

## Le projet POSEIDON (Phoenix)

Pr Bruno Dubois – IM2A  
Hôpital de la Salpêtrière  
Mars 2021

---

1

### Un double objectif :

1. Identifier des nouveaux biomarqueurs pour le diagnostic des maladies neurodégénératives du cerveau, responsables de troubles cognitifs et comportementaux, et en particulier pour la maladie d'Alzheimer.
2. Définir des algorithmes prédictifs de l'évolution des maladies neurodégénératives, et en particulier celle des patients souffrant de la maladie d'Alzheimer.

### Rationnel :

- Les démences dégénératives, et en particulier la maladie d'Alzheimer, sont à l'origine de progrès considérables dans le domaine de la recherche clinique. Il apparaît en effet qu'il est possible, pour la première fois dans les maladies du cerveau, de repérer des signatures biologiques de ces affections. Les progrès sont apparus à la fin des années 90, avec la mise en évidence de modifications de la concentration de protéines du liquide céphalorachidien (augmentation de la concentration de la protéine Tau totale et de la protéine Tau phosphorylée ; diminution de la concentration du peptide amyloïde) et avec la possibilité de visualiser, directement in vivo, la présence des lésions amyloïdes (grâce au PET amyloïde) et lésions Tau (grâce PET Tau).
- Ces deux approches (étude du liquide céphalo-rachidien prélevé par ponction lombaire et visualisation des lésions cérébrales par PET SCAN) permettent ainsi de vérifier la présence des deux lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. Cette affection est en effet définie par la présence de plaques amyloïdes (agrégation extra-membranaire de protéines amyloïdes) et la présence de dégénérescences neuro-fibrillaires au sein des neurones du cortex cérébral, liées à des modifications des micro-tubules intra-neuronaux par hyperphosphorylation des protéines Tau. La mise en évidence de la positivité de ces marqueurs physiopathologiques permet aujourd'hui de confirmer, si besoin, l'existence d'une maladie d'Alzheimer chez les patients présentant des troubles cognitifs.
- La recherche de biomarqueurs est réalisée couramment maintenant dans des centres experts comme celui de l'institut de la mémoire et de la maladie d'Alzheimer (IM2A). La recherche est recommandée lorsqu'il y a besoin d'affirmer un diagnostic qui ne peut être formellement établi sur la seule présence des troubles cognitifs. Le développement de cette recherche a révolutionné l'approche clinique des maladies neurodégénératives et la maladie d'Alzheimer en particulier. En effet, les lésions de la maladie sont présentes dès les premiers symptômes

dont elles sont responsables. Il est donc possible maintenant de repérer précocement la maladie d'Alzheimer, bien avant qu'elle ait atteint le stade de démence.

- L'institut de la mémoire et de la maladie d'Alzheimer a été très proactif dans la nouvelle définition de la maladie d'Alzheimer, incluant ce stade précoce, que nous avons dénommé stade prodromal de la maladie d'Alzheimer. Il est maintenant possible d'identifier des patients dès les tous premiers symptômes de la maladie, au stade prodromal. Mais cela se fait au prix d'un examen invasif (la ponction lombaire) ou coûteux (le PET amyloïde et le PET Tau), ce qui en limite l'application en pratique clinique. Ce d'autant que l'usage du PET Scanner lésionnel (PET amyloïde et PET Tau) n'est pas autorisé en France dans des fins cliniques. Pour ces raisons, nous cherchons à identifier les biomarqueurs des maladies neurodégénératives dans le sang des patients.

### **Le projet :**

- L'objectif du projet est d'identifier des biomarqueurs diagnostiques de la maladie d'Alzheimer dans le plasma des patients. Cette recherche ne peut se faire que sur des populations de sujets parfaitement phénotypés et formellement caractérisés. Pour cela, nous mettons à la disposition de cette recherche les cohortes de patient INSIGHT et SOCRATES, deux cohortes de sujets ayant bénéficié d'une signature biologique par biomarqueurs du liquide céphalo-rachidien.
- Le projet vise également à définir des algorithmes prédictifs d'évolution de la maladie chez des patients dont le diagnostic a été formellement établi.

