

COMMUNICATION

Les déficits cognitifs dans la trisomie 21, de la naissance à la démence : mécanismes et traitements

MOTS-CLÉS : TRISOMIE. SYNDROME DE DOWN. MALADIE D'ALZHEIMER. ENDOSOMES

Cognitive deficits in Down syndrome, from birth to dementia: mechanisms and treatments

KEY-WORDS: TRISOMY. DOWN SYNDROME. ALZHEIMER DISEASE. ENDOSOMES.

Marie-Claude POTIER *

L'auteur déclare n'avoir aucun lien d'intérêt en relation avec le contenu de cet article.

RÉSUMÉ

La Trisomie 21 (T21) est la première cause génétique de retard mental affectant plus de 5 millions de personnes dans le monde. Les individus porteurs de T21 montrent des altérations cognitives et de comportement d'intensité variable dès le plus jeune âge, puis des signes histopathologiques parfois accompagnés de symptômes de type Alzheimer vers quarante ans. Après le séquençage entier du chromosome 21 en 2000, le développement de modèles de souris de T21 et l'étude de l'expression des gènes en trois copies dans un contexte T21, les recherches actuelles portent sur l'amélioration du déficit cognitif de l'enfant et du jeune adulte, et la prévention de la démence du sujet âgé via la recherche de marqueurs et la définition d'une nouvelle population-cible. Cette revue présentera l'état de l'art ainsi que nos recherches menées sur le front des traitements des déficits cognitifs et de la découverte de biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer dans un contexte T21, applicables à maladie d'Alzheimer sporadique.

* Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, CNRS UMR7225, INSERM U1127, UPMC ; Hôpital de la Pitié-Salpêtrière ; 47 Bd de l'Hôpital 75013 Paris.

Tirés-à-part : Professeur Marie-Claude POTIER, même adresse

Article reçu le 20 avril 2016, accepté le 27 juin 2016

SUMMARY

Down syndrome due to trisomy 21 (T21) is the leading genetic cause of mental retardation affecting more than 5 million people worldwide. Individuals carrying T21 show cognitive impairments of variable intensity from an early age and histopathological changes, sometimes associated with clinical signs of Alzheimer's disease in their forties. After the entire sequencing of chromosome 21 in 2000, the development of mouse models of Down syndrome and the study of expression of the three copies genes in a T21 context, current research focuses on treatment of cognitive deficits in children and young adults, and the prevention of dementia in elderly individuals by defining predictive biomarkers and new target-population. This review will present the state of the art and our research on the treatment of cognitive deficits and the discovery of biomarkers of Alzheimer's disease in Down syndrome, also valid in sporadic Alzheimer's disease.

INTRODUCTION

La trisomie 21 (T21) ou syndrome de Down est la première cause génétique de retard mental touchant plus de 5 millions de personnes à travers le monde et 500 000 en Europe. La triplification du chromosome 21 décrite en 1959 comme étant responsable du syndrome de Down [1] modifie le développement du système nerveux central et la plasticité neuronale, conduisant à des altérations de la cognition et du comportement. À un âge plus avancé la trisomie 21 augmente fortement le risque de développer la maladie d'Alzheimer.

L'amélioration des soins des personnes atteintes de T21 a considérablement allongé leur espérance de vie et a conduit à une augmentation notable et concomitante du nombre d'adultes de plus de 35 ans porteurs d'une T21 avec un risque élevé de démence [2]. Leur espérance de vie en France est actuellement de 55 ans. Presque 100 % des adultes porteurs d'une T21 ont des dépôts amyloïdes dans leur cerveau, caractéristiques d'une des pathologies présentes dans la maladie d'Alzheimer, la pathologie amyloïde. Le gène codant la protéine précurseur des peptides amyloïdes (APP) étant localisé sur le chromosome 21, les porteurs de T21 ont des quantités plus importantes d'APP au niveau cérébral, responsable de leur charge amyloïde élevée et de leur risque augmenté de maladie d'Alzheimer, selon la théorie de la cascade amyloïde décrite par John Hardy en 1992 [3]. Cette théorie stipule que l'évènement initial dans la cascade conduisant à la maladie d'Alzheimer est la présence d'une pathologie amyloïde. Les récentes études d'imagerie amyloïde corrélées au statut cognitif des individus porteurs de T21 montrent que certaines personnes résistent mieux que d'autres à de fortes charges amyloïdes cérébrales, suggérant ainsi l'existence de facteurs de risque génétiques ou environnementaux [4].

Les personnes porteuses de T21 sont donc actuellement confrontées à des déficits cognitifs dès le plus jeune âge, souvent associés à d'autres pathologies développementales puis à des risques de démence importants vers 40 ans. Il faut donc repenser les traitements. Ainsi les recherches actuelles vont dans deux directions : trouver les

cibles pour traiter les déficits cognitifs dès le plus jeune âge et empêcher l'apparition des démences à l'âge mûr. Cette revue fera le point sur les cibles pharmacologiques actuellement en développement pour le traitement des individus porteurs de T21 et sur les recherches en cours sur la maladie d'Alzheimer dans la T21.

QUELS SONT LES GÈNES CIBLES POUR TRAITER LA TRISOMIE 21 ?

Le chromosome 21 humain (Hsa21) a été entièrement séquencé 40 ans après la découverte de la T21 [5]. Sa séquence a révélé une taille de 47Mb avec la présence de 190 gènes codant des protéines connues et environ 230 séquences autres. Nous avons développé des outils permettant d'étudier l'expression de toutes ces séquences codantes et non codantes dans des cellules provenant d'individus porteurs de T21. Alors que nous attendions une surexpression globale d'un facteur 1.5 de l'expression des gènes en trois copies géniques, nous avons observé qu'environ 60 % de ces gènes ne présentent pas d'augmentation d'expression, un phénomène de compensation se mettant en place [6]. Moins de la moitié des gènes en 3 copies présentant une amplification égale ou supérieure à 1.5, il semblait ainsi plus réaliste d'identifier parmi ces gènes surexprimés ceux qui sont impliqués dans des phénotypes particuliers liés à la T21.

