrhagic manifestations of CAA. ARIA-E and ARIA-H are not independent phenomena. First, the presence of baseline microbleeds increased the risk of ARIA-E. Second, *de novo* ARIA-H were 10 times more prevalent in patients with ARIA-E (67). They appeared during the same timeline, and often in the same cortical areas (66).

Although no neuropathological description of ARIA-E have been reported, the pathophysiological relationship between ARIA-E and spontaneous CAA-related inflammation on the one hand, and ARIA-H, and spontaneous CAA-related hemorrhages on the other hand, was suggested. Hence, it became obvious that antibodies targeting A β are sufficient to trigger CAA-like manifestations, and that T-cell anti-A β responses arising from active immunization are not required. Thus, some authors suggested that despite differences in severity, meningoencephalitis and ARIA-E could be part of

a same pathophysiological spectrum linked to A β vascular deposition (66, 67).

ARIA in Other Anti-A β Passive Immunotherapies

Aducanumab is a human IgG1 selected from a B-cell library obtained from healthy aged donors who were cognitively normal. It was selected for its reactivity against soluble A β oligomers and insoluble A β fibrils. Similarly to Bapineuzumab, 22% (27/125) Aducanumab-treated subjects developed ARIA-E, 33% being symptomatic, usually mild. Once again, this phenomenon appeared to be dose-dependent and ApoE ϵ 4-related. Among ARIA-E subjects, 15 (56%) also had ARIA-H. In particular, while none of the placebo-treated subjects had cortical superficial siderosis, 9 Aducanumab-treated patients presented with such manifestations (75).

Gantenerumab is a human IgG1 selected by phage display from a human antibody library and optimized *in vitro* to enhance its affinity to fibrillar A β , and binds to the N-terminal A β _{1–10} but also the middle portion A β _{19–26} (76). Then again, 10% (53/531) treated patients developed ARIA-E, and 20% (104/531) developed ARIA-H in a dose-dependent, ApoE ϵ 4-related manner. The clinical course was similar to those of Bapineuzumab and Aducanumab in terms of incidence, symptoms, kinetics and response to withdrawal (77).

Solanezumab is a humanized IgG1 that binds to the mid-domain of soluble A β . ARIA-E occurred in 18 Solanezumab-treated subjects, however it was always asymptomatic, with a low incidence (1.1%), and without statistical difference from placebo-treated subjects (0.5%). Under Solanezumab treatment, ARIA-H was more frequent than ARIA-E (9.1%), but once again without statistically significant difference from placebo-treated subjects (7.3%). Even though Solanezumab did not seem to induce a higher frequency of ARIA, the link between ARIA-E and ARIA-H was still obvious: 71% of patients with ARIA-E displayed increases in ARIA-H at the time of ARIA-E, and 48% had co-localized ARIA-H and ARIA-E (78).

Crenezumab is a humanized IgG4 that was designed in order to avoid Fc γ Rc-binding, hence anti-A β antibody-mediated cellular reaction in order to lower the risk of ARIA. Crenezumab has a preferential affinity for soluble oligomers (79). Crenezumab-treated patients in the ABBY study did not show a higher incidence of ARIA-E, microbleeds and cortical superficial siderosis. Of note, one asymptomatic macrohemorrhage was reported in a treated-patient (80). In the independent BLAZE study, however, 14.5% treated-patients presented new ARIA-H, as compared to 3.4% placebo-treated patients (81).

Ponezumab is a humanized IgG2 targeting the C-terminus of A β _{30–40} that binds to soluble A β . The incidence of microhemorrhages was 16.4% in the Ponezumab group and 21.4% in the placebo group. However, various MRI features corresponding to what can be observed during CAA were reported solely in the Ponezumab-treated group, either inflammatory-like (1 case with ARIA-E associated with superficial siderosis, 1 case with cerebral/meningeal enhancement), hemorrhagic-like (1 case of subdural hematoma),

or ischemic-like (4 cases of cortical infarcts, 2 subcortical gray-matter infarcts) (82). In 24 CAA patients treated with Ponezumab, 2 hemorrhagic adverse events (1 case of cerebral hemorrhage, 1 case of subdural hematoma), and 1 inflammatory-like event (1 case of asymptomatic ARIA-E) occurred but were not considered treatment-related by the investigators (83).