### **Méthodes :**

Elles reposent sur 2 principes essentiels :

- Le principe de l'approche multimodale:
  - o Le principe de l'approche multimodale est d'étudier la performance diagnostique d'un outil croisant des données issues de domaines d'information différents : domaine de la biologie plasmatique, de la neuropsychologie, de la neuro-imagerie, de l'électro-encéphalographie notamment. Ceci dans le but de contourner le problème de la précocité du diagnostic et de l'hétérogénéité de la maladie. Cette approche multidimensionnelle des biomarqueurs permet de repérer des trajectoires spatio-temporelles spécifiques de mécanismes pathophysiologiques éventuellement différents. En d'autres termes, certains biomarqueurs sont positifs précocement pour atteindre un plateau (c'est le cas par exemple des marqueurs amyloïdes dans le cerveau) ; d'autres peuvent être modifiés plus tardivement (c'est le cas de l'atrophie hippocampique). La conjonction de ces différents paramètres doit permettre l'établissement d'un diagnostic, quel que soit le stade et quel que soit le patient, sans recourir à la ponction lombaire ou au PET Scan. C'est l'hypothèse qui est à la base du projet et qui est fondé sur le principe de l'intégration multimodale.

- Le deuxième principe est celui de la qualité des cohortes utilisées pour valider les algorithmes diagnostiques du projet Phoenix. Il faut savoir que la performance des biomarqueurs plasmatiques, actuellement rapportée dans la littérature, est décevante. Une des raisons avancées tient à la qualité souvent médiocre des cohortes utilisées pour valider ces outils. L'expertise clinique des médecins chercheurs de l'IM2A et les ressources mises à la disposition des patients hospitalisés, nous ont permis d'établir deux cohortes de référence qui sont aujourd'hui repérées et reconnues comme telles. Il s'agit de :
  - o La cohorte INSIGHT : cette cohorte, débutée en 2013, consiste en l'inclusion de 318 sujets âgés, cognitivement normaux, et qui ont accepté :
    - Que l'on définisse leur statut amyloïde cérébral initial par un PET Amyloïde ;
    - D'être suivis sur une base annuelle en réalisant des investigations complètes dans le domaine de la cognition, de la neuro-imagerie, de l'électro-encéphalographie, de la biologie ;
    - Que l'on fasse des prélèvements sanguins pour constituer une banque plasmatique.
    - Sur les 318 sujets initialement recrutés, avec un âge moyen de 76 ans, 88 d'entre eux avaient déjà des lésions amyloïdes dans le cerveau (SUVR supérieur à 0.79). Ces sujets sont donc à risque de développer une maladie d'Alzheimer. En revanche, 230 sujets étaient amyloïdes négatifs, ils sont donc considérés comme des sujets contrôles parfaitement normaux.
    - Grâce au Bio-banking, il est donc possible de tester l'hypothèse de nouveaux biomarqueurs plasmatiques en étudiant la concentration dans le groupe de sujets amyloïdes négatifs et dans le groupe de sujets amyloïdes positifs.
    - Par ailleurs, le suivi évolutif a montré que seuls 15% des sujets qui étaient cognitivement normaux à l'entrée, ont développé au cours de l'évolution des symptômes de la maladie d'Alzheimer. Tous ces sujets étaient amyloïdes positifs au départ. Il est donc possible de tester également les hypothèses de nouveaux biomarqueurs plasmatiques sur ces patients ayant développé la maladie secondairement.