Les recherches sur la T21 ont pu avancer grâce au développement de modèles de souris. Hsa21 est orthologue à des segments des chromosomes 16, 17 et 10 de souris (Mmu16, Mmu17 et Mmu10). Les $\frac{3}{4}$ des gènes sur le bras long du Hsa21 (112 gènes) sont présents sur la partie télomérique du Mmu16. Le segment télomérique de Hsa21 est orthologue à une portion de Mmu17 (19 gènes) et de Mmu10 (39 gènes). Le premier modèle de souris T21 développé contenait trois copies de Mmu16 avec un nombre très important de gènes non orthologues au Hsa21 [7]. Puis est arrivé le deuxième modèle généré de manière fortuite par irradiation de cellules embryonnaires, les souris Ts65Dn, le modèle le plus utilisé actuellement [8]. Ce modèle contient en trois copies 65 % des gènes présents chez l'Homme sur Hsa21, il est relativement facile à obtenir et les déficits cognitifs sont visibles sur différents tests d'apprentissage et de mémorisation. Par la suite de nombreux modèles de trisomies ségmentaires ont été développés [9, 10] et ont permis de réaliser des études de corrélation génotype/phénotype et de définir des intervalles géniques dont la surexpression était responsable de traits phénotypiques. Des études similaires de corrélation génotype/phénotype ont pu être réalisées à partir de cellules d'individus porteurs de trisomies ou de monosomies partielles de Hsa21 [11].

C'est ainsi que plusieurs gènes sont apparus comme étant des gènes clés dans la T21 et pouvant être considérés comme des cibles thérapeutiques. On peut citer par exemple le gène *DYRK1A* (Dual Specificity Tyrosine Phosphorylation Regulated Kinase 1A) encore connu sous le nom de minibrain chez la Drosophile et qui a des fonctions multiples notamment dans le développement du cerveau et de la pathologie Alzheimer [12]. D'autres gènes du Hsa21 sont aussi plus particu-

lièrement étudiés car clairement impliqués dans le fonctionnement synaptique : l'APP (Amyloid Precursor Protein), DSCAM (Down syndrome cell adhesion molecule), SIM2 (Single-Minded homolog 2), GIRK2 (Potassium Channel, Inwardly Rectifying Subfamily J), OLIG1 et OLIG2 (Oligodendrocyte Transcription Factor 1 and 2) et SYNJ1 (Synaptojanin1) dont nous reparlerons plus tard.

Ces 13 dernières années, le nombre de publications faisant apparaître des études principalement précliniques dans la T21 a fortement augmenté (55 articles publiés entre 2002 et 2015) [13]. Ces traitements ciblent les récepteurs aux neurotransmetteurs (GABA, sérotonine, acétylcholine, noradrénaline, glutamate et cannabinoïde), des agents neuroprotecteurs et antioxydants et des inhibiteurs de protéines codées par des gènes du Hsa21.

L'inhibition de l'activité de DYRK1A par l'épigallocatechin-3-gallate, composant du thé vert, améliore les déficits cognitifs non seulement dans les modèles de souris T21 mais aussi chez les individus porteurs de T21 [14, 15]. Une stimulation de la neurogenèse conduisant à une augmentation des capacités cognitives peut être obtenue par traitement avec des inhibiteurs de recapture de la sérotonine tels la fluoxetine [13].

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à une classe pharmacologique de molécules agissant sur la transmission GABAergique : les agonistes inverses GABA α 5.

L'INHIBITION GABAERGIQUE COMME CIBLE THÉRAPEUTIQUE DANS LA TRISOMIE 21

Deux équipes américaines ont montré que la potentialisation à long terme est diminuée dans l'hippocampe des modèles souris de T21 et qu'il est possible de rétablir ce déficit avec des antagonistes GABA [16, 17]. Par la suite deux équipes, une aux États-Unis et l'autre en Espagne ont observé une restauration des déficits cognitifs des souris Ts65Dn après traitement avec un antagoniste GABA, le pentylènetétrazol [18, 19]. Ces études suggéraient donc qu'une diminution de l'inhibition GABAergique pouvait rétablir à la fois les déficits de potentialisation à long terme et les déficits cognitifs dans la T21.

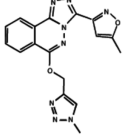
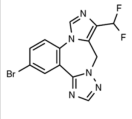
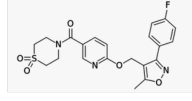
Les récepteurs GABA_A sont constitués de 5 sous-unités transmembranaires formant un canal perméant aux ions chlorure. Les récepteurs ont un site de liaison du GABA et des sites de liaison de modulateurs tels que les benzodiazépines, les barbituriques et le pentylènetétrazol. De ce site de liaison des benzodiazépines, il existe des agonistes qui augmentent la transmission GABAergique et présentent des propriétés graduellement anticonvulsivantes, anxiolytiques et sédatives selon le pourcentage d'occupation des récepteurs, et des agonistes inverses qui diminuent la transmission GABAergique et sont promnésiants, anxiogènes et convulsivants [20, 21]. L'industrie pharmaceutique a recherché des molécules anticonvulsivantes et