Other antibodies have been used in A β -related diseases. AAB-003 was developed by introducing a 3-aminoacid mutation in the Fc region of Bapineuzumab, resulting in reduced Fc γ Rc binding and reduced binding to C1q. ARIA-H and ARIA-E were however reported in the treated group (84). BAN2401 is a humanized IgG1 monoclonal antibody that selectively binds to A β soluble protofibrils and that did not appear to be related with ARIA during phase I (85).

CONCLUSION: IMPLICATIONS FOR THE MANAGEMENT OF CAA COMPLICATIONS

Overall, treatments of A β -related diseases with monoclonal anti-A β antibodies can trigger CAA-like manifestations, either inflammatory or hemorrhagic. In most cases, these radiological signs are not associated with clinical manifestations. Since they were followed by treatment discontinuation in most trials, the question of whether the asymptomatic radiological signs would have remained infra-clinical or represent a pre-clinical state remains unanswered. The mechanism of such CAA-like manifestations is also unknown. Anti-A β antibodies could simply worsen CAA (65) by displacing parenchymal A β to the cerebral vasculature, hence enhancing the risk of CAA manifestations. A more direct pathogenic role for anti-A β antibodies would involve the mediation of inflammation and/or the triggering of hemorrhagic events after antibody binding to cerebrovascular deposits, by impairment of the structural integrity of the blood vessel, complement-mediated or Fc γ Rc-mediated inflammation. As a general rule, three concomitant factors seem to modulate the risk of ARIA. The dose-dependent effect of such anti-A β monoclonal antibodies is the first and better established one. The second one is anti-A β antibody isotype: IgG1 anti-A β monoclonal antibodies such as Bapineuzumab, Aducanumab, and Gantenerumab, triggered ARIA-E and ARIA-H, while IgG2 (Ponezumab) and IgG4 (Crenezumab) appeared less prone to trigger CAA-like manifestations. The third one is the selectivity for soluble or deposited forms of A β : Ponezumab and Crenezumab were more selective for targeting soluble forms of A β , as were Solanezumab and BAN2401, hence maybe less prone than other antibodies to bind to cerebrovascular deposits in body fluids.

In any case, the pathogenicity of anti-A β antibodies likely depends on their characteristics: isotype (Ig class and subclass), specificity toward soluble or aggregated forms of A β _{1–42} or A β _{1–40}, differential affinity for such forms, and concentration in body fluids.

By analogy with passive immunotherapy-induced ARIA, these considerations lead to the hypothesis that in sporadic CAA, the occurrence of some species of anti-A β antibodies can trigger spontaneous inflammatory or hemorrhagic CAA manifestations. However, serum anti-A β antibodies have been scarcely studied in

CAA (86). Most investigations focused on (i) CSF antibodies (ii) during CAA-related inflammation. Piazza et al. showed elevated CSF levels of anti-A β IgG during the clinical and radiological active phase of spontaneous CAA-ri (87). The same group argued in favor of an intrathecal synthesis of CSF anti-A β antibodies, based on a single case (88). However, experimental evidence in transgenic mouse model that exhibit AD-like pathology with a strong CAA component suggested that blood anti-A β antibodies are by themselves prone to aggravate CAA and related manifestations, including hemorrhages (89, 90).

Anti-A β antibodies circulating in the serum are part of the natural antibody repertoire. Despite methodological difficulties hindering their study, adverse events that occurred during anti-A β immunotherapies in AD suggest that natural anti-A β antibodies are likely to play a role in the triggering of CAA-related inflammation, but also in other CAA manifestations such as hemorrhagic features. Whether such pathogenic anti-A β species would be part of an individual pre-immune natural repertoire, or would be the result of adaptive processes driven by cerebrovascular deposits during the course of CAA is unknown. The pathogenic features of these anti-A β antibodies that would correlate with CAA clinical phenotypes remain to be determined by a fine-scale analysis of the circulating anti-A β antibody repertoire, focusing on serum concentration,

isotypes and IgG subclasses, specificity, and affinity toward soluble or aggregated forms of A β . Such analysis would deliver pathophysiological insights about CAA manifestations, but would hopefully provide new biomarkers for the prediction of spontaneous and immunotherapy-induced complications in sporadic CAA and AD.

