



**HAL**  
open science

# Évaluation des performances analytique et diagnostique du dosage des biomarqueurs Tau, P-Tau, $A\beta_{42}$ et $A\beta_{40}$ dans le liquide cébrospinal sur l'automate LUMIPULSE® G600II au CHU de Rouen

Aurélie Gesland

► **To cite this version:**

Aurélie Gesland. Évaluation des performances analytique et diagnostique du dosage des biomarqueurs Tau, P-Tau,  $A\beta_{42}$  et  $A\beta_{40}$  dans le liquide cébrospinal sur l'automate LUMIPULSE® G600II au CHU de Rouen. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-03209852

**HAL Id: dumas-03209852**

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03209852v1>

Submitted on 27 Apr 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.

**UNIVERSITE DE ROUEN NORMANDIE**  
**UFR SANTE – Département PHARMACIE**

Année 2020

N°

**THESE**  
**pour le DIPLOME D’ETAT DE DOCTEUR EN**  
**PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement le 28 Avril 2020

par

Aurélie GESLAND

Née le 05/08/1991 à Rouen

**Evaluation des performances analytique et diagnostique  
du dosage des biomarqueurs Tau, P-Tau, A $\beta$ 42 et A $\beta$ 40  
dans le liquide cébrospinal sur l’automate  
LUMIPULSE® G600II au CHU de Rouen.**

Président du jury : Pr Loïc FAVENNEC, PU-PH  
Directeur de thèse : Dr Muriel QUILLARD - MURAINÉ, MCU-PH  
Membres du jury : Pr Oliver MARTINAUD, PU-PH  
Dr Valéry BRUNEL, PH  
Dr David WALLON, MCU-PH



L'Université de Rouen et l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse. Ces opinions sont propres à leurs auteurs.

**ANNEE UNIVERSITAIRE 2019 - 2020**

**U.F.R. SANTÉ DE ROUEN**

-----

DOYEN : **Professeur Benoît VEBER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**  
**Professeur Agnès LIARD-ZMUDA**  
**Professeur Guillaume SAVOYE**

|                     |
|---------------------|
| <b>I - MEDECINE</b> |
|---------------------|

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS**

|                                    |       |   |
|------------------------------------|-------|---|
| Mr Frédéric <b>ANSELME</b>         | HCN   | Cardiologie                                 |
| Mme Gisèle <b>APTER</b>            | Havre | Pédopsychiatrie                             |
| Mme Isabelle <b>AUQUIT AUCKBUR</b> | HCN   | Chirurgie plastique                         |
| Mr Jean-Marc <b>BASTE</b>          | HCN   | Chirurgie Thoracique                        |
| Mr Fabrice <b>BAUER</b>            | HCN   | Cardiologie                                 |
| Mme Soumeya <b>BEKRI</b>           | HCN   | Biochimie et biologie moléculaire           |
| Mr Ygal <b>BENHAMOU</b>            | HCN   | Médecine interne                            |
| Mr Jacques <b>BENICHOU</b>         | HCN   | Bio statistiques et informatique médicale   |
| Mr Olivier <b>BOYER</b>            | UFR   | Immunologie                                 |
| Mme Sophie <b>CANDON</b>           | HCN   | Immunologie                                 |
| Mr François <b>CARON</b>           | HCN   | Maladies infectieuses et tropicales         |
| Mr Philippe <b>CHASSAGNE</b>       | HCN   | Médecine interne (gériatrie)                |
| Mr Vincent <b>COMPERE</b>          | HCN   | Anesthésiologie et réanimation chirurgicale |
| Mr Jean-Nicolas <b>CORNU</b>       | HCN   | Urologie                                    |
| Mr Antoine <b>CUVELIER</b>         | HB    | Pneumologie                                 |

|  |        |  |
|--|--------|--|
| Mr Jean-Nicolas <b>DACHER</b>                | HCN    | Radiologie et imagerie médicale                      |
| Mr Stéfan <b>DARMONI</b>                     | HCN    | Informatique médicale et techniques de communication |
| Mr Pierre <b>DECHELOTTE</b>                  | HCN    | Nutrition  |
| Mr Stéphane <b>DERREY</b>                    | HCN    | Neurochirurgie                                       |
| Mr Frédéric <b>DI FIORE</b>                  | HCH-CB | Cancérologie   |
| Mr Fabien <b>DOGUET</b>                      | HCN    | Chirurgie Cardio Vasculaire                          |
| Mr Jean <b>DOUCET</b>                        | SJ     | Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie        |
| Mr Bernard <b>DUBRAY</b>                     | CB     | Radiothérapie  |
| Mr Frank <b>DUJARDIN</b>                     | HCN    | Chirurgie orthopédique - Traumatologique             |
| Mr Fabrice <b>DUPARC</b>                     | HCN    | Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique |
| Mr Eric <b>DURAND</b>                        | HCN    | Cardiologie  |
| Mr Bertrand <b>DUREUIL</b>                   | HCN    | Anesthésiologie et réanimation chirurgicale          |
| Mme Hélène <b>ELTCHANINOFF</b>               | HCN    | Cardiologie  |
| Mr Manuel <b>ETIENNE</b>                     | HCN    | Maladies infectieuses et tropicales                  |
| Mr Thierry <b>FREBOURG</b>                   | UFR    | Génétique  |
| Mr Pierre <b>FREGER</b> ( <i>surnombre</i> ) | HCN    | Anatomie - Neurochirurgie                            |
| Mr Jean François <b>GEHANNO</b>              | HCN    | Médecine et santé au travail                         |
| Mr Emmanuel <b>GERARDIN</b>                  | HCN    | Imagerie médicale                                    |
| Mme Priscille <b>GERARDIN</b>                | HCN    | Pédopsychiatrie                                      |
| M. Guillaume <b>GOURCEROL</b>                | HCN    | Physiologie  |
| Mr Dominique <b>GUERROT</b>                  | HCN    | Néphrologie  |
| Mr Olivier <b>GUILLIN</b>                    | HCN    | Psychiatrie Adultes                                  |
| Mr Claude <b>HOUDAYER</b>                    | HCN    | Génétique  |
| Mr Fabrice <b>JARDIN</b>                     | CB     | Hématologie  |
| Mr Luc-Marie <b>JOLY</b>                     | HCN    | Médecine d'urgence                                   |
| Mr Pascal <b>JOLY</b>                        | HCN    | Dermato – Vénérologie                                |
| Mme Bouchra <b>LAMIA</b>                     | Havre  | Pneumologie  |
| Mme Annie <b>LAQUERRIERE</b>                 | HCN    | Anatomie et cytologie pathologiques                  |
| Mr Vincent <b>LAUDENBACH</b>                 | HCN    | Anesthésie et réanimation chirurgicale               |
| Mr Joël <b>LECHEVALLIER</b>                  | HCN    | Chirurgie infantile                                  |
| Mr Hervé <b>LEFEBVRE</b>                     | HB     | Endocrinologie et maladies métaboliques              |
| Mr Thierry <b>LEQUERRE</b>                   | HB     | Rhumatologie   |

|  |     |   |
|--|-----|---|
| Mme Anne-Marie <b>LEROI</b>                              | HCN | Physiologie                                     |
| Mr Hervé <b>LEVESQUE</b>                                 | HB  | Médecine interne                                |
| Mme Agnès <b>LIARD-ZMUDA</b>                             | HCN | Chirurgie Infantile                             |
| Mr Pierre Yves <b>LITZLER</b>                            | HCN | Chirurgie cardiaque                             |
| Mr Bertrand <b>MACE</b>                                  | HCN | Histologie, embryologie, cytogénétique          |
| M. David <b>MALTETE</b>                                  | HCN | Neurologie                                      |
| Mr Christophe <b>MARGUET</b>                             | HCN | Pédiatrie                                       |
| Mme Isabelle <b>MARIE</b>                                | HB  | Médecine interne                                |
| Mr Jean-Paul <b>MARIE</b>                                | HCN | Oto-rhino-laryngologie                          |
| Mr Loïc <b>MARPEAU</b>                                   | HCN | Gynécologie - Obstétrique                       |
| Mr Stéphane <b>MARRET</b>                                | HCN | Pédiatrie                                       |
| Mme Véronique <b>MERLE</b>                               | HCN | Epidémiologie                                   |
| Mr Pierre <b>MICHEL</b>                                  | HCN | Hépto-gastro-entérologie                        |
| M. Benoit <b>MISSET</b> ( <i>détachement</i> )           | HCN | Réanimation Médicale                            |
| Mr Marc <b>MURAINÉ</b>                                   | HCN | Ophthalmologie                                  |
| Mr Christophe <b>PEILLON</b>                             | HCN | Chirurgie générale                              |
| Mr Christian <b>PFISTER</b>                              | HCN | Urologie  |
| Mr Jean-Christophe <b>PLANTIER</b>                       | HCN | Bactériologie - Virologie                       |
| Mr Didier <b>PLISSONNIER</b>                             | HCN | Chirurgie vasculaire                            |
| Mr Gaëtan <b>PREVOST</b>                                 | HCN | Endocrinologie                                  |
| Mr Jean-Christophe <b>RICHARD</b> ( <i>détachement</i> ) | HCN | Réanimation médicale - Médecine d'urgence       |
| Mr Vincent <b>RICHARD</b>                                | UFR | Pharmacologie                                   |
| Mme Nathalie <b>RIVES</b>                                | HCN | Biologie du développement et de la reproduction |
| Mr Horace <b>ROMAN</b> ( <i>disponibilité</i> )          | HCN | Gynécologie - Obstétrique                       |
| Mr Jean-Christophe <b>SABOURIN</b>                       | HCN | Anatomie – Pathologie                           |
| Mr Mathieu <b>SALAUN</b>                                 | HCN | Pneumologie                                     |
| Mr Guillaume <b>SAVOYE</b>                               | HCN | Hépto-gastrologie                               |
| Mme Céline <b>SAVOYE-COLLET</b>                          | HCN | Imagerie médicale                               |
| Mme Pascale <b>SCHNEIDER</b>                             | HCN | Pédiatrie                                       |
| Mr Michel <b>SCOTTE</b>                                  | HCN | Chirurgie digestive                             |
| Mme Fabienne <b>TAMION</b>                               | HCN | Thérapeutique                                   |
| Mr Luc <b>THIBERVILLE</b>                                | HCN | Pneumologie                                     |

|  |     |  |
|--|-----|--|
| Mr Hervé <b>TILLY</b> ( <i>surnombre</i> ) | CB  | Hématologie et transfusion                 |
| M. Gilles <b>TOURNEL</b>                   | HCN | Médecine Légale                            |
| Mr Olivier <b>TROST</b>                    | HCN | Chirurgie Maxillo-Faciale                  |
| Mr Jean-Jacques <b>TUECH</b>               | HCN | Chirurgie digestive                        |
| Mr Benoît <b>VEBER</b>                     | HCN | Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale |
| Mr Pierre <b>VERA</b>                      | CB  | Biophysique et traitement de l'image       |
| Mr Eric <b>VERIN</b>                       | HB  | Service Santé Réadaptation                 |
| Mr Eric <b>VERSPYCK</b>                    | HCN | Gynécologie obstétrique                    |
| Mr Olivier <b>VITTECOQ</b>                 | HB  | Rhumatologie                               |
| Mme Marie-Laure <b>WELTER</b>              | HCN | Physiologie                                |

#### **MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS**

|  |     |                                     |
|--|-----|-------------------------------------|
| Mme Najate <b>ACHAMRAH</b>                     | HCN | Nutrition                           |
| Mme Noëlle <b>BARBIER-FREBOURG</b>             | HCN | Bactériologie – Virologie           |
| Mr Emmanuel <b>BESNIER</b>                     | HCN | Anesthésiologie - Réanimation       |
| Mme Carole <b>BRASSE LAGNEL</b>                | HCN | Biochimie                           |
| Mme Valérie <b>BRIDOUX HUYBRECHTS</b>          | HCN | Chirurgie Vasculaire                |
| Mr Gérard <b>BUCHONNET</b>                     | HCN | Hématologie                         |
| Mme Mireille <b>CASTANET</b>                   | HCN | Pédiatrie                           |
| Mme Nathalie <b>CHASTAN</b>                    | HCN | Neurophysiologie                    |
| Mr Moïse <b>COEFFIER</b>                       | HCN | Nutrition                           |
| Mr Serge <b>JACQUOT</b>                        | UFR | Immunologie                         |
| Mr Joël <b>LADNER</b>                          | HCN | Epidémiologie, économie de la santé |
| Mr Jean-Baptiste <b>LATOUCHE</b>               | UFR | Biologie cellulaire                 |
| M. Florent <b>MARGUET</b>                      | HCN | Histologie                          |
| Mme Chloé <b>MELCHIOR</b>                      | HCN | Gastroentérologie                   |
| Mr Thomas <b>MOUREZ</b> ( <i>détachement</i> ) | HCN | Virologie                           |
| Mr Gael <b>NICOLAS</b>                         | HCN | Génétique                           |



|   |     |                                   |
|---|-----|-----------------------------------|
| Mme Muriel <b>QUILLARD</b>              | HCN | Biochimie et biologie moléculaire |
| Mme Laëtitia <b>ROLLIN</b>              | HCN | Médecine du Travail               |
| Mme Pascale <b>SAUGIER-VEBER</b>        | HCN | Génétique                         |
| Mme Anne-Claire <b>TOBENAS-DUJARDIN</b> | HCN | Anatomie                          |
| Mr David <b>WALLON</b>                  | HCN | Neurologie                        |
| Mr Julien <b>WILS</b>                   | HCN | Pharmacologie                     |

**PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE**

|                                 |     |               |
|---------------------------------|-----|---------------|
| Mr Thierry <b>WABLE</b>         | UFR | Communication |
| Mme Mélanie <b>AUVRAY-HAMEL</b> | UFR | Anglais       |

## II - PHARMACIE

### PROFESSEURS

|   |                      |
|---|----------------------|
| Mr Jérémy <b>BELLIEN</b> (PU-PH)                  | Pharmacologie        |
| Mr Thierry <b>BESSON</b>                          | Chimie Thérapeutique |
| Mr Jean <b>COSTENTIN</b> (Professeur émérite)     | Pharmacologie        |
| Mme Isabelle <b>DUBUS</b>                         | Biochimie            |
| Mr Abdelhakim <b>EL OMRI</b>                      | Pharmacognosie       |
| Mr François <b>ESTOUR</b>                         | Chimie Organique     |
| Mr Loïc <b>FAVENNEC</b> (PU-PH)                   | Parasitologie        |
| Mr Jean Pierre <b>GOULLE</b> (Professeur émérite) | Toxicologie          |
| Mr Michel <b>GUERBET</b>                          | Toxicologie          |
| Mme Christelle <b>MONTEIL</b>                     | Toxicologie          |
| Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b> (PU-PH)           | Microbiologie        |
| Mr Rémi <b>VARIN</b> (PU-PH)                      | Pharmacie clinique   |
| Mr Jean-Marie <b>VAUGEOIS</b>                     | Pharmacologie        |
| Mr Philippe <b>VERITE</b>                         | Chimie analytique    |

### MAITRES DE CONFERENCES

|  |  |
|--|--|
| Mme Cécile <b>BARBOT</b>                   | Chimie Générale et Minérale                        |
| Mr Frédéric <b>BOUNOURE</b>                | Pharmacie Galénique                                |
| Mr Thomas <b>CASTANHEIRO-MATIAS</b>        | Chimie Organique                                   |
| Mr Abdeslam <b>CHAGRAOUI</b>               | Physiologie  |
| Mme Camille <b>CHARBONNIER (LE CLEZIO)</b> | Statistiques                                       |
| Mme Elizabeth <b>CHOSSON</b>               | Botanique  |
| Mme Marie Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b>   | Législation pharmaceutique et économie de la santé |

|                                       |                              |
|---------------------------------------|------------------------------|
| Mme Cécile <b>CORBIERE</b>            | Biochimie                    |
| Mme Nathalie <b>DOURMAP</b>           | Pharmacologie                |
| Mme Isabelle <b>DUBUC</b>             | Pharmacologie                |
| Mme Dominique <b>DUTERTE- BOUCHER</b> | Pharmacologie                |
| Mr Gilles <b>GARGALA</b> (MCU-PH)     | Parasitologie                |
| Mme Nejla EL <b>GHARBI-HAMZA</b>      | Chimie analytique            |
| Mme Marie-Laure <b>GROULT</b>         | Botanique                    |
| Mr Hervé <b>HUE</b>                   | Biophysique et mathématiques |
| Mme Hong <b>LU</b>                    | Biologie                     |
| Mme Marine <b>MALLETER</b>            | Toxicologie                  |
| M. Jérémie <b>MARTINET</b> (MCU-PH)   | Immunologie                  |
| Mme Marine <b>MALLETER</b>            | Toxicologie                  |
| Mme Tiphaine <b>ROGEZ-FLORENT</b>     | Chimie analytique            |
| Mr Mohamed <b>SKIBA</b>               | Pharmacie galénique          |
| Mme Malika <b>SKIBA</b>               | Pharmacie galénique          |
| Mme Christine <b>THARASSE</b>         | Chimie thérapeutique         |
| Mr Frédéric <b>ZIEGLER</b>            | Biochimie                    |

#### **PROFESSEURS ASSOCIES**

|                                   |                      |
|-----------------------------------|----------------------|
| Mme Cécile <b>GUERARD-DETUNCQ</b> | Pharmacie officinale |
| Mme Caroline <b>BERTOUX</b>       | Pharmacie            |

#### **PAU-PH**

M. Mikaël **DAOUPHARS**

#### **PROFESSEUR CERTIFIE**

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| Mme Mathilde <b>GUERIN</b> | Anglais |
|----------------------------|---------|

#### **ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE**

|                         |           |
|-------------------------|-----------|
| Mme Alice <b>MOISAN</b> | Virologie |
| M. Henri <b>GONDÉ</b>   | Pharmacie |

**ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE**

M. Abdel **MOUHAJIR**

Parasitologie

M. Maxime **GRAND**

Bactériologie

## LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

|  |                                     |
|--|-------------------------------------|
| Mme Cécile <b>BARBOT</b>                 | Chimie Générale et minérale         |
| Mr Thierry <b>BESSON</b>                 | Chimie thérapeutique                |
| Mr Abdeslam <b>CHAGRAOUI</b>             | Physiologie                         |
| Mme Elisabeth <b>CHOSSON</b>             | Botanique                           |
| Mme Marie-Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b> | Législation et économie de la santé |
| Mme Isabelle <b>DUBUS</b>                | Biochimie                           |
| Mr Abdelhakim <b>ELOMRI</b>              | Pharmacognosie                      |
| Mr Loïc <b>FAVENNEC</b>                  | Parasitologie                       |
| Mr Michel <b>GUERBET</b>                 | Toxicologie                         |
| Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b>          | Microbiologie                       |
| Mr Mohamed <b>SKIBA</b>                  | Pharmacie galénique                 |
| Mr Rémi <b>VARIN</b>                     | Pharmacie clinique                  |
| M. Jean-Marie <b>VAUGEOIS</b>            | Pharmacologie                       |
| Mr Philippe <b>VERITE</b>                | Chimie analytique                   |

### III – MEDECINE GENERALE

#### PROFESSEUR DES UNIVERSITES MEDECIN GENERALISTE

Mr Jean-Loup **HERMIL** (PU-MG) UFR Médecine générale

#### MAITRE DE CONFERENCE DES UNIVERSITES MEDECIN GENERALISTE

Mr Matthieu **SCHUERS** (MCU-MG) UFR Médecine générale

#### PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTE

Mr Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine Générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN** UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX** UFR Médecine générale

#### MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTES

Mr Pascal **BOULET** UFR Médecine générale

Mme Laëtitia **BOURDON** UFR Médecine Générale

Mr Emmanuel **HAZARD** UFR Médecine Générale

Mme Lucile **PELLERIN** UFR Médecine générale

## ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

### PROFESSEURS

|                              |                        |
|------------------------------|------------------------|
| Mr Paul <b>MULDER</b> (phar) | Sciences du Médicament |
| Mme Su <b>RUAN</b> (med)     | Génie Informatique     |

### MAITRES DE CONFERENCES

|  |  |
|--|--|
| Mr Sahil <b>ADRIOUCH</b> (med)             | Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905) |
| Mme Gaëlle <b>BOUGEARD-DENOYELLE</b> (med) | Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)         |
| Mme Carine <b>CLEREN</b> (med)             | Neurosciences (Néovasc)                              |
| M. Sylvain <b>FRAINEAU</b> (med)           | Physiologie (Inserm U 1096)                          |
| Mme Pascaline <b>GAILDRAT</b> (med)        | Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)             |
| Mr Nicolas <b>GUEROUT</b> (med)            | Chirurgie Expérimentale                              |
| Mme Rachel <b>LETELLIER</b> (med)          | Physiologie  |
| Mr Antoine <b>OUVRARD-PASCAUD</b> (med)    | Physiologie (Unité Inserm 1076)                      |
| Mr Frédéric <b>PASQUET</b>                 | Sciences du langage, orthophonie                     |
| Mme Christine <b>RONDANINO</b> (med)       | Physiologie de la reproduction                       |
| Mr Youssan Var <b>TAN</b>                  | Immunologie  |
| Mme Isabelle <b>TOURNIER</b> (med)         | Biochimie (UMR 1079)                                 |

### **CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE**

*HCN - Hôpital Charles Nicolle*

*CB - Centre Henri Becquerel*

*CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation*

*HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME*

*CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray*

*SJ - Saint Julien Rouen*

# Table des matières

|  |    |
|--|----|
| LISTE DES ABREVIATIONS .....   | 17 |
| INDEX DES TABLEAUX .....   | 19 |
| INDEX DES FIGURES .....  | 20 |
| I. INTRODUCTION.....   | 22 |
| 1.1 Epidémiologie.....   | 23 |
| 1.2 Neurophysiopathologie.....   | 25 |
| 1.2.1 Les plaques amyloïdes et la cascade amyloïde .....                         | 26 |
| 1.2.1.1 Les plaques amyloïdes .....  | 26 |
| 1.2.1.2 La cascade amyloïde .....  | 28 |
| 1.2.2 Les dégénérescences neurofibrillaires et la protéine Tau.....              | 31 |
| 1.2.3 Dynamique hypothétique d’installation des lésions.....                     | 34 |
| 1.3 Clinique .....   | 37 |
| 1.4 Imagerie.....  | 38 |
| 1.5 Les principaux marqueurs biologiques du LCS .....                            | 40 |
| 1.5.1 Place des biomarqueurs du LCS dans le diagnostic de la MA.....             | 40 |
| 1.5.2 Profil biologique du LCS compatible avec une MA .....                      | 42 |
| 1.5.3 Aspects pré-analytiques des dosages des biomarqueurs dans le LCS.....      | 46 |
| 1.5.4 Méthodes de dosage .....   | 48 |
| 1.5.4.1 Techniques ELISA manuelles INNOTEST® .....                               | 48 |
| 1.5.4.2 Technique automatisée LUMIPULSE® G600II.....                             | 52 |
| 1.5.4.3 Autres méthodes commercialisées pour le dosage des BM du LCS.....        | 55 |
| 1.5.4.4 Facteurs de variabilité analytique .....                                 | 55 |
| 1.5.4.5 Matériaux de référence certifiés (CRM).....                              | 56 |
| 1.5.5 Interprétation des biomarqueurs du LCS : ratios et outils facilitants..... | 56 |
| 1.5.6 Prise en charge basée sur l’interprétation des biomarqueurs du LCS .....   | 59 |
| 1.6 Les autres biomarqueurs dans le LCS .....                                    | 60 |
| 1.7 Les biomarqueurs sanguins .....  | 61 |
| 1.8 Objectifs de l’étude.....  | 64 |
| II. MATERIELS ET METHODES .....  | 65 |
| 2.1 Matériel.....  | 65 |
| 2.1.1 Phase pré-analytique .....   | 65 |
| 2.1.2 Phase analytique .....   | 65 |
| 2.2 Méthodologie.....  | 65 |



|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 2.2.1 | Population d'étude.....   | 65  |
| 2.2.2 | Sélection des patients .....  | 66  |
| 2.2.3 | Variables étudiées .....  | 68  |
| 2.3   | Analyse statistique.....  | 68  |
| III.  | Résultats .....   | 70  |
| 3.1   | Performances analytiques .....  | 70  |
| 3.1.1 | Etude de répétabilité.....  | 70  |
| 3.1.2 | Etude de fidélité intermédiaire .....   | 72  |
| 3.2   | Etude de corrélation.....   | 73  |
| 3.2.1 | Tau totale.....   | 74  |
| 3.2.2 | P-Tau .....   | 75  |
| 3.2.3 | A $\beta$ 42.....   | 76  |
| 3.2.4 | A $\beta$ 40.....   | 77  |
| 3.2.5 | Rapport A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 .....   | 78  |
| 3.2.6 | Rapport A $\beta$ 42/P-Tau .....  | 79  |
| 3.3   | Comparaisons des techniques par la méthode de Bland et Altman.....  | 81  |
| 3.3.1 | Tau totale.....   | 82  |
| 3.3.2 | P-Tau .....   | 84  |
| 3.3.3 | A $\beta$ 42.....   | 85  |
| 3.3.4 | A $\beta$ 40.....   | 86  |
| 3.4   | Etude comparative des groupes selon le diagnostic avant PL : démographie et dosage des marqueurs en LUMIPULSE ..... | 88  |
| 3.5   | Courbes ROC.....  | 93  |
| 3.5.1 | Tau.....  | 94  |
| 3.5.2 | P-Tau .....   | 95  |
| 3.5.3 | A $\beta$ 42.....   | 96  |
| 3.5.4 | A $\beta$ 40.....   | 97  |
| 3.5.5 | Rapport A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 .....   | 98  |
| 3.5.6 | Rapport A $\beta$ 42/P-Tau .....  | 99  |
| 3.6   | Etude de concordance .....  | 102 |
| 3.6.1 | Test Kappa selon Cohen.....   | 102 |
| IV.   | Discussion .....  | 109 |
| V.    | Conclusion.....   | 121 |
| VI.   | Références bibliographiques et sitographiques .....   | 122 |
| VII.  | Annexes.....  | 135 |

# LISTE DES ABREVIATIONS

A $\beta$  : Peptide b $\beta$ ta amyloïde

A $\beta$ 40 : Peptide b $\beta$ ta amyloïde de 40 acides aminés

A $\beta$ 42 : Peptide b $\beta$ ta amyloïde de 42 acides aminés

APP : Amyloid Precursor Protein

AUC : Area Under the Curve (Aire sous la courbe)

CE : Conformité Européenne

CIQ : Contrôles Internes de Qualité

CLEIA : Chemi-Luminescent Enzyme Immuno-Assay

COFRAC : Comité Français d'Accréditation

CRM : Certified Reference Material

CV : Coefficient de Variation

DFT : Dégénérescences fronto-temporales

DNF : Dégénérescences neurofibrillaires

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

ET : Ecart-Type

HAS : Haute Autorité de Santé

ICC : Coefficient de corrélation intra-classe

IFCC : International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

IVD : In Vitro Diagnostic

LCS : Liquide Cérébro-Spinal

MA : Maladie d'Alzheimer

MCI : Mild Cognitive Impairment

MCL : Maladie à Corps de Lewy

MMSE : Mini Mental State Evaluation

NIA-AA : National Institute on Aging - Alzheimer's Association

NINCDS-ADRDA : National Institute of Neurological and communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association

PL : Ponction Lominaire

P-Tau : Protéine Tau phosphorylée en position 181

ROC : Receiver Operating Characteristic

RUO : Research Use Only

Tau : Tubulin associated unit (Protéine Tau totale)

TCM : Troubles Cognitifs Majeurs

TEP : Tomographie par Emission de Positons

# INDEX DES TABLEAUX

|   |     |
|---|-----|
| Tableau I : Caractéristiques analytiques des tests INNOTEST®.....   | 52  |
| Tableau II : Caractéristiques analytiques des tests LUMIPULSE® .....  | 54  |
| Tableau III : Etude de répétabilité des dosages Tau, P-Tau, A $\beta$ 42, A $\beta$ 40 sur l'automate LUMIPULSE® G600 II.....   | 71  |
| Tableau IV : Etude de fidélité intermédiaire des dosages Tau, P-Tau, A $\beta$ 42, A $\beta$ 40 sur l'automate LUMIPULSE® G600 II .....   | 72  |
| Tableau V : Récapitulatif des seuils INNOTEST® (IT) précédemment utilisés au laboratoire et des seuils calculés correspondants pour le LUMIPULSE® (LP), équations des droites de régression linéaire selon Passing Bablok, Médiane [Q1 ; Q3], coefficients de corrélation de Pearson [IC95], ICC [IC95] et delta moyen $\pm$ ET entre méthodes sans correction pour chaque paramètre..... | 80  |
| Tableau VI : Comparaison de l'âge et du sexe selon diagnostic .....   | 88  |
| Tableau VII : Récapitulatif des aires sous la courbe (AUC) pour chaque paramètre .....  | 99  |
| Tableau VIII : Récapitulatif des Sp et Se pour les seuils transposés issus de l'étude de régression selon Passing Bablok (PB) et les seuils obtenus à partir des courbes ROC .....  | 100 |
| Tableau IX : Récapitulatif des aires sous la courbe des courbes ROC effectuées à partir du diagnostic après PL. ....  | 100 |
| Tableau X : Valeurs seuils des méthodes INNOTEST® et LUMIPULSE® (selon Passing Bablok (PB)) et variables qualitatives « négatif / positif » associées .....   | 102 |
| Tableau XI : Concordance de classification entre LUMIPULSE® (selon Passing Bablok) et INNOTEST® pour Tau, P-Tau, A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42/P-Tau .....  | 103 |
| Tableau XII : Concordance de classification entre LUMIPULSE® (selon Passing Bablok) et INNOTEST® pour A $\beta$ 42 .....  | 103 |
| Tableau XIII : Valeurs seuils des méthodes INNOTEST® et LUMIPULSE® (selon courbes ROC) et variables qualitatives « négatif / positif » associées .....  | 104 |
| Tableau XIV : Concordance de classification entre LUMIPULSE® (selon Passing Bablok) et INNOTEST® pour Tau, P-Tau, A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42/P-Tau .....   | 105 |
| Tableau XV : CV interlaboratoires (%) du contrôle de qualité externe 29A - année 2019 du programme Alzheimer's association.....   | 110 |

|   |     |
|---|-----|
| Tableau XVI : Récapitulatif des seuils des biomarqueurs de la MA dans le LCS dosés en LUMIPULSE® .....  | 114 |
| Tableau XVII : Valeurs seuils obtenues par les droites de régression de Passing Bablok et calcul des zones grises associées en fonction du CV. .... | 119 |

## INDEX DES FIGURES

|   |    |
|---|----|
| Figure 1 : Plaques amyloïdes et DNF (Tangles) dans le cortex cérébral d'un patient atteint de MA .....  | 25 |
| Figure 2 : Les différents dépôts d'A $\beta$ du cerveau d'un patient atteint de MA mis en évidence par immunohistochimie anti A $\beta$ .....                   | 27 |
| Figure 3 : Métabolisme de l'APP : la voie de l' $\alpha$ -sécrétase ou voie "non amyloïdogène" et la voie de la $\beta$ -sécrétase ou voie "amyloïdogène" ..... | 28 |
| Figure 4 : Principales voies de production des peptides A $\beta$ par clivage de la $\gamma$ sécrétase .....  | 29 |
| Figure 5 : Les 6 isoformes de la protéine Tau.....  | 31 |
| Figure 6 : Conséquence de la phosphorylation anormale de la protéine Tau.....   | 32 |
| Figure 7 : Lésions de DNF par immunohistochimie anti-Tau .....  | 33 |
| Figure 8 : Hypothèse de la cascade amyloïde .....   | 35 |
| Figure 9 : Les biomarqueurs du LCS, reflet du processus sous-jacent de la MA .....  | 43 |
| Figure 10 : Modèle d'évolution temporelle hypothétique de la MA intégrant les biomarqueurs .....  | 45 |
| Figure 11 : Principe de la méthode INNOTEST® A $\beta$ 42 et séquence du peptide A $\beta$ 42.....  | 49 |
| Figure 12 : Principe du dosage INNOTEST® P-Tau <sub>(181P)</sub> et séquence partielle de la protéine intégrant les épitopes des anticorps monoclonaux .....    | 50 |
| Figure 13 : Principe du dosage INNOTEST® Tau totale et séquence partielle de la protéine intégrant les épitopes des anticorps monoclonaux .....                 | 51 |
| Figure 14 : Vision globale des épitopes des anticorps de FUJIREBIO Europe dans la région riche en prolines de Tau .....   | 51 |
| Figure 15 : Principe de la technique CLEIA automatisée sur LUMIPULSE® pour le dosage de P-Tau et A $\beta$ 40.....  | 53 |
| Figure 16 : Principe de la technique CLEIA automatisée sur LUMIPULSE® pour le dosage de Tau et A $\beta$ 42 .....   | 53 |
| Figure 17 : Représentation graphique de l'index ATI/P-Tau .....   | 57 |

|   |    |
|---|----|
| Figure 18 : Chronologie des diagnostics cliniques et dosages .....  | 66 |
| Figure 19 : Sélection des patients de notre étude. ....   | 67 |
| Figure 20 : Régression linéaire selon Passing Bablok : Tau Lumipulse=f(Tau Innotest).....   | 74 |
| Figure 21 : Régression linéaire selon Passing Bablok : P-Tau Lumipulse=f(P-Tau Innotest)  | 75 |
| Figure 22 : Régression linéaire selon Passing Bablok : A $\beta$ 42 Lumipulse=f(A $\beta$ 42 Innotest) ..                             | 76 |
| Figure 23 : Régression linéaire selon Passing Bablok : A $\beta$ 40 Lumipulse=f(A $\beta$ 40 Innotest) ..                             | 77 |
| Figure 24 : Régression linéaire selon Passing Bablok : A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 Lumipulse=f(A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 Innotest)..... | 78 |
| Figure 25 : Régression linéaire selon Passing Bablok : A $\beta$ 42/P-Tau Lumipulse=f(A $\beta$ 42/P-Tau Innotest).....               | 79 |
| Figure 26 : Graphique de Bland et Altman : Tau totale. ....   | 82 |
| Figure 27 : Graphique de Bland et Altman : P-Tau .....  | 84 |
| Figure 28 : Graphique de Bland et Altman : A $\beta$ 42 .....   | 85 |
| Figure 29 : Graphique de Bland et Altman : A $\beta$ 40 .....   | 86 |
| Figure 30 : Diagramme en boîte : Tau selon MA vs non MA.....  | 89 |
| Figure 31 : Diagramme en boîte : P-Tau selon MA vs non MA .....   | 90 |
| Figure 32 : Diagrammes en boîte : A $\beta$ 42 selon MA vs non MA .....   | 91 |
| Figure 33 : Diagrammes en boîte : A $\beta$ 40 selon MA vs non MA .....   | 92 |
| Figure 34 : Courbe ROC de la protéine Tau sur l'automate LUMIPULSE®.....  | 94 |
| Figure 35 : Courbe ROC de la P-Tau sur l'automate LUMIPULSE® .....  | 95 |
| Figure 36 : Courbe ROC du peptide A $\beta$ 42 sur l'automate LUMIPULSE® .....  | 96 |
| Figure 37 : Courbe ROC du peptide A $\beta$ 40 sur l'automate LUMIPULSE®.....   | 97 |
| Figure 38 : Courbe ROC du rapport A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 sur l'automate LUMIPULSE® .....   | 98 |
| Figure 39 : Courbe ROC du rapport A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 sur l'automate LUMIPULSE® .....   | 99 |

# I. INTRODUCTION

En 1906, le neuropsychiatre Allemand Aloïs Alzheimer identifie la maladie qui portera son nom en 1910. C'est en pratiquant l'autopsie du cerveau d'une de ses patientes qui présentait des troubles de la mémoire, qu'il décrit les deux lésions neuropathologiques principales de la maladie d'Alzheimer (MA) : les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF ou tangles). Dès lors, l'étude anatomopathologique du cerveau en *post mortem* prend une place importante dans le diagnostic de la MA.