*REF : Bruno Dubois, Stephane Epelbaum, Francis Nyasse, Hovagim Bakardjian, Geoffroy Gagliardi, Olga Uspenskaya, Marion Houot, Simone Lista, Federica Cacciamani, Marie-Claude Potier, Anne Bertrand, Foudil Lamari, Habib Benali, Jean-François Mangin, Olivier Colliot, Remy Genthon, Marie-Odile Habert, Harald Hampel, INSIGHT-preAD study group. Cognitive and neuroimaging features and brain  $\beta$ -amyloidosis in individuals at risk of Alzheimer's disease (INSIGHT-preAD): a longitudinal observational study. Lancet Neurol. 2018 Apr;17(4):335-346. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30029-2.*
  - o La cohorte SOCRATES : Il s'agit cette fois-ci d'une cohorte de patients ayant développé une démence dégénérative diagnostiquée à l'institut de la mémoire et de la maladie d'Alzheimer : le plus souvent une maladie d'Alzheimer, à différents stades d'évolution

de l'affection (stade prodromal ou stade démence) ; plus rarement une démence frontotemporale, une démence à corps de Lewy, une paralysie supra-nucléaire progressive, une dégénérescence cortico-basale ou une aphasia progressive primaire... Dans tous les cas, l'affection est formellement caractérisée par la présentation clinique phénotypique, par les données de l'IRM structurelle, par les données de la neuro-imagerie moléculaire en PET-FDG montrant les profils d'hypométabolisme spécifique, et enfin par la réalisation d'une ponction lombaire à la recherche de la présence ou de l'absence des biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer. Ainsi, sur la base de cette investigation complète, il est possible de définir formellement l'affection neurodégénérative des patients qui ont accepté, là aussi, le principe d'une participation dans un projet de recherche, un suivi sur une base annuelle, et des prélèvements sanguins pour la bio-banque.

- L'intérêt des patients de la cohorte SOCRATES est considérable. En effet, quand on veut valider de nouveaux biomarqueurs ou un algorithme diagnostique, il ne suffit pas d'en démontrer la capacité de discrimination entre des patients atteints de maladie d'Alzheimer et des sujets normaux. Il est essentiel de démontrer aussi la valeur discriminative entre des patients souffrant de la maladie d'Alzheimer et des patients souffrant d'autres démences neurodégénérative car il s'agit de la discussion diagnostique qui est habituellement rencontrée dans la pratique clinique. C'est pourquoi il est fondamental de tester la qualité des nouveaux biomarqueurs en les confrontant, en aveugle, à des populations de patients atteints d'affection proche.
- o Les Cohortes Multi-MA et COMAJ avec prélèvement post-mortem. Ces deux cohortes sont exceptionnelles car les patients y participant ont accepté d'être suivi régulièrement tout au long de leur maladie et ont signé un engagement pour un prélèvement post-mortem. Il s'agit de sujets ayant soit une maladie neurodégénérative avec démence (cohorte Multi-MA), soit de sujets ayant une maladie d'Alzheimer jeune, déclarée avant l'âge de 60 ans (cohorte COMAJ). A la date d'aujourd'hui, 75 sujets, ont eu un prélèvement post-mortem. Ces deux cohortes nationales, multicentriques, incluant les centres de Paris, Lille, Montpellier, Bordeaux, Toulouse, Nice et Rouen, ont nécessité la mise en place d'un réseau complexe pour l'étude du prélèvement post-mortem qui devait se faire les 24h après le décès. L'intérêt de ces deux cohortes est considérable car il y a la certitude du diagnostic établi par l'examen direct du cerveau des patients décédés. Cette certitude valorise la bio-banque qui renferme les prélèvements sanguins, LCR et les tissus cérébraux.

### **Les recherches biologiques en cours :**

Il faut distinguer deux niveaux différents de recherche : les recherches concernant des biomarqueurs dans des domaines spécifiques (biomarqueurs biologiques, biomarqueurs de neuro-imagerie, biomarqueurs cognitifs, biomarqueurs électro-encéphalographiques) et les recherches fondées sur le

principe de l'intégration multimodale de ces différents biomarqueurs, dans des algorithmes diagnostiques ou des algorithmes de prédiction pronostique.

- **Les biomarqueurs unitaires :**

La recherche porte sur la mise en évidence de biomarqueurs :

- moins onéreux que ceux de la neuro-imagerie moléculaire ;
- moins agressifs que ceux du liquide céphalo-rachidien ;
- et sur des marqueurs qui permettront d'ouvrir des voies de recherche sur de nouveaux mécanismes physiopathologiques sous tendant la maladie d'Alzheimer.