To date, cognition and education remain the best predictors of dementia in the elderly, while ApoE polymorphisms consistently predict A β -related pathology (91). The vascular component in AD and other dementia has raised more and more interest over the last years. In this view, the study of spontaneously produced pathogenic anti-A β antibodies seems promising. Its inclusion in prediction models of dementia might be the keystone that would link cerebrovascular A β deposition and macro- or microvascular impairment.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

YC and PA wrote the manuscript. All authors revised the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the SATT Lutec for its support.

REFERENCES

- Coutinho A, Kazatchkine MD, Avrameas S. Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol.* (1995) 7:812-8. doi: 10.1016/0952-7915(95)80053-0
- Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. B-1 B cell development in the fetus and adult. *Immunity.* (2012) 36:13-21. doi: 10.1016/j.immuni.2011.11.017
- Panda S, Ding JL. Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity. *J Immunol.* (2015) 194:13-20. doi: 10.4049/jimmunol.1400844
- Baccala R, Quang TV, Gilbert M, Ternynck T, Avrameas S. Two murine natural polyreactive autoantibodies are encoded by nonmutated germ-line genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1989) 86:4624-8. doi: 10.1073/pnas.86.12.4624
- Rothstein TL. Natural antibodies as rheostats for susceptibility to chronic diseases in the aged. *Front Immunol.* (2016) 7:127. doi: 10.3389/fimmu.2016.00127
- Mouthon L, Nobrega A, Nicolas N, Kaveri SV, Barreau C, Coutinho A, et al. Invariance and restriction toward a limited set of self-antigens characterize neonatal IgM antibody repertoires and prevail in autoreactive repertoires of healthy adults. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1995) 92:3839-43. doi: 10.1073/pnas.92.9.3839
- Mouthon L, Haury M, Lacroix-Desmazes S, Barreau C, Coutinho A, Kazatchkine MD. Analysis of the normal human IgG antibody repertoire. Evidence that IgG autoantibodies of healthy adults recognize a limited and conserved set of protein antigens in homologous tissues. *J Immunol.* (1995) 154:5769-78.
- Hardy RR, Hayakawa K. Selection of natural autoreactive B cells. *Clin Exp Rheumatol.* (2015) 33(4 suppl. 92):S80-6.
- Nagele EP, Han M, Acharya NK, DeMarshall C, Kosciuk MC, Nagele RG. Natural IgG autoantibodies are abundant and ubiquitous in human sera, and their number is influenced by age, gender, and disease. *PLoS ONE.* (2013) 8:e60726. doi: 10.1371/journal.pone.0060726