En 1975, le premier test neuropsychologique assorti d'un score vient renforcer l'approche clinique. Bien qu'elle constitue encore aujourd'hui le diagnostic de certitude de la maladie, l'autopsie est progressivement délaissée, au profit des critères cliniques intégrant les tests neuropsychologiques.

Au fil des années, la médecine a fait de nombreux progrès dans la compréhension de la maladie et la mise en évidence des mécanismes physiopathologiques. Avec notamment, l'identification en 1984 et 1985 des principaux constituants biologiques de ses lésions caractéristiques, le peptide bêta-amyloïde ( $A\beta$ ), la protéine Tau (Tubulin-associated unit) et la protéine Tau phosphorylée (P-Tau). C'est en 1997 que les premiers dosages biologiques utiles au diagnostic de MA apparaissent, ce sont les biomarqueurs du LCS ( $A\beta_{42}$  et Tau), dans le même temps, les premiers appareils d'IRM commencent à être commercialisés. Le développement concomitant des marqueurs d'imagerie et des biomarqueurs du LCS a permis d'améliorer considérablement la confiance diagnostique du clinicien.

Aujourd'hui, les marqueurs biologiques du LCS ont largement confirmé leur utilité dans le diagnostic de MA, ils sont largement utilisés dans le monde entier et entrent dans une nouvelle phase de développement, l'automatisation, permettant un accès plus rapide aux résultats et une meilleure standardisation qui augmentera la transférabilité des résultats.

## 1.1 Epidémiologie

Les troubles cognitifs majeurs (TCM) dont la maladie d'Alzheimer sont un enjeu de santé publique. On compte 50 millions de personnes atteintes de TCM dans le monde et il apparaît chaque année près de 10 millions de nouveaux cas. Le nombre total de personnes atteintes de TCM devrait atteindre 82 millions en 2030 et 152 millions d'ici 2050 (1).

Dans le DSM-V (Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux) paru en 2013 aux Etats-Unis, le terme trouble neurocognitif majeur a remplacé celui de démence et se caractérise par la mise en évidence d'un déclin cognitif par rapport aux performances globales antérieures dans un ou plusieurs des domaines cognitifs suivant : l'attention complexe, les fonctions exécutives, l'apprentissage et la mémoire, le langage, la perception-motricité et la cognition sociale. Les TCM ne sont pas expliqués par une pathologie psychiatrique.

La maladie d'Alzheimer est la forme la plus commune de TCM et serait à l'origine de 60-70% des cas. En seconde position, les TCM cérébro-vasculaires (20 à 30 %) et dans une proportion moindre (< 10%), les dégénérescences fronto-temporales (DFT) et les maladies à corps de Lewy (MCL) (1-3).

En 2019, on estime à 1,2 million le nombre de personnes atteintes de la MA en France. Elles devraient être 1,3 million en 2020, compte tenu de l'augmentation de l'espérance de vie. Dans la majorité des cas, la MA touche les sujets âgés de plus de 65 ans (4). En effet, l'âge est le principal facteur de risque, l'incidence de la maladie double tous les 5 ans après 65 ans (5). La fréquence de la maladie est de 2 à 4% de la population générale. Elle augmente rapidement pour atteindre 15% de la population à 80 ans. Les femmes âgées sont plus exposées puisque, sur 25 malades, 10 sont des hommes et 15 des femmes, mais cette différence pourrait être liée aux écarts d'espérance de vie (6). Parmi les cas survenant chez les moins de 65 ans, 10% sont des formes familiales héréditaires à transmission autosomique dominante avec mutations des gènes de l'amyloid precursor protein (APP) ou des présénilines 1 ou 2 (PSEN1, PSEN2). Après 65 ans, les formes sporadiques d'origine plurifactorielle sont majoritaires, des facteurs dits de susceptibilité génétiques sont tout de même connus, le principal est le génotype APOE  $\epsilon$ 4 (7).

L'impact socio-économique que représente la MA est colossal, en effet, les retentissements de la maladie vont impacter le malade dans son quotidien ainsi que son entourage, qui se



retrouve très souvent submergé face à la maladie. Du fait d'une perte d'autonomie, le patient nécessite un accompagnement à domicile au début de la maladie et dans les stades plus sévères, une institutionnalisation dans une structure d'accueil est souvent inévitable.

La MA expose particulièrement au risque d'inégalité d'accès aux soins du fait des charges financières très importantes qu'elle induit. En effet le coût de la maladie pour la société est important, les coûts médicaux et paramédicaux s'élèvent à 5,3 milliards d'euros par an et à 14 milliards d'euros par an pour l'aide informelle. On estime qu'il reste 1000 euros/mois de reste à charge pour la famille (8). A noter qu'il n'y a actuellement aucun traitement curatif ou permettant de ralentir la progression de la maladie mais des traitements symptomatiques peuvent être proposés tels que les inhibiteurs de l'acétylcholine estérase ou les antiglutamatergiques, antagonistes des récepteurs NMDA, tels que la mémantine.

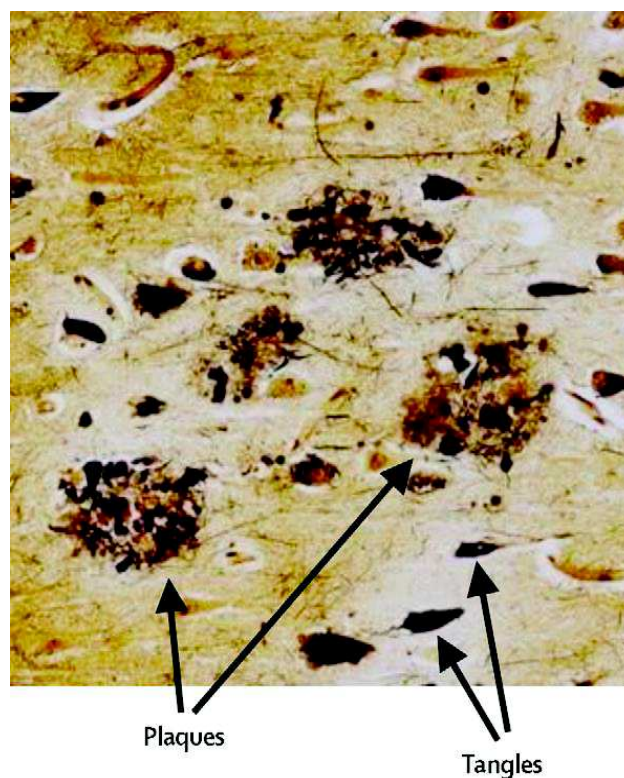
Face à cet enjeu de santé publique, le gouvernement Français a mené de multiples actions, notamment par la mise en place d'un plan maladies neuro-dégénératives 2014-2019, 4<sup>ème</sup> plan d'action qui succède au plan Alzheimer 2008-2012. Il comprend trois grandes priorités : l'amélioration du diagnostic et de la prise en charge des malades, le développement de la recherche et l'assurance de la qualité de vie des malades et de leurs aidants (9). Aussi, de nombreuses associations ont vu le jour ces dernières années, afin d'accompagner, rassembler et informer sur la MA.

## 1.2 Neurophysiopathologie

A l'état macroscopique, l'étude neuropathologique de patients atteints de MA montre une atrophie cérébrale touchant la substance grise et la substance blanche. Elle est prédominante au sein du lobe temporal interne et particulièrement au niveau de l'hippocampe. L'atrophie peut, avec l'évolution de la maladie, s'étendre au néocortex temporal, au lobe pariétal et au gyrus cingulaire (10).

A l'état microscopique, on peut classer les lésions de la MA en deux catégories : les lésions dites positives ou « par excès » : les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF ou tangles) et les lésions dites négatives ou « par pertes » peu spécifiques de la maladie, se caractérisant par une perte neuronale et synaptique (11).

Ce sont les lésions « positives », présentes à l'examen histopathologique qui vont permettre le diagnostic de certitude de la MA (12) (figure 1)



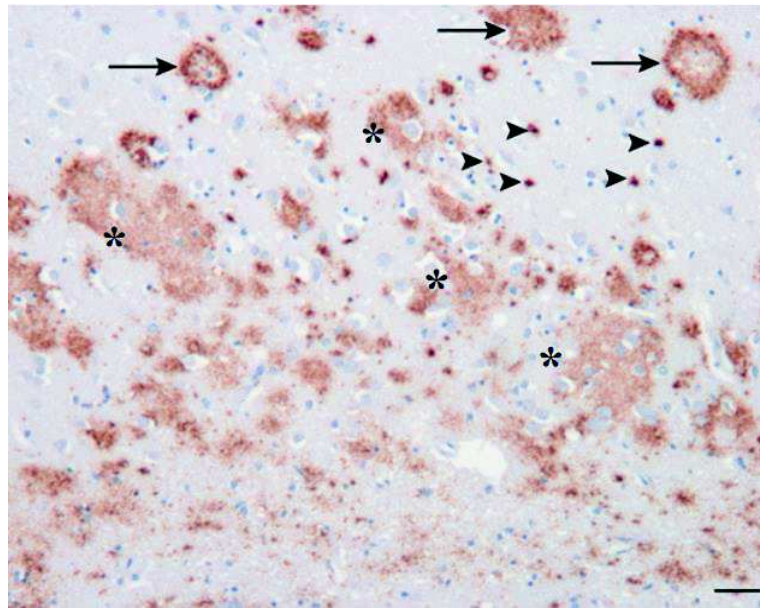
**Figure 1** : Plaques amyloïdes et DNF (Tangles) dans le cortex cérébral d'un patient atteint de MA, extraite de (7)

## 1.2.1 Les plaques amyloïdes et la cascade amyloïde

### 1.2.1.1 Les plaques amyloïdes

Les plaques amyloïdes sont la conséquence de dépôts amyloïdes extracellulaires de peptides A $\beta$ . Il existe une vingtaine d'isoformes de peptides A $\beta$  dont la taille varie de 695 à 770 acides aminés, toutes issues de la protéine précurseur APP dont le gène est situé sur le chromosome 21. La protéine APP est présente dans toutes les cellules. Au niveau cérébral, elle serait un facteur de survie neuronale et aurait un rôle dans l'adhésion de la matrice extracellulaire et la séquestration de métaux potentiellement toxiques (13,14). Les peptides A $\beta$  sont amphiphiles, ils sont enrichis en feuillets plissés  $\beta$  et c'est cette particularité qui leur confère une faible solubilité et explique la tendance spontanée des peptides à former des oligomères solubles. Les dépôts amyloïdes se présentent sous différentes formes (figure 2) (15–17) :

- Les dépôts focaux, denses et de petite taille, à contours bien limités sont entourés d'une couronne neuritique riche en axones et dendrites en dégénérescence et de fibrilles riches en protéine Tau anormalement phosphorylée, structurellement identique à celle retrouvée dans les DNF : ce sont les plaques neuritiques ou plaques séniles, elles jouent un rôle clé dans la pathogénèse de la MA. Au microscope, elles sont visibles après une coloration au rouge Congo ou à la Thioflavine.
- Les dépôts diffus, quant à eux, sont de grande taille à contours mal limités et ils sont par définition dépourvus de couronne neuritique. Ils sont visibles par technique immuno-histo-chimique.
- Les dépôts stellaires sont punctiformes et leur signification est mal établie.



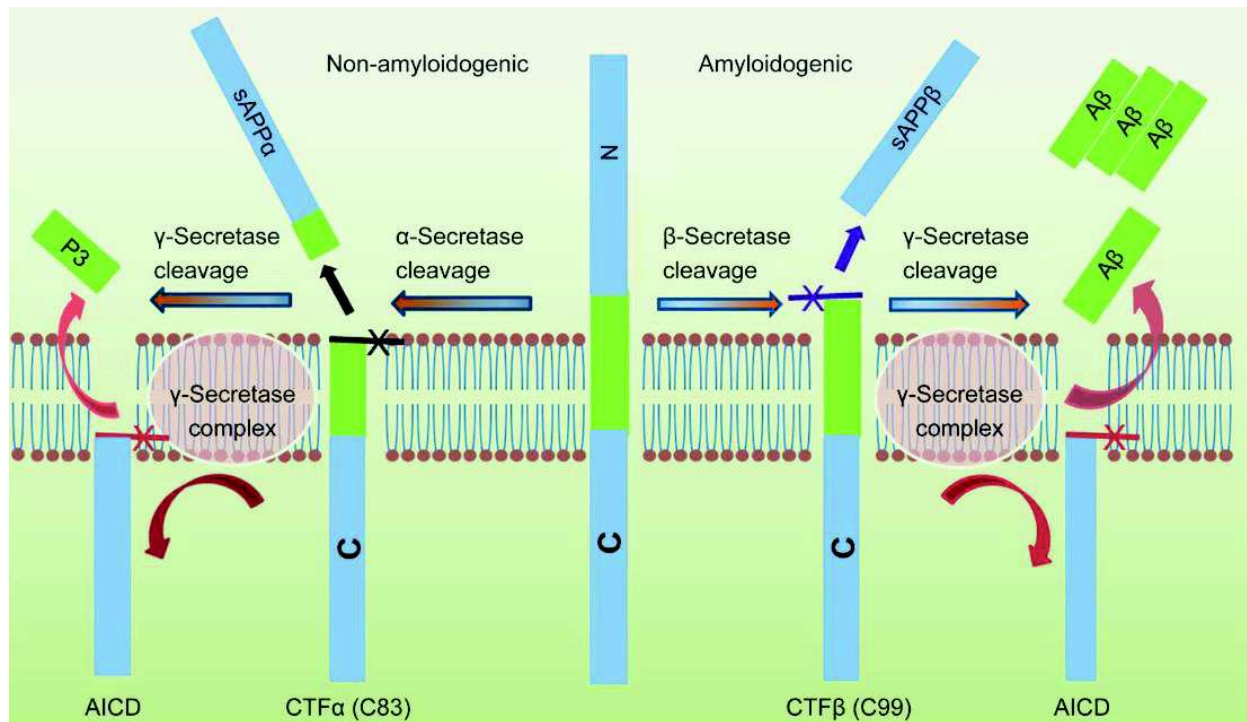
**Figure 2** : Les différents dépôts d'A $\beta$  du cerveau d'un patient atteint de MA mis en évidence par immunohistochimie anti A $\beta$  : dépôts diffus (astérisques), dépôts focaux constituant des plaques neuritiques (flèches) et dépôts stellaires (têtes de flèches), extraite de (16)

La progression des plaques amyloïdes a fait l'objet d'une classification selon plusieurs phases par Thal *et al* en 2002 (18), cette classification a été adoptée par le NIA AA (National Institute on Aging - Alzheimer's Association) en 2012 (19). En phase 1, le néocortex est impliqué, suivi par l'allocortex et notamment l'hippocampe en phase 2, puis les noyaux gris centraux en phase 3, le tronc cérébral en phase 4 et le cervelet en phase 5.

Les plaques amyloïdes sont retrouvées chez un grand nombre de personnes âgées mais pas de façon universelle. Elles peuvent également se déposer dans les vaisseaux sanguins cérébraux et être la cause d'angiopathie amyloïde cérébrale. 85 à 95% des cas de MA présentent au moins un certain degré d'angiopathie amyloïde cérébrale. Les plaques neuritiques seraient plus susceptibles d'être associées à un déficit cognitif que les plaques diffuses. Par ailleurs, les plaques amyloïdes de façon globale sont moins corrélées au déficit cognitif que les DNF. La présence de plaques amyloïdes n'est pas un argument suffisant en l'absence d'autres lésions neurodégénératives pour conclure à une MA. Elle n'est pas forcément associée à une forme avancée de la maladie (15).

### 1.2.1.2 La cascade amyloïde

Le peptide A $\beta$ 42 est produit de façon constitutive au cours du métabolisme cellulaire normal dans le cerveau, néanmoins il est anormalement accumulé en cas de MA. Il provient du clivage de l'APP. L'APP est une protéine transmembranaire, elle possède un court segment intracellulaire (extrémité C-terminale), un long segment extracellulaire (extrémité N-terminale) et un segment hydrophobe intermembranaire (figure 3).

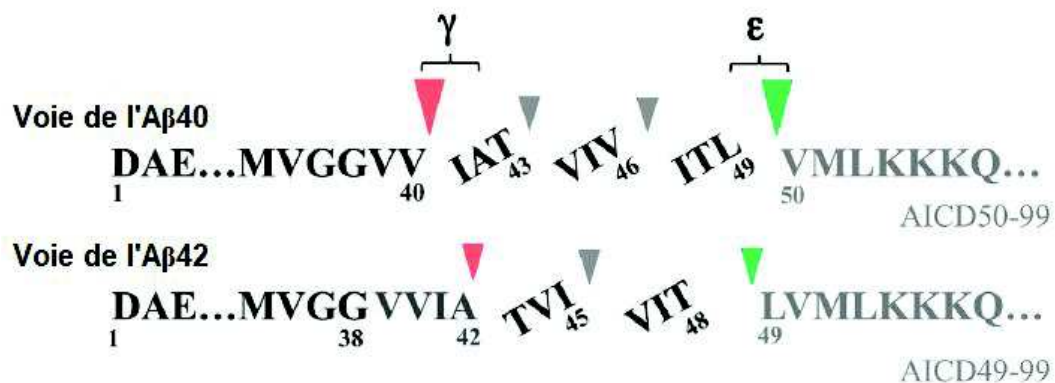


**Figure 3 : Métabolisme de l'APP : la voie de l' $\alpha$ -sécrétase ou voie "non amyloïdogène" et la voie de la  $\beta$ -sécrétase ou voie "amyloïdogène", extraite de (20)**

L'APP fait l'objet de deux voies métaboliques (7) :

- La voie de l' $\alpha$ -sécrétase ou voie non amyloïdogène : cette enzyme clive l'APP au milieu du domaine A $\beta$ , libérant un fragment soluble de l'APP :  $\alpha$ -sAPP qui jouerait un rôle dans la régulation de l'hémostase et les mécanismes de neuroprotection (14). Le fragment C-terminal restant :  $\alpha$ -CTF ou C83 est clivé par le complexe  $\gamma$ -sécrétase qui libère le peptide p3. Le domaine intracellulaire restant (AICD) est métabolisé dans le cytoplasme. En raison d'un clivage de l'APP par l' $\alpha$ -sécrétase dans le domaine A $\beta$ , la génération de peptide A $\beta$  n'est pas possible.

- La voie de la  $\beta$ -sécrétase ou voie amyloïdogène : cette enzyme clive l'APP juste avant le domaine  $A\beta$ , libérant un fragment soluble de l'APP ( $\beta$ -sAPP) qui aurait un rôle dans la mort cellulaire neuronale (14). Le fragment C-terminal restant :  $\beta$ -CTF ou C99 est clivé par le complexe  $\gamma$ -sécrétase sur les sites  $\epsilon$  et  $\gamma$  et libère des peptides  $A\beta$  de taille variable (de 37 à 49 acides aminés) en fonction de la zone de clivage. Il existe deux voies principales de production des peptides  $A\beta$  (figure 4), le clivage commence sur les sites  $\epsilon$  entre les acides aminés 48 et 49 ou entre les acides aminés 49 et 50.  $A\beta_{49}$  est le produit majoritaire du clivage  $\epsilon$ , tandis que  $A\beta_{48}$  est minoritaire. Ensuite, la  $\gamma$ -sécrétase aura la possibilité de couper  $A\beta_{49}$  et  $A\beta_{50}$  tous les 3 acides aminés de façon séquentielle sur des sites de clivage intermédiaires  $\zeta$  jusqu'au site  $\gamma$  générant ainsi des peptides  $A\beta$  de taille variable.



**Figure 4** : Principales voies de production des peptides  $A\beta$  par clivage de la  $\gamma$  sécrétase, issue de (21)

Les formes majoritairement produites sont  $A\beta_{40}$  et  $A\beta_{42}$ , elles représentent 75% de la production des peptides amyloïdes. Mais  $A\beta_{40}$  est largement plus abondant qu' $A\beta_{42}$ , il est le reflet de la production globale des peptides  $A\beta$ .

Outre les deux principales voies représentées sur la figure 4, il existe de nombreux clivages alternatifs avec des zones de clivages tous les 4 ou 5 acides aminés. Ces voies mineures relient les deux voies principales. Aussi, l' $A\beta_{38}$  est majoritairement produit à partir d' $A\beta_{43}$  ou d' $A\beta_{42}$ . Il est important de souligner que l' $A\beta_{40}$  ne peut pas être produit à partir de l' $A\beta_{42}$ .

Par ailleurs, on sait que le peptide  $A\beta_{42}$  est plus enclin à l'agrégation car c'est un peptide très hydrophobe, il est le composant majoritaire des plaques amyloïdes avec  $A\beta_{40}$  (17,21,22).

Les enzymes de la voie amyloïdogène ont été décrites : BACE1 ( $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1) est la principale  $\beta$ -sécrétase et le complexe  $\gamma$ -sécrétase est composé de quatre protéines : préséniline 1 ou 2 (site actif du complexe enzymatique), nicastrine, PEN-2 et APOE1 (7).

Les mutations touchant les présénilines 1 (PSEN1) ou 2 (PSEN2), et l'APP sont responsables de formes familiales de MA à début précoce et plusieurs d'entre elles sont associées à des présentations atypiques. Pour l'APP, il existe également des duplications (23).

Les mutations PSEN1 sont les plus fréquentes avec 185 mutations pathogènes comptabilisées, 32 mutations (ou duplications) sont connues pour l'APP et 13 pour PSEN2 (24).

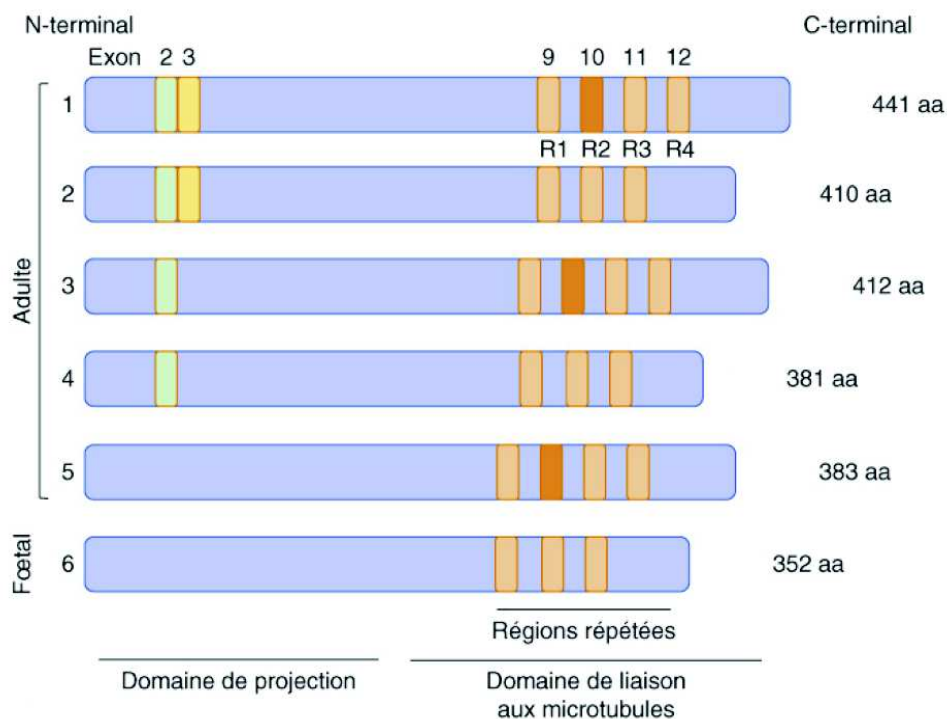
Des mutations de l'APP conduisent à une surproduction du peptide  $A\beta$ , à la production préférentielle d' $A\beta_{42}$  ou à une augmentation de l'agrégabilité du peptide  $A\beta$ . Les duplications du gène APP sont de taille variable, elles entraînent une surexpression quantitative du gène provoquant une surproduction de la protéine APP et donc une surproduction de peptides  $A\beta$  (25). Le gène de l'APP, étant situé sur le chromosome 21, les personnes atteintes du syndrome de Down ont une copie supplémentaire du chromosome 21, par conséquent ils sont susceptibles de produire la protéine APP en grande quantité et donc plus à risque de développer une MA, l'incidence globale de la MA au sein de cette population est 3 à 5 fois plus élevée que chez la population générale (26).

Les mutations touchant les présénilines sont aussi à l'origine d'une surproduction de peptides  $A\beta$  résultant d'une modification du site actif de la  $\gamma$ -sécrétase (14).

En temps normal, la clairance des peptides  $A\beta$  est médiée par une dégradation enzymatique, il y a également une diffusion dans le LCS, enfin ils sont aussi éliminés du cerveau par un système d'efflux à travers la barrière hémato-encéphalique (dans lequel l'apolipoprotéine E, se comporterait comme une protéine chaperon du peptide  $A\beta$ )(7). Dans la MA, il y a une accumulation de peptides  $A\beta$  de taille variable, dans l'espace extracellulaire. L' $A\beta_{42}$  étant peu soluble, elle va former des oligomères solubles instables avec d'autres peptides  $A\beta_{42}$ , ou des hétéro-oligomères avec d'autres formes comme l' $A\beta_{40}$  ou l' $A\beta_{38}$ . Ces oligomères instables vont continuer de s'agréger pour former des dépôts fibrillaires insolubles, alors résistants au clivage protéolytique (27). L'excès de peptides amyloïdes serait à l'origine d'une perte synaptique (14).

### 1.2.2 Les dégénérescences neurofibrillaires et la protéine Tau

La protéine Tau est une protéine phosphorylée normalement présente dans le cerveau. Elle est principalement exprimée au niveau du système nerveux central et elle est localisée dans les corps cellulaires et les prolongements neuronaux. Il existe 6 isoformes de taille variable (de 352 à 441 acides aminés) produites par épissage alternatif des exons 2,3 et 10 d'un transcrit primaire du gène MAPT (microtubule associated protein tau), situé sur le chromosome 17 en position 17q21 (figure 5). Une seule forme est présente à la naissance et ne comporte pas d'insertions codées par les exons 2, 3 ou 10. Les autres isoformes apparaissent au cours du développement.



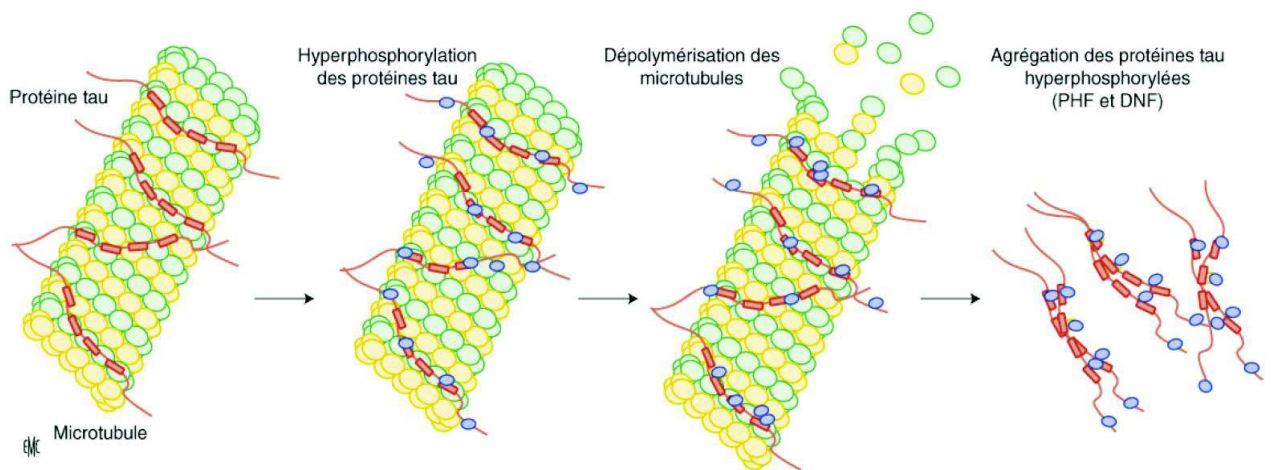
**Figure 5 : Les 6 isoformes de la protéine Tau, issue de (14)**

Le domaine N-terminal de Tau également appelé domaine de projection est riche en proline et constitue un domaine d'interaction avec les tyrosines kinases. A son extrémité C-terminale, Tau présente un motif protéique répété 3 ou 4 fois (Tau 3R ou Tau 4R), c'est via ce domaine de liaison que Tau favorise l'assemblage et la stabilité des microtubules et permet ainsi le transport de molécules et de vésicules le long des axones.