anxiolytiques mais non sédatives ou promnésiantes sans être anxiogènes ou convulsivantes [22]. C'est dans ce contexte qu'ont été découverts les agonistes inverses des récepteurs GABA_A contenant la sous-unité $\alpha 5$, présents principalement dans le cortex et l'hippocampe, qui augmentent les capacités cognitives chez les rongeurs [23, 24]. En 2008, nous avons démarré une étude visant à tester l'activité du composé $\alpha 5$ IA ($\alpha 5$ inverse agonist) développé par Merck-Sharp & Dohme dans le modèle souris de T21, Ts65Dn. Ainsi nous avons clairement montré que l' $\alpha 5$ IA rétablit les déficits cognitifs dans les tests d'apprentissage évaluant la mémoire spatiale hippocampique (test de la piscine de Morris) et la mémoire non spatiale dépendante du néocortex (test de reconnaissance de nouvel objet) après une seule injection. De plus le composé ne montrait pas de propriétés anxiogènes ou convulsivantes [25]. Par la suite nous avons trouvé que les déficits d'expression de gènes précoces immédiats tels c-Fos chez les souris Ts65Dn suite à une stimulation comportementale étaient rétablis après un traitement chronique avec l' $\alpha 5$ IA, tant au niveau des transcrits que des protéines [26]. Le composé $\alpha 5$ IA avait fait l'objet d'une étude clinique de phase I chez des volontaires sains jeunes et âgés sans effet promnésiant notoire avec cependant un composé de référence dans l'étude, le lorazépam, qui n'avait pas montré de déficit attendu [27]. Une autre étude clinique de phase I chez des volontaires sains avait révélé un effet bénéfique de l' $\alpha 5$ IA sur les pertes de mémoire induites par la prise d'alcool [28]. Le composé $\alpha 5$ IA ayant été arrêté pour des problèmes de faible solubilité et de propriétés néphrotoxiques éventuelles, nous n'avons pas pu démarrer d'étude clinique dans la T21.

Deux ans plus tard, le laboratoire Hoffmann La Roche a publié les effets bénéfiques de leur composé de même classe pharmacologique chez les souris Ts65Dn [29]. Outre les effets dans des tests comportementaux, ils montraient une correction des déficits de neurogenèse et de potentialisation à long terme, et le rétablissement du nombre de neurones GABAergiques augmenté chez les souris Ts65Dn (Figure 1). Ces deux études ouvraient la voie aux études cliniques dans la T21 [30, 31].

Un des composés Roche est actuellement en étude clinique de phase II dans 37 centres de par le monde chez 173 individus porteurs de T21 âgés de 12 à 30 ans avec un traitement de 26 semaines en double aveugle (étude CLEMATIS). Une autre étude a démarré chez 36 enfants âgés de 6 à 11 ans. Ces deux études ont été arrêtées en 2016 pour des problèmes d'efficacité du traitement comparé au placebo qui semblait avoir un effet. Les résultats de ces études n'ont pas encore été publiés.

Il reste à savoir quand traiter et pour combien de temps. En effet, l'activité du GABA évolue au cours du développement, le GABA étant excitateur à la naissance pour devenir ensuite inhibiteur après des changements d'expression d'échangeurs d'ions régulant les concentrations intra et extracellulaires d'ions chlorure. Il faudra analyser ces changements d'expression dans un contexte T21 avant de traiter des nouveau-nés porteurs de T21. Enfin nos données préliminaires semblent montrer qu'une seule injection d' $\alpha 5$ IA induit des effets sur le comportement et sur la potentialisation à long terme qui persistent au moins une semaine après l'injection aigue.

Etudes précliniques chez les souris modèles de trisomie 21 ^{22,23,29,30}		Etudes cliniques chez les individus porteurs de trisomie 21
 <p>Triazolophthalazine α5-GABA Alnerverse Agonist (α5-1A)</p>	 <p>RO4938581</p>	 <p>RO5186582, RG-1662, Basmisanil</p>
Effets pharmacologiques	Effets pharmacologiques	
Promnésiant (piscine de Morris) ²⁴	Promnésiant (piscine de Morris) ²⁸	Etude d'imagerie cérébrale pour mesurer l'occupation des récepteurs GABA _{α5} après une dose unique de RO5186582 chez des volontaires sains japonais (NCT01667367, finie pas de résultats)
Promnésiant (reconnaissance de nouvel objet) ²⁴	Non fait	Protocole d'évaluation d'adultes et d'adolescents porteurs de trisomy 21 pour inclusion dans les études ultérieures avec le RG-1662 (NCT01920633) ⁴⁵
Non anxiogène ²⁴	Non anxiogène ²⁸	Etude de sécurité et de tolérabilité du RG1662 chez 35 individus de 18 à 35 ans porteurs de trisomie 21: multicentrique, randomisée, en double aveugle, avec placebo, multidoses, (NCT01436955, finie pas de résultats)
Non convulsivant ²⁴	Non convulsivant ²⁸	Etude du RG1662 dans 37 centres chez 173 adultes et adolescents de 12 à 30 ans porteurs de trisomie 21, à faible (120mg) ou forte (2410mg) dose ou placebo par voie orale deux fois par jours pendant 26 semaines (CLEMATIS, NCT02024789, fin en 2016)
Non proconvulsivant ²⁴	Non proconvulsivant ²⁸	
Restaure déficit de PLT (non publié)	Restaure déficit de PLT ²⁸	
En cours	Restaure déficit de neurogenèse ²⁸	
En cours	Restaure l'augmentation de neurones GABAergiques ²⁸	Etude du RG1662 chez 36 enfants de 6 à 11 ans porteurs de trisomy 21: sécurité, tolérabilité, efficacité, pharmacocinétique à 3 doses après 26 semaines de traitement (NCT02484703, en cours)

PLT : Potentialisation à Long Terme

FIG. 1. — Traitement de la trisomie 21 par diminution de la transmission GABAergique avec des agonistes inverse GABA $\alpha 5$: profil pharmacologique de ces molécules chez la souris Ts65Dn et études cliniques en cours chez les porteurs de trisomie 21.