- Besong-Agbo D, Wolf E, Jessen E, Oechsner M, Hametner E, Poewe W, et al. Naturally occurring α -synuclein autoantibody levels are lower in patients with Parkinson disease. *Neurology.* (2013) 80:169-75. doi: 10.1212/WNL.0b013e31827b90d1
- Rosenmann H, Meiner Z, Geylis V, Abramsky O, Steinitz M. Detection of circulating antibodies against tau protein in its unphosphorylated and in its neurofibrillary tangles-related phosphorylated state in Alzheimer's disease and healthy subjects. *Neurosci Lett.* (2006) 410:90-3. doi: 10.1016/j.neulet.2006.01.072
- Gaskin F, Finley J, Fang Q, Xu S, Fu SM. Human antibodies reactive with beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *J Exp Med.* (1993) 177:1181-6. doi: 10.1084/jem.177.4.1181
- Britschgi M, Olin CE, Johns HT, Takeda-Uchimura Y, LeMieux MC, Rufibach K, et al. Neuroprotective natural antibodies to assemblies of amyloidogenic peptides decrease with normal aging and advancing Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2009) 106:12145-50. doi: 10.1073/pnas.0904866106
- Dorothee G, Bottlaender M, Moukari E, de Souza LC, Maroy R, Corlier F, et al. Distinct patterns of anti-amyloid- β antibodies in typical and atypical Alzheimer disease. *Arch Neurol.* (2012) 69:1181-5. doi: 10.1001/archneurol.2012.604
- Szabo P, Relkin N, Weksler ME. Natural human antibodies to amyloid beta peptide. *Autoimmun Rev.* (2008) 7:415-20. doi: 10.1016/j.autrev.2008.03.007
- Du Y, Dodel R, Hampel H, Buerger K, Lin S, Eastwood B, et al. Reduced levels of amyloid beta-peptide antibody in Alzheimer disease. *Neurology.* (2001) 57:801-5. doi: 10.1212/WNL.57.5.801
- Weksler ME, Relkin N, Turkenich R, LaRusse S, Zhou L, Szabo P. Patients with Alzheimer disease have lower levels of serum anti-amyloid peptide antibodies than healthy elderly individuals. *Exp Gerontol.* (2002) 37:943-8. doi: 10.1016/S0531-5565(02)00029-3
- Moir RD, Tseitlin KA, Soscia S, Hyman BT, Irizarry MC, Tanzi RE. Autoantibodies to redox-modified oligomeric A β are attenuated in the plasma of Alzheimer's disease patients. *J Biol Chem.* (2005) 280:17458-63. doi: 10.1074/jbc.M414176200
- Jianping L, Zhibing Y, Wei Q, Zhikai C, Jie X, Jinbiao L. Low avidity and level of serum anti-A β antibodies in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* (2006) 20:127-32. doi: 10.1097/00002093-200607000-00001
- Nath A, Hall E, Tuzova M, Dobbs M, Jons M, Anderson C, et al. Autoantibodies to amyloid β -peptide (A β) are increased in Alzheimer's disease patients and A β antibodies can enhance A β neurotoxicity: implications for disease pathogenesis and vaccine development. *Neuromolecular Med.* (2003) 3:29-39 doi: 10.1385/NMM:3:1:29