La phosphorylation de Tau régule sa liaison aux microtubules et 85 sites putatifs de phosphorylation sont présents sur la protéine, parmi lesquels on trouve des sites de



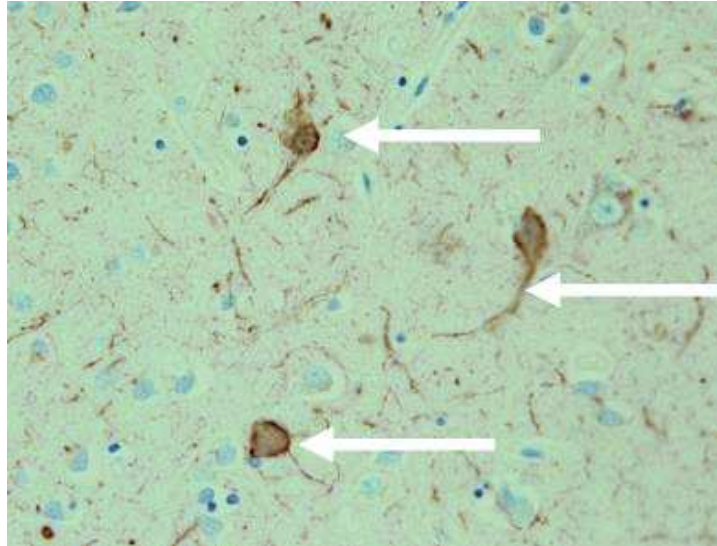
phosphorylation physiologiques et d'autres pathologiques, de plus, tous ne sont pas impliqués dans la liaison aux microtubules, par exemple les sites Thr181, Thr 231 et les Ser 202, 235, 262, 396 ont une influence sur la liaison aux microtubules. Une Tau phosphorylée va déstabiliser les microtubules et entraîner leur dépolymérisation, à l'inverse une Tau déphosphorylée favorise leur polymérisation. Dans la MA, on observe une augmentation de la quantité de protéines Tau phosphorylées sur des sites de phosphorylation physiologiques, on parle de Tau hyperphosphorylée, mais également sur des sites de phosphorylation pathologiques qui en conditions physiologiques ne le sont jamais, on parle de Tau anormalement phosphorylée. Ces protéines Tau hyperphosphorylées et anormalement phosphorylées s'agrègent sous forme de paires hélicoïdales (figure 6), entraînant la dépolymérisation des microtubules, la perturbation du transport des vésicules dans les axones et une désorganisation du cytosquelette (14,16,17).



**Figure 6 : Conséquence de la phosphorylation anormale de la protéine Tau, issue de (14)**

On différencie plusieurs types d'agrégats Tau selon leur localisation dans le neurone (16) (figure 7) :

- Dans les corps cellulaires neuronaux, ils correspondent aux DNF, on peut également retrouver des DNF extracellulaires, persistant après la mort des neurones, on parle de « DNF fantômes ».
- Dans les dendrites, on parle de fibres tortueuses.
- Dans les axones dégénérés, ils constituent la couronne neuritique des plaques séniles.



**Figure 7 : Lésions de DNF par immunohistochimie anti-Tau**

La propagation des DNF et fibres tortueuses a fait l'objet d'une classification détaillée selon plusieurs stades par Braak et Braak en 1991 (28). Le cortex transentorhinal est la première structure touchée, situé dans une région interne du lobe temporal (stade I), les lésions progressent ensuite dans le cortex entorhinal (stade II), puis dans l'hippocampe (stade III et IV) (associées aux troubles de la mémoire), le néocortex associatif (stade V) (symptômes aphaso-apraxo-agnosiques) et enfin le néocortex primaire (stade VI) (troubles visuels) (28). La répartition et le nombre des DNF sont corrélés à la perte neuronale, aux symptômes cliniques et à la sévérité du déficit cognitif (15).

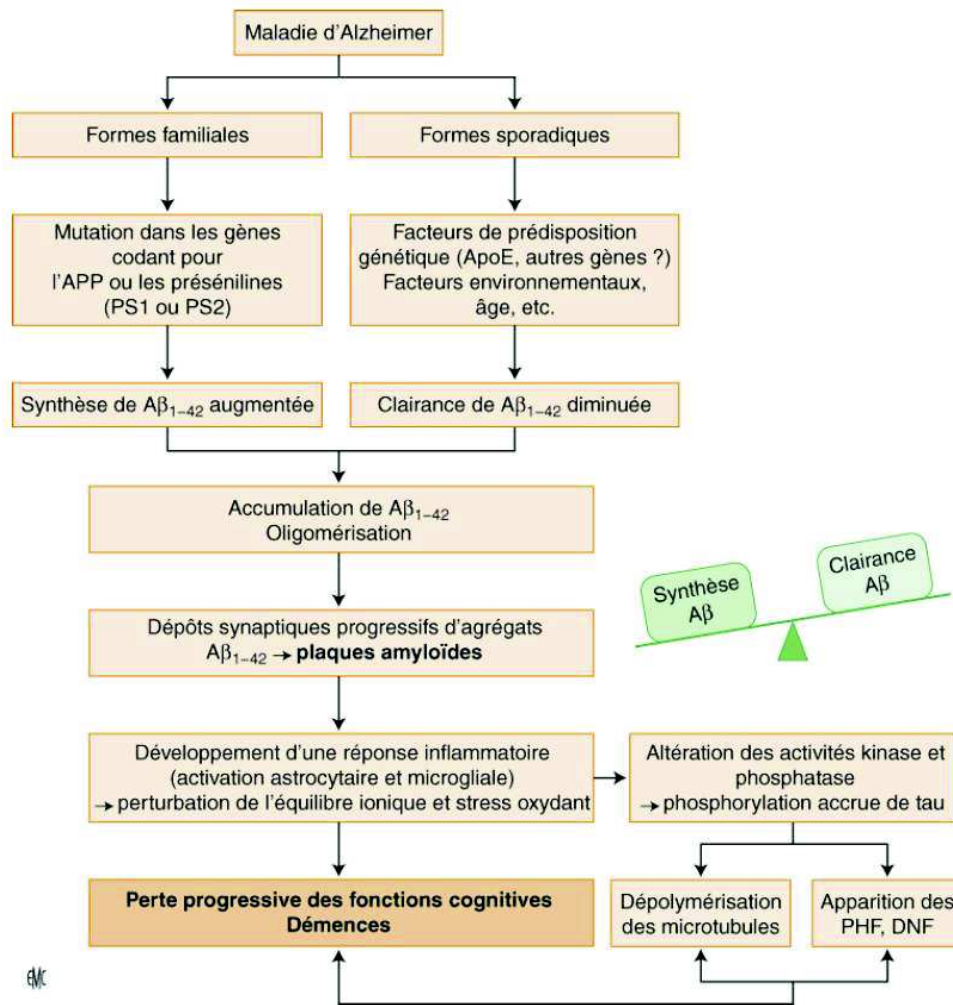
Les DNF ne sont pas spécifiques de la MA, on les retrouve dans d'autres pathologies telles que les tauopathies (paralysie supranucléaire progressive, dégénérescence corticobasale, certaines dégénérescences fronto-temporales), la maladie de Creutzfeldt-Jakob et autres. Par ailleurs, on retrouve les DNF de façon universelle chez les sujets âgés sains, néanmoins la densité et la localisation neuroanatomique des DNF sont des paramètres importants. Un nombre modeste de DNF dans le lobe temporal médian serait présent de façon universelle chez les sujets de plus de 70 ans, dont la cognition est intacte. De même, les DNF limitées aux sites sous corticaux est souvent subclinique. En revanche, les lésions sévères et généralisées dans le cortex n'ont été retrouvées que chez des patients MA, les DNF néocorticales étendues sont presque toujours associées à des troubles cognitifs graves, c'est la caractéristique anatomopathologique la mieux corrélée à l'état cognitif ante-mortem (15).

L'ensemble des critères pour l'évaluation neuropathologique de la maladie d'Alzheimer est basé sur l'évaluation des phases amyloïdes selon Thal *et al*, du stade des DNF selon Braak et Braak, et du score de plaques neuritiques du CERAD (Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease) (19).

### 1.2.3 Dynamique hypothétique d'installation des lésions

Il semblerait que les plaques amyloïdes et les DNF ne se développeraient pas selon le même schéma anatomique et temporel et beaucoup de controverses existent depuis des décennies à ce sujet. Plusieurs hypothèses sont discutées quant à l'installation et la progression des lésions et la communauté scientifique se divise entre les partisans de l'hypothèse de la cascade amyloïde et les partisans de l'hypothèse « tauiste ».

Contrairement à la pathologie neurofibrillaire Tau, il existe une forte association entre les mutations familiales impactant la cascade amyloïde (entraînant une surproduction d'A $\beta$ ), la formation de plaques amyloïdes et le développement de la maladie. De cette observation découle l'hypothèse de la cascade amyloïde. Les partisans de cette hypothèse (figure 8) pensent que les plaques amyloïdes provoqueraient une activation de la microglie et des astrocytes suivie d'une réponse inflammatoire associée à un stress oxydatif qui entraînerait une altération de l'activité des kinases et des phosphatases, ce qui aurait pour conséquence une hyperphosphorylation de la protéine Tau, à l'origine des lésions de DNF. Les plaques amyloïdes précéderaient donc l'apparition des DNF et se comporteraient comme un facteur déclencheur de la propagation de ces dernières.



**Figure 8 : Hypothèse de la cascade amyloïde, issue de (14)**

L'hypothèse de la cascade amyloïde a été la plus explorée et de nombreux essais thérapeutiques se sont basés sur celle-ci.

Néanmoins plusieurs arguments nuancent cette supposition. Tout d'abord la majeure partie des connaissances sur la physiopathologie amyloïde provient de souris transgéniques et on ne sait pas si les formes sporadiques et familiales partagent le même « déclencheur pathogène ». Les modèles transgéniques APP et PS1 surexpriment l'APP, elles ne sont pas représentatives des formes sporadiques et ne présentent pas de DNF et de mort neuronale franche, même si l'on sait que les souris expriment un profil d'isoforme Tau différent de l'Homme. Par ailleurs, de nombreuses stratégies thérapeutiques ont été étudiées sur la base de la cascade amyloïde et se sont soldées par des échecs (29). L'une des raisons évoquées est que ces essais ont été effectués chez des patients dont le processus neurodégénératif était déjà trop avancé et de ce

fait irréparable. Des études sur des sujets cognitivement normaux et à risque d'hériter d'une mutation entraînant la MA (déjà identifiée dans leur famille) sont en cours, c'est le cas de la cohorte DIAN (Dominantly Inherited Alzheimer Network), les résultats de ces études seront déterminants pour statuer sur le sort final de l'hypothèse de la cascade amyloïde.

Les « tauistes » soutiennent à l'inverse que la formation des DNF serait le mécanisme initiateur et prépondérant de la physiopathologie de la maladie et que les plaques amyloïdes seraient un produit secondaire de la formation des DNF. Cette seconde hypothèse est basée sur l'étude de Braak et Braak en 1997 qui rapporte la présence de DNF en l'absence de plaques amyloïdes chez un nombre de cas significatif. Même si dans cette étude, il est compliqué de conclure à l'absence totale de plaques amyloïdes chez ces patients, car il aurait fallu étudier un nombre d'échantillons suffisants pour survoler toutes les aires potentiellement touchées par la MA.

Plus récemment d'autres hypothèses ont émergé, certains ont émis une hypothèse fondée sur une pathogénie partagée entre  $A\beta$  et Tau supposant que les DNF dont l'apparition correspondrait à un phénomène physiologique précoce et lent perturberait la clairance du peptide  $A\beta$ . Au-delà d'une certaine concentration d' $A\beta$ , la toxicité des oligomères solubles d' $A\beta$  altérerait le métabolisme des protéines Tau, accélérant l'apparition des DNF et provoquant l'entrée dans un cercle vicieux caractérisant la maladie et où la diminution de la résorption d' $A\beta$  entrainerait également une augmentation des oligomères insolubles à l'origine des plaques neuritiques (16).

D'autres envisagent un mécanisme de propagation de type prion, les protéines de conformation anormales riches en feuillets  $\beta$  seraient capables de transmettre leur toxicité de proche en proche en altérant la conformation des protéines normales. La formation des DNF, une fois « déclenchée » par la cascade amyloïde pourrait se propager indépendamment d' $A\beta$  (30).

L'ensemble des études menées jusqu'à présent indique qu'il reste encore de nombreuses incompréhensions quant à la dynamique d'installation des lésions et de nombreuses questions restent en suspens. Il est probable que les deux mécanismes physiopathologiques ne puissent être dissociés. L'étude neuropathologique ne permet pas de visualiser la dynamique d'installation et la progression des lésions. La compréhension du lien entre la pathologie

amyloïde et Tau reste un domaine de recherche actif et les progrès de neuroimagerie devraient contribuer au moins en partie à résoudre ces questions.

### 1.3 Clinique

La MA est une maladie neurodégénérative tardivement symptomatique et d'évolution progressive, néanmoins dans les cas de formes familiales, le début de la maladie est généralement précoce avec une évolution rapide. La progression de la maladie suit généralement plusieurs étapes, ou stades.

Avant d'atteindre le stade de TCM, la maladie connaît une longue période d'évolution. En effet, le processus physiopathologique débute des années avant que le diagnostic de MA puisse être posé.

La première phase est la phase préclinique, asymptomatique (31–33), les biomarqueurs de la MA ainsi que l'imagerie ont permis de confirmer l'existence de cette phase.

Ensuite, on observe une phase prodromale avec des troubles cognitifs légers, aussi appelée Mild Cognitive Impairment (MCI), elle fait l'objet d'une plainte cognitive et l'apparition de déficits concernant un ou plusieurs des domaines cognitifs suivant : la mémoire, le langage, les fonctions exécutives, l'attention, le secteur visuo-spatial. Il y a une préservation relative des activités de la vie quotidienne et de l'indépendance malgré une gêne fonctionnelle légère pour les tâches complexes par rapport aux aptitudes passées (34). En général, la MA débute par des troubles mnésiques touchant la mémoire épisodique mais il existe des formes de début atypiques avec des difficultés au niveau du langage, des troubles visuospatiaux ou de la fonction exécutive (35). Environ 35% des patients MCI développeront une MA au stade de TCM dans les 3 ans, le taux de conversion annuel est de 5 à 10% (36).

La dernière phase de la maladie est caractérisée par la présence de TCM. On la distingue de la phase MCI quand sont observées des perturbations significatives dans les activités de la vie quotidienne du malade (12).

La haute autorité de santé (HAS) recommande d'utiliser les critères diagnostiques de la MA selon le DSM-IV-TR (Annexe 1) ou le NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association)(Annexe 2). Il est à noter que ces critères de diagnostic clinique ne s'utilisent qu'au stade de TCM. Le diagnostic clinique fait l'objet d'un entretien avec le patient, autant

que possible accompagné d'un proche. L'anamnèse du malade permet de constater un déclin cognitif qui sera quantifié par une évaluation cognitive globale, de manière standardisée, à l'aide de tests neuropsychologiques comme le Mini Mental State Examination (MMSE), associé à d'autres épreuves évaluant la praxie, la mémoire, les fonctions exécutives et le langage. (Tests neuropsychologiques effectués au CHU de Rouen en annexe 3). Une évaluation psycho-comportementale est réalisée ainsi qu'une évaluation fonctionnelle afin de mesurer le retentissement du déclin cognitif dans les activités de la vie quotidienne. L'examen clinique doit apprécier l'état général et cardio vasculaire, le degré de vigilance et d'éventuels déficits sensoriels et moteurs pouvant perturber la réalisation des tests neuropsychologiques. Il est recommandé de réviser un certain nombre d'hypothèses diagnostiques pouvant être à l'origine du trouble cognitif et notamment les étiologies curables telles que :

- Une prise de médicaments, de toxique ou d'alcool.
- Une maladie infectieuse, comme la syphilis, la maladie de Lyme ou encore le VIH.
- Un trouble métabolique ou carenciel, à savoir, une hyponatrémie, une hypercalcémie, une hypothyroïdie, une hyperglycémie chronique ou encore des carences en vitamines B1 et B12 (3).

La sensibilité des critères cliniques selon le NINCDS-ADRDA de 1984 (annexe 2) est de 81 % et la spécificité de 70 % (37). Les avancées biologiques ont permis la révision de ces critères par l'International Working Group (IWG) en 2007 puis en 2014 (annexe 4 et 5) et par le NIA-AA en 2011 (annexe 6). Les biomarqueurs du LCS et de neuro-imagerie ont été ajoutés à ces nouveaux critères diagnostiques permettant d'apporter la preuve d'un processus physiopathologique et ainsi d'augmenter les performances du diagnostic de la maladie.

## 1.4 Imagerie

Les marqueurs de la maladie recherchés en neuro-imagerie sont le reflet topographique et anatomo-fonctionnel des processus physiopathologiques de la MA. Ces dernières années, ce domaine a connu de nombreux progrès techniques.

La réalisation d'une IRM fait généralement partie de l'exploration initiale d'un patient présentant des troubles cognitifs, comme le recommande l'HAS et la Fédération des centres mémoire de Ressources et de recherche (FCMRR) (38). Le but étant de ne pas méconnaître l'existence d'autres pathologies cérébrales telles qu'un processus expansif intracrânien, une hydrocéphalie à pression normale ou une séquelle d'accident vasculaire (3). Dans la MA, une atrophie cérébrale est observée. Elle est présente dès le stade prodromal, mais cette

caractéristique morphologique n'est pas spécifique de la maladie, elle est également retrouvée dans les maladies cérébro-vasculaires, l'épilepsie, la sclérose hippocampique, les encéphalopathies traumatiques chroniques, la paralysie supra nucléaire et dans d'autres pathologies (39). L'IRM permet de quantifier cette atrophie, qui est prédominante au sein du lobe temporal interne et particulièrement au niveau de l'hippocampe. L'atrophie peut avec l'évolution de la maladie s'étendre au néocortex temporal, au lobe pariétal et au gyrus cingulaire (10). A défaut de pouvoir réaliser une IRM, une tomodensitométrie cérébrale peut être réalisée.

La réalisation d'un électroencéphalogramme n'est recommandée qu'en fonction du contexte clinique: si crises comitiales, si suspicion d'encéphalite, de maladie de Creutzfeldt-Jakob.

L'utilisation d'autres techniques de neuro imagerie tels que la tomographie par émission de positons (TEP ou PET-Scan) ou la tomographie d'émission monophotonique (SPECT/TEMP) n'est recommandée que lors de présentations cliniques atypiques, devant une évolution atypique ou chez les patients jeunes.

La TEMP peut être utilisée pour imager la perfusion cérébrale. Dans la MA, des hypoperfusions intéressent le cortex temporo-pariétal.

La TEP permet de réaliser une imagerie métabolique en observant et en quantifiant la répartition d'un radiotracer émetteur de positons dans un organe vivant (10). Dès le stade prodromal, il est possible de mettre en évidence un hypométabolisme des carrefours temporo-pariétaux, en utilisant le 18-fluorodésoxyglucose (18-FDG) comme radiotracer (38).

Plus récemment, des traceurs spécifiques ont permis de visualiser la présence de plaques amyloïdes (PET amyloïde) et les lésions de DNF (PET Tau). Ils pourraient considérablement révolutionner le diagnostic de la MA mais reste peu accessibles. En 2002, le 11C-PIB (composé B de Pittsburgh) est le premier radiotracer utilisé ayant une affinité pour les plaques amyloïdes mais en raison de sa courte demi-vie courte (20 minutes), son utilisation est limitée aux centres où un cyclotron est disponible. Le développement d'analogues marqués au 18F de demi-vie plus longue a permis de dépasser cet inconvénient. Trois sont approuvés par la Food and Drug Administration (FDA), le 18F-florbétapir, le 18F-flutémétamol et le 18F-florbétabène (40). Le 18F-florbétapir est le plus largement utilisé, l'intensité de son marquage est corrélé aux lésions histopathologiques retrouvées à l'autopsie, la sensibilité et la spécificité de cette technique pour la détection de la présence de plaques



amyloïdes en moyenne ou grande quantité sont respectivement de 92 et 96% (41). Cet examen permet d'augmenter la confiance diagnostique du clinicien lorsque ces résultats sont à sa disposition. La TEP amyloïde est un outil prometteur mais une harmonisation des pratiques est nécessaire, afin de pouvoir effectuer des comparaisons pertinentes d'un centre à l'autre. De façon à utiliser la TEP amyloïde comme outil diagnostique approprié, un groupe de travail sur le sujet, the Amyloid Imaging Taskforce (AIT) a émis trois principales indications : les patients classés MCI de façon persistante, les patients présentant des signes cliniques atypiques et susceptibles d'être atteints de MA et les patients jeunes présentant des TCM progressifs inexplicables (40). Bien que l'imagerie TEP soit maintenant capable de détecter de façon fiable les dépôts amyloïdes, il est reconnu que la charge amyloïde n'est pas fortement corrélée au degré de sévérité du déclin cognitif, en revanche elle indique un risque plus élevé de déclin cognitif dans la population vieillissante (42). De plus, l'identification de plaques amyloïdes, seule, ne permet pas de poser un diagnostic de MA, puisque les plaques peuvent également être observées chez des personnes âgées cognitivement normales (43).

Des radiotraceurs spécifiques de Tau ont également été mis au point (38) et il a été constaté que la présence d'enchevêtrements neurofibrillaires identifiés par autopsie est plus fortement corrélée avec le déclin cognitif. La seconde génération de radiotraceurs Tau présenterait une liaison hautement spécifique et des essais sont en cours (40).

Il est à noter que ces examens sont onéreux et peu disponibles, en France, les radiotraceurs amyloïdes et Tau ne sont utilisés qu'en recherche.

## 1.5 Les principaux marqueurs biologiques du LCS

### 1.5.1 Place des biomarqueurs du LCS dans le diagnostic de la MA

Le biomarqueur idéal doit refléter au mieux le processus physiopathologique in vivo de la maladie et avoir été validé par des études neuropathologiques, il doit avoir une sensibilité et une spécificité > 80 %, être fiable, reproductible, non invasif, simple à réaliser et peu coûteux. Il doit être présent à tous les stades de la maladie y compris ceux présymptomatiques et aider à l'inclusion des patients dans des essais cliniques (44,45).

Le LCS est le reflet des changements biochimiques physiopathologiques qui ont lieu au niveau cérébral et c'est pour cela que les biomarqueurs ont un rôle majeur dans le diagnostic de la MA, en particulier chez les patients jeunes et les présentations cliniques atypiques. Ils se

modifient plusieurs années avant que les premiers signes cliniques apparaissent, une diminution d'A $\beta$ 42 est observable 25 ans avant les premiers symptômes et une augmentation de Tau est détectable 15 ans auparavant (46). Les biomarqueurs du LCS, A $\beta$ 42, Tau et P-Tau, utilisés en soins courants dans les centres spécialisés depuis les années 2000 sont corrélés avec l'étendue des lésions neuropathologiques et ils permettent de refléter à la fois le processus amyloïde et les DNF. Les critères cliniques de diagnostic de la MA sont insuffisants car les TCM sont des maladies complexes, dont les profils se chevauchent, par exemple, des études neuropathologiques ont pu montrer que 40 à 80 % des cas de TCM cérébro-vasculaires étaient finalement associés à une MA (47). Le diagnostic clinique serait exact seulement dans 63 à 90 % des cas (48). Dans une série de 100 patients dont la MA a été confirmée par autopsie, le diagnostic lors de la première visite était correct dans 68% des cas, incorrect dans 16 % des cas et douteux pour les 16% restant (49). On peut logiquement s'attendre à une exactitude beaucoup plus faible lors des premières phases de la maladie et il est donc difficile de diagnostiquer précocement la MA en se fondant uniquement sur des critères cliniques. De leur côté, les biomarqueurs peuvent détecter ces changements neuropathologiques dès les stades précliniques et avant que les dépôts amyloïdes puissent être visibles par PET scan (50).

Ainsi, les critères diagnostiques révisés de l'IWG 2 de 2014 (annexe 5) et du NIA AA de 2011 (annexe 6) incluent les biomarqueurs et améliorent considérablement la précision du diagnostic de la MA et des autres TCM. Être précis précocement dans le diagnostic de cette maladie est important pour améliorer l'efficacité thérapeutique. En effet, les médicaments en cours de développement pour le traitement de la MA auraient probablement une efficacité avant que les dommages neuropathologiques ne soient généralisés.

Plus récemment, en 2018, le NIA AA propose une nouvelle classification uniquement basée sur les biomarqueurs et destinée à la recherche: la classification ATN classe les biomarqueurs du LCS et de neuroimagerie selon les trois catégories : A, T et N. « A » pour les marqueurs de la pathologie amyloïde : TEP amyloïde et [A $\beta$ 42] dans le LCS ou le ratio A $\beta$ 42/40, « T » pour les marqueurs de DNF : TEP Tau et [P-Tau] dans le LCS et « N » pour les marqueurs de neurodégénérescence : 18-Fluorodeoxyglucose-PET, IRM et [Tau] dans le LCS (39,51).

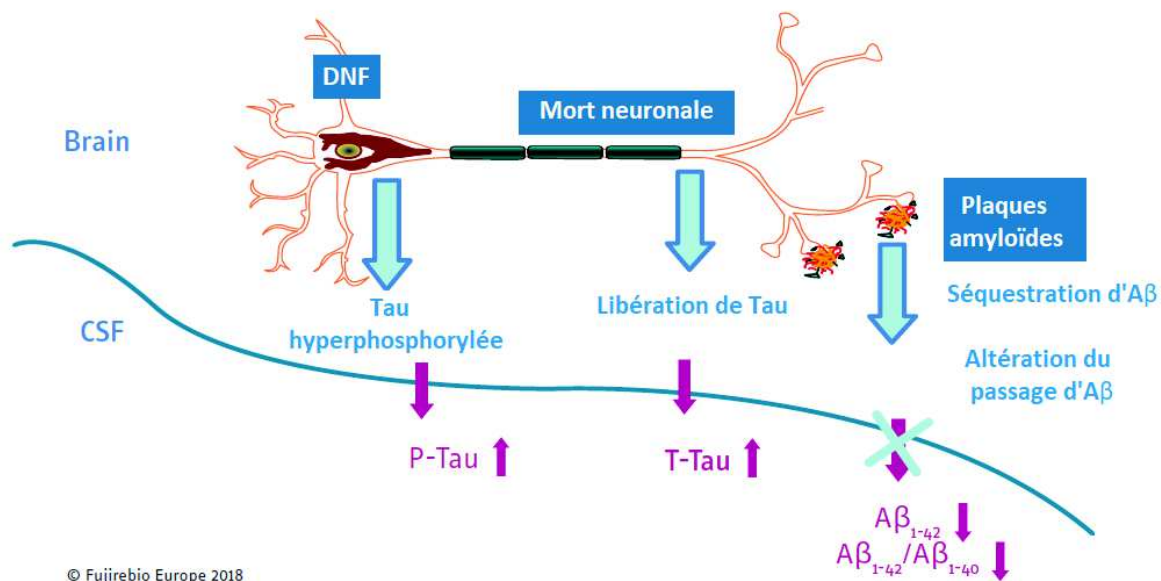
L'HAS (2011), réserve le dosage des biomarqueurs aux situations cliniques atypiques ou d'évolution inhabituelle, en cas de doute diagnostique et en particulier chez les sujets jeunes.

En 2017, un groupe de travail Européen a émis des recommandations quant à l'usage des biomarqueurs. Chez les patients MCI, pour prédire le déclin et la conversion vers le stade de TCM (52) et chez les patients au stade de TCM, ils recommandent l'utilisation des biomarqueurs du LCS afin d'identifier ou d'exclure la MA lors de présentations cliniques atypiques ou en cas de doute important (53).

Une étude multicentrique française menée sur 604 patients, a étudié la reclassification diagnostique après prise de connaissance des résultats des biomarqueurs du LCS, il s'avère que pour les cas où le diagnostic clinique initial et les marqueurs du LCS étaient discordants, la reclassification diagnostique est en faveur des biomarqueurs dans 76,9 % des cas, ce qui montre bien que les marqueurs biologiques du LCS sont d'une grande aide pour les cliniciens dans cette maladie où le diagnostic clinique est complexe (54). Toutefois, les performances diagnostiques des biomarqueurs ne sont pas de 100 %. Ils sont parfois non informatifs et de plus, ils sont souvent insuffisants pour la détermination d'un diagnostic différentiel précis. Le suivi clinique ou la réalisation d'examens paracliniques supplémentaires est alors capital et permettra d'affirmer ou d'infirmer une hypothèse diagnostique.

### 1.5.2 Profil biologique du LCS compatible avec une MA

Les patients atteints de la MA présentent des variations des biomarqueurs (A $\beta$ 42, Tau et P-Tau) du LCS caractéristiques, la combinaison d'une diminution en A $\beta$ 42 et d'une augmentation en Tau et P-Tau est définie comme étant la signature biologique d'une MA (figure 9). Toutefois, ces biomarqueurs peuvent être affectés individuellement par des pathologies non liées à la MA. Par exemple, une augmentation isolée et temporaire de Tau est observée avec des niveaux normaux de P-Tau en cas de lésions cérébrales traumatiques récentes, d'AVC ou au décours d'une crise convulsive, où Tau est corrélée à la gravité des dommages neuronaux (55,56). Une forte augmentation de Tau est aussi observée dans la maladie de Creutzfeldt-Jakob. On sait également que Tau augmente avec l'âge (57,58). Une diminution isolée en A $\beta$ 42 est typiquement constatée dans les angiopathies amyloïdes cérébrales mais également dans les méningites bactériennes, l'encéphalite liée au VIH (59) ou l'atrophie multisystématisée (60).



**Figure 9 : Les biomarqueurs du LCS, reflet du processus sous-jacent de la MA, tirée d'un document Fujirebio Europe**

La diminution d'Aβ<sub>42</sub> dans le LCS s'explique par une séquestration du peptide dans les plaques amyloïdes et un défaut d'élimination dans le LCS, elle est fortement concordante avec les dépôts amyloïdes cérébraux décrits en neuropathologie (61) et avec l'imagerie PET amyloïde que ce soit au stade de TCM ou au stade prodromal (62,63). Une augmentation de Tau et de P-Tau dans le LCS signe la dysfonction neuronale et le processus neurodégénératif de la MA et s'explique par le fait que Tau est relarguée dans l'espace extracellulaire au cours de la mort neuronale. La P-Tau est beaucoup plus spécifique de la MA que Tau (qui reflète un processus neurodégénératif de façon non spécifique), elle ne s'élève pas dans la plupart des tauopathies non MA telles que la dégénérescence cortico-basale, la paralysie supranucléaire progressive, certaines DFT. L'augmentation de P-Tau qui est un important composant des enchevêtrements neurofibrillaires dans le LCS est corrélée à la présence de DNF à l'autopsie (64) et également avec la TEP Tau (65,66). La sensibilité et la spécificité individuelles des trois biomarqueurs pour la MA et la MCI vis-à-vis de patients sains oscillent entre 80 et 92 % (47). L'association de plusieurs biomarqueurs permet d'améliorer les performances diagnostiques (67). Le profil de 3 biomarqueurs anormaux n'est pas non plus spécifique à 100% de la MA et il est possible de le retrouver dans les MCL, les angiopathies amyloïdes ou les TCM cérébro-vasculaires sous corticaux par exemple.