Il s'agit

- de marqueurs biologiques plasmatiques : de nouvelles méthodes sont en cours d'expérimentation à l'institut de la mémoire et de la maladie d'Alzheimer :

- 1 De la technique SIMOA (Single MOlecular Array) : Il s'agit d'une méthode de dosage ultrasensible. Alors que la méthode classique ELISA (Enzyme Linked Immuno-absorbant Assay) a un seuil de détection de l'ordre du pg/ml (soit  $10^{-12}$ g/ml), le seuil de détection par SIMOA est de l'ordre du fg/ml, soit 1000 fois plus faible. On peut ainsi détecter dans le plasma des marqueurs connus dans le LCR, mais présents à des niveaux beaucoup plus faibles dans le sang, ou identifier de nouveaux biomarqueurs reflétant des mécanismes pathophysiologiques particuliers.
- 2 De la spectrométrie de masse, en partenariat avec le CEA. Le projet vise à identifier, à partir des prélèvements cérébraux des patients décédés, issus de la cohorte Multi-MA et COMAJ, des protéines d'intérêt dont les caractéristiques ainsi définies par la spectrométrie sur les tissus cérébraux permettront de les identifier ultérieurement dans le LCR et le plasma. Ce projet va en particulier explorer deux domaines encore mal caractérisés sur le plan des biomarqueurs et dont le diagnostic différentiel clinique avec la maladie d'Alzheimer est parfois difficile. Le premier est celui des tauopathies non-Alzheimer marquées par différentes isoformes de tau. Le second est celui d'un cadre anatomo-pathologique récemment décrit, lié à la protéine TDP-43 (Limbic predominant Aged-related TDP-43 Encephalopathy, ou LATE).
- 3 De la technique MagQu, méthode innovante qui s'appuie sur le principe de la technologie par IMR (Immunomagnétique Réduction). Cette méthode utilise des nanoparticules magnétiques sur laquelle se fixent les antigènes et qui vont

aussi dans le champ magnétique en fonction de la concentration d'antigène.

D'une façon générale, les biomarqueurs recherchés dans le plasma sont :

- La concentration de peptide amyloïde Abeta 1-40
  - Les concentrations de peptide amyloïde Abeta 1-42
  - Les concentrations de protéine Tau
  - Les concentrations de protéine Tau phosphorylée en 181
  - Les concentrations de TDP-43
  - Les concentrations d'Alpha-synucléine
  - Les concentrations de phospho-Alpha-synucléine S129
  - Les concentrations de neuro-filaments à chaîne légère (NFL)
  - Les concentrations de BACE 1
  - Etude de la concentration de YKL-40
- De marqueurs de neuro-imagerie :
- Calculs volumiques de structures d'intérêt (ROI) telles que : volume hippocampique, ruban cortical, extraction de substance grise, volume ventriculaire... par des techniques automatiques,
  - Mesures d'images vasculaires de comorbidité éventuelle telle que microbleeds, hyperdensités de la substance blanche, lacunes...
  - Etude de la connectivité des réseaux de connexion entre les différentes structures cérébrales par IRM fonctionnelle.
- De marqueurs génomiques, métabolomiques
- Marqueurs électrophysiologiques grâce au recueil électro-encéphalographique annuel chez tous les sujets de l'étude INSIGHT permettant de définir des prédicteurs éventuels d'une évolution secondaire vers la maladie d'Alzheimer.
- La valeur respective et le poids prédictif diagnostique et pronostique de chacun de ces marqueurs seront comparés dans les différentes populations de sujets atteints de maladie d'Alzheimer par rapport à des sujets contrôle (avec ou sans biomarqueurs positifs, grâce à l'étude INSIGHT) et par rapport à des patients atteints d'autres maladies neurodégénératives (grâce à la cohorte SOCRATES).
- **Parallèlement, une approche multimodale** sera développée pour l'identification de trajectoires spatio-temporelles reflétant des mécanismes physiopathologiques différents. Ainsi, les associations sont en particulier recherchées en corrélation avec l'atteinte du système cholinergique du basal forebrain et en fonction du génotypage APOE E 4.