LA MALADIE D'ALZHEIMER DANS LA TRISOMIE 21

Plus de 75 millions de personnes dans le monde pourraient avoir une maladie d'Alzheimer en 2030. Les individus porteurs d'une T21 sont les plus à risque pour développer une maladie d'Alzheimer après les cas familiaux apparaissant très tôt. Il serait donc possible de trouver des marqueurs précoces de la maladie d'Alzheimer chez les personnes porteuses de T21. Ainsi un marqueur sanguin prédictif de conversion vers une démence de type Alzheimer chez des personnes T21 a déjà été décrit [32]. Les essais cliniques récents contre la maladie d'Alzheimer visent des populations bien définies, en particulier les formes familiales ou les individus porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ du gène codant l'Apolipoprotéine E, facteur de risque génétique majeur pour la maladie d'Alzheimer. Cependant le nombre de ces cas est réduit et la population des personnes porteuses de T21 présentant une forme relativement « pure » de pathologie Alzheimer, sans pathologie vasculaire, pourrait faire l'objet d'études cliniques ciblées. Des publications récentes montrent l'effet bénéfique d'un traitement avec des modulateurs de sécrétase, le complexe enzymatique qui clive l'APP en peptides amyloïdes chez les souris Ts65Dn [33]. De plus une vaccination anti-A β traiterait les déficits cognitifs des souris Ts65Dn [34]. En cas de succès chez les personnes porteuses de T21, ces traitements pourront être appliqués à des cas sporadiques de maladie d'Alzheimer chez lesquels le dépôt d'amyloïde

peut être suivi par des symptômes cliniques après quelques décennies. Ainsi les études sur les trisomies 21 pourraient conduire à des ouvertures thérapeutiques pour les patients atteints de maladie d'Alzheimer sporadique, tout comme les études cliniques menées actuellement chez les sujets à risque portant une mutation familiale ou ceux porteurs de deux allèles Apo $\epsilon 4$.

ÉTUDE D'UN PHÉNOTYPE PRÉCOCE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER DANS LA TRISOMIE 21 : LA MORPHOLOGIE DES ENDOSOMES

En 2000, le groupe de Ralph Nixon à New-York montrait par immunohistochimie que certains neurones pyramidaux dans le cortex préfrontal de cerveaux *postmortem* de patients atteints de maladie d'Alzheimer et de personnes porteuses de T21 contenaient des endosomes de taille anormale qu'ils nommaient « endosomes élargis » [35]. Les expériences étaient réalisées avec des anticorps contre des protéines spécifiques des endosomes précoces (Rab5, une petite protéine G et EEAI pour Early Endosome Antigen1). Ce compartiment sub-cellulaire sert à internaliser des protéines membranaires ou des molécules extracellulaires qui iront ensuite vers des compartiments permettant leur dégradation, leur recyclage à la membrane ou leur sécrétion sous forme d'exosomes. Le compartiment endosomal est particulièrement important dans la maladie d'Alzheimer puisque c'est dans ce compartiment que l'APP est clivé par les β — et γ -secretases. Et en effet les endosomes élargis contiennent de l'A β . Dans la T21, depuis la gestation et jusqu'à l'âge adulte le nombre de neurones contenant des endosomes élargis augmente. De manière intéressante, ce phénotype est présent avant l'apparition de dépôts amyloïdes et est aussi retrouvé dans des cas familiaux de maladie d'Alzheimer avec des mutations sur le gène codant l'APP mais pas dans les cas avec des mutations dans la préséniline 1 et 2, composants du complexe γ -secretase [36]. Aussi les cellules endothéliales contiennent des endosomes élargis ainsi que les fibroblastes d'individus porteurs de T21.

Nous avons voulu savoir si le compartiment endosomal de cellules sanguines périphériques chez les individus porteurs de T21 était modifié, partant du principe que toute cellule de ces personnes porteuses de T21 complète comporte 3 Hsa21, un phénotype présent dans un type cellulaire devrait être retrouvé dans tout type cellulaire quand bien même les protéines responsables y sont exprimées. Ainsi nous avons montré que les endosomes de lymphocytes provenant d'individus porteurs de T21 ont une taille 2 fois plus élevée que des lymphocytes d'individus contrôles. Il en était de même des endosomes de lignées lymphoblastoïdes [37]. Une étude de corrélation génotype/phénotype sur 8 lignées lymphoblastoïdes provenant d'individus porteurs de T21 partielles a permis d'identifier un gène du Hsa21, SYNJ1 dont la surexpression était responsable de la présence d'endosomes élargis. Ce gène synaptojanine1 est une phosphatase qui déphosphoryle les phosphatidylinositol 4,5-biphosphate et aussi une protéine adaptatrice pour la nucléation des manteaux de clathrine. Cette découverte a été validée par trois types d'expériences :

i) la surexpression de SYNJ1 dans des cellules issues de neuroblastomes induit la formation d'endosomes élargis ; ii) l'analyse de cerveaux de souris transgéniques surexprimant la SYNJ1 montre la présence d'endosomes élargis dans le noyau septal médian ; iii) l'inhibition de l'expression de SYNJ1 dans des fibroblastes d'individus porteurs de T21 diminue la taille des endosomes et rétablit le phénotype « endosomes élargis ». Ainsi nous montrions que la surexpression de SYNJ1 modifie le compartiment endosomal dans lequel l'APP est clivé en peptides amyloïdes. Nous avons entrepris plusieurs études qui devraient nous mener vers la compréhension des effets de la surexpression de SYNJ1 dans le contexte de la T21 et aussi de la maladie d'Alzheimer : i) par l'étude de mutants de SYNJ1 ; ii) par la caractérisation de partenaires de SYNJ1 ; iii) par l'étude des effets de surexpression de SYNJ1 sur le clivage de l'APP.

Dans le contexte T21 et de la maladie d'Alzheimer les endosomes sont modifiés dans les cellules du système nerveux central. Dans le contexte T21 les endosomes sont également modifiés en périphérie leur conférant un potentiel de biomarqueur prédictif de l'évolution de la pathologie. Nous avons entrepris de savoir si des modifications similaires pouvaient être retrouvées dans des cellules périphériques chez des patients atteints de maladie d'Alzheimer.