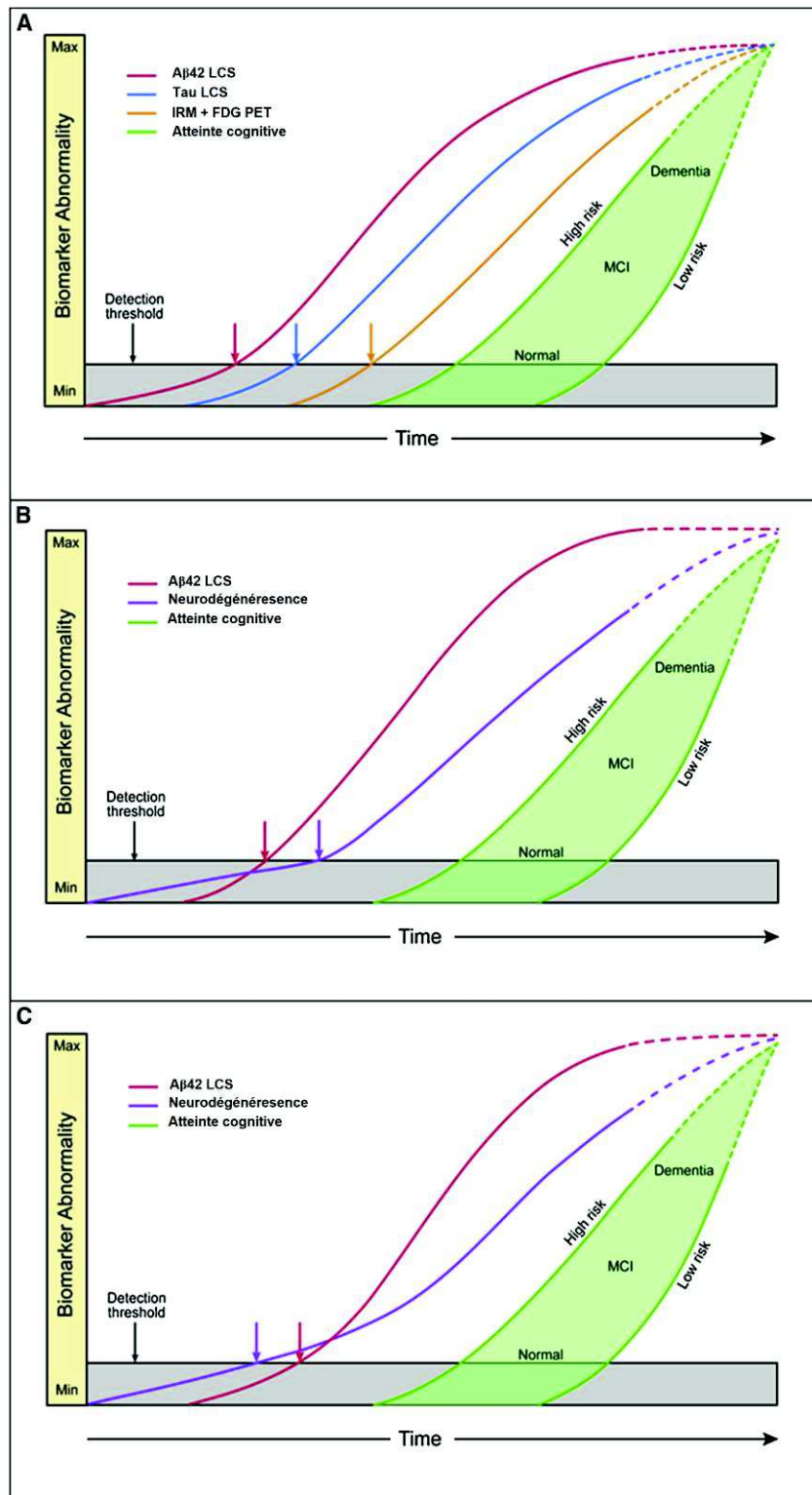
Le dosage du peptide Aβ<sub>40</sub>, qui fait également partie intégrante des plaques amyloïdes permet d'améliorer les performances diagnostiques en cas de profils biologiques discordants (Tau et

P-Tau augmentées et A $\beta$ 42 normale, ou A $\beta$ 42 diminuée et Tau et P-Tau normales). Il informe sur le niveau de synthèse globale de peptides amyloïdes qui diffère d'un sujet à l'autre. L'usage du rapport A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 permet une meilleure interprétation d'A $\beta$ 42, il peut confirmer une diminution réelle d'A $\beta$ 42 dans le LCS, suggérant la présence de plaques amyloïdes cérébrales, quand le ratio est diminué ou au contraire, si le ratio est normal alors qu'A $\beta$ 42 est diminuée cela suggère une simple variabilité physiologique de production totale en peptides amyloïdes. Le ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 corrigerait 2/3 des profils discordants A-/T+ (68) et il montrerait une meilleure concordance avec le PET amyloïde qu'A $\beta$ 42 seul (63). Toutefois, d'autres études sont moins nettement tranchées concernant l'usage du ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 (69,70).

L'évolution temporelle des biomarqueurs a été étudiée chez des familles porteuses de mutations APP, PSEN1 ou PSEN2, les premiers résultats de la cohorte DIAN (Dominantly Inherited Alzheimer Network) suggèrent que le marqueur amyloïde est le premier à devenir pathologique, la concentration en A $\beta$ 42 est diminuée dans le LCS, ce qui confirme les résultats précédents (46). Secondairement, apparaissent les marqueurs de neurodégénérescence, la concentration en Tau dans le LCS augmente puis l'atrophie cérébrale et l'hypométabolisme cérébral sont visibles à l'imagerie. Le déficit cognitif est le dernier événement dans la progression de la maladie, il est variable d'un individu à l'autre, en effet, la courbe de l'atteinte cognitive est décalée vers la gauche pour les sujets ayant une faible réserve cognitive, en revanche, la courbe est décalée vers la droite pour les sujets ayant une réserve cognitive élevée (figure 10A).

Ce modèle est en accord avec l'hypothèse de la cascade amyloïde.

Pour les formes sporadiques de la maladie à début tardif, d'autres modèles sont possibles (figures 10B et 10C). En effet, l'existence d'un processus neurodégénératif physiologique et universel lié au vieillissement se traduit par la formation de DNF dans la région temporale interne (> 50% des personnes de plus de 50 ans ont quelques DNF dans le cortex temporal interne), ce processus neurodégénératif physiologique peut être associé à des tauopathies non MA. L'apparition des plaques amyloïdes et leur progression, indépendante du phénomène précédent, provoquerait la propagation pathologique des DNF hors des régions temporales internes, ce qui serait l'élément déclencheur de la maladie. Ainsi, selon les patients la diminution d'A $\beta$ 42 dans le LCS peut précéder (figure 10B) ou non (figure 10C) les anomalies des marqueurs de neurodégénérescence, ce modèle soutient l'hypothèse fondée sur une pathogénie partagée entre A $\beta$  et Tau.



**Figure 10** : Modèle d'évolution temporelle hypothétique de la MA intégrant les biomarqueurs d'après (71). A : MA familiale, B et C : MA sporadique

L'axe horizontal représente le temps, l'axe vertical représente la sévérité de l'anomalie du marqueur, le seuil de détection des marqueurs est indiqué par la ligne horizontale noire.

Les pointillés indiquent que la trajectoire des courbes est inconnue lors de la phase terminale des TCM. Le terme de neurodégénérescence regroupe Tau LCS, IRM et FDG TEP.

### 1.5.3 Aspects pré-analytiques des dosages des biomarqueurs dans le LCS

Selon la norme ISO 15189, la phase pré-analytique comporte plusieurs étapes : la prescription d'une analyse et le recueil d'informations cliniques pertinentes, le prélèvement de l'échantillon, son transport et sa réception au laboratoire puis son pré-traitement ainsi que sa conservation. Chaque point est décisif et cette phase pré-analytique peut être à l'origine d'une variabilité considérable dans le rendu du résultat. En effet, les facteurs pré-analytiques seraient à l'origine d'au moins 40 à 60% de la variabilité totale des dosages (72).

Le LCS est le reflet des mécanismes physiopathologiques cérébraux et reste actuellement le meilleur prélèvement pour le dosage des biomarqueurs de la MA. Le prélèvement doit être effectué au niveau des vertèbres L3/L4 ou L4/L5 (72,73). Il sera fait de préférence le matin sans qu'il y ait de réelles recommandations à ce sujet. En effet, une première étude en 2007 incluant 15 patients sains de 23 à 78 ans, rapporte des fluctuations d'A $\beta$ 42 diurnes en étudiant les concentrations d'A $\beta$  chaque heure, par recueil du LCS via un cathéter lombaire à demeure sur 36 heures (74). Une étude plus récente regroupant les données de plusieurs sites (n=178) aurait mis en évidence une augmentation progressive d'A $\beta$ 42 dans les 12 premières heures, néanmoins sans retour au niveau de base après 24 heures (75). D'autres études ne confirment pas ces observations (72,76,77). La plupart des études s'intéressant aux fluctuations des biomarqueurs au cours de la journée ont été effectuées sur de petits échantillons (n < 20), plusieurs facteurs ont pu influencer les résultats, tels que la méthode de prélèvement (interactions possibles du LCS avec les parois du cathéter et la présence de biofilm bactérien), la fréquence du recueil ainsi que la quantité de LCS prélevée. Au final, l'existence d'une variabilité de concentration d'A $\beta$  au cours de la journée reste incertaine. De rares investigations portant sur les fluctuations de Tau et P-Tau au cours de la journée sont disponibles et aucune n'a révélé de changement significatif (76,78). Enfin, il n'y a aucune preuve concernant l'influence du statut alimentaire sur les concentrations en biomarqueurs du LCS. Il n'y aurait à priori pas d'évidence d'un gradient rostro-caudal significatif sur les concentrations des biomarqueurs, bien que certaines études le contestent (72,79).

La nature du tube pour le recueil du LCS est un point critique majeur. En effet, le type de plastique utilisé dans la composition des tubes servant au recueil et au stockage du LCS entraîne une variabilité importante des concentrations en biomarqueurs à doser, plus particulièrement, il a été démontré que les peptides amyloïdes sont sujets à une adsorption majeure sur les parois du tube selon le matériau utilisé. Les tubes en polypropylène sont

recommandés car ils limitent ce phénomène (79–81) alors que les tubes en verre ou en polystyrène doivent être bannis. Cependant, une étude a montré que le type de polypropylène utilisé (homo ou copolymère) modifiait également de manière significative la concentration d'Aβ42, une variation allant jusqu'à 48% a été observée parmi 11 tubes tous répertoriés par leur fabricant comme étant du polypropylène (82). Selon l'étude de Lehmann *et al*, le tube obtenant les meilleurs résultats serait le tube Starstedt 62.610.201 fait d'un copolymère constitué de polypropylène et polyéthylène (80).

En ce qui concerne la stabilité des biomarqueurs à température ambiante avant centrifugation, la plupart des études montrent que durant les premières 24 heures, les concentrations d'Aβ42, Tau et P-Tau sont stables (83–85), passé ce délai, les résultats divergent, certains rapportent une stabilité des quatre biomarqueurs à température ambiante durant quatre jours (86), d'autres observent une augmentation de la concentration en Aβ42 (>15%) (84) ou une diminution (d'environ 20%) (87). La centrifugation rapide reste toutefois importante lorsque les échantillons sont hématiques.

L'aspect du LCS est un point important à considérer, la présence de sang ou de concentration élevée en protéines dans le LCS vont perturber la stabilité des biomarqueurs. Par exemple, l'albumine en excès va pouvoir se lier aux biomarqueurs tandis que des protéases présentes dans le sang vont les dégrader. La PL est un geste délicat qui peut être variablement traumatique selon l'expérience des préleveurs, une contamination sanguine peut être observée dans 14 à 20% des cas selon la littérature. C'est pour cela, que la centrifugation du prélèvement est une étape indispensable permettant d'éliminer les cellules sanguines interférentes. Del Campo *et al* recommandent d'ailleurs d'effectuer la centrifugation des échantillons hémorragiques dans les 2 heures suivant le prélèvement afin d'éviter une lyse cellulaire (88). Jusqu'à 5000 érythrocytes/μL, les échantillons centrifugés dans un délai de 2 heures pourraient être analysés sans interférence manifeste (81,83).

Par ailleurs, la température de centrifugation n'aurait pas de réel impact sur les concentrations en biomarqueurs (81) et la vitesse de centrifugation non plus (79,81).

Après centrifugation, le LCS est ensuite aliquoté dans des microtubes en polypropylène et il est recommandé de les remplir à 50 ou 75% de leur volume total. Plusieurs études soutiennent l'intérêt de la limitation du rapport surface/volume, afin de réduire au maximum l'adsorption, cependant les résultats varient d'une étude à l'autre et souvent la différence observée entre les



différents remplissages est inférieure au coefficient de variation de la méthode (72,79,81). La congélation des tubes s'effectue à moins 80 °C (73,89), à cette température, la stabilité des biomarqueurs est de plusieurs années (90) et il serait possible d'effectuer au maximum 3 cycles de congélation / décongélation avant qu'une baisse de concentration significative en A $\beta$ 42, Tau et P-Tau ne soit observée (81). Même si le nombre de cycles en question diffèrent d'une étude à l'autre, toutes ont convenu que l'augmentation du nombre de cycle de congélation/décongélation diminue les concentrations des biomarqueurs (79).

#### 1.5.4 Méthodes de dosage

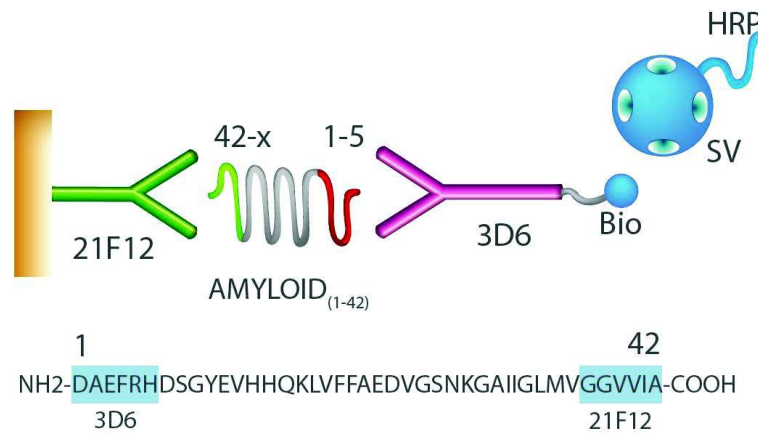
##### 1.5.4.1 Techniques ELISA manuelles INNOTEST®

Depuis plus de 20 ans, les techniques manuelles INNOTEST® ont été largement utilisées pour le dosage des biomarqueurs Alzheimer dans le LCS. C'est une technique ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay) dite en « sandwich », commercialisée initialement par le laboratoire INNOGENETICS qui a été racheté par FUJIREBIO en 2010. Une plaque sensibilisée par des anticorps de capture spécifiques de la protéine à doser est utilisée, les échantillons de LCS sont alors déposés et incubés simultanément avec un anticorps de détection couplé à la biotine. Après plusieurs lavages, un conjugué streptavidine-peroxydase est ajouté, le complexe [protéine à doser - anticorps] pourra être détecté après addition d'une solution de substrat qui est transformée en un produit coloré. Enfin la réaction est stoppée par l'ajout d'une solution d'acide sulfurique. La densité optique est alors mesurée à 450nm par un spectrophotomètre, l'intensité de coloration obtenue est proportionnelle à la quantité de protéine à doser. Une gamme d'étalonnage en plusieurs points de concentration connue est réalisée à chaque série et à partir de cette gamme il sera possible de déduire les concentrations en protéines des échantillons des patients, des échantillons de contrôle interne sont également dosés dans chaque série. Au laboratoire, chaque échantillon est dosé en double, le résultat final étant la moyenne des deux passages. Cette technique peut être semi-automatisée à l'aide de processeurs ELISA (91–94).

Les trousse INNOTEST® de dosage des peptides amyloïdes A $\beta$ 42 et A $\beta$ 40, de la protéine Tau totale et de la P-Tau ont été utilisées pour notre travail.

### Dosage du peptide A $\beta$ 42 et A $\beta$ 40 :

- L'A $\beta$ 42 est capturée par un anticorps monoclonal spécifique (21F12) présent sur la phase solide qui reconnaît 6 acides aminés au niveau de la fraction C-terminale du peptide (figure 11), tandis que l'anticorps monoclonal biotinylé (3D6) de détection se lie sur 6 acides aminés de la partie N-terminale (95).

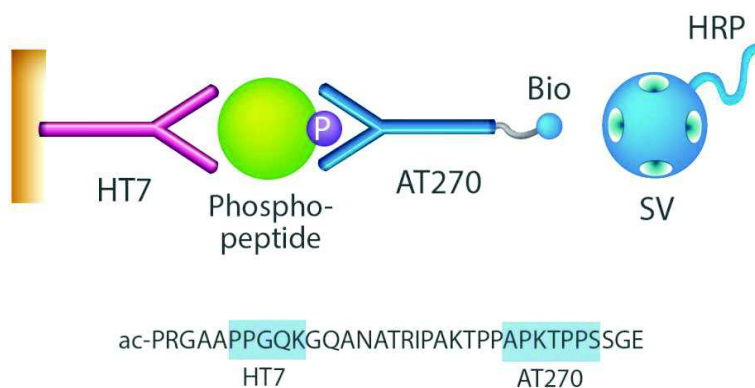


### **Figure 11 : Principe de la méthode INNOTEST® A $\beta$ 42 et séquence du peptide A $\beta$ 42**

(Bio=biotine, SV= streptavidine, HRP= peroxydase de la racine de raifort), issue de (91)

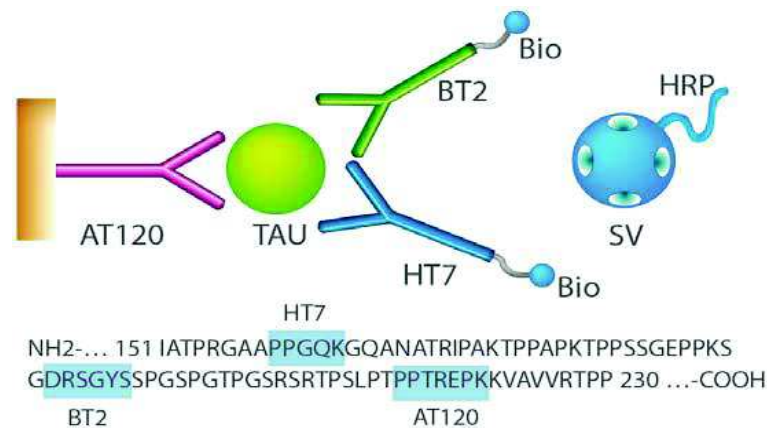
- Le principe est similaire pour le peptide A $\beta$ 40, l'anticorps de capture 2G3 est utilisé et l'anticorps de détection est le même que pour l'A $\beta$ 42 (3D6) (94).

• La P-Tau (figure 12) est capturée par un anticorps monoclonal spécifique (HT7) présent sur la phase solide. L'anticorps monoclonal biotinylé (AT270) de détection reconnaît spécifiquement la Tau phosphorylée en position thréonine 181 (96). Aucune réactivité n'a été obtenue en utilisant des peptides non phosphorylés ou phosphorylés sur d'autres sites. Le site de phosphorylation sur la thréonine 181 est un site de phosphorylation physiologique. En effet, chez des sujets sains, la quantité de Tau phosphorylée sur ce site est d'environ 20 à 30% (97). En revanche, lorsque Tau est présente sous la forme de paires hélicoïdales à l'origine des DNF, la quantité de Tau phosphorylée sur ce site est d'environ 85% (96). Différents épitopes ont été étudiés et aucune supériorité pour un épitope en particulier n'a été démontré dans la littérature, par exemple dans l'étude de Hampel *et al*, les dosages des P-Tau (Thr181), P-Tau (Thr231) et P-Tau (Ser199) ont été comparés et indiquent qu'il n'y a pas de différence entre les 3 épitopes quant à la discrimination des patients MA vs non MA (98).



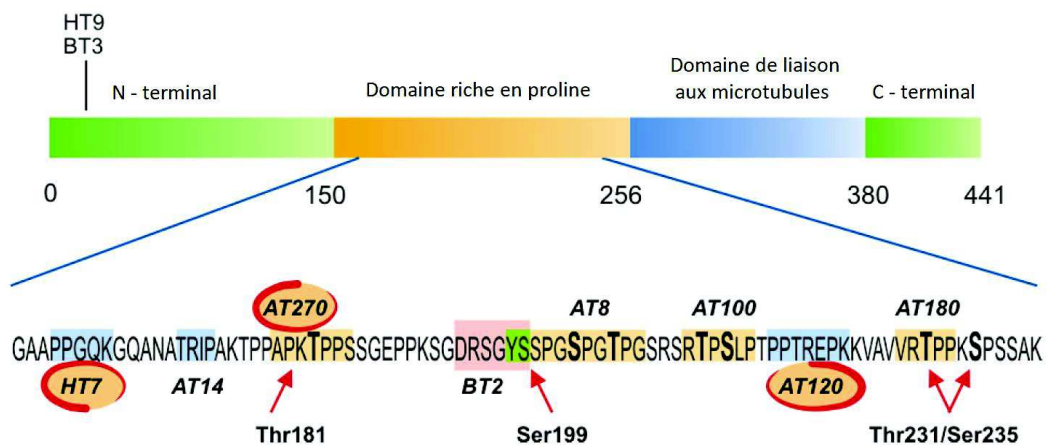
**Figure 12** : Principe du dosage INNOTEST® P-Tau<sub>(181P)</sub> et séquence partielle de la protéine intégrant les épitopes des anticorps monoclonaux, issue de (92).

- La Tau (figure 13) est capturée par un anticorps monoclonal spécifique (AT120) (99) présent sur la phase solide et deux anticorps de détection sont utilisés (BT2 et HT7) (100).



**Figure 13** : Principe du dosage INNOTEST® Tau totale et séquence partielle de la protéine intégrant les épitopes des anticorps monoclonaux, issue de (93)

Les 3 anticorps monoclonaux utilisés dans le Kit INNOTEST® Tau ont un épitope dans la région riche en prolines de Tau, toutes les isoformes de la protéine sont donc reconnues sans influence des niveaux de phosphorylation (figure 14).



**Figure 14** : Vision globale des épitopes des anticorps de FUJIREBIO Europe dans la région riche en prolines de Tau, issue de (92)

Les caractéristiques des dosages pour chaque biomarqueur ont été récapitulées dans le tableau suivant :

Tableau I : Caractéristiques analytiques des tests INNOTEST®

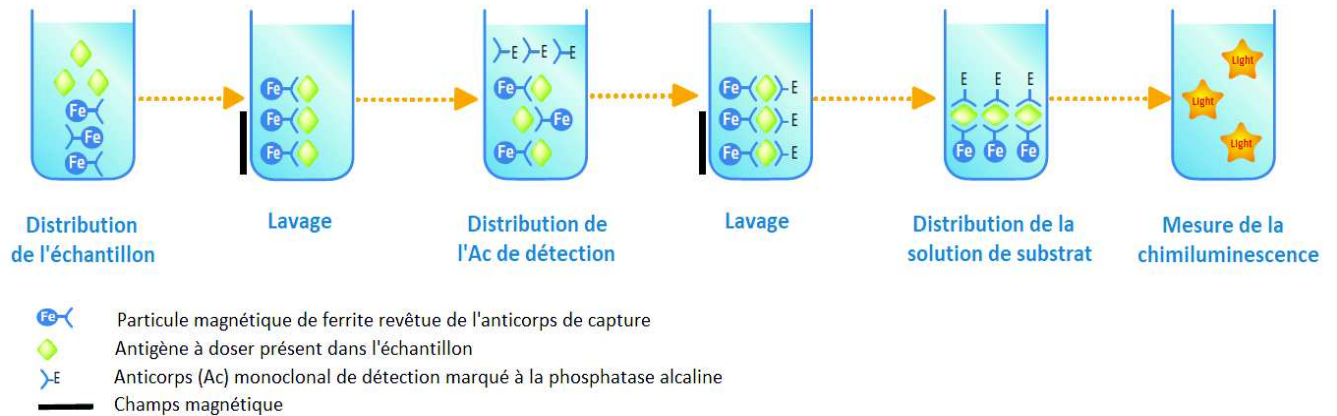
|   | Aβ42       | Tau               | P-Tau             | Aβ40                                  |
|---|------------|-------------------|-------------------|---------------------------------------|
| Limite de détection (ng/L)                      | 65         | 34                | 13                | 2,8                                   |
| Limite de quantification (ng/L)                 | 225        | 57                | 20                | 3,4                                   |
| Plage de Linéarité (ng/L)                       | 225 - 1452 | 57 - 968          | 20 - 199          | 3,4 – 459                             |
| Temps d'analyse                                 | ~ 4 heures | 1 nuit + 3 heures | 1 nuit + 4 heures | 1 nuit + 3 heures                     |
| Volume utilisé (μL)                             | 60         | 25                | 75                | 5 (puis dil au 1/100 <sup>ème</sup> ) |
| Volume utilisé lors du dosage en duplicate (μL) | 120        | 50                | 150               | 10                                    |
| Anticorps de capture                            | 21F12      | AT120             | HT7               | 2G3                                   |
| Anticorps de détection                          | 3D6        | HT7 et BT2        | AT270             | 3D6                                   |

#### 1.5.4.2 Technique automatisée LUMIPULSE® G600II

La technique automatisée LUMIPULSE® commercialisée par FUJIREBIO est une technique CLEIA (Chemi-Luminescent Enzyme Immuno-assay) en deux étapes. Cette technologie est disponible depuis 2018 pour les quatre biomarqueurs. L'échantillon est mis en présence d'une suspension de particules sur lesquelles sont fixés les anticorps monoclonaux de capture spécifique de la protéine à doser, des complexes antigène-anticorps sont alors formés. Après lavage, les anticorps monoclonaux de détection marqués à la phosphatase alcaline (ALP) sont ajoutés et se lient aux complexes. Une solution de substrat est ensuite ajoutée et mélangée aux particules. L'AMPPD\* contenu dans la solution de substrat est déphosphorylé par catalyse par l'ALP indirectement conjuguée aux particules. La luminescence générée par la réaction de

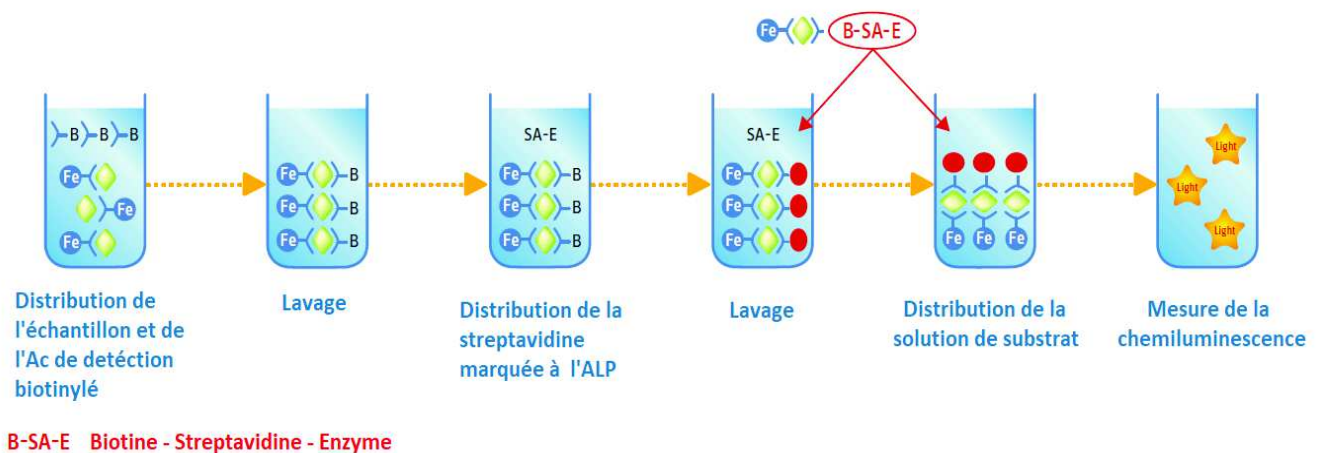
\* 3-(2'-spiroadamantane)-4-methoxy-4-(3''-phosphoryloxy)phenyl-1, 2-dioxetane

clivage de l'AMPPD déphosphorylé est mesurée à une longueur d'onde maximale de 477 nm par un tube photomultiplicateur. Le signal lumineux reflète la quantité de protéine à doser présente dans l'échantillon (101,102) (figure 15).



**Figure 15 : Principe de la technique CLEIA automatisée sur LUMIPULSE® pour le dosage de P-Tau et Aβ40 (adaptée de FUJIREBIO)**

Les dosages d'Aβ42 et de Tau Totale comportent une spécificité supplémentaire : dès la première étape, en plus des anticorps de capture fixés à des particules, sont ajoutés des anticorps de détection biotinylés spécifiques de la protéine à doser et la streptavidine marquée à l'ALP est ensuite ajoutée et se lie aux complexes formés (103,104) (figure 16).



**Figure 16 : Principe de la technique CLEIA automatisée sur LUMIPULSE® pour le dosage de Tau et Aβ42 (adaptée de FUJIREBIO)**

Les caractéristiques des dosages pour chaque biomarqueur ont été récapitulées dans le tableau suivant :

Tableau II : Caractéristiques analytiques des tests LUMIPULSE®

|                                 | A $\beta$ 42 | Tau        | P-Tau       | A $\beta$ 40 |
|---------------------------------|--------------|------------|-------------|--------------|
| Limite de détection (ng/L)      | 7,17         | 141        | 0,282       | 2,78         |
| Limite de quantification (ng/L) | 14,02        | 150        | 1,058       | 4,08         |
| Plage de Linéarité (ng/L)       | 131 - 2069   | 150 - 1919 | 3,5 – 314,7 | 207 - 18644  |
| Temps d'analyse (min)           | 35           | 35         | 35          | 35           |
| Volume utilisé ( $\mu$ L)       | 50           | 75         | 40          | 40           |
| Anticorps de capture            | 21F12        | AT120      | HT7         | 2G3          |
| Anticorps de détection          | 3D6          | HT7 et BT2 | AT270       | 3D6          |

Les avantages/inconvénients et différences notables entre les deux techniques de dosage sont récapitulés en annexe 7.

### 1.5.4.3 Autres méthodes commercialisées pour le dosage des BM du LCS

- Méthodes ELISA - plaques (manuelles) :
  - EUROIMMUN® (CE/IVD) : Tau, P-Tau, A $\beta$ 42 et A $\beta$ 40.
  - IBL® (IVD) : Tau, P-Tau, A $\beta$ 42 et A $\beta$ 40.

Ces méthodes présentent les mêmes inconvénients que l'INNOTEST® et elles sont beaucoup moins utilisées et validées.

- Méthode en immunoanalyse automatisée :
  - ROCHE® (CE/IVD) : Tau, P-Tau et A $\beta$ 42.
- Autres approches :
  - MSD® (RUO) : Tau, P-Tau, A $\beta$ 42 et A $\beta$ 40.
  - LUMINEX® (RUO) : Alz Bio3 : Tau, P-Tau et A $\beta$ 42
  - SIMOA® (RUO) : Tau plasmatique, A $\beta$ 42 plasmatique, A $\beta$ 40 plasmatique

### 1.5.4.4 Facteurs de variabilité analytique

Les différentes étapes de la phase analytique peuvent causer une variabilité des résultats. La méthode manuelle avec des étapes de pipetage, agitation et lavages est fortement dépendante de la dextérité de l'opérateur. Il est particulièrement important de respecter les recommandations analytiques du fournisseur, devant être claires et précises afin de limiter au mieux une interprétation subjective de ces données en fonction d'un laboratoire à un autre. Un autre facteur de variabilité analytique est l'étalonnage de l'instrument qui se fait à l'aide de standards (ou étalons) de concentrations définies, ils permettent de calibrer un système avant le début de l'analyse. Une courbe de calibration issue de différents points de mesure est utilisée pour quantifier l'analyte. Les calibrants peuvent être fournis prêt à l'emploi ou à reconstituer. Les points de gamme peuvent être préparés de manière industrielle ou interne au laboratoire. Il peut exister des variations analytiques (normalement maîtrisées) lors des changements de kits de calibration appartenant à des lots différents. Enfin, d'autres facteurs entrent en jeu dans la variabilité analytique du dosage tels que la spécificité des anticorps, la disponibilité des épitopes de l'antigène à doser, les différences de matrice entre les étalons et les échantillons ou les réglages de l'instrument.