21. Storace D, Cammarata S, Borghi R, Sanguineti R, Giliberto L, Piccini A, et al. Elevation of {beta} amyloid 1-42 autoantibodies in the blood of amnesic patients with mild cognitive impairment. *Arch Neurol.* (2010) 67:867-72. doi: 10.1001/archneurol.2010.137
22. Maftei M, Thurm F, Schnack C, Tumani H, Otto M, Elbert T, et al. Increased levels of antigen-bound β -amyloid autoantibodies in serum and cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *PLoS ONE.* (2013) 8:e68996. doi: 10.1371/journal.pone.0068996
23. Hyman BT, Smith C, Buldyrev I, Whelan C, Brown H, Tang MX, et al. Autoantibodies to amyloid-beta and Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* (2001) 49:808-10. doi: 10.1002/ana.1061
24. Li Q, Gordon M, Cao C, Ugen KE, Morgan D. Improvement of a low pH antigen-antibody dissociation procedure for ELISA measurement of circulating anti-Abeta antibodies. *BMC Neurosci.* (2007) 8:22. doi: 10.1186/1471-2202-8-22
25. Adib M, Ragimbeau J, Avrameas S, Ternynck T. IgG autoantibody activity in normal mouse serum is controlled by IgM. *J Immunol.* (1990) 145:3807-13.
26. Kellner A, Matschke J, Bernreuther C, Moch H, Ferrer I, Glatzel M. Autoantibodies against beta-amyloid are common in Alzheimer's disease and help control plaque burden. *Ann Neurol.* (2009) 65:24-31. doi: 10.1002/ana.21475
27. Dodel R, Hampel H, Depboylu C, Lin S, Gao F, Schock S, et al. Human antibodies against amyloid beta peptide: a potential treatment for Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* (2002) 52:253-6. doi: 10.1002/ana.10253
28. O'Nuallain B, Hrnčić R, Wall JS, Weiss DT, Solomon A. Diagnostic and therapeutic potential of amyloid-reactive IgG antibodies contained in human sera. *J Immunol.* (2006) 176:7071-8. doi: 10.4049/jimmunol.176.11.7071
29. Hromadkova L, Kolarova M, Jankovicova B, Bartos A, Ricny J, Bilkova Z, et al. Identification and characterization of natural antibodies against tau protein in an intravenous immunoglobulin product. *J Neuroimmunol.* (2015) 289:121-9. doi: 10.1016/j.jneuroim.2015.10.017
30. Relkin NR, Szabo P, Adamiak B, Burgut T, Monthe C, Lent RW, et al. 18-Month study of intravenous immunoglobulin for treatment of mild Alzheimer disease. *Neurobiol Aging.* (2009) 30:1728-36. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.12.021
31. Dodel R, Rominger A, Bartenstein P, Barkhof F, Blennow K, Förster S, et al. Intravenous immunoglobulin for treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-finding trial. *Lancet Neurol.* (2013) 12:233-43. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70014-0
32. Kile S, Au W, Parise C, Rose K, Donnel T, Hankins A, et al. IVIG treatment of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: a randomised double-blinded exploratory study of the effect on brain atrophy, cognition and conversion to dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* (2017) 88:106-112. doi: 10.1136/jnnp-2015-311486
33. Relkin NR, Thomas RG, Rissman RA, Brewer JB, Raffi MS, van Dyck CH, et al. A phase 3 trial of IV immunoglobulin for Alzheimer disease. *Neurology.* (2017) 88:1768-75. doi: 10.1212/WNL.0000000000003904
34. Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, et al. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature.* (1999) 400:173-7. doi: 10.1038/22124
35. Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, et al. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature.* (2000) 408:982-5. doi: 10.1038/35050116
36. Check E. Nerve inflammation halts trial for Alzheimer's drug. *Nature.* (2002) 415:462. doi: 10.1038/415462a
37. Bayer AJ, Bullock R, Jones RW, Wilkinson D, Paterson KR, Jenkins L, et al. Evaluation of the safety and immunogenicity of synthetic A β 42 (AN1792) in patients with AD. *Neurology.* (2005) 64:94-101. doi: 10.1212/01.WNL.0000148604.77591.67
38. Gilman S, Koller M, Black RS, Jenkins L, Griffith SG, Fox NC, et al. Clinical effects of A β immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology.* (2005) 64:1553-62. doi: 10.1212/01.WNL.0000159740.16984.3C
39. Orgogozo JM, Gilman S, Dartigues JF, Laurent B, Puel M, Kirby LC, et al. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after A β 42 immunization. *Neurology.* (2003) 61:46-54. doi: 10.1212/01.WNL.0000073623.84147.A8
40. Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med.* (2003) 9:448-52. doi: 10.1038/nm840
41. Ferrer I, Boada Rovira M, Sánchez Guerra ML, Rey MJ, Costa-Jussà F. Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* (2004) 14:11-20. doi: 10.1111/j.1750-3639.2004.tb00493.x
42. Masliah E, Hansen L, Adame A, Crews L, Bard F, Lee C, et al. A beta vaccination effects on plaque pathology in the absence of encephalitis in Alzheimer disease. *Neurology.* (2005) 64:129-31. doi: 10.1212/01.WNL.0000148590.39911.DF
43. Lee M, Bard F, Johnson-Wood K, Lee C, Hu K, Griffith SG, et al. A β 42 immunization in Alzheimer's disease generates A β N-terminal antibodies. *Ann Neurol.* (2005) 58:430-5. doi: 10.1002/ana.20592
44. Hock C, Konietzko U, Papassotiropoulos A, Wollmer A, Streffer J, von Rotz RC, et al. Generation of antibodies specific for beta-amyloid by vaccination of patients with Alzheimer disease. *Nat Med.* (2002) 8:1270-5. doi: 10.1038/nm783
45. Pride M, Seubert P, Grundman M, Hagen M, Eldridge J, Black RS. Progress in the active immunotherapeutic approach to Alzheimer's disease: clinical investigations into AN1792-associated meningoencephalitis. *Neurodegener Dis.* (2008) 5:194-6. doi: 10.1159/000113700
46. Revesz T, Holton JL, Lashley T, Plant G, Frangione B, Rostagno A, et al. Genetics and molecular pathogenesis of sporadic and hereditary cerebral amyloid angiopathies. *Acta Neuropathol.* (2009) 118:115-30. doi: 10.1007/s00401-009-0501-8
47. Cabrejo L, Guyant-Maréchal L, Laquerrière A, Vercelletto M, De la Fourrière F, Thomas-Antérion C, et al. Phenotype associated with APP duplication in five families. *Brain.* (2006) 129:2966-76. doi: 10.1093/brain/awl237
48. Vinters HV, Gilbert JJ. Cerebral amyloid angiopathy: incidence and complications in the aging brain. II. The distribution of amyloid vascular changes. *Stroke.* (1983) 14:924-8. doi: 10.1161/01.STR.14.6.924
49. Thal DR, Griffin WS, de Vos RA, Ghebremedhin E. Cerebral amyloid angiopathy and its relationship to Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* (2008) 115:599-609. doi: 10.1007/s00401-008-0366-2
50. Keage HA, Carare RO, Friedland RP, Ince PG, Love S, Nicoll JA, et al. Population studies of sporadic cerebral amyloid angiopathy and dementia: a systematic review. *BMC Neurol.* (2009) 9:3. doi: 10.1186/1471-2377-9-3
51. Yamada M. Cerebral amyloid angiopathy: emerging concepts. *J Stroke.* (2015) 17:17-30. doi: 10.5853/jos.2015.17.1.17
52. Greenberg SM, Vonsattel JP, Segal AZ, Chiu RI, Clatworthy AE, Liao A, et al. Association of apolipoprotein E epsilon2 and vasculopathy in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology.* (1998) 50:961-5. doi: 10.1212/WNL.50.4.961
53. Love S, Chalmers K, Ince P, Esiri M, Attems J, Jellinger K, et al. Development, appraisal, validation and implementation of a consensus protocol for the assessment of cerebral amyloid angiopathy in post-mortem brain tissue. *Am J Neurodegener Dis.* (2014) 3:19-32.
54. Charidimou A, Boulouis G, Gurol ME, Ayata C, Bacskai BJ, Froesch MP, et al. Emerging concepts in sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Brain.* (2017) 140:1829-50. doi: 10.1093/brain/awx047
55. Zhu YC, Chabriat H, Godin O, Dufouil C, Rosand J, Greenberg SM, et al. Distribution of white matter hyperintensity in cerebral hemorrhage and healthy aging. *J Neurol.* (2012) 259:530-6. doi: 10.1007/s00415-011-6218-3
56. Thanprasertskul S, Martinez-Ramirez S, Pontes-Neto OM, Ni J, Ayres A, Reed A, et al. Posterior white matter disease distribution as a predictor of amyloid angiopathy. *Neurology.* (2014) 83:794-800. doi: 10.1212/WNL.0000000000000732
57. Gurol ME, Viswanathan A, Gidicsin C, Hedden T, Martinez-Ramirez S, Dumas A, et al. Cerebral amyloid angiopathy burden associated with leukoaraiosis: a positron emission tomography/magnetic resonance imaging study. *Ann Neurol.* (2013) 73:529-36. doi: 10.1002/ana.23830
58. Hirohata M, Yoshita M, Ishida C, Ikeda SI, Tamaoka A, Kuzuhara S, et al. Clinical features of non-hypertensive lobar intracerebral hemorrhage related to cerebral amyloid angiopathy. *Eur J Neurol.* (2010) 17:823-9. doi: 10.1111/j.1468-1331.2009.02940.x
59. Cordonnier C, Al-Shahi Salman R, Wardlaw J. Spontaneous brain microbleeds: systematic review, subgroup analyses and standards for