Nous avons analysé les endosomes de lymphocytes de patients Alzheimer à différents stades de la maladie (le stade de troubles cognitifs légers ou Mild Cognitive Impairment —MCI et le stade de démence) par immunocytochimie. L'analyse de 23 contrôles, 25 Alzheimer-MCI et de 23 Alzheimer à un stade de démence nous a permis de montrer que le pourcentage d'endosomes de taille anormalement élevée est plus important chez les Alzheimer que chez les contrôles avec un effet graduel entre les prodromaux et les déments [38]. De plus le volume moyen des endosomes est corrélé à la rétention du composé PIB évaluant la charge amyloïde dans le cerveau des individus par imagerie TEP (Tomographie par Emission de Positons). Enfin nous montrons que les fibroblastes de 6 patients atteints de maladie d'Alzheimer sporadique contiennent des endosomes de taille anormalement élevée comparés aux fibroblastes de 5 contrôles. La présence d'endosomes élargis dans les cellules sanguines pourrait ainsi être un biomarqueur cellulaire précoce de la maladie d'Alzheimer et de la T21 (Figure 1).

La taille d'un endosome (environ 100-200 nm de diamètre) étant à la limite de résolution de la microscopie optique, nous avons voulu observer ces structures par microscopie super résolutive. Ces études sont en cours et montrent que les endosomes élargis seraient des amas d'endosomes de taille normale. Cette découverte pourrait avoir des implications quant aux mécanismes mis en jeu. En effet une augmentation de taille pourrait être due à une fusion anormale des vésicules d'endocytose observée lors de la surexpression de protéines cargo telle Rab5 activée par le GTP. La formation d'agrégats pourrait faire intervenir d'autres mécanismes en particulier des défauts de trafic mettant en jeu les réseaux d'actine ou de tubuline ou des protéines associées.

Pathologie	Neurones avec « endosomes élargis »	Cellules non neuronales avec « endosomes élargis »
MA familiale APP _{Swedish}	OUI ³⁵	OUI ³⁵ cellule endothéliales
MA familiale APP _{London}	OUI ³⁵	OUI ³⁵ cellule endothéliales
MA familiale APP _{Dutch}	OUI ³⁵	NON ³⁵ cellule endothéliales
MA familiale APP _{Flemish}	OUI ³⁵	OUI ³⁵ cellule endothéliales
MA familiale PS1	NON ³⁵	NON ³⁵ cellule endothéliales
MA familiale PS2	NON ³⁵	NON ³⁵ cellule endothéliales
MA sporadique	OUI ³⁴	OUI ³⁷ fibroblastes, globules blancs
Trisomie 21	OUI ³⁴	OUI ³⁶ fibroblastes, globules blancs

MA Maladie d'Alzheimer ;
 APP Amyloid Precursor Protein ;
 Swedish, London, Dutch et Flemish sont des mutations dans des formes familiales de MA ;
 PS1 et PS2 préséniline 1 et préséniline 2, composants du complexe γ -secrétase. En rouge ce que notre équipe a montré.

FIG. 2. — Pathologies montrant une modification du compartiment endosomal : un biomarqueur précoce de la maladie d'Alzheimer.

Des études très récentes montrent le rôle des protéines Rab5 activées dans les perturbations de la voie endolysosomale observées dans la maladie d'Alzheimer [39, 40]. Nos données sur les agrégats suggèrent que l'activation accrue de Rab5 dans un contexte T21 ne permettrait pas l'augmentation de fusion des endosomes précoces. Nous cherchons à identifier le mécanisme en aval de l'activation de Rab5 qui empêcherait la fusion des endosomes.

Nous avons mis en évidence une agrégation des endosomes de cellules dans lesquelles nous avons artificiellement augmenté le cholestérol membranaire [41, 42]. Ces changements de cholestérol membranaire conduisent aussi à un accroissement de l'internalisation de l'APP dans les endosomes ainsi qu'à une sécrétion d'A β accrue. Compte tenu des augmentations de cholestérol observées dans les cerveaux *postmortem* de patients atteints de maladie d'Alzheimer sporadique [43, 44], nous

suggérons ici un lien entre une modification du compartiment endosomal et le clivage de l'APP avec plusieurs causes : une augmentation de cholestérol membranaire, une surexpression de SYNJI.

CONCLUSIONS

La T21, découverte il y a presque 60 ans, reste la première cause génétique de retard mental. Il faut espérer qu'avec l'avancée spectaculaire des recherches en pharmacothérapie, les prochaines années verront la mise sur le marché de traitements des déficits cognitifs dès le plus jeune âge et de traitements préventifs des démences de type Alzheimer qui apparaissent chez un grand nombre de ces individus autour de 40 ans. Ces traitements pourraient être appliqués à d'autres retards mentaux et aux formes sporadiques de maladie d'Alzheimer. Reste à savoir si les récentes méthodes d'édition des génomes permettraient d'éteindre l'expression d'un des trois allèles de la T21 de manière efficace et sécurisée, au moins pour un certain nombre de gènes en 3 copies importants dans le phénotype T21.