#### 1.5.4.5 Matériaux de référence certifiés (CRM)

La fabrication et l'attribution de valeur de concentration aux standards (ou étalons) diffère selon les fournisseurs, ce qui peut entraîner un biais systématique des concentrations mesurées en fonction des différents kits. L'harmonisation des résultats entre fournisseurs industriels de diagnostics in vitro (DIV) est possible grâce à l'utilisation de matériaux de référence certifiés (CRM) ; ils sont accompagnés d'une documentation délivrée par un organisme faisant autorité et fournissant une ou plusieurs valeurs certifiées de l'analyte à doser avec les incertitudes associées. Souvent appelés « étalons internationaux », les CRM, quand ils existent, sont utilisés par chaque industriel pour le titrage des étalons commerciaux qui seront fournis aux laboratoires de biologie médicale. L'objectif est d'obtenir une transférabilité optimale du dosage de l'analyte concerné et *in fine* d'aboutir à l'utilisation d'intervalles de référence communs à toutes les méthodes et à tous les laboratoires pour des populations comparables. A l'heure actuelle, trois CRM ont été mis au point par l'IFCC (the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) uniquement pour l'Aβ42, ils correspondent à 3 niveaux de concentrations différents d'Aβ42 (ERM®-DA480, ERM®-DA481 et ERM®-DA482) et sont disponibles depuis le 1<sup>er</sup> décembre 2017 (105). En décembre 2018, la société Fujirebio a été le premier des fournisseurs de DIV à se raccorder à ce premier étalon international en modifiant les valeurs des standards d'Aβ42 qu'elle commercialise avec ses trousse, Fujirebio avait alors conclu qu'un facteur de correction (division par 1,46) devait être appliqué. Les kits d'Aβ42 corrigés vis-à-vis des CRM sont disponibles pour le LUMIPULSE® depuis Janvier 2019 (106). Les autres fournisseurs devraient par la suite eux aussi converger vers le CRM d'Aβ42. Les autres paramètres Tau et P-Tau n'ont pas à ce jour d'étalon international.

#### 1.5.5 Interprétation des biomarqueurs du LCS : ratios et outils facilitants

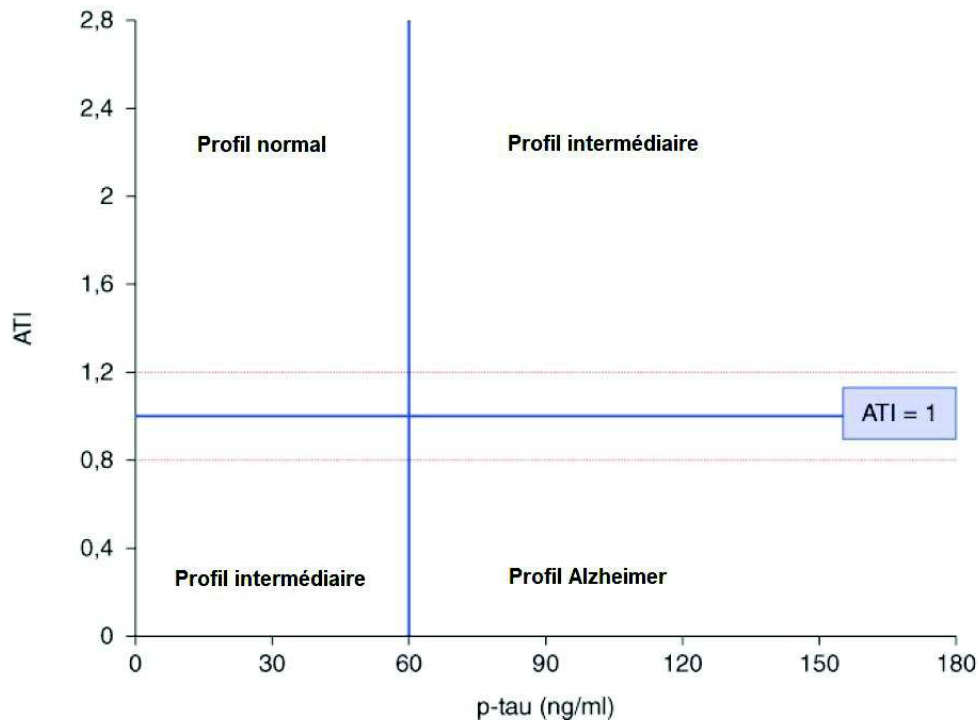
Depuis 1997, les biomarqueurs du LCS ont progressivement été intégrés en pratique clinique spécialisée. Afin d'harmoniser l'interprétation, différents outils et ratios facilitants ont été développés et différentes recommandations ont été émises par des groupes d'experts.

##### •Outils et ratios facilitants :

- Le ATI ou IATI (Innotest Amyloid Tau Index) intégrant Aβ42 et Tau dans la formule de régression suivante :  $A\beta42 / (240 + 1,18 \times \text{Tau})$  est proposé pour la première fois

en 1999 par Hulstaert *et al* (107). Son équipe montre que selon ce modèle, il y a une amélioration des performances diagnostiques avec la combinaison de ces biomarqueurs pour le diagnostic de MA vs contrôles (sujets sains + autres pathologies neurologiques) avec une sensibilité de 85% et une spécificité de 86%.

La représentation graphique de cet index en fonction de P-Tau combine les 3 biomarqueurs (figure 17), on obtient 4 zones correspondant à différents profils permettant de classer les patients.



**Figure 17 : Représentation graphique de l'index ATI/P-Tau, adaptée de (14)**

Les profils intermédiaires peuvent correspondre à des situations cliniques diverses (maladie d'Alzheimer atypique ou débutante, MCI, autres maladies dégénératives). Longtemps utilisé pour l'interprétation des résultats en technique INNOTEST®, le IATI n'est plus utilisable avec la technique automatisée LUMIPULSE®

- Ratio P-Tau/A $\beta$ 42 : la combinaison d'A $\beta$ 42 et P-Tau est pertinente, en effet on a pu voir que P-Tau est plus spécifique du processus neurodégénératif de la MA que Tau. Dans l'étude de Tapiola *et al* en 2019 (108), le rapport A $\beta$ 42/P-Tau est le mieux corrélé à la présence de plaques neuritiques à l'examen neuropathologique, avec une sensibilité de 91,6% et une spécificité de 85,7% et aussi le mieux corrélé au stade de Braak (DNF)(28) avec une sensibilité 82,7% de et une spécificité de 100%.

- Le PLM scale (2014) utilise un modèle simple et intuitif : il catégorise les patients en fonction du nombre de marqueurs pathologiques, les probabilités (avec un intervalle de confiance à 95%) qu'un patient soit atteint d'une MA sont respectivement de : 9,6% (6,0 à 13,2%) pour un score égal à 0 (tous les biomarqueurs sont normaux), 24,7 % (18,0 % à 31,3%) pour un score égal à 1 (un biomarqueur pathologique sur trois), 77,2% (67,8 à 86,5%) pour un score égal à 2 (deux biomarqueurs pathologiques sur trois) et 94,2% (90,7% à 97,7%) pour un score égal à 3 (les trois biomarqueurs sont pathologiques). Les scores 2 et 3 sont considérés comme étant positifs pour le diagnostic de MA (109). L'échelle surpasse les biomarqueurs du LCS lorsqu'ils sont utilisés seuls.

Dans l'étude de 2014, le PLM scale est comparé à un modèle de régression logistique permettant de prédire la présence probable de la MA, similaire à celui de Spies *et al* (110), dans lequel sont intégrés le sexe, A $\beta$ 42 et P-Tau. On observe que 23,25% des patients sont mieux classés avec le PLM scale.

- Une révision de cette échelle diagnostique (PLMR scale 2018) dans laquelle A $\beta$ 42 a été remplacé par le ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 a montré une diminution des profils discordants (111). Deux cohortes ont été étudiées, dans la première (Mtp1), le dosage d'A $\beta$ 40 a été effectué de façon systématique, alors que dans la deuxième (Mtp2), le dosage d'A $\beta$ 40 n'a été effectué que lorsque l'un des biomarqueurs se trouvait en zone grise ou en cas de discordance entre l'hypothèse diagnostique clinique et la valeur d'A $\beta$ 42. Le pourcentage de MA bien classés (classe 3) a augmenté de 38 à 83% pour Mtp1 et de 33 à 53% pour Mtp2. Une diminution des profils discordants passant de 34 à 16,3 % et de 37,5 à 19,8% respectivement pour Mtp1 et Mtp2.
- Ratio Tau/P-Tau : lorsque la concentration en Tau est élevée > 1400 ng/L, d'autres diagnostics comme celui de la maladie de Creutzfeldt-Jakob doivent être évoqués, le calcul du ratio Tau/P-Tau présente un intérêt dans ces situations, en effet la combinaison d'une Tau>1400 ng/L et d'un ratio Tau/P-Tau > 25 présente une sensibilité de 78,5% et une spécificité de 99,6% pour le diagnostic de maladie de Creutzfeldt-Jakob vis-à-vis de la MA (112). C'est le seul ratio ayant à ce jour démontré son utilité pour étayer un diagnostic différentiel de la MA.

Toutefois, l'analyse et l'interprétation des biomarqueurs du LCS reste complexe du fait de nombreuses perturbations pré-analytiques, analytiques et des réunions de concertation pluridisciplinaire sont utiles entre biologistes et cliniciens afin d'exploiter au mieux ces résultats.

### 1.5.6 Prise en charge basée sur l'interprétation des biomarqueurs du LCS

#### •Recommandations d'un groupe de travail multidisciplinaire d'experts européens de 12 pays (2017) concernant l'interprétation des biomarqueurs :

##### → Au stade de TCM (53):

- Lorsque tous les biomarqueurs sont normaux, il est peu probable que la MA soit la cause des TCM.
- Lorsque les résultats des biomarqueurs du LCS présente un profil de MA typique c'est-à-dire : A $\beta$ 42 diminuée, Tau et P-Tau augmentées, il y a une grande probabilité que les TCM soient causés par la MA, le patient se verra proposer un traitement par inhibiteurs de l'acétylcholinestérase ou par mémantine (et/ou il aura la possibilité de participer à des essais cliniques).
- Lorsque les résultats des biomarqueurs sont proches des valeurs seuils, ils doivent être interprétés avec prudence. Il existe une zone grise de 10% inhérente à la variabilité analytique et intra-individuelle qui serait de l'ordre de 5%. Dans ce cas, un autre biomarqueur peut être ajouté ou l'analyse pourra éventuellement être répétée.
- Lorsque le profil est discordant :
  - Chez les patients présentant une Tau ou P-Tau augmentées mais une A $\beta$ 42 normale, d'autres troubles neurodégénératifs peuvent être envisagés et d'autres biomarqueurs tels que l'A $\beta$ 40 ou des biomarqueurs d'imagerie peuvent être ajoutés pour clarifier le diagnostic.
  - A $\beta$ 42 diminuée et Tau et/ou P-Tau normales, il est recommandé de vérifier le compte cellulaire du LCS et le quotient albumine. La MA reste une cause possible de TCM bien que moins probable. Une réanalyse pourra être envisagée et l'ajout d'un autre biomarqueur (imagerie) peut être effectué pour clarifier le diagnostic. On peut souligner que curieusement le groupe de travail ne recommande pas le dosage de l'A $\beta$ 40 alors qu'il peut avoir un apport supplémentaire et débrouiller ces situations.

Les auteurs (53) ne sont pas en mesure de recommander l'utilisation d'un biomarqueur plus qu'un autre et n'a pas mis en évidence la supériorité des biomarqueurs du LCS par rapport aux biomarqueurs d'imagerie, faute de preuves disponibles. Finalement c'est la facilité d'accès à l'imagerie PET ou la proximité d'un laboratoire spécialisé dans l'analyse du LCS qui jouera un rôle dans la sélection du marqueur complémentaire à réaliser. Plusieurs études ont prouvé l'efficacité des biomarqueurs dans la différenciation des sujets MA versus sujets âgés sains, mais seules quelques études ont abordé la question du diagnostic différentiel.

→ Au stade MCI (52):

- Les biomarqueurs permettent d'identifier le risque de progression des symptômes vers le stade de TCM si la MA est la cause de ces troubles cognitifs : avec des biomarqueurs normaux le risque d'évolution vers le stade de TCM est de 14% et avec des biomarqueurs anormaux de 54% (113). Le groupe de travail recommande de conseiller aux patients atteints de MCI la réduction de facteurs de risque liés au mode de vie, d'offrir des conseils et un soutien continu, de traiter les comorbidités, de leur offrir un traitement pharmacologique le plus tôt possible et de leur proposer l'inclusion dans des essais cliniques. La réalisation d'une ponction lombaire à ce stade pourra permettre d'identifier une maladie neuro-inflammatoire ou infectieuse qui peut être traitée (Encéphalopathie de Lyme, neurosyphilis).

## 1.6 Les autres biomarqueurs dans le LCS

De nombreux travaux de recherche portant sur de nouveaux biomarqueurs impliqués dans la mort neuronale, l'atteinte synaptique ou l'inflammation sont en cours ; certains marqueurs ont pu montrer un intérêt possible (liste non exhaustive) :

- Les neurofilaments légers (NFL) : Ce sont des constituants des neurones présents dans les corps cellulaires, les dendrites et les axones, ils possèdent diverses missions et sont notamment impliqués dans le maintien de l'architecture cellulaire, dans le transport axonal et dans la régulation de la formation des microtubules. Non spécifiques de la MA, ils sont augmentés dans le LCS au cours des atteintes neurodégénératives et sont proposés comme marqueurs pronostiques potentiels pour le suivi de la dégénérescence

axonale. Chez les patients MCI, ils sont corrélés à l'évolution du déclin cognitif et à l'atrophie cérébrale.

- VLP-1 (Visinin-like protein 1) : protéine appartenant à la superfamille de la calmoduline, elle est impliquée dans la neurotoxicité à médiation calcique, VLP-1 reflète la mort neuronale et est modérément augmenté au cours de la MA.
- YKL-40 : protéine principalement exprimée par les astrocytes, sa fonction physiologique reste floue mais elle est associée aux processus neuro-inflammatoires, à l'activation astrocytaire et microgliale. Il a été constaté qu'elle est modérément augmentée dans la MA.

La méta analyse de Olsson *et al* (2016), a montré que les NFL permettaient de différencier de façon significative les patients MA de patients contrôles (ratio MA/contrôles = 2,35) tandis que le pouvoir discriminant de VLP 1 et YKL-40 était modéré avec des ratios MA/contrôles de 1,46 et 1,28 respectivement. Pour comparaison, les ratios MA/contrôles pour A $\beta$ 42, Tau et P-Tau sont respectivement de 0,56, 2,54 et 1,88. Notons toutefois, que VLP 1 et YKL-40 ont été moins étudiés, dans des essais de plus petite taille rapportant des résultats hétérogènes et sans avoir le recul nécessaire quant aux potentiels facteurs pré-analytiques pouvant influencer les résultats des dosages. Ces marqueurs pourraient être utiles dans des essais cliniques thérapeutiques pour la prévention ou le traitement de la MA en tant que mesure de la neurodégénérescence et de l'activation gliale, indépendante de Tau et A $\beta$  (114).

- La neurogranine : protéine post synaptique présente au niveau des dendrites, son dosage permet d'analyser la dégénérescence synaptique qui est un évènement précoce au cours de la MA. La concentration en neurogranine dans le LCS est élevée chez les patients MA et MCI et elle est corrélée avec l'évolution du déclin cognitif chez les patients MCI (115). Une étude récente suggère qu'un taux élevé de neurogranine dans le LCS pourrait être spécifique de la MA (116).

## 1.7 Les biomarqueurs sanguins

La PL est un geste invasif et difficile à généraliser à grande échelle et il ne fait aucun doute que le prélèvement de sang serait préférable au LCS tant pour le diagnostic des patients mais aussi dans le cadre des essais cliniques où des prélèvements répétés sont souvent nécessaires. Le développement de dosages sanguins représente donc un défi à relever mais la mise au point de biomarqueurs sanguins pour la MA s'avère difficile, tout d'abord parce que des

quantités infimes de protéines d'origine cérébrale entrent dans le sang : il y a 10 à 20 fois moins d'A $\beta$ 42 et d'A $\beta$ 40 dans le sang que dans le LCS et environ 100 fois moins pour Tau et les NFL. Ces biomarqueurs doivent être mesurés dans une matrice contenant des niveaux élevés de nombreuses autres protéines plasmatiques ce qui introduit un risque élevé d'interférence dans les méthodes d'analyse. De plus, les protéines cérébrales libérées dans le sang peuvent être dégradées par des protéases du sang circulant, métabolisées dans le foie ou éliminées par voie rénale, ce qui introduit une variabilité qui n'est pas liée aux changements cérébraux et qui est difficile à contrôler. Néanmoins, la mise au point de techniques ultrasensibles a fait naître de nouveaux espoirs.

La technique SIMOA (single molecule array) est une technique immuno-digitale ultrasensible commercialisée par QUANTERIX®, la sensibilité de la méthode est de l'ordre du fg/mL alors que la sensibilité de la technique LUMIPULSE est de l'ordre du pg/mL. Cette technique est basée sur une nouvelle approche d'immunodosage en sandwich avec des supports modifiés permettant d'être plus sensible. Cette technique est réservée à quelques centres dans le monde, et plutôt à visée de recherche (117).

L'évaluation du dosage d'A $\beta$ 42 plasmatique par cette technique dans la cohorte suédoise bioFINDER de 719 patients a montré une corrélation faible mais significative entre le dosage d'A $\beta$ 42 et le ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 plasmatiques et les mesures correspondantes dans le LCS. Un rapport A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 a été retrouvé significativement plus faible chez les MCI et MA par rapport aux contrôles, cependant l'analyse des courbes ROC a montré que ni A $\beta$ 42, ni le rapport A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ne permettaient de discriminer de façon suffisante les patients en fonction de leur statut en TEP amyloïde ou en fonction du profil biologique typique de la MA (P-Tau et Tau augmentés et A $\beta$ 42 diminué) (118). Des études dont les effectifs sont plus faibles que la précédente étude ont aussi évalué le dosage des peptides A $\beta$  par immunoprécipitation couplé à la spectrométrie de masse, certaines révèlent une diminution significative d'A $\beta$ 42 et du rapport A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 chez les patients TEP amyloïde positif par rapport aux TEP amyloïde négatif (119,120).

Concernant la protéine Tau plasmatique, il a été montré dans la méta-analyse de Olsson *et al*, une différence significative de concentration chez les patients MA vs contrôle (ratio 1,95)(114). La technique de dosage ultrasensible SIMOA® permet également de mesurer la protéine Tau dans le sang, une vaste étude portant sur les cohortes DIAN et bioFINDER a été menée afin d'évaluer la pertinence du dosage de Tau dans le plasma, cette étude montre une

discrète augmentation de la protéine Tau plasmatique dans le groupe MA de la cohorte DIAN par rapport aux sujets contrôles, mais ce constat n'est cependant pas retrouvé dans la cohorte bioFINDER. Les données longitudinales de la cohorte DIAN ont montré que la Tau plasmatique était corrélée au déclin cognitif et à l'atrophie cérébrale (121).

Au total, que ce soit pour A $\beta$ 42 ou Tau, les études sur le sujet sont contradictoires et n'ont pour l'instant pas montré d'intérêt majeur concernant le dosage de ces biomarqueurs dans le sang avec les méthodes existantes.

En ce qui concerne les neurofilaments légers (NFL), une étude menée dans la cohorte DIAN, a démontré que le dosage dans le plasma était étroitement corrélé au dosage dans le LCS. Aussi, une augmentation significative des NFL plasmatiques a été retrouvée chez les patients MA aux stades symptomatique et pré clinique. Enfin, le dosage de NFL plasmatique est corrélé au déclin cognitif, à l'atrophie cérébrale et à l'hypométabolisme mesuré par FDG-PET (122). Rappelons toutefois, que si les NFL reflètent bien l'existence d'un processus neurodégénératif, ils ne sont pas des marqueurs spécifiques de la MA.



## 1.8 Objectifs de l'étude

Le laboratoire de biochimie au CHU de Rouen réalise le dosage des biomarqueurs Alzheimer Tau, P-Tau, A $\beta$ 42 et A $\beta$ 40 dans le LCS par technique manuelle ELISA (INNOTEST® Innogenetics, Fujirebio) depuis 2008. De nouvelles techniques automatisées sont désormais disponibles, permettant d'espérer mettre à disposition plus rapidement les résultats des examens biologiques au clinicien demandeur et au patient.

L'objectif de ce travail est d'effectuer une validation de méthode et une vérification des performances analytiques du dosage des biomarqueurs Tau, P-Tau, A $\beta$ 42 et A $\beta$ 40 dans le LCS sur l'automate LUMIPULSE® G600II, de comparer cette méthode automatisée à la méthode manuelle INNOTEST® et de réévaluer si besoin les valeurs seuils en faveur du diagnostic de la MA.

Lors du démarrage de l'activité, le laboratoire a adopté les valeurs usuelles fournies par la littérature (Tau et A $\beta$ 42, (123)) ou par l'industriel du DIV (P-Tau, données INNOGENETICS), elles ont ensuite été affinées au cours du temps et via des échanges d'expérience entre laboratoires français utilisant ces trousse pour aboutir aux seuils utilisés depuis 2013 et jusqu'à aujourd'hui.

Aujourd'hui, l'industriel propose de nouvelles valeurs usuelles (124) et seuils de décision clinique (125) pour la technique automatisée LUMIPULSE®, notre étude devra permettre d'établir des seuils de décision clinique basés sur les résultats de nos expériences de comparaison tout en inspectant leur cohérence avec les données de l'industriel et de la littérature.

Cette démarche a pour but d'opérer un transfert technologique du dosage des biomarqueurs d'une méthode manuelle vers une méthode automatisée avec les meilleures connaissances et maîtrise possibles du nouveau système et de sa correspondance avec l'ancien, de façon à ce que la prise en charge des patients puisse tirer bénéfice du changement sans contrepartie.

## II. MATERIELS ET METHODES

### 2.1 Matériel

#### 2.1.1 Phase pré-analytique

Au CHU de Rouen, le tube STARSTEDT 62.610.201 est utilisé pour le recueil du LCS, une feuille de prescription dédiée au dosage des biomarqueurs Alzheimer est remplie et l'hypothèse diagnostique doit être renseignée. L'acheminement du LCS jusqu'au laboratoire doit être inférieur à 4 heures. Une fois arrivé au laboratoire le LCS est centrifugé à 3500 tours (2000 g) pendant 10 minutes et à 4 °C. le LCS est ensuite aliquoté dans des microtubes en polypropylène de 2 mL (Simport T 341-6T), chacun contenant 450 µL puis une congélation à – 80°C est effectuée.

#### 2.1.2 Phase analytique

Les échantillons de LCS de notre étude sont des échantillons de patients qui ont été aliquotés et congelés à – 80°C entre Janvier 2012 et Février 2013. En 2019, ils ont été dosés en technique manuelle INNOTEST® et en technique automatisée LUMIPULSE® à partir de deux aliquots n'ayant jamais été décongelés avant le dosage.

Les trousse de dosages : INNOTEST® hTau Ag, INNOTEST® Phospho-Tau<sub>(181P)</sub>, INNOTEST® β-Amyloid<sub>(1-42)</sub>, INNOTEST® β-Amyloid <sub>(1-40)</sub> ont été utilisés pour la technique manuelle.

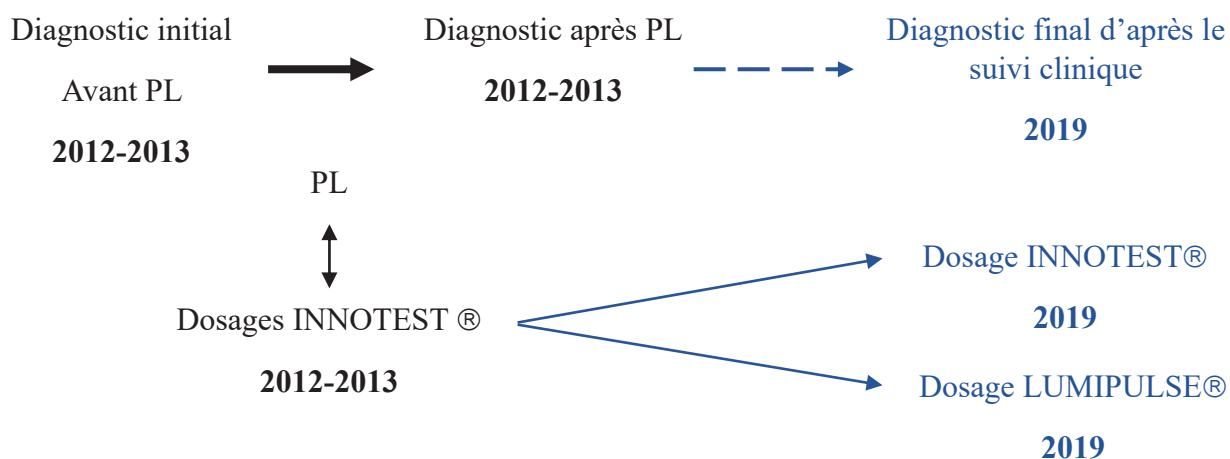
Les trousse de dosages : LUMIPULSE® G Total Tau, LUMIPULSE® G pTau 181, LUMIPULSE® G β-Amyloid 1-42, LUMIPULSE® G β-Amyloid 1-40 ont été utilisées pour la technique automatisée.

### 2.2 Méthodologie

#### 2.2.1 Population d'étude

La population d'étude a été constituée en sélectionnant 53 patients ayant bénéficié d'un prélèvement pour le dosage des biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer dans le LCS en consultation de neurologie spécialisée au CHU de Rouen entre Janvier 2012 et Février 2013. Les patients choisis ont tous bénéficié d'une évaluation clinique, neuropsychologique et d'une

imagerie cérébrale. Nous disposons d'un diagnostic avant PL qui a été posé par le clinicien en charge du patient en se basant sur les données cliniques disponibles au moment du prélèvement en aveugle des biomarqueurs et d'un diagnostic après PL établi par le clinicien après avoir pris connaissance du résultat des biomarqueurs. Ces données étaient existantes et disponibles car cette méthodologie avait été mise en place au CHU de Rouen pour une précédente étude, multicentrique, qui souhaitait évaluer la confiance diagnostique du clinicien avant et après PL ainsi que la reclassification diagnostique des patients après prise de connaissance des résultats de la PL (54). En 2019, nous disposons également d'un diagnostic final pour certains patients obtenus après révision des données de suivi clinique quand il a été possible. La méthodologie de notre étude est résumée dans la figure 18.



**Figure 18 : Chronologie des diagnostics cliniques et dosages**

Les dosages INNOTEST® ont de nouveau été effectués en 2019, pour deux raisons : du fait d'une modification des trousse de dosage INNOTEST® en 2014 et pour éviter un biais lié à la conservation de longue durée à -80°C des échantillons depuis la première étude (6 à 7ans).

### 2.2.2 Sélection des patients

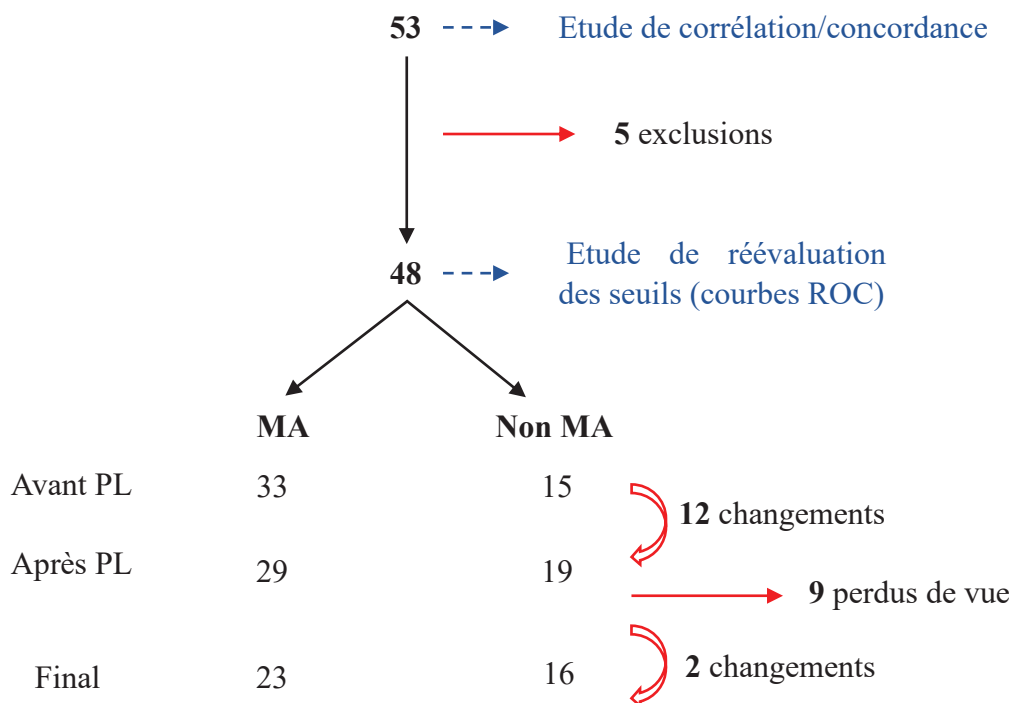
53 patients ont été inclus pour l'étude de corrélation et de concordance entre les deux méthodes de dosage.

Pour l'étude d'évaluation des seuils de décision clinique par courbes ROC, 5 patients ont été exclus du fait de leur diagnostic initial, posé en aveugle des biomarqueurs : TCM mixtes

(MA et TCM cérébrovasculaire) (n= 3), angiopathie amyloïde (n=1) et maladie à corps de Lewy (n=1) . Il y a donc 48 patients restant, inclus dans l'étude des seuils.

Ces 48 patients ont été séparés en deux groupes, un groupe « maladie d'Alzheimer (MA) » de 33 patients et un groupe « non MA » de 15 patients (figure 19). Les diagnostics évoqués pour le groupe « non MA » sont des maladies psychiatriques (n=7), des iatrogénies médicamenteuses associées à une maladie psychiatrique (n=4), un retard mental, une sclérose latérale amyotrophique, une paraparésie spastique, une exogénose chronique.

Après prise de connaissance du résultat des biomarqueurs, une réévaluation diagnostique a été effectuée par le clinicien. Sur les 48 patients, 12 diagnostics ont changé, le groupe MA comprend à ce stade 29 patients et le groupe non MA 19 patients. Les diagnostics évoqués pour le groupe « non MA » sont des maladies psychiatriques (n=6), des iatrogénies médicamenteuses associées à une maladie psychiatrique (n=2), un retard mental, une sclérose latérale amyotrophique, une paraparésie spastique, une exogénose chronique, une maladie à corps de Lewy, un trouble cognitif léger (MCI), une épilepsie temporale, une dégénérescence cortico-basale, des TCM cérébrovasculaires (n=2) et une dégénérescence lobaire fronto-temporale.



**Figure 19 : Sélection des patients de notre étude.**

En 2019, nous avons recherché si des données de suivi clinique étaient disponibles pour certains des 48 patients. Lorsque les observations cliniques de suivi étaient disponibles (au moins une visite supplémentaire, après le rendu de la PL), un recueil de données a été effectué de façon rétrospective, afin de mettre en évidence d'éventuelles infirmités du diagnostic posé après PL. Ce suivi clinique était disponible pour 39 patients et constitue le diagnostic final.