- study design and reporting. *Brain*. (2007) 130:1988-2003. doi: 10.1093/brain/awl387
60. Linn J, Halpin A, Demaerel P, Ruhland J, Giese AD, Dichgans M, et al. Prevalence of superficial siderosis in patients with cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. (2010) 74:1346-50. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181dad605
 61. Salvarani C, Hunder GG, Morris JM, Brown RD Jr, Christianson T, Giannini C. A β -related angiitis: comparison with CAA without inflammation and primary CNS vasculitis. *Neurology*. (2013) 81:1596-603. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182a9f545
 62. Salvarani C, Brown RD Jr, Christianson T, Miller DV, Giannini C, Huston J III, et al. An update of the Mayo Clinic cohort of patients with adult primary central nervous system vasculitis: description of 163 patients. *Medicine*. (2015) 94:e738. doi: 10.1097/MD.0000000000000738
 63. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, et al. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum*. (2013) 65:1-11. doi: 10.1002/art.37715
 64. Salvarani C, Brown RD Jr, Hunder GG. Adult primary central nervous system vasculitis. *Lancet*. (2012) 380:767-77. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60069-5
 65. Boche D, Zotova E, Weller RO, Love S, Neal JW, Pickering RM, et al. Consequence of Abeta immunization on the vasculature of human Alzheimer's disease brain. *Brain*. (2008) 131:3299-310. doi: 10.1093/brain/awn261
 66. Sperling RA, Jack CR Jr, Black SE, Frosch MP, Greenberg SM, Hyman BT, et al. Amyloid-related imaging abnormalities in amyloid-modifying therapeutic trials: recommendations from the Alzheimer's Association Research Roundtable Workgroup. *Alzheimers Dement*. (2011) 7:367-85. doi: 10.1016/j.jalz.2011.05.2351
 67. Frisoni GB. ARIA from off-key operas? *Lancet Neurol*. (2012) 11:207-8. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70021-2
 68. Miles LA, Crespi GA, Doughty L, Parker MW. Bapineuzumab captures the N-terminus of the Alzheimer's disease amyloid-beta peptide in a helical conformation. *Sci Rep*. (2013) 3:1302. doi: 10.1038/srep01302
 69. Rinne JO, Brooks DJ, Rossor MN, Fox NC, Bullock R, Klunk WE, et al. 11C-PiB PET assessment of change in fibrillar amyloid-beta load in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a phase 2, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study. *Lancet Neurol*. (2010) 9:363-72. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70043-0
 70. Liu E, Schmidt ME, Margolin R, Sperling R, Koeppe R, Mason NS, et al. Amyloid- β 11C-PiB-PET imaging results from 2 randomized bapineuzumab phase 3 AD trials. *Neurology*. (2015) 85:692-700. doi: 10.1212/WNL.0000000000001877
 71. Salloway S, Sperling R, Fox NC, Blennow K, Klunk W, Raskind M, et al. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. (2014) 370:322-33. doi: 10.1056/NEJMoa1304839
 72. Black RS, Sperling RA, Safirstein B, Motter RN, Pallay A, Nichols A, et al. A single ascending dose study of bapineuzumab in patients with Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. (2010) 24:198-203. doi: 10.1097/WAD.0b013e3181c53b00
 73. Salloway S, Sperling R, Gilman S, Fox NC, Blennow K, Raskind M, et al. A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology*. (2009) 73:2061-70. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181c67808
 74. Sperling R, Salloway S, Brooks DJ, Tampieri D, Barakos J, Fox NC, et al. Amyloid-related imaging abnormalities in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a retrospective analysis. *Lancet Neurol*. (2012) 11:241-9. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70015-7
 75. Sevigny J, Chiao P, Bussière T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, et al. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature*. (2016) 537:50-6. doi: 10.1038/nature19323
 76. Panza F, Solfrizzi V, Imbimbo BP, Giannini M, Santamato A, Seripa D, et al. Efficacy and safety studies of gantenerumab in patients with Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother*. (2014) 14:973-86. doi: 10.1586/14737175.2014.945522