RÉFÉRENCES

- [1] Lejeune J, Gautier M, Turpin R. [Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children.]. C R Hebd Seances Acad Sci. 1959;248(11):1721-2.
- [2] Coppus AM, Schuur M, Vergeer J, Janssens AC, Oostra BA, Verbeek MM, et al. Plasma beta amyloid and the risk of Alzheimer's disease in Down syndrome. Neurobiol Aging. 2012;33(9):1988-94.
- [3] Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. Science. 1992;256(5054):184-5.
- [4] Hartley SL, Handen BL, Devenny DA, Hardison R, Mihaila I, Price JC, et al. Cognitive functioning in relation to brain amyloid-beta in healthy adults with Down syndrome. Brain. 2014.
- [5] Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park HS, et al. The DNA sequence of human chromosome 21. Nature. 2000;405(6784):311-9.
- [6] Ait Yahya-Graison E, Aubert J, Dauphinot L, Rivals I, Prieur M, Golfier G, et al. Classification of human chromosome 21 gene-expression variations in Down syndrome: impact on disease phenotypes. Am J Hum Genet. 2007;81(3):475-91.
- [7] Epstein CJ, Cox DR, Epstein LB. Mouse trisomy 16: an animal model of human trisomy 21 (Down syndrome). Ann N Y Acad Sci. 1985;450:157-68.
- [8] Reeves RH, Irving NG, Moran TH, Wohn A, Kitt C, Sisodia SS, et al. A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. Nat Genet. 1995;11(2):177-84.
- [9] Choong XY, Tosh JL, Pulford LJ, Fisher EM. Dissecting Alzheimer disease in Down syndrome using mouse models. Front Behav Neurosci. 2015;9:268.
- [10] Herault Y, Duchon A, Velot E, Marechal D, Brault V. The *in vivo* Down syndrome genomic library in mouse. Prog Brain Res. 2012;197:169-97.

- [11] Lyle R, Bena F, Gagos S, Gehrig C, Lopez G, Schinzel A, et al. Genotype-phenotype correlations in Down syndrome identified by array CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21. *Eur J Hum Genet.* 2009; 17(4):454-66.
- [12] Becker W, Soppa U, Tejedor FJ. DYRK1A: a potential drug target for multiple Down syndrome neuropathologies. *CNS & neurological disorders drug targets.* 2014;13(1):26-33.
- [13] Bartesaghi R, Haydar TF, Delabar JM, Dierssen M, Martinez-Cue C, Bianchi DW. New Perspectives for the Rescue of Cognitive Disability in Down Syndrome. *J Neurosci.* 2015;35(41):13843-52.
- [14] De la Torre R, De Sola S, Pons M, Duchon A, de Lagran MM, Farre M, et al. Epigallocatechin-3-gallate, a DYRK1A inhibitor, rescues cognitive deficits in Down syndrome mouse models and in humans. *Molecular nutrition & food research.* 2014;58(2):278-88.
- [15] de la Torre R, de Sola S, Hernandez G, Farre M, Pujol J, Rodriguez J, et al. Safety and efficacy of cognitive training plus epigallocatechin-3-gallate in young adults with Down's syndrome (TESDAD): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet neurology.* 2016;15(8):801-10.
- [16] Kleschevnikov AM, Belichenko PV, Villar AJ, Epstein CJ, Malenka RC, Mobley WC. Hippocampal long-term potentiation suppressed by increased inhibition in the Ts65Dn mouse, a genetic model of Down syndrome. *J Neurosci.* 2004;24(37):8153-60.
- [17] Siarey RJ, Carlson EJ, Epstein CJ, Balbo A, Rapoport SI, Galdzicki Z. Increased synaptic depression in the Ts65Dn mouse, a model for mental retardation in Down syndrome. *Neuropharmacology.* 1999;38(12):1917-20.
- [18] Fernandez F, Morishita W, Zuniga E, Nguyen J, Blank M, Malenka RC, et al. Pharmacotherapy for cognitive impairment in a mouse model of Down syndrome. *Nature neuroscience.* 2007;10(4):411-3.
- [19] Rueda N, Florez J, Martinez-Cue C. Chronic pentylentetrazole but not donepezil treatment rescues spatial cognition in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Neuroscience letters.* 2008;433(1):22-7.
- [20] Potier MC, Prado de Carvalho L, Dodd RH, Besselievre R, Rossier J. In vivo binding of beta-carbolines in mice: regional differences and correlation of occupancy to pharmacological effects. *Molecular pharmacology.* 1988;34(2):124-8.
- [21] Venault P, Chapouthier G, de Carvalho LP, Simiand J, Morre M, Dodd RH, et al. Benzodiazepine impairs and beta-carboline enhances performance in learning and memory tasks. *Nature.* 1986;321(6073):864-6.
- [22] Mohler H. The legacy of the benzodiazepine receptor: from flumazenil to enhancing cognition in Down syndrome and social interaction in autism. *Advances in pharmacology.* 2015; 72:1-36.
- [23] Ballard TM, Knoflach F, Prinssen E, Borroni E, Vivian JA, Basile J, et al. RO4938581, a novel cognitive enhancer acting at GABAA alpha5 subunit-containing receptors. *Psychopharmacology (Berl).* 2009;202(1-3):207-23.
- [24] Dawson GR, Maubach KA, Collinson N, Cobain M, Everitt BJ, MacLeod AM, et al. An inverse agonist selective for alpha5 subunit-containing GABAA receptors enhances cognition. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;316(3):1335-45.
- [25] Braudeau J, Delatour B, Duchon A, Pereira PL, Dauphinot L, de Chaumont F, et al. Specific targeting of the GABA-A receptor alpha5 subtype by a selective inverse agonist restores cognitive deficits in Down syndrome mice. *J Psychopharmacol.* 2011;25(8):1030-42.
- [26] Braudeau J, Dauphinot L, Duchon A, Loistron A, Dodd RH, Hérault Y, et al. Chronic Treatment with a Promnesiant GABA-A alpha5-Selective Inverse Agonist Increases Immediate Early Genes Expression during Memory Processing in Mice and Rectifies Their Expression Levels in a Down Syndrome Mouse Model. *Adv Pharmacol Sci.* 2011;2011:153218.