### 2.2.3 Variables étudiées

Les données suivantes ont été recueillies pour chaque patient : le sexe, la date du prélèvement de LCS, l'âge au moment de la PL et le diagnostic clinique retenu (MA ou non MA) à différents temps : avant PL en aveugle des biomarqueurs, après PL en tenant compte des résultats des biomarqueurs et le diagnostic final retenu après un suivi clinique (au moins une visite supplémentaire) lorsque les observations cliniques étaient disponibles dans le logiciel CDP2 (dossier informatisé du patient au CHU de Rouen).

Nous avons dosé les concentrations en Tau, P-Tau, A $\beta$ 42, A $\beta$ 40 en méthode manuelle INNOTEST® et en méthode automatisée LUMIPULSE® G600 II ainsi que les rapports A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 et P-Tau/A $\beta$ 42.

En amont, une étude des performances analytiques (répétabilité et fidélité intermédiaire) a été réalisée sur le LUMIPULSE® G600 II pour chaque paramètre afin d'évaluer la fidélité des dosages. L'essai de répétabilité consiste à analyser un même échantillon dans les conditions suivantes : même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage dans un délai le plus court possible. L'objectif est de caractériser la meilleure performance possible, dans des conditions optimales et de vérifier le bon fonctionnement du système (instrument/réactif) pour l'analyte concerné. L'essai de fidélité intermédiaire (reproductibilité intra laboratoire) consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages, il reflète la variation analytique longitudinale au laboratoire (126).

## 2.3 Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide des logiciels Medcalc (version 13.0) et R (version 3.6.1).

Pour l'étude de corrélation entre les deux méthodes d'analyse INNOTEST® et LUMIPULSE® G600 II, ont été réalisées pour chaque marqueur, les droites de régression obtenues par la méthode de Passing Bablok. L'intervalle de confiance de la droite de régression a été estimé par bootstrap percentile sur la base de 10 000 ré-échantillonnages. Le coefficient de corrélation de Pearson et le coefficient de corrélation intra-classe ont également été calculés. Les intervalles de confiance de ces deux outils statistiques ont été estimés par bootstrap à biais corrigé accéléré (BC<sub>a</sub>) selon la méthode décrite par Efron en 1987 (127). 10 000 ré-échantillonnages ont été faits à chaque fois. Enfin le delta moyen c'est-à-dire la valeur absolue de la différence entre les deux méthodes de mesure pour chaque patient +/- l'écart type (ET) entre les deux méthodes sans correction a également été calculé.

Les données des comparaisons (différences relatives) entre les deux méthodes ont également été représentées sous la forme de graphique de Bland et Altman.

Les variables quantitatives ont été décrites par la moyenne et l'écart type (ET), la médiane et les quartiles. Les variables qualitatives ont été décrites par les pourcentages et effectifs.

Une comparaison des groupes MA et non MA a été effectuée par la réalisation de diagrammes en boîte et l'utilisation du test non paramétrique de Mann Whitney pour les variables quantitatives, en raison d'un écart à la normalité. Pour comparer la répartition hommes/femmes, le test du Chi<sup>2</sup> a été utilisé.

De nouveaux seuils pour le LUMIPULSE® ont été calculés à partir de l'équation des droites de régression par la méthode de Passing Bablok. La capacité discriminante de chaque paramètre en faveur du diagnostic de MA a été évaluée par une courbe ROC (Receiver Operating Characteristic), ainsi que l'aire sous la courbe (AUC).

Les courbes ROC ont également permis de sélectionner des seuils de décision clinique « candidats » correspondant au maximum de l'indice de Youden. Cette analyse a été faite en fonction du diagnostic avant PL qui n'est pas sujet au biais d'incorporation contrairement au diagnostic après PL.

Les seuils candidats issus des deux approches (translation et courbes ROC) ont ensuite été évalués par une étude de concordance clinique entre les deux méthodes, chaque variable a été transformée en une variable qualitative à deux ou trois classes : test négatif, positif et en zone grise quand elle existe. Ces classes ont été construites en prenant en compte les valeurs seuils

de chaque méthode. Pour le LUMIPULSE® les valeurs seuils ont été calculées à l'aide des droites de régression linéaire selon Passing Bablok à partir des seuils INNOTEST® et aussi à partir des valeurs seuils obtenues à partir des courbes ROC, afin de comparer quelle approche possède la meilleure concordance avec la technique INNOTEST®. Le test de pourcentage de concordance a été calculé et le test non paramétrique de Kappa de Cohen a été utilisé.

La significativité statistique a été fixée au seuil  $p = 0,05$ .

## III. Résultats

### 3.1 Performances analytiques

Une étude des performances analytiques (répétabilité et fidélité intermédiaire) a été réalisée sur le LUMIPULSE® G600 II pour chaque paramètre car elle est le préalable requis avant toute comparaison d'une méthode avec une autre et avant la mise en production d'une méthode.

Le COFRAC (comité Français d'accréditation) qui est chargé de l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme ISO 15189, préconise d'effectuer ces essais sur 30 déterminations et un nombre d'essais inférieur doit être argumenté. Dans notre cas, le coût des analyses est important et le LCS est un prélèvement précieux, cette étude a donc été effectuée sur 10 essais et sur matrice artificielle pour chaque paramètre.

#### 3.1.1 Etude de répétabilité

Un contrôle interne de qualité (CIQ) est un matériau, fabriqué par l'homme la plupart du temps produit par le fournisseur du kit. Il se compose d'un ou plusieurs analytes de concentration connue dont la matrice doit se rapprocher au mieux d'un échantillon patient. A chaque série de dosages la validité des CIQ est analysée de la même façon que les échantillons de patients, ils permettent de vérifier la maîtrise du processus analytique, d'encadrer les séries de dosage des échantillons de patient et d'en confirmer la validité des résultats. Plusieurs niveaux de concentration de CIQ sont disponibles pour chaque analyte, classiquement un niveau de concentration normal et un ou plusieurs niveaux de concentrations anormaux déterminés en fonction du paramètre à doser.

L'étude de répétabilité a été effectuée sur 10 passages consécutifs pour chacun des 4 biomarqueurs à partir des CIQ du fournisseur, sur 3 niveaux de concentration pour les peptides A $\beta$ 42 et A $\beta$ 40, afin d'une part d'encadrer les plages de mesure étendues de ces deux

biomarqueurs et d'autre part de garantir un degré de confiance important sur le ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 et sur 2 niveaux de concentration (un proche du seuil décisionnel et un pathologique) pour Tau et P-Tau.

La moyenne des valeurs, l'ET et les coefficients de variation (CV) du laboratoire, calculés à partir du logiciel Excel (version 1911) et les CV du fournisseur sont inscrits dans le tableau III

Tableau III : Etude de répétabilité des dosages Tau, P-Tau, A $\beta$ 42, A $\beta$ 40 sur l'automate LUMIPULSE® G600 II

|                              | Contrôles | Moyenne (ng/L) | Ecart-type (ng/L) | CV (%)      | CV fournisseur (%) (concentration ng/L) |
|------------------------------|-----------|----------------|-------------------|-------------|---|
| <b>Tau</b>                   | Niveau 2  | 461,90         | 7,94              | 1,72        | 3,6 (500)                               |
|                              | Niveau 3  | 767,20         | 13,29             | 1,73        | 2 (783)                                 |
| <b>P-Tau</b>                 | Niveau 2  | 60,91          | 1,71              | 2,80        | 2,9 (57)                                |
|                              | Niveau 3  | 100,21         | 2,02              | 2,02        | 3,1 (95,8)                              |
| <b>A<math>\beta</math>42</b> | Niveau 1  | 283,90         | 3,05              | 1,07        | 1,7 (409)                               |
|                              | Niveau 2  | 547,70         | 6,34              | <b>1,16</b> | 1 (773)                                 |
|                              | Niveau 3  | 995,50         | 11,09             | <b>1,11</b> | 1 (1228)                                |
| <b>A<math>\beta</math>40</b> | Niveau 1  | 4083,20        | 51,41             | 1,26        | 1,3 (3759)                              |
|                              | Niveau 2  | 10096,70       | 93,20             | 0,92        | 1,2 (9363)                              |
|                              | Niveau 3  | 19871,90       | 183,05            | 0,92        | 2 (18994)                               |

Avant la commercialisation d'un test, le fabricant effectue ses propres essais pour étudier les performances du couple automate - réactif pour le dosage en question. Ces données sont disponibles dans la documentation technique fournie. Le laboratoire doit ensuite vérifier dans ses locaux avec son appareil, ses réactifs et son personnel si les performances annoncées sont satisfaites dans les conditions réelles d'utilisation, le CV fournisseur est généralement calculé à partir de CIQ dans des conditions idéales et il donne une valeur indicative vers laquelle il faut tendre.



Dans l'étude de répétabilité, les CV obtenus sont tous inférieurs aux CV fournisseur à l'exception des niveaux 2 et 3 d'A $\beta$ 42 qui sont légèrement supérieurs à ceux du fournisseur tout en restant concordants avec les données de la littérature (128).

### 3.1.2 Etude de fidélité intermédiaire

L'étude de fidélité intermédiaire a été effectuée à partir de 10 passages des contrôles internes de qualité du fournisseur, sur 3 niveaux pour les A $\beta$ 42, A $\beta$ 40 et sur 2 niveaux pour Tau, P-Tau sur 10 jours différents.

La moyenne des valeurs, l'ET et les CV du laboratoire ont été calculés à partir du logiciel Excel (version 1911) et les CV du fournisseur sont inscrits dans le tableau IV.

Tableau IV : Etude de fidélité intermédiaire des dosages Tau, P-Tau, A $\beta$ 42, A $\beta$ 40 sur l'automate LUMIPULSE® G600 II

|                              | Contrôles | Moyenne (ng/L) | Ecart-type (ng/L) | CV (%)      | CV fournisseur (%) (concentration ng/L) |
|------------------------------|-----------|----------------|-------------------|-------------|---|
| <b>Tau</b>                   | Niveau 2  | 469,90         | 23,80             | <b>5,07</b> | 4 (500)                                 |
|                              | Niveau 3  | 777,50         | 18,11             | <b>2,33</b> | 2,2 (783)                               |
| <b>P-Tau</b>                 | Niveau 2  | 59,54          | 1,55              | 2,61        | 4,4 (57)                                |
|                              | Niveau 3  | 98,64          | 2,21              | 2,24        | 4,4 (95,8)                              |
| <b>A<math>\beta</math>42</b> | Niveau 1  | 278,30         | 7,27              | <b>2,61</b> | 2,3 (409)                               |
|                              | Niveau 2  | 546,20         | 17,42             | <b>3,19</b> | 1,9 (773)                               |
|                              | Niveau 3  | 987,60         | 39,01             | <b>3,95</b> | 2,3 (1228)                              |
| <b>A<math>\beta</math>40</b> | Niveau 1  | 4166,30        | 172,43            | <b>4,14</b> | 2,8 (3759)                              |
|                              | Niveau 2  | 10347,70       | 446,54            | <b>4,32</b> | 2,6 (9363)                              |
|                              | Niveau 3  | 19999,10       | 1010,65           | <b>5,05</b> | 3,1 (18994)                             |

A titre informatif, une étude de fidélité intermédiaire a également été effectuée par le fournisseur sur des échantillons de LCS plutôt que sur des matériaux de type CIQ, les valeurs maximales de CV retrouvées pour chaque paramètre sont les suivantes : A $\beta$ 42  $\leq$  3,9%, Tau  $\leq$  8,3%, A $\beta$ 40  $\leq$  4,5% (102–104).

Dans l'étude de fidélité intermédiaire, les CV obtenus sont supérieurs à ceux du fournisseur sauf pour la P-Tau. De façon générale, nos résultats de CV sont en accord avec les autres études récemment publiées sur le sujet (128,129) et bien inférieurs aux CV constatés dans les programmes de qualité externe.

### 3.2 Etude de corrélation

L'étude de corrélation entre la technique manuelle INNOTEST® et la technique automatisée LUMIPULSE® G600 II repose sur 53 patients, elle a été effectuée à partir de 2 aliquots de LCS conservés à -80°C pour chaque patient. Pour le dosage sur LUMIPULSE® G600 II, nous avons réparti les échantillons en 10 séries sur 10 jours différents. Le dosage par méthode manuelle INNOTEST® a été effectué en deux séries. Les points de la gamme ont été dosés en double et les patients en simple.

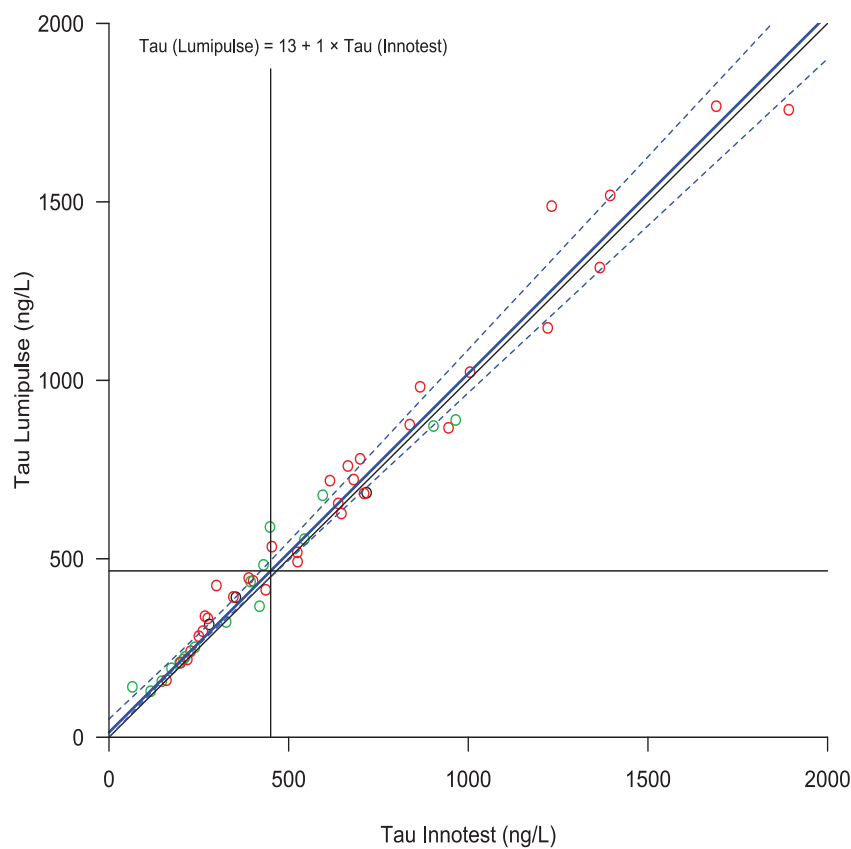
Pour chacune des 4 variables, ont été réalisées les droites de régression obtenues par la méthode de Passing Bablok. Elles permettent de s'intéresser à la présence ou non d'erreurs systématiques entre les deux méthodes. Par ailleurs, nous nous sommes intéressés au coefficient de corrélation de Pearson et au coefficient de corrélation intra-classe. Le premier permet d'apprécier l'intensité de la liaison entre les deux méthodes si on applique une correction, le second permet d'évaluer l'intensité de la liaison entre les deux méthodes sans correction. Le delta moyen (valeur absolue de la différence pour chaque patient) +/- l'ET entre les deux méthodes sans correction a également été calculé.

L'avantage de calculer le delta moyen à partir des valeurs absolues est d'éviter les compensations des différences négatives et positives qui pourraient donner une impression trompeuse sur les corrélations des deux méthodes.

Toutes ces données sont reportées dans le tableau V à la fin de cette sous partie.

### 3.2.1 Tau totale

L'équation de la régression linéaire selon Passing Bablok présentée dans la figure 20 est : **Tau (Lumipulse) = 13 + 1 × Tau (Innotest)**. Le coefficient de corrélation de Pearson  $r = 0,988$  [0,978 ; 0,993] et le coefficient de corrélation intra-classe (ICC) = 0,988 [0,974 ; 0,992]. Il existe une très forte corrélation linéaire positive significative. L'IC95% de la droite de régression linéaire englobe la diagonale  $y=x$ . La valeur seuil Tau (Innotest) = 450 ng/L correspond à Tau (Lumipulse) = 466 ng/L

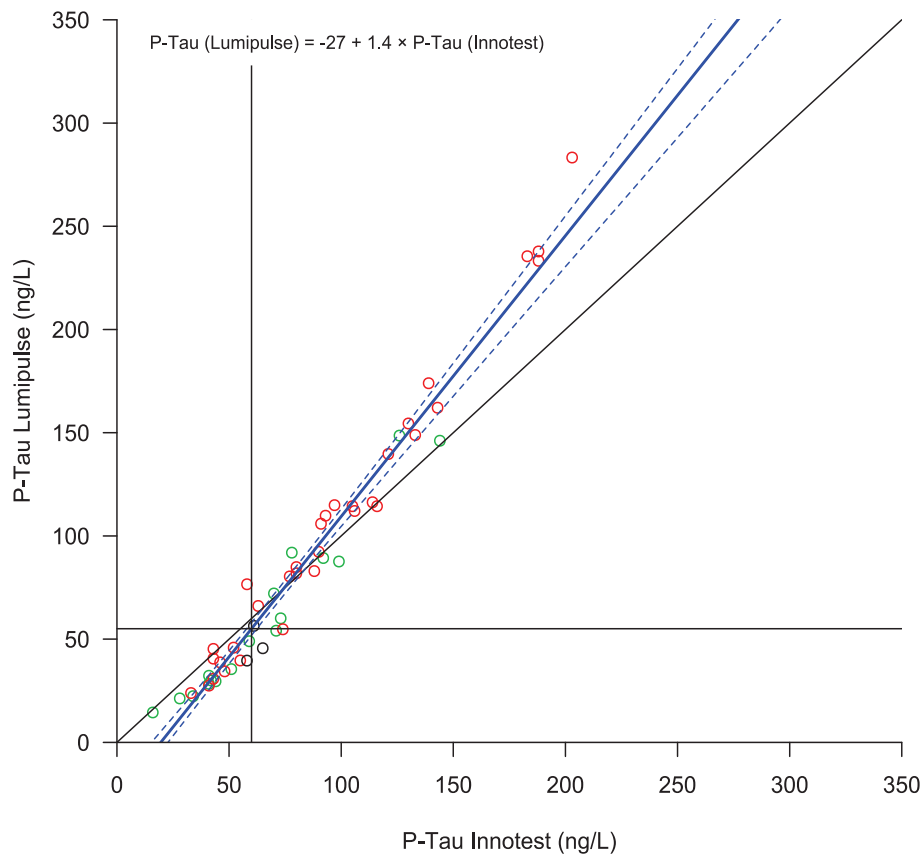


**Figure 20: Régression linéaire selon Passing Bablok : Tau Lumipulse=f(Tau Innotest).**

*Les cercles rouges représentent les patients MA selon le diagnostic initial, les cercles verts : les non MA, et les cercles noirs : les TCM mixtes (diagnostic avant PL). La diagonale noire correspond à la ligne d'identité  $y=x$ . La droite bleue correspond à la droite de Passing Bablok accompagnée de son intervalle de confiance à 95% (en pointillés) calculé par Bootstrap percentile. La valeur seuil INNOTEST® a été reportée sur le graphique ( $x=450$ ) et une valeur seuil LUMIPULSE® en a été déduite par correspondance.*

### 3.2.2 P-Tau

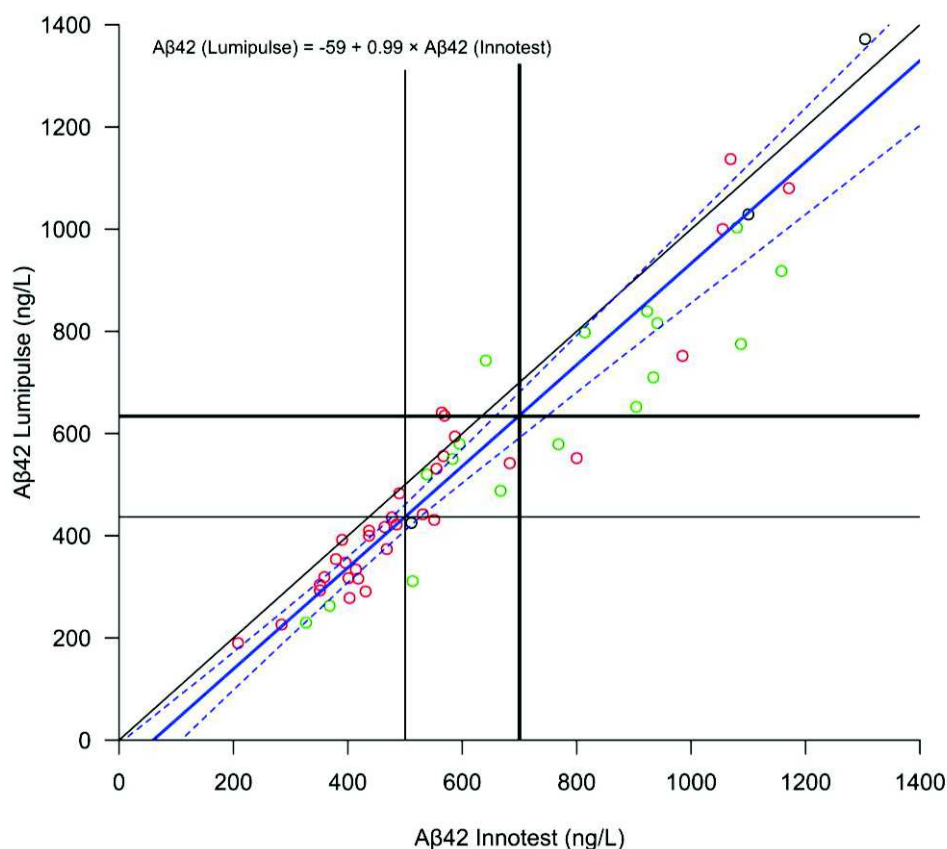
L'équation de la régression linéaire selon Passing Bablok présentée dans la figure 21 est : **P-Tau (Lumipulse) = -27 + 1,4 × P-Tau (Innotest)**. Le coefficient de corrélation de Pearson  $r = 0,98$  [0,97 ; 0,99] et ICC = 0,93 [0,90 ; 0,95]. Il existe une très forte corrélation linéaire positive significative. La représentation graphique informe que le LUMIPULSE® sous évalue la P-Tau pour des concentrations < 75ng/L en INNOTEST® et qu'il la surévalue pour les concentrations > 75 ng/L. La valeur seuil P-Tau (Innotest) = 60 ng/L correspond à P-Tau (Lumipulse) = 55 ng/L. On a donc à la fois des surévaluations et des sous évaluations autour de la valeur pivot de 75 ng/L proche du seuil de décision clinique de P-Tau (60ng/L). On note visuellement la présence de points s'écartant notablement de la droite de régression pour les valeurs de P-Tau proches de 60 en INNOTEST®.



**Figure 21** : Régression linéaire selon Passing Bablok : P-Tau Lumipulse=f(P-Tau Innotest)

### 3.2.3 A $\beta$ 42

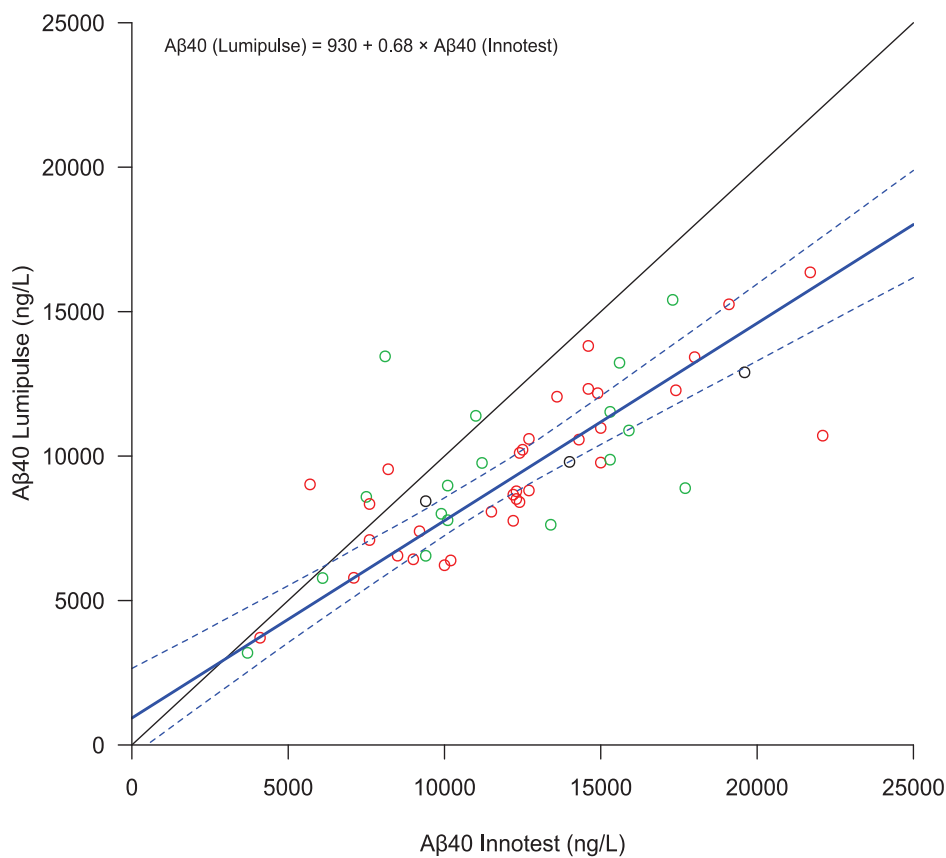
L'équation de la régression linéaire selon Passing Bablok présentée dans la figure 22 est : **A $\beta$ 42 (Lumipulse) = -59 + 0,99  $\times$  A $\beta$ 42 (Innotest)**. Le coefficient de corrélation de Pearson  $r = 0,95$  [0,91; 0,97] et ICC = 0,91 [0,86 ; 0,95]. Il existe une très forte corrélation linéaire positive significative. La représentation graphique informe que le LUMIPULSE® sous évalue A $\beta$ 42 quelle que soit la concentration d'A $\beta$ 42 en INNOTEST® (Il est difficile de tirer une conclusion pour les concentrations en A $\beta$ 42 > 1000 ng/L, car peu de points disponibles). La zone grise A $\beta$ 42 (Innotest) = 500 - 700 ng/L correspond à A $\beta$ 42 (Lumipulse) = 437 - 635 ng/L.



**Figure 22:** Régression linéaire selon Passing Bablok : A $\beta$ 42 Lumipulse=f(A $\beta$ 42 Innotest)

### 3.2.4 A $\beta$ 40

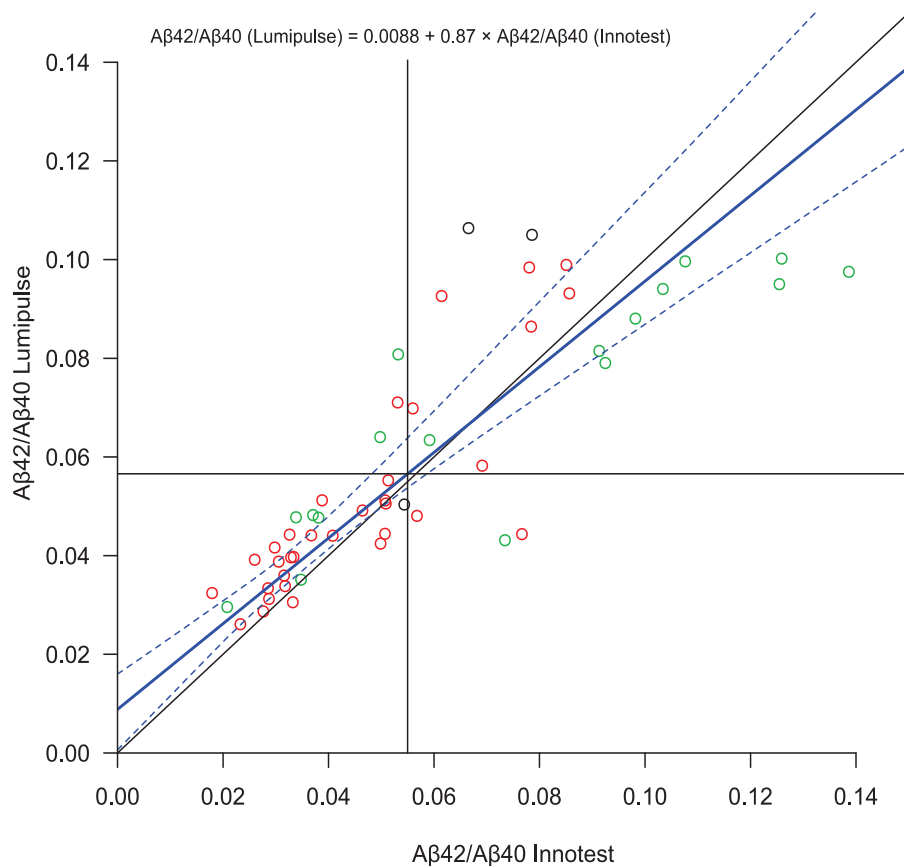
L'équation de la régression linéaire selon Passing Bablok présentée dans la figure 23 est : **A $\beta$ 40 (Lumipulse) = 930 + 0,68  $\times$  A $\beta$ 40 (Innotest)**. Le coefficient de corrélation de Pearson  $r = 0,77$  [0,56; 0,88] et ICC= 0,56 [0,40 ; 0,70]. Il existe une corrélation modérée linéaire positive significative. La représentation graphique informe que le LUMIPULSE® sous évalue de façon systématique et proportionnelle l'A $\beta$ 40 pour des valeurs en INNOTEST® > 3000 ng/L (à noter que les valeurs < 3000 ng/L sont rarement rencontrées).



**Figure 23:** Régression linéaire selon Passing Bablok : A $\beta$ 40 Lumipulse=f(A $\beta$ 40 Innotest)

### 3.2.5 Rapport A $\beta$ 42/A $\beta$ 40

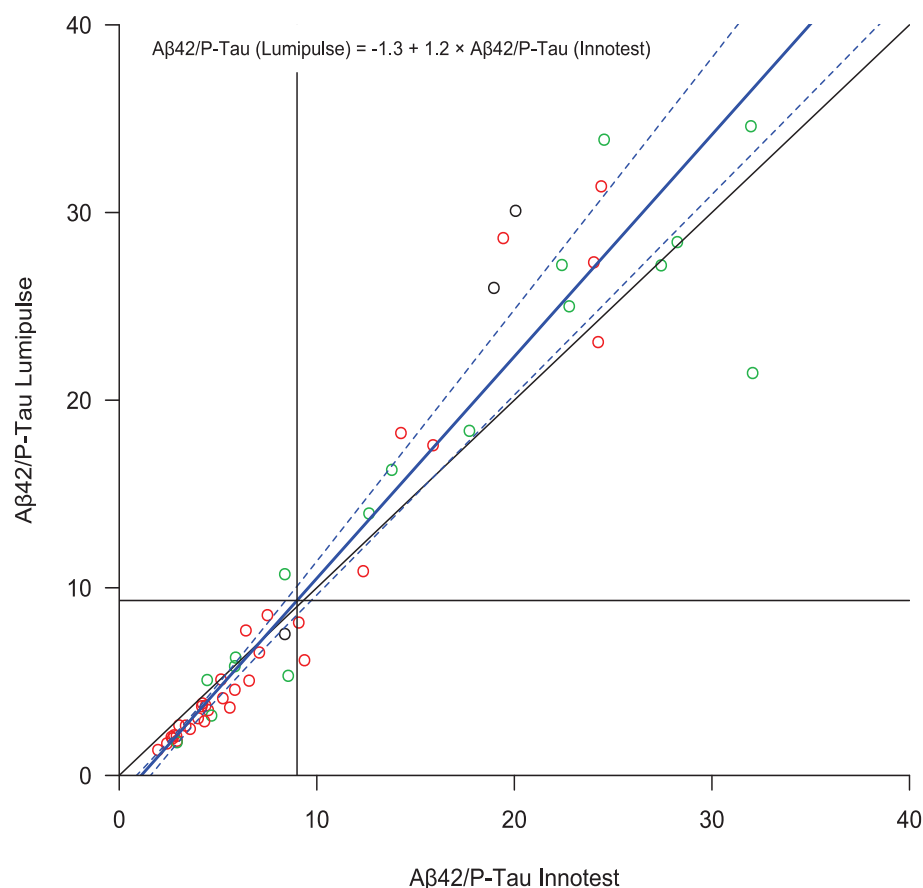
L'équation de la régression linéaire selon Passing Bablok présentée dans la figure 24 est : **A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 (Lumipulse) = 0,0088 + 0,87 × A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 (Innotest)**. Le coefficient de corrélation de Pearson  $r = 0,84$  [0,75; 0,90] et ICC = 0,83 [0,75 ; 0,89]. Il existe une forte corrélation linéaire positive significative. La représentation graphique informe que le LUMIPULSE® surévalue A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 quand le rapport est inférieur à 0,067 en INNOTEST®. Également, on observe une dispersion des valeurs importante pour les rapports > 0,06 en INNOTEST®. La valeur seuil A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 (Innotest) = 0,055 correspond à A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 (Lumipulse) = 0,057.