 77. Ostrowitzki S, Lasser RA, Dorflinger E, Scheltens P, Barkhof F, Nikolcheva T, et al. A phase III randomized trial of gantenerumab in prodromal Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. (2017) 9:95. doi: 10.1186/s13195-017-0318-y
 78. Carlson C, Siemers E, Hake A, Case M, Hayduk R, Suhy J, et al. Amyloid-related imaging abnormalities from trials of solanezumab for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. (2016) 2:75-85. doi: 10.1016/j.dadm.2016.02.004
 79. Adolfsson O, Pihlgren M, Toni N, Varisco Y, Buccarello AL, Antonello K, et al. An effector-reduced anti- β -amyloid (A β) antibody with unique A β binding properties promotes neuroprotection and glial engulfment of A β . *J Neurosci*. (2012) 32:9677-89. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4742-11.2012
 80. Cummings JL, Cohen S, van Dyck CH, Brody M, Curtis C, Cho W, et al. ABBY: A phase 2 randomized trial of crenezumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology*. (2018) 90:e1889-97. doi: 10.1212/WNL.0000000000005550
 81. Salloway S, Honigberg LA, Cho W, Ward M, Friesenhahn M, Brunstein F, et al. Amyloid positron emission tomography and cerebrospinal fluid results from a crenezumab anti-amyloid-beta antibody double-blind, placebo-controlled, randomized phase II study in mild-to-moderate Alzheimer's disease (BLAZE). *Alzheimers Res Ther*. (2018) 10:96. doi: 10.1186/s13195-018-0424-5
 82. Landen JW, Cohen S, Billing CB Jr, Cronenberg C, Styren S, Burstein AH, et al. Multiple-dose ponezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease: Safety and efficacy. *Alzheimers Dement*. (2017) 3:339-47. doi: 10.1016/j.trci.2017.04.003
 83. Leurent C, Goodman JA, Zhang Y, He P, Polimeni JR, Gurol ME, et al. Immunotherapy with ponezumab for probable cerebral amyloid angiopathy. *Ann Clin Transl Neurol*. (2019) 6:795-806. doi: 10.1002/acn3.761
 84. Delnomdedieu M, Duvvuri S, Li DJ, Atassi N, Lu M, Brashear HR, et al. First-In-Human safety and long-term exposure data for AAB-003 (PF-05236812) and biomarkers after intravenous infusions of escalating doses in patients with mild to moderate Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. (2016) 8:12. doi: 10.1186/s13195-016-0177-y
 85. Logovinsky V, Satlin A, Lai R, Swanson C, Kaplow J, Osswald G et al. Safety and tolerability of BAN2401-a clinical study in Alzheimer's disease with a protofibril selective A β antibody. *Alzheimers Res Ther*. (2016) 8:14. doi: 10.1186/s13195-016-0181-2
 86. Cao Z, Lv J, Quan W. Low avidity and level of serum anti-A β antibodies in patients with cerebral amyloid angiopathy-related cerebral hemorrhage. *Int J Neurosci*. (2010) 120:760-4. doi: 10.3109/00207454.2010.520379
 87. Piazza F, Greenberg SM, Savoia M, Gardinetti M, Chiapparini L, Raicher I, et al. Anti-amyloid β autoantibodies in cerebral amyloid angiopathy-related inflammation: implications for amyloid-modifying therapies. *Ann Neurol*. (2013) 73:449-58. doi: 10.1002/ana.23857
 88. DiFrancesco JC, Brioschi M, Brighina L, Ruffmann C, Saracchi E, Costantino G, et al. Anti-A β autoantibodies in the CSF of a patient with CAA-related inflammation: a case report. *Neurology*. (2011) 76:842-4. doi: 10.1212/WNL.0b013e31820e773c
 89. Pfeifer M, Boncristiano S, Bondolfi L, Stalder A, Deller T, Staufenbiel M, et al. Cerebral hemorrhage after passive anti-Abeta immunotherapy. *Science*. (2002) 298:1379. doi: 10.1126/science.1078259
 90. Thakker DR, Weatherspoon MR, Harrison J, Keene TE, Lane DS, Kaemmerer WF, et al. Intracerebroventricular amyloid-beta antibodies reduce cerebral amyloid angiopathy and associated micro-hemorrhages in aged Tg2576 mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2009) 106:4501-6. doi: 10.1073/pnas.0813404106
 91. Hall A, Pekkala T, Polvikoski T, van Gils M, Kivipelto M, Lötjönen J, et al. Prediction models for dementia and neuropathology in the oldest old: the Vantaa 85+ cohort study. *Alzheimers Res Ther*. (2019) 11:11. doi: 10.1186/s13195-018-0450-3

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Chantran, Capron, Alamowitch and Aucouturier. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.