- [27] Atack JR. Preclinical and clinical pharmacology of the GABAA receptor alpha5 subtype-selective inverse agonist alpha5IA. *Pharmacology & therapeutics*. 2010;125(1):11-26.
- [28] Nutt DJ, Besson M, Wilson SJ, Dawson GR, Lingford-Hughes AR. Blockade of alcohol's amnestic activity in humans by an alpha5 subtype benzodiazepine receptor inverse agonist. *Neuropharmacology*. 2007;53(7):810-20.
- [29] Martinez-Cue C, Martinez P, Rueda N, Vidal R, Garcia S, Vidal V, et al. Reducing GABAA alpha5 receptor-mediated inhibition rescues functional and neuromorphological deficits in a mouse model of down syndrome. *J Neurosci*. 2013;33(9):3953-66.
- [30] Martinez-Cue C, Delatour B, Potier MC. Treating enhanced GABAergic inhibition in Down syndrome: use of GABA alpha5-selective inverse agonists. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2014;46 Pt 2:218-27.
- [31] Potier MC, Braudeau J, Dauphinot L, Delatour B. Reducing GABAergic inhibition restores cognitive functions in a mouse model of Down syndrome. *CNS & neurological disorders drug targets*. 2014;13(1):8-15.
- [32] Dekker AD, Coppus AM, Vermeiren Y, Aerts T, van Duijn CM, Kremer BP, et al. Serum MHPG Strongly Predicts Conversion to Alzheimer's Disease in Behaviorally Characterized Subjects with Down Syndrome. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2014.
- [33] Weissmiller AM, Natera-Naranjo O, Reyna SM, Pearn ML, Zhao X, Nguyen P, et al. A gamma-secretase inhibitor, but not a gamma-secretase modulator, induced defects in BDNF axonal trafficking and signaling: evidence for a role for APP. *PLoS One*. 2015;10(2):e0118379.
- [34] Belichenko PV, Madani R, Rey-Bellet L, Pihlgren M, Becker A, Plassard A, et al. An Anti-beta-Amyloid Vaccine for Treating Cognitive Deficits in a Mouse Model of Down Syndrome. *PLoS One*. 2016;11(3):e0152471.
- [35] Cataldo AM, Peterhoff CM, Troncoso JC, Gomez-Isla T, Hyman BT, Nixon RA. Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. *The American journal of pathology*. 2000;157(1):277-86.
- [36] Cataldo A, Rebeck GW, Ghetti B, Hulette C, Lippa C, Van Broeckhoven C, et al. Endocytic disturbances distinguish among subtypes of Alzheimer's disease and related disorders. *Ann Neurol*. 2001;50(5):661-5.
- [37] Cossec JC, Lavaur J, Berman DE, Rivals I, Hoischen A, Stora S, et al. Trisomy for Synaptojanin1 in Down syndrome is functionally linked to the enlargement of early endosomes. *Hum Mol Genet*. 2012.
- [38] Corlier F, Rivals I, Lagarde J, Hamelin L, Corne H, Dauphinot L, et al. Modifications of the endosomal compartment in peripheral blood mononuclear cells and fibroblasts from Alzheimer's disease patients. *Translational psychiatry*. 2015;5:e595.
- [39] Kim S, Sato Y, Mohan PS, Peterhoff C, Pensalfini A, Rigoglioso A, et al. Evidence that the rab5 effector APPL1 mediates APP-betaCTF-induced dysfunction of endosomes in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Molecular psychiatry*. 2015.
- [40] Xu W, Weissmiller AM, White JA, 2nd, Fang F, Wang X, Wu Y, et al. Amyloid precursor protein-mediated endocytic pathway disruption induces axonal dysfunction and neurodegeneration. *The Journal of clinical investigation*. 2016.
- [41] Marquer C, Devauges V, Cossec JC, Liot G, Lecart S, Saudou F, et al. Local cholesterol increase triggers amyloid precursor protein-Bace1 clustering in lipid rafts and rapid endocytosis. *FASEB J*. 2011;25(4):1295-305.
- [42] Marquer C, Laine J, Dauphinot L, Hanbouch L, Lemercier-Neuillet C, Pierrot N, et al. Increasing membrane cholesterol of neurons in culture recapitulates Alzheimer's disease early phenotypes. *Molecular neurodegeneration*. 2014;9:60.

- [43] Lazar AN, Bich C, Panchal M, Desbenoit N, Petit VW, Touboul D, et al. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS) imaging reveals cholesterol overload in the cerebral cortex of Alzheimer disease patients. *Acta Neuropathol.* 2012;125(1):133-44.
- [44] Panchal M, Loeper J, Cossec JC, Perruchini C, Lazar A, Pompon D, et al. Enrichment of cholesterol in microdissected Alzheimer's disease senile plaques as assessed by mass spectrometry. *J Lipid Res.* 2010;51(3):598-605.
- [45] Liogier d'Ardhuy X, Edgin JO, Bouis C, de Sola S, Goeldner C, Kishnani P, et al. Assessment of Cognitive Scales to Examine Memory, Executive Function and Language in Individuals with Down Syndrome: Implications of a 6-month Observational Study. *Front Behav Neurosci.* 2015;9:300.

DISCUSSION

M. Jean-Pierre OLIÉ

Le modèle murin indique l'effet promnésiant des agonistes inverses GABA capables de corriger l'éventuel excès de GABA : comment passez-vous d'une observation d'effet promnésiant à la notion de correction de déficits cognitifs de la trisomie 21 ?

Les agonistes inverses GABA α 5 sont promnésiants c'est-à-dire qu'ils augmentent les capacité d'apprentissage et de mémorisation chez des souris, des rats, des primates non humains sans pathologie. Dans le modèle de trisomie 21, nous avons montré que l'agoniste inverse GABA α 5 non seulement corrige les déficits GABA dans ce modèle mais a aussi une activité supplémentaire promnésiante de sorte que les souris contrôles traitées apprennent mieux que celles non traitées, et les souris trisomiques traitées montrent les même performances que les souris contrôles traitées dans le test de reconnaissance de nouvel objet. Ce résultat est remarquable car il y a additivité des effets thérapeutique qui corrigeraient la sur-inhibition GABAergique et promnésiant.