**Figure 24 : Régression linéaire selon Passing Bablok : A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 Lumipulse=f(A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 Innotest)**

### 3.2.6 Rapport Aβ42/P-Tau

L'équation de la régression linéaire selon Passing Bablok présentée dans la figure 25 est : **Aβ42/P-Tau (Lumipulse) = -1,3 + 1,2 × Aβ42/P-Tau (Innotest)**. Le coefficient de corrélation de Pearson  $r = 0,95$  [0,89; 0,98] et ICC = 0,94 [0,90 ; 0,97]. Il existe une très forte corrélation linéaire positive significative. La représentation graphique informe que le LUMIPULSE® sous évalue Aβ42/P-Tau quand le rapport est inférieur à 7 en INNOTEST® et qu'il le surévalue dans le cas contraire. Également, on observe une dispersion des valeurs plus importante pour les rapports > 19 en INNOTEST®. La valeur seuil Aβ42/P-Tau (Innotest) = 9 correspond à Aβ42/P-Tau (Lumipulse) = 9,3.



**Figure 25 : Régression linéaire selon Passing Bablok : Aβ42/P-Tau Lumipulse=f(Aβ42/P-Tau Innotest)**



Tableau V : Récapitulatif des seuils INNOTEST® (IT) précédemment utilisés au laboratoire et des seuils calculés correspondants pour le LUMIPULSE® (LP), équations des droites de régression linéaire selon Passing Bablok, Médiane [Q1 ; Q3], coefficients de corrélation de Pearson [IC95], ICC [IC95] et delta moyen ± ET entre méthodes sans correction pour chaque paramètre

|   | Tau                      | P-Tau                      | Aβ42                        | Aβ40                        | Aβ42/Aβ40                      | Aβ42/<br>P-Tau              |
|---|--------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| Seuil Innotest                                  | 450                      | 60                         | 500 / 700                   |                             | 0,055                          | 9                           |
| Seuil Lumipulse                                 | 466                      | 55                         | 437 / 635                   |                             | 0,057                          | 9,3                         |
| Eq Lumipulse = f(Innotest)                      | $LP = 13 + 1 \times IT$  | $LP = -27 + 1,4 \times IT$ | $LP = -59 + 0,99 \times IT$ | $LP = 930 + 0,68 \times IT$ | $LP = 0,0088 + 0,87 \times IT$ | $LP = -1,3 + 1,2 \times IT$ |
| Médiane (Q1 ; Q3) Innotest                      | 436<br>(261 ; 710)       | 74<br>(48 ; 106)           | 551<br>(418 ; 814)          | 12300<br>(9400 ; 15000)     | 0,051<br>(0,033 ; 0,077)       | 6,6<br>(4,2 ; 17,7)         |
| Médiane (Q1 ; Q3) Lumipulse                     | 483<br>(297 ; 760)       | 77<br>(40 ; 114)           | 488<br>(347 ; 710)          | 9020<br>(7779 ; 11392)      | 0,049<br>(0,04 ; 0,081)        | 6,1<br>(3,2 ; 18,4)         |
| Coefficient de corrélation de Pearson           | 0,988<br>[0,978 ; 0,993] | 0,98<br>[0,97 ; 0,99]      | 0,95<br>[0,91 ; 0,97]       | 0,77<br>[0,56 ; 0,88]       | 0,84<br>[0,75 ; 0,90]          | 0,95<br>[0,89 ; 0,98]       |
| ICC   | 0,986<br>[0,974 ; 0,992] | 0,93<br>[0,90 ; 0,95]      | 0,91<br>[0,86 ; 0,95]       | 0,56<br>[0,40 ; 0,70]       | 0,83<br>[0,75 ; 0,89]          | 0,94<br>[0,90 ; 0,97]       |
| Delta moyen ± ET entre méthodes sans correction | 52 ± 47                  | 15 ± 15                    | 92 ± 74                     | 3162 ± 2153                 | 0,012 ± 0,01                   | 2,2 ± 2,7                   |

### 3.3 Comparaisons des techniques par la méthode de Bland et Altman

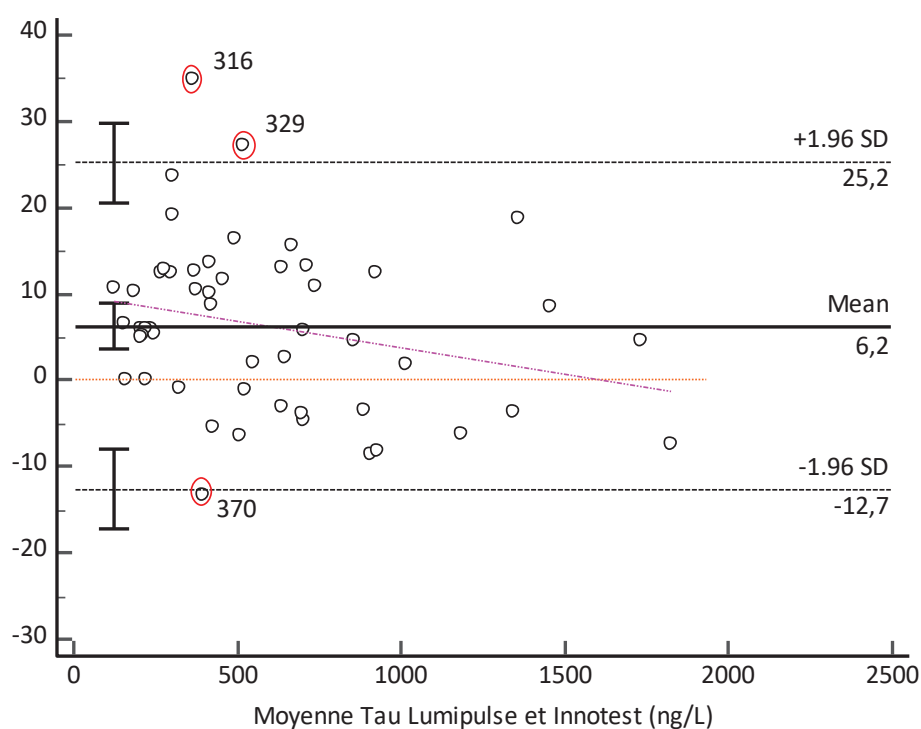
La représentation graphique de Bland et Altman (130) permet d'évaluer l'écart observé entre deux valeurs obtenues à partir d'un même échantillon, par deux méthodes de dosage différentes, en passant par une approche graphique.

Plusieurs représentations sont possibles, il est possible de représenter les différences absolues ou relatives entre les deux méthodes de dosage soit par rapport à l'une des deux méthodes qui serait de référence ou « gold standard », soit par rapport à la moyenne des deux méthodes quand aucune n'est « gold standard ».

Dans notre étude, le choix s'est porté sur la représentation des différences relatives (c'est-à-dire la différence entre les 2 méthodes par rapport à la moyenne des deux méthodes) en ordonnée par rapport à la moyenne des deux méthodes en abscisse car aucune des deux méthodes n'est considérée de référence.

### 3.3.1 Tau totale

La figure ci-dessous présente un diagramme de dispersion des différences relatives (DR) de concentration en Tau totale obtenues par Lumipulse et Innotest (en %) en fonction des moyennes de ces deux mesures (en ng/L). La ligne continue appelée « mean » correspond à la moyenne des différences relatives, on l'appellera aussi « moyenne des DR », tandis que les lignes en pointillés « +/- 1,96 SD » appelées limites de concordance, montrent les limites à +/- 1,96 écart-type (ET) de la moyenne des DR, accompagnées de leur intervalle de confiance à 95% (signalé sous forme de barre d'erreur). La ligne au niveau 0 représente l'hypothèse d'une concordance parfaite entre les deux techniques. La ligne diagonale en pointillés représente la régression linéaire entre les différences relatives de concentrations entre les deux techniques et la moyenne des concentrations.



**Figure 26 : Graphique de Bland et Altman : Tau totale.**

Données graphiques : moyenne des DR (+/- écart type entre les deux méthodes) : 6,2 % (+/- 9,7%)

Equation de la droite de régression linéaire :  $y = 9,89 - 0,00617 x$

Ce graphe nous informe que les résultats LUMIPULSE® de Tau totale peuvent être 12,7% plus bas ou 25,2% que le résultat INNOTEST®.

La moyenne des DR entre les deux méthodes est faible mais l'écart est significatif car la ligne d'égalité n'est pas comprise dans l'IC 95 de la moyenne des DR.

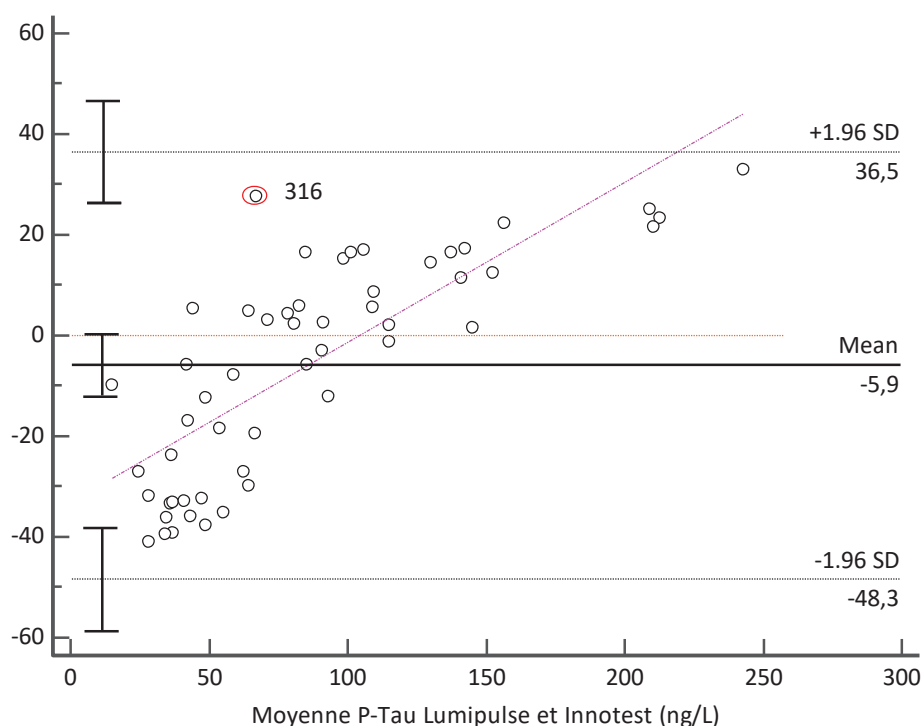
La droite de régression indique que les différences relatives ne seraient pas constantes d'une extrémité à l'autre du domaine de mesure, toutefois sa pente reste faible et sa fiabilité peut être relativisée car on a peu de points après 1000ng/L.

Les points sortant des limites de concordance ont été signalés par un cercle rouge et nommés par un numéro à 3 chiffres (codification utilisée au laboratoire), les valeurs des dosages en INNOTEST® et en LUMIPULSE® pour ces points sont indiquées ci-dessous :

| N° patient | Valeur INNOTEST®<br>(ng/L) | Valeur LUMIPULSE®<br>(ng/L) |
|------------|----------------------------|-----------------------------|
| 316        | 299                        | 425                         |
| 329        | 448                        | 589                         |
| 370        | 419                        | 367                         |

On peut considérer que ces points sont des erreurs aléatoires.

### 3.3.2 P-Tau



**Figure 27 : Graphique de Bland et Altman : P-Tau**

Données graphiques : moyenne des DR (+/- écart type entre les deux méthodes) : -5,9 % (+/- 21,6%)

Equation de la droite de régression linéaire :  $y = -33,2302 + 0,3176 x$

Pour la P-Tau, la moyenne des DR est faible mais elle représente mal le comportement des DR d'une extrémité à l'autre du domaine de mesure. En effet, les DR sont majoritairement négatives pour des concentrations moyennes < 100 ng/L et majoritairement positives pour des concentrations moyennes > 100 ng/L. L'information donnée par la moyenne des DR n'est donc pas exploitable du fait de l'allure de la droite de régression linéaire et les limites de concordance s'appliquent mal.

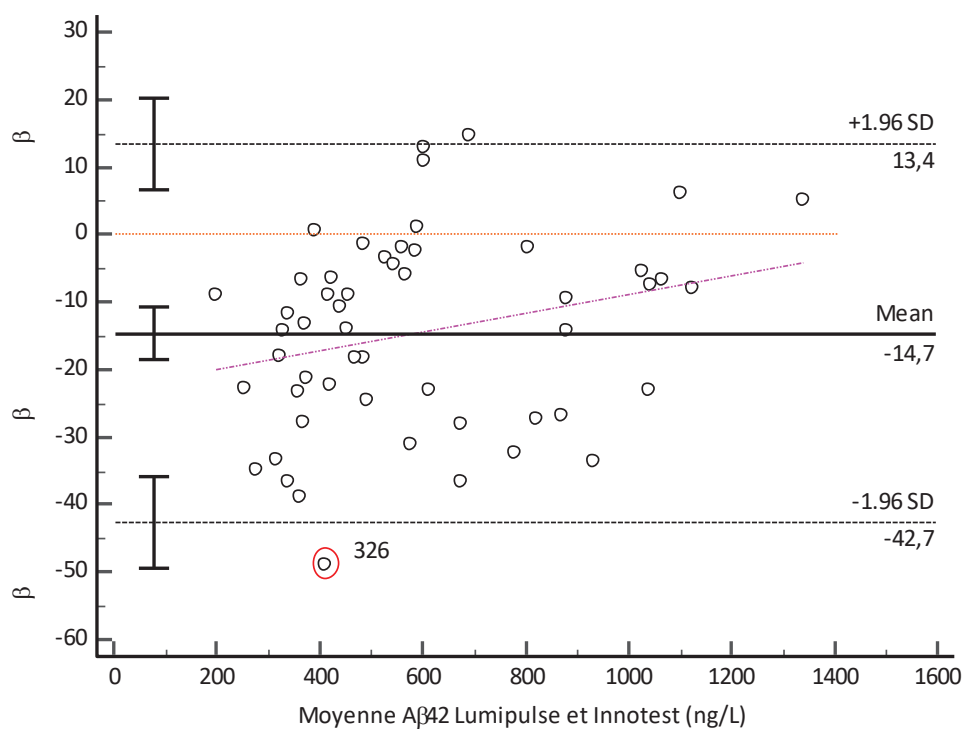
On note aussi que le point entouré d'un cercle rouge ne suit pas la tendance générale des autres points, les valeurs du dosage en INNOTEST® et en LUMIPULSE® pour ce point sont indiquées ci-dessous :

| N° patient | Valeur INNOTEST® (ng/L) | Valeur LUMIPULSE® (ng/L) |
|------------|-------------------------|--------------------------|
| 316        | 58                      | 76,6                     |

Pour la P-Tau, le nombre d'erreur aléatoire est limité.

De même, comme on a déjà pu le constater sur la droite de régression linéaire de la P-Tau selon Passing Bablok, on remarque qu'aux alentours de 60 ng/L, il y a des points présentant des différences relatives positives et d'autres négatives.

### 3.3.3 Aβ42



**Figure 28 : Graphique de Bland et Altman : Aβ42**

Données graphiques : moyenne des DR (+/- écart type entre les deux méthodes) : -14,65 (+/- 14,3 %)

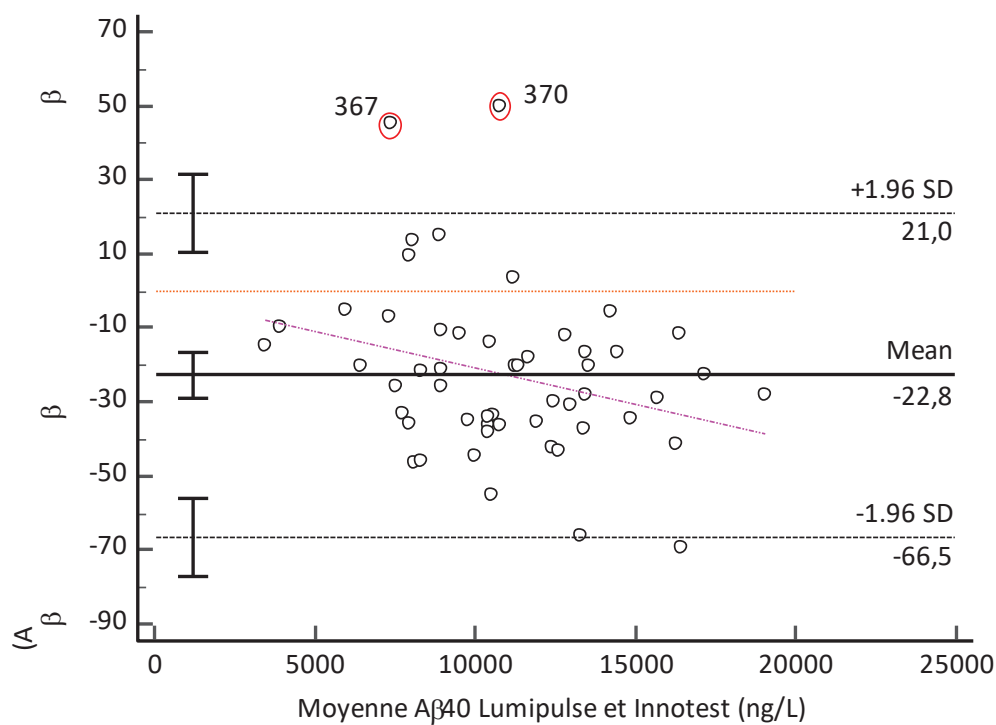
Equation de la droite de régression linéaire :  $y = - 22,91 + 0,014 x$

La droite de régression représentant les DR en fonction des concentrations moyennes indique que les différences sont majoritairement négatives sur toute l'étendue du domaine de mesure. La fiabilité de la droite de régression est à relativiser car on a peu de points après 10000 ng/L et les différences relatives sont dispersées.

Le point sortant des limites de concordance a été signalé par un cercle rouge, les valeurs du dosage en INNOTEST® et en LUMIPULSE® pour ce point sont indiquées ci-dessous :

| N° patient | Valeur INNOTEST® (ng/L) | Valeur LUMIPULSE® (ng/L) |
|------------|-------------------------|--------------------------|
| 316        | 513                     | 311                      |

### 3.3.4 Aβ40



**Figure 29 : Graphique de Bland et Altman : Aβ40**

Données graphiques : moyenne des DR (+/- écart type entre les deux méthodes) : -22,75% (+/-22,34 %)

Equation de la droite de régression linéaire :  $y = - 1,16 - 0,00198 x$

Pour l'A $\beta$ 40, il existe une différence systématiquement négative importante avec une part de proportionnalité apparente, la dispersion des différences est également importante, ces différences entre les deux techniques ont certainement des causes multiples, parmi lesquelles intervient le fait que la technique manuelle INNOTEST® pour le dosage d'A $\beta$ 40 est une technique avec un volume de prise d'essai très faible (5 $\mu$ L) suivi d'une dilution au 1/100<sup>ème</sup>, les résultats qui en découlent sont donc sujet à de plus grandes variations et la rend plus imprécise que la technique automatisée LUMIPULSE®

Les points sortant des limites de concordance ont été signalés par un cercle rouge, les valeurs des dosages en INNOTEST® et en LUMIPULSE® pour ces points sont indiquées ci-dessous :

| N° patient | Valeur INNOTEST®<br>(ng/L) | Valeur LUMIPULSE®<br>(ng/L) |
|------------|----------------------------|-----------------------------|
| 367        | 5700                       | 9020                        |
| 370        | 8100                       | 13453                       |

Au total, sur les 4 paramètres évalués nous avons pu constater que les différences relatives observées entre les deux familles de méthodes variaient d'une extrémité à l'autre du domaine de mesure, il n'était donc pas raisonnable d'utiliser la moyenne des différences relatives pour effectuer une translation des seuils de chaque analyte et préférable d'utiliser les équations des droites de régression selon Passing Bablok.



### 3.4 Etude comparative des groupes selon le diagnostic avant PL : démographie et dosage des marqueurs en LUMIPULSE

Cette étude a été effectuée sur 48 patients pour ne garder que patients appartenant aux groupes MA / non MA.

- Etude démographique :

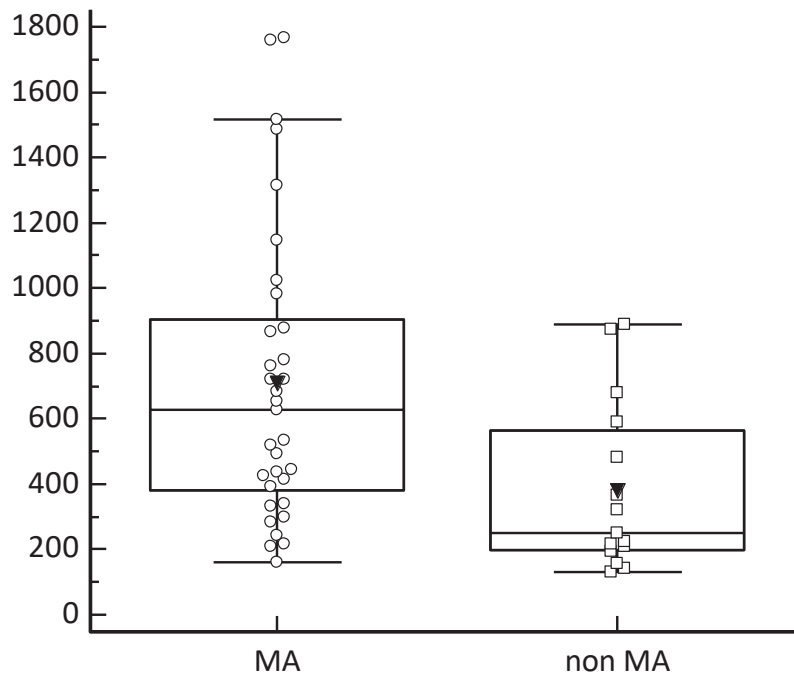
Tableau VI : Comparaison de l'âge et du sexe selon diagnostic

|        | Nombre de patients | Age        | % femmes |
|--------|--------------------|------------|----------|
| MA     | 33                 | 66 [63;71] | 52%      |
| Non MA | 15                 | 67 [60;71] | 53%      |

Il n'y a pas de différence significative d'âge ( $p=0,982$ , test non paramétrique de Mann Withney) et de répartition des femmes ( $p=0,8456$ , test du  $\chi^2$ ) entre les deux groupes.

- L'étude comparative des concentrations en biomarqueurs selon le diagnostic clinique posé avant PL en aveugle des biomarqueurs a été réalisée à partir des concentrations mesurées sur le LUMIPULSE®, les résultats sont présentés sous forme de diagramme en boîte.

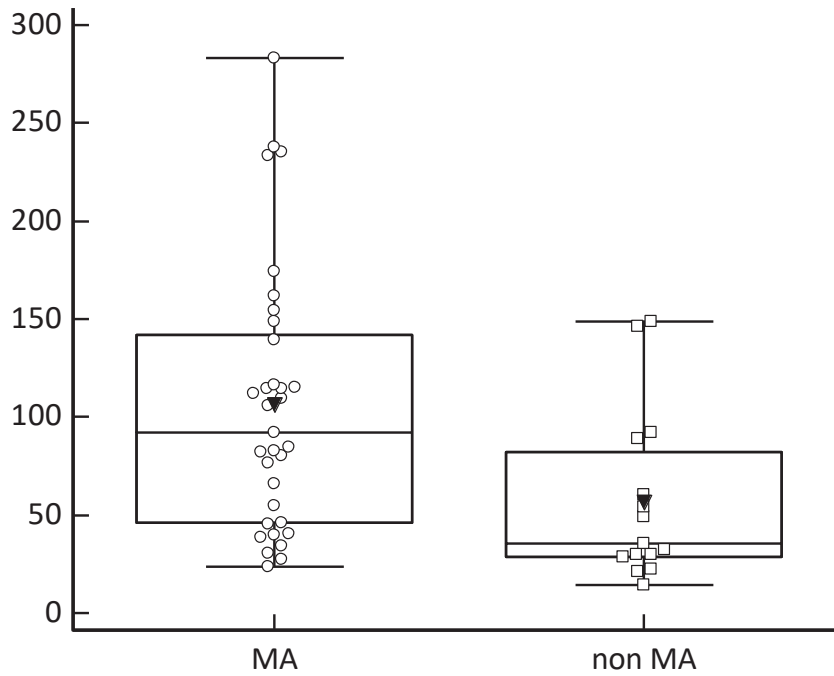
- Pour la Tau, il existe une différence significative de concentration en Tau entre les groupes MA et non MA ( $p=0,0052$  test de Mann Withney)



|        | Moyenne | ET    | Min | Q1  | Médiane | Q3  | Max  |
|--------|---------|-------|-----|-----|---------|-----|------|
| MA     | 709,9   | 449,1 | 160 | 380 | 627     | 903 | 1768 |
| non MA | 381,7   | 260,3 | 129 | 197 | 252     | 563 | 889  |

**Figure 30** : Diagramme en boîte : Tau selon MA vs non MA

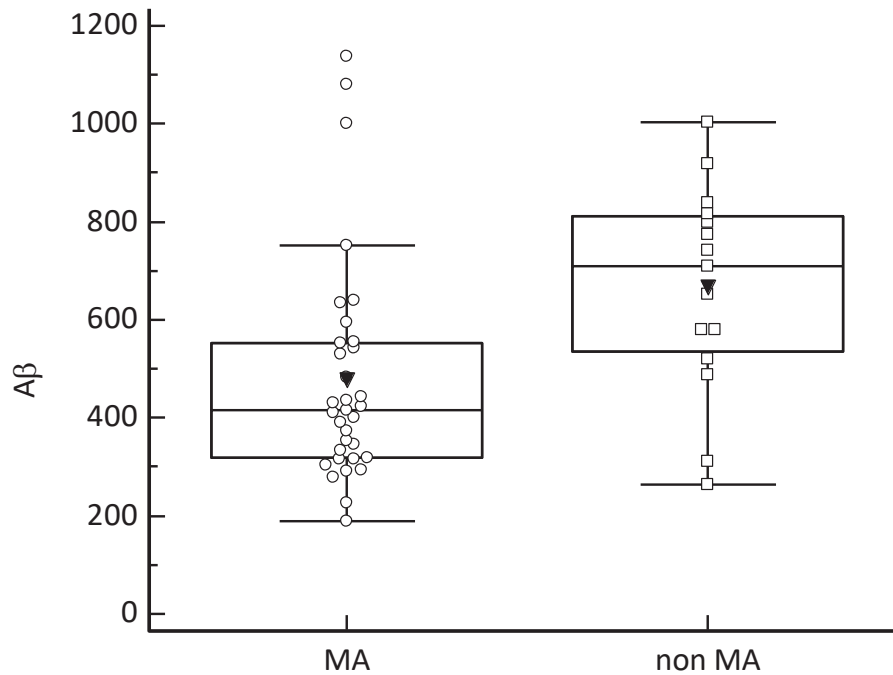
- Pour la P-Tau, il existe une différence significative de concentration en P-Tau entre les groupes MA et non MA ( $p=0,0056$  test de Mann Withney).



|        | Moyenne | ET   | Min  | Q1   | Médiane | Q3  | Max   |
|--------|---------|------|------|------|---------|-----|-------|
| MA     | 106,2   | 67,8 | 23,9 | 45,8 | 92,3    | 142 | 283,3 |
| non MA | 56,9    | 43,4 | 14,5 | 28,7 | 35,5    | 82  | 148,6 |

**Figure 31 : Diagramme en boîte : P-Tau selon MA vs non MA**

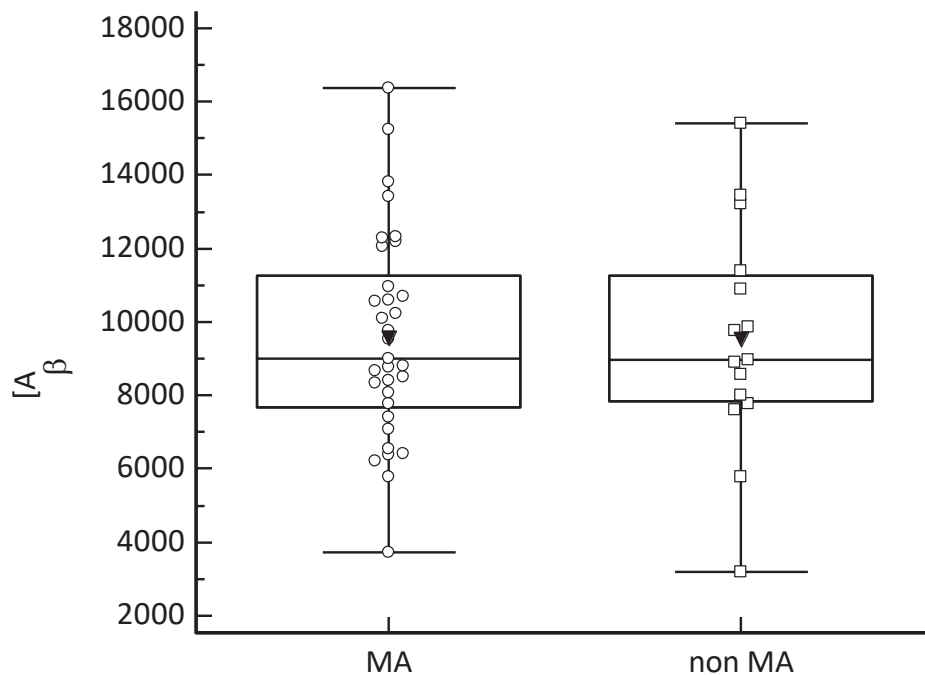
• Pour l'Aβ42, il existe une différence significative de concentration en Aβ42 entre les groupes MA et non MA (p=0,0056 test de Mann Withney). (Les points sortants du diagramme en boîte pour le groupe MA > 1,5 × écart interquartile, sont les 327, 428, 374 : dont les diagnostics finals sont respectivement : MCI, TCM cérébro-vasculaire ?, et dégénérescence lobaire fronto-temporale)



|        | Moyenne | ET    | Min | Q1  | Médiane | Q3  | Max  |
|--------|---------|-------|-----|-----|---------|-----|------|
| MA     | 478,7   | 229,5 | 190 | 319 | 417     | 553 | 1137 |
| non MA | 666,3   | 211,0 | 263 | 535 | 710     | 812 | 1003 |

**Figure 32 : Diagrammes en boîte : Aβ42 selon MA vs non MA**

- Pour l'A $\beta$ 40, il n'existe pas de différence significative de concentration en A $\beta$ 40 entre les groupes MA et non MA ( $p=0,9734$ , test de Mann Withney).



|        | Moyenne | ET     | Min  | Q1   | Médiane | Q3    | Max   |
|--------|---------|--------|------|------|---------|-------|-------|
| MA     | 9579,8  | 2833,2 | 3712 | 7670 | 9020    | 11245 | 16361 |
| non MA | 9522,6  | 3094,2 | 3189 | 7835 | 8981    | 11266 | 15408 |

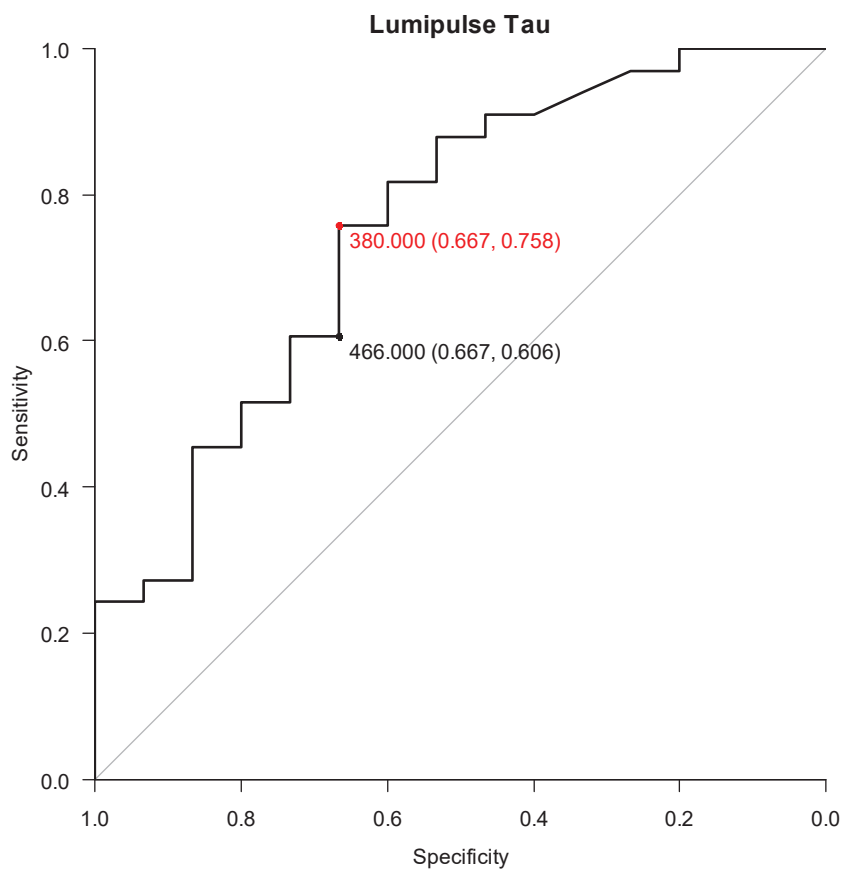
**Figure 33 : Diagrammes en boîte : A $\beta$ 40 selon MA vs non MA**

### 3.5 Courbes ROC

Les groupes MA et non MA ont été formés sur la base du diagnostic avant PL qui n'est pas sujet au biais d'incorporation contrairement au diagnostic après PL et au diagnostic final (à la dernière visite). Pour rappel, le groupe MA est constitué de 33 patients et le groupe non MA de 15 patients. La capacité discriminante d'un paramètre est évaluable au moyen de la réalisation de courbes ROC qui est une représentation graphique de la relation entre la spécificité (abscisse) et la sensibilité (ordonnée) calculées pour toutes les valeurs seuils possibles. Cette courbe est aussi utile pour la détermination d'une valeur seuil optimale correspondant au maximum de l'indice de Youden = Sensibilité + Spécificité – 1 ou au point le plus éloigné de la diagonale représentant un apport nul du test. La sensibilité correspond à la proportion de vrais positifs chez les malades, il s'agit du rapport des vrais positifs sur la somme des vrais positifs et des faux négatifs. Enfin, la spécificité correspond à la proportion de vrais négatifs chez les non malades, il s'agit du rapport des vrais négatifs sur la somme des vrais négatifs et des faux positifs. (131)

### 3.5.1 Tau

L'aire sous la courbe ROC de la protéine Tau est égale à 0,75. La valeur seuil calculée comme le meilleur compromis entre la sensibilité et la spécificité est de 380 ng/L. La spécificité liée à ce seuil est de 66,7% et la sensibilité de 75,8%. A 466 ng/L, valeur seuil transposée issue de l'étude de régression selon Passing Bablok, la spécificité est de 66,7% et la sensibilité de 60,6%.