## Résultats :

1. Dans une étude multidimensionnelle, nous avons étudié les relations entre les différents réseaux cérébraux de connectivité fonctionnelle et les voies métaboliques moléculaires dans l'hypothèse où certains de ces réseaux pourraient être plus vulnérables à l'effet de molécules pathogènes, permettant de comprendre alors l'histoire naturelle de la maladie. Ces voies moléculaires ont été identifiées par la concentration plasmatique des biomarqueurs suivants :
  - La voie de la neurodégénérescence : par la concentration protéine Tau total
  - La voie de l'amyloïdose cérébrale : par la concentration de peptide Abeta 1-42, 1-40 et le ratio 1-42 sur 1-40 ainsi que la concentration de la BACE 1
  - La voie de la neuro-inflammation et de l'activation gliale : par la concentration du YKL-40
  - La voie de la souffrance axonale : par la concentration de NFL.

Les cinq biomarqueurs plasmatiques étaient associés à plusieurs réseaux de connectivité fonctionnelle, en particulier, celui de la salience, du langage, du traitement visuo-spatial et du réseau 'mode par défaut' qui étaient les plus impliqués.

**REFERENCE:** Patrizia A Chiesa 1 Marion Houot 2 , Andrea Vergallo 3 , Enrica Cavedo 4 , Simone Lista 3 Marie Claude Potier 5 , Henrik Zetterberg 6 , Kaj Blennow 7 , Eugen Vanmechelen 8 , Ann De Vos 9 , Bruno Dubois 3 , Harald Hampel 10 , INSIGHT-preAD study group; Alzheimer Precision Medicine Initiative (APMI). Association of brain network dynamics with plasma biomarkers in subjective memory complainers. *Neurobiol Aging*. 2020 Apr;88:83-90. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2019.12.017.

2. Dans l'hypothèse que les noyaux cholinergiques du télencéphale basal joue un rôle dans la neurodégénérescence corticale (comme cela a été avancé notamment à la suite des travaux de Peter Whitehouse montrant une atteinte massive du Nucleus Basalis de Meynert dans la maladie d'Alzheimer), une association entre les taux plasmatiques de la protéine Tau Totale et de NFL et le volume du basal Forebrain a montré qu'il existait bien une corrélation entre les concentrations élevées de protéine Tau Totale et un pourcentage d'atrophie élevée du basal forebrain, et ce qu'il s'agisse de la partie antérieure (CH1-2) ou postérieure (CH4). Ces résultats sont indépendants du statut amyloïde et du génotype APOE.

**REFERENCE:** Enrica Cavedo 1 , Simone Lista 2 , Marion Houot 2 , Andrea Vergallo 2 , Michel J Grothe 2 Stefan Teipel 2 , Henrik Zetterberg 2 , Kaj Blennow 2 , Marie-Odile Habert 2 Marie C Potier 2 , Bruno Dubois 2 , Harald Hampel 2 , INSIGHT-preAD Study Group; Alzheimer Precision Medicine Initiative. Plasma tau correlates with basal forebrain atrophy rates in people at risk for Alzheimer disease. *Neurology*. 2020 Jan 7;94(1):e30-e41. doi: 10.1212/WNL.CavedoKVDO ET 2020 ref.4).

3. La performance du ratio Abeta 40 sur Abeta 42 dans le plasma comme prédicteur de présence de lésions amyloïdes en PET Scan a été investigué et montre que ce ratio peut être un

prédicteur fiable dans 81% des cas. La performance n'est pas influencée par le statut APOE 4, par le sexe ou par l'âge. Ce résultat est très important car il montre que le dosage plasmatique d'Abeta 40/42 peut être un prédicteur de l'amyloïdose cérébrale. Cela ouvre la porte d'un pré-screening chez les sujets à risque ou se plaignant de leur mémoire.