M. Jean-Jacques HAUW

Vous avez montré que la proportion de cellules sanguines comportant des agrégats d'endosomes élargis est élevée dans la trisomie 21 et la maladie d'Alzheimer. Ce test pourrait-il être utilisé pour le diagnostic de cette maladie ?

Nous montrons une augmentation de la taille des endosomes dans les cellules sanguines de patients atteints de maladie d'Alzheimer et chez les individus porteurs de trisomie 21. Cependant les agrégats n'ont été identifiés que dans la trisomie 21. Nous sommes actuellement entrain de réaliser les mêmes études chez des patients atteints de maladie d'Alzheimer.

Le test que nous avons développé serait difficilement utilisable en routine. En effet il faut partir de prélèvements de sang frais, récupérer les cellules et procéder à une immunocytochimie et une analyse d'image poussée, le tout prenant au moins 48H. Nous cherchons actuellement à trouver des modifications d'internalisation de ligands fluorescents détectables plus facilement dans des trieurs de cellules ou des différences d'expression de protéines d'endocytose plus faciles à quantifier par exemple par ELISA.

Les agrégats d'endosomes élargis que vous avez décrits sont liés au métabolisme du peptide A β . Sont-ils aussi en rapport avec les troubles du métabolisme de la protéine tau qui sont aussi caractéristiques de la maladie d'Alzheimer ?

Nous avons montré en effet que les modifications des endosomes sont corrélées à la charge amyloïde dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer. Nous n'avons pas trouvé de corrélation entre le niveau d'augmentation de taille des endosomes et les quantités de protéines tau phosphorylées dans le liquide céphalo rachidien.

M. Jean-Daniel SRAER

Qu'est-ce que la microscopie hautement résolutive ?

La microscopie à super-résolution permet d'imager en microscopie optique des objets de l'ordre du nanomètre. La technique que nous avons utilisée est la microscopie SIM basée sur l'utilisation d'une illumination structurée sinusoïdale des fluorophores. On obtient ainsi trois patrons d'illumination indépendants qui sont utilisés pour obtenir des informations super-résolues. La reconstruction des images par transformation de Fourier donne une image super-résolue de l'échantillon avec un gain d'un facteur 8 en volume. On peut ainsi détecter des endosomes d'une centaine de nanomètres. Cette technique nous a permis d'identifier des groupements d'endosomes qui n'avaient pas été vus en microscopie confocale classique.

M. Patrice QUENEAU

Quelle structure scientifique a coordonné l'étude et en a validé la méthodologie ?

L'étude des endosomes dans la maladie d'Alzheimer et la trisomie 21 a été réalisée sur une cohorte de patients atteints de maladie d'Alzheimer de l'Institut de la Mémoire et de la Maladie d'Alzheimer à la Pitié-Salpêtrière (Professeur Dubois) en collaboration avec l'Hôpital Sainte-Anne (Professeur Marie Sarazin). Les personnes porteuses de trisomie 21 venaient de l'Institut Médical Jérôme Lejeune. La description des patients, les valeurs des biomarqueurs du LCR et d'imagerie ont été fondamentaux pour définir les groupes contrôles, Alzheimer ou avec un déclin cognitif léger.

Cet essai clinique était-il le premier de ce type avec cette molécule ?

L'essai clinique avec l'agoniste inverse GABA α 5 était le premier réalisé par un grand groupe pharmaceutique chez des personnes porteuses de trisomie 21. 173 adultes et adolescents de 12 à 30 ans ont été traités dans 37 centres de par le monde.

Vous avez souligné avec regret que l'essai thérapeutique auquel vous avez fait référence a été interrompu inopinément par la firme pharmaceutique soutenant cette étude. Pouvez-vous nous préciser si cette firme était alors au courant de résultats partiels ou intermédiaires, qui auraient pu éventuellement influencer sa décision en raison d'une efficacité décevante de la molécule et/ou d'éventuels effets indésirables qui lui soient imputables ?

Nous n'avons pas d'informations, seul un communiqué a été publié ne précisant pas les raisons de l'arrêt de l'essai clinique. Ce pourrait être un problème de toxicité ou de manque d'efficacité. Il semblerait que ce soit le manque d'efficacité qui ne serait pas surprenant compte tenu du protocole incluant 4 à 5 personnes par centre dans 37 centres de par le monde et la difficulté d'évaluer les capacités cognitives et d'adaptation chez les

individus porteurs de trisomie 21 qui sont déjà à la base très variables. Il faudra attendre la publication des résultats. D'autre part la molécule passée en clinique n'est pas celle sur laquelle Roche a publié les études précliniques dans le modèle de souris trisomiques mais une autre de structure chimique très différente. Actuellement on ne sait pas si la préclinique a été réalisée avec cette autre molécule.

M. Jacques BATTIN

Dans les cohortes d'essais thérapeutiques qui s'annoncent, il conviendra de tenir compte de la variabilité des facultés cognitives de la trisomie 21, surtout pendant les quatre premières années de la vie, le QI dépend du QI des parents suivant le nombre de Gauss, la qualité de la stimulation et de l'éventualité d'un mosaïsme qui réclame d'examiner au moins une centaine de cellules sanguines. Le mosaïsme peut concerner les organes, comme le montre la culture des fibroblastes. Donc veiller à la variabilité phénotypique.

La variabilité phénotypique est en effet importante à prendre en compte. Il ne semble pas que les trisomies 21 en mosaïque aient été incluses dans cette étude. Dans cette première étude, seuls des adolescents et des adultes ont été inclus. Cependant ils comptaient poursuivre par une deuxième étude chez des enfants de 6 à 11 ans qui a aussi été arrêtée.