**REFERENCE:** Andrea Vergallo 1, Lucile Mégret 2, Simone Lista 3, Enrica Cavedo 3, Henrik Zetterberg 4, Kaj Blennow 5, Eugeen Vanmechelen 6, Ann De Vos 6, Marie-Odile Habert 7, Marie-Claude Potier 8, Bruno Dubois 3, Christian Neri 2, Harald Hampel 9, INSIGHT-preAD study group; Alzheimer Precision Medicine Initiative (APMI). Plasma amyloid  $\beta$  40/42 ratio predicts cerebral amyloidosis in cognitively normal individuals at risk for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2019 Jun;15(6):764-775. doi: 10.1016/j.jalz.2019.03.009.

4. L'analyse EEG en Resting-State des 314 sujets de l'étude INSIGHT à la 'baseline' a mis en évidence des changements de fréquence oscillatoire dans les régions frontales chez les sujets ayant des lésions amyloïdes cérébrales en PET-Scan, mais pourtant cognitivement normaux. Cela démontre, et pour la première fois, l'existence de mécanismes de connectivité fonctionnelle, compensatoire, permettant de maintenir un fonctionnement cognitif normal en dépit de la présence d'altérations structurelles. Ref.Gaubert AN 2019.

**REFERENCE:** Babiloni C, Lopez S, Del Percio C, Noce G, Pascarelli MT, Lizio R, Teipel SJ, González-Escamilla G, Bakardjian H, George N, Cavedo E, Lista S, Chiesa PA, Vergallo A, Lemercier P, Spinelli G, Grothe MJ, Potier MC, Stocchi F, Ferri R, Habert MO, Fraga FJ, Dubois B, Hampel H; INSIGHT-preAD Study Group. Resting-State Posterior Alpha Rhythms Are Abnormal In Subjective Memory Complaint Seniors With Preclinical Alzheimer's Neuropathology And High Education Level: The Insight-Pread Study. *Neurobiol Aging.* 2020 Jun;90:43-59. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2020.01.012.

**REFERENCE:** Sinead Gaubert, Federico Raimondo, Marion Houot, Marie-Constance Corsi, Lionel Naccache, Jacobo Diego Sitt, Bertrand Hermann, Delphine Oudiette, Marie-Odile Habert, Bruno Dubois, Fabrizio De Vico Fallani, Hovagim Bakardjian, Stéphane Epelbaum, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. EEG evidence of compensatory mechanisms in preclinical Alzheimer's disease. *BRAIN*, 2019 Jul 1;142(7):2096-2112. doi: 10.1093/brain/awz150.

5. Dans le même ordre d'idée, nous avons montré, avec Gregory Penner, l'efficacité de la plateforme Aptamarker pour la prédiction plasmatique de la présence de dépôts beta-amyloïde dans le cerveau. Les résultats sur les sujets de l'étude INSIGHT montrent une sensibilité de 85%, une spécificité de 75% et une accuracy de 80%. Ces résultats sont encourageants et montrent qu'il est possible, grâce à l'étude de populations très bien définies, de valider des biomarqueurs sanguins qui permettront, dans l'avenir, de repérer des sujets à fort risque de développer la maladie d'Alzheimer. Ces études sont d'un intérêt considérable et montrent le leadership de l'institut de la mémoire et de la maladie d'Alzheimer et de ses cohortes dans une recherche hautement compétitive, grâce à ses contacts et collaborations locales, nationales et européennes.

**REFERENCE:** Soizic Lecocq, Katia Spinella, Bruno Dubois, Simone Lista, Harald Hampel, Gregory Penner. *Aptamers as biomarkers for neurological disorders. Proof of concept in transgenic mice.* PLoS One. 2018 Jan 5;13(1):e0190212. doi: 10.1371/journal.pone.0190212. eCollection 2018.

**REFERENCE:** Gregory Penner<sup>1</sup>, Soizic Lecocq<sup>1</sup>, Anaëlle Chopin<sup>1</sup>, Ximena Vedoya<sup>1</sup>, Simone Lista, Andrea Vergallo, Enrica Cavedo, Francois-Xavier Lejeune, Harald Hampel, Bruno Dubois, and the INSIGHT-preAD study group for the Alzheimer Precision Medicine Initiative (APMI). *Aptamer prediction of brain amyloid- $\beta$  status in cognitively normal individuals at risk for Alzheimer's disease.* Soumis.