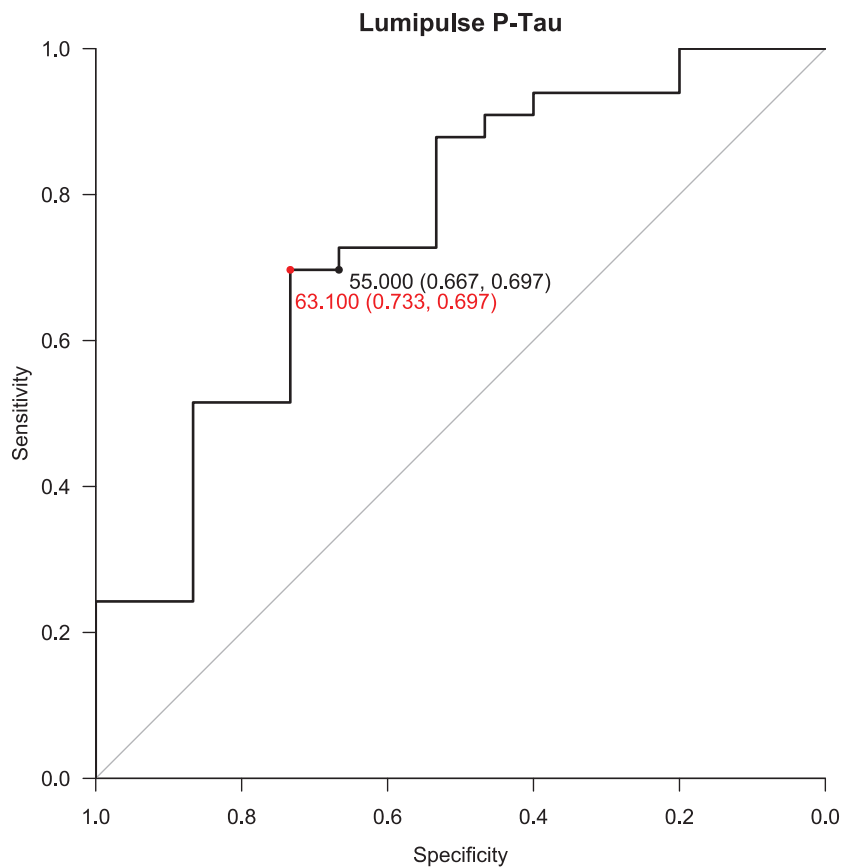


**Figure 34 :** Courbe ROC de la protéine Tau sur l'automate LUMIPULSE®.

*En rouge est indiqué le seuil optimal calculé à partir de l'indice de Youden maximal. La spécificité et la sensibilité pour cette valeur sont indiquées entre parenthèses. Le seuil calculé pour le LUMIPULSE® à partir des seuils INNOTEST® via les droites de régression selon Passing Bablok a également été positionné sur le graphique avec les spécificité et sensibilité entre parenthèses.*

### 3.5.2 P-Tau

L'AUC est égale à 0,75. La valeur seuil calculée comme le meilleur compromis entre la sensibilité et la spécificité est de 63,1 ng/L. La spécificité liée à ce seuil est de 73,3% et la sensibilité de 69,7%. A 55 ng/L la spécificité est de 66,7% et la sensibilité de 69,7%.

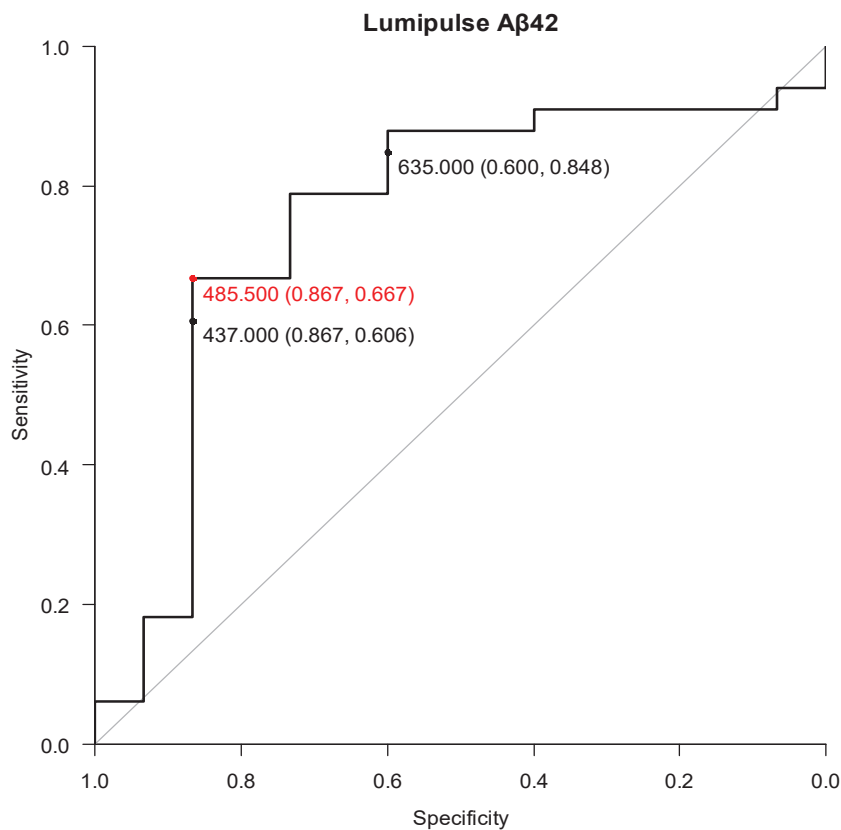


**Figure 35** : Courbe ROC de la P-Tau sur l'automate LUMIPULSE®



### 3.5.3 A $\beta$ 42

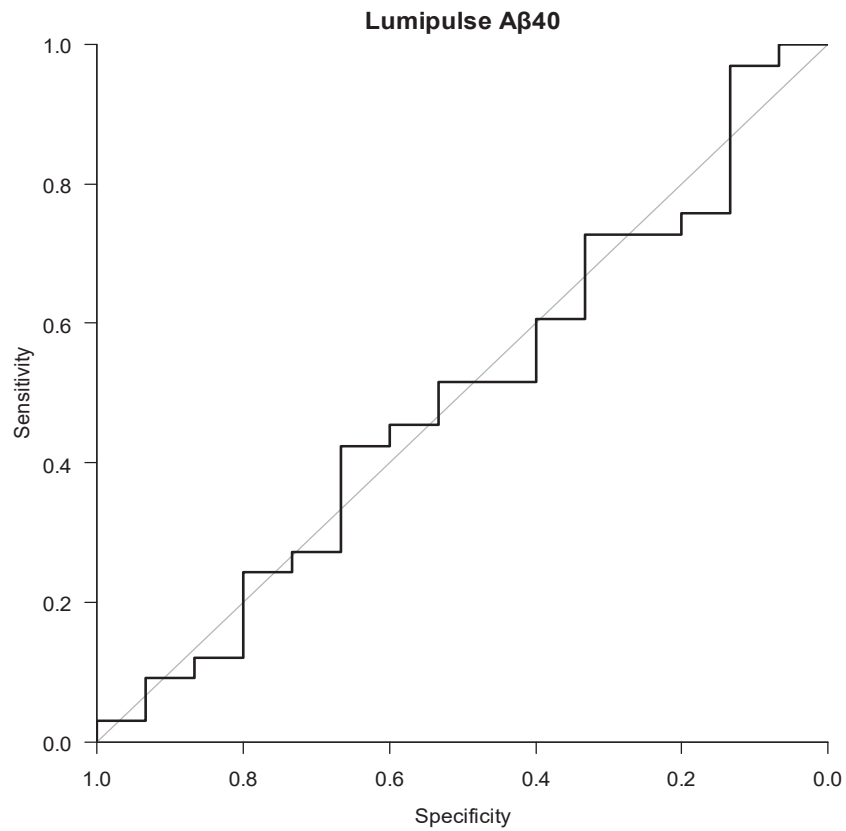
L'AUC est égale à 0,75. La valeur seuil calculée comme le meilleur compromis entre la sensibilité et la spécificité est de 485,5 ng/L. La spécificité liée à ce seuil est de 86,6% et la sensibilité de 66,7%. A 437 ng/L la spécificité est de 86,7% et la sensibilité de 60,6% et à 635 ng/L la spécificité est de 60% et la sensibilité est de 84,8%.



**Figure 36 : Courbe ROC du peptide A $\beta$ 42 sur l'automate LUMIPULSE®**

### 3.5.4 A $\beta$ 40

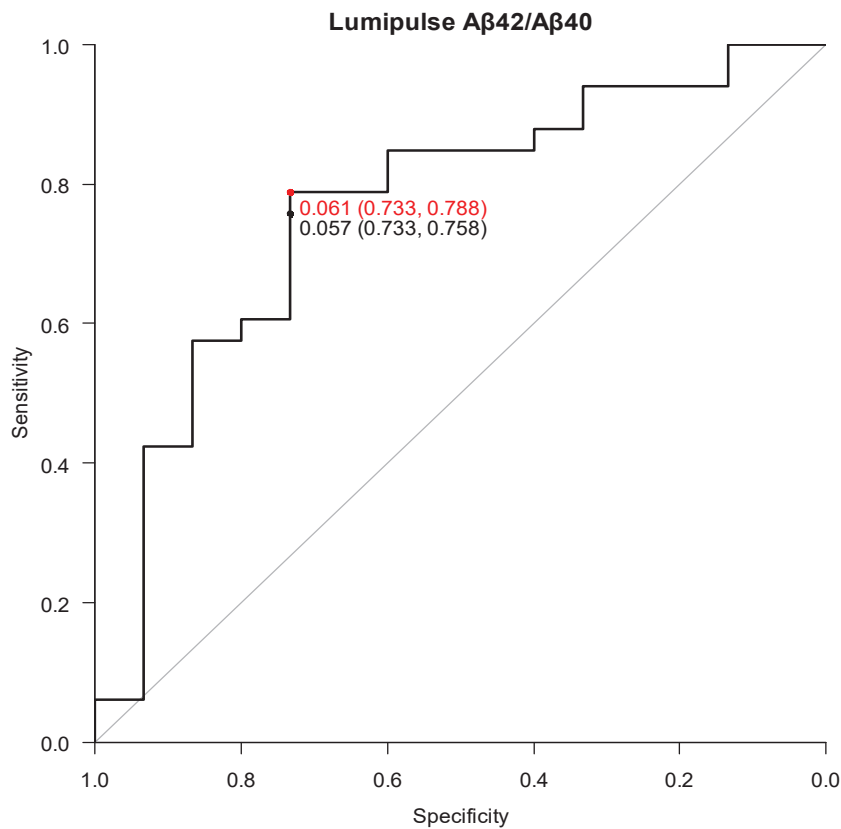
L'AUC est égale à 0,5. Aucune valeur seuil n'a été calculée pour ce paramètre.



**Figure 37** : Courbe ROC du peptide A $\beta$ 40 sur l'automate LUMIPULSE®

### 3.5.5 Rapport A $\beta$ 42/A $\beta$ 40

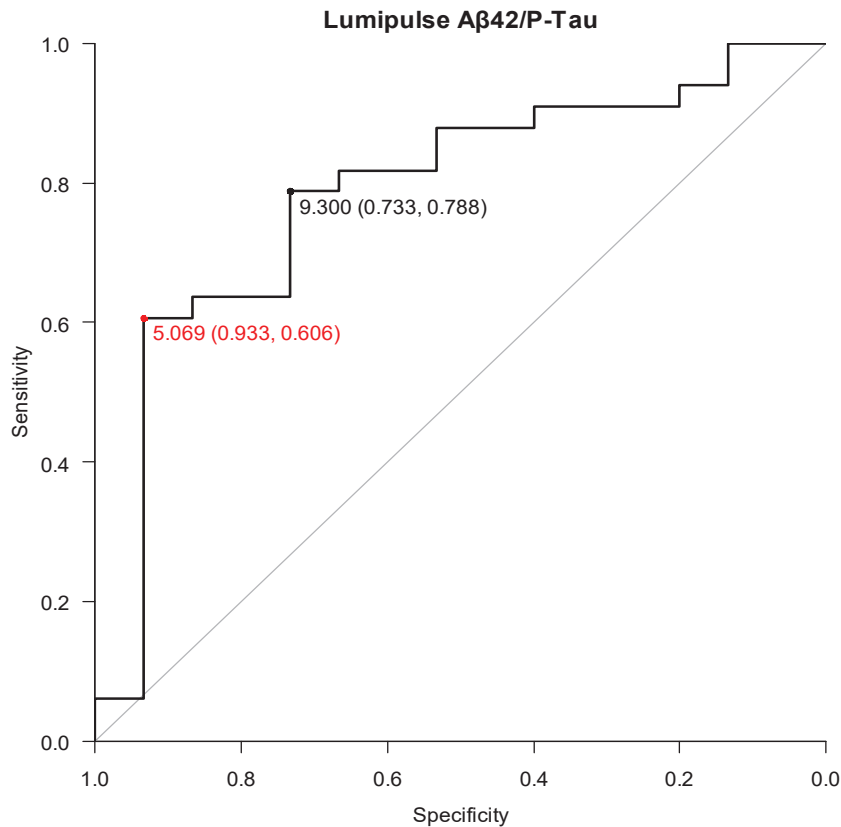
L'AUC est égale à 0,77. La valeur seuil calculée comme le meilleur compromis entre la sensibilité et la spécificité est de 0,061. La spécificité liée à ce seuil est de 73,3% et la sensibilité de 78,8%. A 0,057 la spécificité est de 73,3% et la sensibilité de 75,8% .



**Figure 38** : Courbe ROC du rapport A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 sur l'automate LUMIPULSE®

### 3.5.6 Rapport A $\beta$ 42/P-Tau

L'AUC est égale à 0,79. La valeur seuil calculée comme le meilleur compromis entre la sensibilité et la spécificité est de 5,069. La spécificité liée à ce seuil est de 93,3% et la sensibilité de 60,6%. A 9,3 la spécificité est de 73,3% et la sensibilité de 78,8% .



**Figure 39 : Courbe ROC du rapport A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 sur l'automate LUMIPULSE®**

Les AUC sont récapitulées dans le tableau VII et les spécificités (Sp) et sensibilités (Se) pour les seuils transposés issus de l'étude de régression selon Passing Bablok (PB) et les seuils obtenus à partir des courbes ROC sont récapitulés dans le tableau VIII.

**Tableau VII : Récapitulatif des aires sous la courbe (AUC) pour chaque paramètre**

|               | Tau                   | P-Tau                 | A $\beta$ 42          | A $\beta$ 40          | A $\beta$ 42/<br>A $\beta$ 40 | A $\beta$ 42 /<br>P-Tau |
|---------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------|-------------------------|
| AUC<br>(IC95) | 0,75<br>(0,60 ; 0,91) | 0,75<br>(0,60 ; 0,91) | 0,75<br>(0,59 ; 0,92) | 0,50<br>(0,31 ; 0,68) | 0,77<br>(0,61 ; 0,92)         | 0,79<br>(0,64 ; 0,93)   |

**Tableau VIII** : Récapitulatif des Sp et Se pour les seuils transposés issus de l'étude de régression selon Passing Bablok (PB) et les seuils obtenus à partir des courbes ROC

|  | Tau         | P-Tau       | A $\beta$ 42                | A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 | A $\beta$ 42/P-Tau |
|--|-------------|-------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------|
| <b>Seuils transposés selon PB (ng/L)</b> | 466         | 55          | 437 - 635*                  | 0,057                     | 9,3                |
| Sp (%) /Se (%)                           | 66,7 / 60,6 | 66,7 / 69,7 | 86,7 / 60,6<br>*60,0 / 84,8 | 73,3 / 75,8               | 73,3 / 78,8        |
| <b>Seuils courbes ROC (ng/L)</b>         | 380         | 63,1        | 485,5                       | 0,061                     | 5,07               |
| Sp (%) /Se (%)                           | 66,7 / 75,8 | 73,3 / 69,7 | 86,7 / 66,7                 | 73,3 / 78,8               | 93,3 / 60,6        |

Dans le cas d'un test parfait, la sensibilité, la spécificité et l'AUC sont égales à 1. Lorsque L'AUC est comprise entre 0,7 et 0,9, le test est moyennement informatif, entre 0,5 et 0,7 il est peu informatif et quand l'AUC = 0,5 l'apport du test est nul (131).

Les tests Tau, P-Tau, A $\beta$ 42 sont donc classables comme moyennement informatifs sur le groupe étudié, de même que les ratios A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42/P-Tau.

A titre informatif, nous avons tout de même calculé les AUC des courbes ROC effectuées à partir du diagnostic après PL (Tableau IX). On note ainsi, que le biais d'incorporation des marqueurs biologiques est majeur car on observe une nette augmentation des AUC de tous les paramètres.

**Tableau IX** : Récapitulatif des aires sous la courbe des courbes ROC effectuées à partir du diagnostic après PL.

| Pour le diagnostic post-PL | Tau                  | P-Tau                | A $\beta$ 42         | A $\beta$ 40         | A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 | A $\beta$ 42 / P-Tau |
|----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------------|----------------------|
| AUC [IC95]                 | 0,98<br>[0,95 ;1,00] | 0,96<br>[0,91 ;1,00] | 0,83<br>[0,70 ;0,95] | 0,62<br>[0,45 ;0,79] | 0,94<br>[0,87 ;1,00]      | 0,97<br>[0,92 ;1,00] |

L'étude de réévaluation des seuils par les courbes ROC a été effectuée sur une petite population, on sait aussi que le diagnostic clinique avant PL basé uniquement sur les critères de diagnostic clinique de la MA manque de spécificité car les TCM sont des maladies complexes, dont les profils se chevauchent. Etant donné l'allure générale des courbes ROC, à priori ces seuils optimaux calculés à partir des indices de Youden n'ont pas la meilleure robustesse et ne semblent pas supérieurs à l'autre approche qui consistant à définir les nouveaux seuils par transposition des seuils INNOTEST® via l'équation des droites de régression selon Passing Bablok.

Nous comparerons toutefois les deux approches de réévaluation des seuils dans l'étude de concordance par le test Kappa de Cohen.

## 3.6 Etude de concordance

### 3.6.1 Test Kappa selon Cohen

Afin de déterminer l'accord de classification des patients entre les deux méthodes INNOTEST® et LUMIPULSE®, chaque variable quantitative a été transformée en une variable qualitative à deux ou trois classes : test négatif, positif et en zone grise quand elle existe. Ces classes ont été construites en prenant en compte les valeurs seuils de chaque méthode. L'étude de concordance par le test de Kappa selon Cohen a été effectuée à partir des valeurs seuils calculées à l'aide des droites de régression linéaire selon Passing Bablok à partir des seuils INNOTEST® et aussi à partir des valeurs seuils obtenues à partir des courbes ROC, afin de comparer quelle approche possède la meilleure concordance avec la technique INNOTEST®.

Dans un premier temps, l'étude du test Kappa selon Cohen est menée avec le premier jeu de valeurs seuils LUMIPULSE®, obtenu à partir de la translation des seuils INNOTEST® via les droites de régression linéaire, reporté dans le tableau suivant :

Tableau X : Valeurs seuils des méthodes INNOTEST® et LUMIPULSE® (selon Passing Bablok (PB)) et variables qualitatives « négatif / positif » associées

|                                   | <b>A<math>\beta</math>42</b> | <b>Tau</b> | <b>P-Tau</b> | <b>A<math>\beta</math>42/A<math>\beta</math>40</b> | <b>A<math>\beta</math>42/<br/>P-Tau</b> |
|-----------------------------------|------------------------------|------------|--------------|--|---|
| Seuils<br>INNOTEST®<br>(ng/L)     | 500 - 700                    | 450        | 60           | 0,055  | 9                                       |
| IT Positif                        | < 500                        | > 450      | > 60         | < 0,055  | < 9                                     |
| IT Négatif                        | > 700                        | < 450      | < 60         | > 0,055  | > 9                                     |
| Seuils<br>LUMIPULSE®<br>PB (ng/L) | 437 - 635                    | 466        | 55           | 0,057  | 9,3                                     |
| LP Positif                        | < 437                        | > 466      | > 55         | < 0,057  | < 9,3                                   |
| LP Négatif                        | > 635                        | < 466      | < 55         | > 0,057  | > 9,3                                   |

Pour l'A $\beta$ 42, une zone grise est définie pour des concentrations entre 500 et 700 ng/L en INNOTEST® et entre 437 et 635 ng/L en LUMIPULSE®.

Tableau XI : Concordance de classification entre LUMIPULSE® (selon Passing Bablok) et INNOTEST® pour Tau, P-Tau, Aβ42/Aβ40 et Aβ42/P-Tau

Le pourcentage de concordance a été calculé comme ceci :  $= \frac{a + d}{a + b + c + d}$

| INNOTEST®  | LUMIPULSE®            |                         | Pourcentage de concordance | Kappa (IC95)                    |
|------------|-----------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------------------|
|            | Négatif               | Positif                 |                            |                                 |
| Tau        |                       |                         |                            |                                 |
| Négatif    | 26 (49%) <sup>a</sup> | 2 (3,8%) <sup>b</sup>   | <b>96,2%</b>               | <b>0,925</b><br>(0,822 ; 1,000) |
| Positif    | 0 (0%) <sup>c</sup>   | 25 (47,2%) <sup>d</sup> |                            |                                 |
| P-Tau      |                       |                         |                            |                                 |
| Négatif    | 19 (35,8%)            | 1 (1,9%)                | <b>92,4%</b>               | <b>0,842</b><br>(0,645 ; 0,990) |
| Positif    | 3 (5,7%)              | 30 (56,6%)              |                            |                                 |
| Aβ42/Aβ40  |                       |                         |                            |                                 |
| Négatif    | 18 (33,9%)            | 3 (5,7%)                | <b>88,7%</b>               | <b>0,763</b><br>(0,585 ; 0,941) |
| Positif    | 3 (5,7%)              | 29 (54,7%)              |                            |                                 |
| Aβ42/P-Tau |                       |                         |                            |                                 |
| Négatif    | 19 (35,8%)            | 2 (3,8%)                | <b>94,3%</b>               | <b>0,881</b><br>(0,750 ; 1,000) |
| Positif    | 1 (1,9%)              | 31 (58,5%)              |                            |                                 |

Tableau XII : Concordance de classification entre LUMIPULSE® (selon Passing Bablok) et INNOTEST® pour Aβ42

Le pourcentage de concordance a été calculé comme ceci :  $= \frac{a + d + h}{a + b + c + d + e + f + g + h}$

| INNOTEST®  | LUMIPULSE®              |                         |                         | Pourcentage de concordance | Kappa (IC95)                    |
|------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------------------|
|            | Négatif                 | Zone grise              | Positif                 |                            |                                 |
| Aβ42       |                         |                         |                         |                            |                                 |
| Négatif    | 14 (26,4%) <sup>a</sup> | 2 (3,8%) <sup>b</sup>   | 0 <sup>c</sup>          | <b>84,90%</b>              | <b>0,721</b><br>(0,537 ; 0,905) |
| Zone grise | 2 (3,8%) <sup>c</sup>   | 10 (18,9%) <sup>d</sup> | 3 (5,6%) <sup>e</sup>   |                            |                                 |
| Positif    | 0 <sup>f</sup>          | 1 (1,9%) <sup>g</sup>   | 21 (39,6%) <sup>h</sup> |                            |                                 |



Un coefficient de Kappa entre 0,6 – 0,8 signale un accord fort entre les deux méthodes et entre 0,81-1,00 : un accord très fort. On constate un accord fort pour A $\beta$ 42 et le ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 et un accord très fort pour Tau, P-Tau et le ratio A $\beta$ 42/P-Tau entre les deux méthodes lorsque les valeurs seuils choisies pour LUMIPULSE® sont celles obtenues à partir des droites de régression linéaire selon Passing Bablok.

Le test est répété avec le second jeu de valeurs seuils obtenu par l'étude des courbes ROC.

Tableau XIII : Valeurs seuils des méthodes INNOTEST® et LUMIPULSE® (selon courbes ROC) et variables qualitatives « négatif / positif » associées

|                                    | <b>A<math>\beta</math>42</b> | <b>Tau</b> | <b>P-Tau</b> | <b>A<math>\beta</math>42/A<math>\beta</math>40</b> | <b>A<math>\beta</math>42/<br/>P-Tau</b> |
|------------------------------------|------------------------------|------------|--------------|--|---|
| Seuils<br>INNOTEST®<br>(ng/L)      | 700                          | 450        | 60           | 0,055  | 9                                       |
| IT Positif                         | < 700                        | > 450      | > 60         | < 0,055  | < 9                                     |
| IT Négatif                         | > 700                        | < 450      | < 60         | > 0,055  | > 9                                     |
| Seuils<br>LUMIPULSE®<br>ROC (ng/L) | 485                          | 380        | 63,1         | 0,061  | 5,07                                    |
| LP Positif                         | < 485                        | > 380      | > 63,1       | < 0,057  | < 5,07                                  |
| LP Négatif                         | > 485                        | < 380      | < 63,1       | > 0,057  | > 5,07                                  |

Le seuil INNOTEST® de 700 ng/L a été retenu pour A $\beta$ 42.

Tableau XIV : Concordance de classification entre LUMIPULSE® (selon Passing Bablok) et INNOTEST® pour Tau, P-Tau, Aβ42/Aβ40 et Aβ42/P-Tau

| INNOTEST®  | LUMIPULSE® |            | Pourcentage de concordance | Kappa (IC95)                     |
|------------|------------|------------|----------------------------|----------------------------------|
|            | Négatif    | Positif    |                            |                                  |
| Tau        |            |            |                            |                                  |
| Négatif    | 19 (35,8%) | 9 (17%)    | <b>83,0%</b>               | <b>0,666</b><br>(0,478 ; 0,853)  |
| Positif    | 0 (0%)     | 25 (47,2%) |                            |                                  |
| P-Tau      |            |            |                            |                                  |
| Négatif    | 19 (35,8%) | 1 (1,9%)   | <b>88,7%</b>               | <b>0,768</b><br>(0,596 ; 0,941)  |
| Positif    | 5 (9,5%)   | 28 (52,8%) |                            |                                  |
| Aβ42/Aβ40  |            |            |                            |                                  |
| Négatif    | 17 (32%)   | 4 (7,6%)   | <b>86,8%</b>               | <b>0,722</b><br>(0,530 ; 0,913 ) |
| Positif    | 3 (5,7%)   | 29 (54,7%) |                            |                                  |
| Aβ42/P-Tau |            |            |                            |                                  |
| Négatif    | 20 (37,8%) | 1 (1,9%)   | <b>86,8%</b>               | <b>0,735</b><br>(0,555 ; 0,915)  |
| Positif    | 6 (11,3%)  | 26 (49%)   |                            |                                  |
| Aβ42       |            |            |                            |                                  |
| Négatif    | 16 (30,2%) | 0 (%)      | <b>79,2%</b>               | <b>0,588</b><br>(0,390 ; 0,785)  |
| Positif    | 11 (20,8%) | 26 (49 %)  |                            |                                  |

Avec le second jeu de valeurs seuils LUMIPULSE® obtenu à partir de l'étude des courbes ROC, On constate un accord fort pour Tau, P-Tau, Aβ42/Aβ40 et le ratio Aβ42/P-Tau et un accord modéré pour Aβ42 entre les deux méthodes. Les discordances entre les deux méthodes sont plus nombreuses que pour les valeurs seuils LUMIPULSE® (selon Passing Bablok), de plus les coefficients de Kappa et les pourcentages de concordance sont moins bons pour tous les paramètres.

Ces résultats confirment que les valeurs seuils obtenues à partir des courbes ROC ne sont pas optimales. La très bonne concordance observée entre les 2 méthodes avec les valeurs seuils

obtenues à partir de la translation des seuils INNOTEST® via les droites de régression linéaire rend imaginable l'utilisation ultérieure de ces seuils.

L'analyse a été poussée plus en détail concernant les discordances observées entre LUMIPULSE® (seuils selon Passing Bablok) et INNOTEST® (seuils actuels) (tableaux XI et XII).

Les discordances observées, peu nombreuses, sont analysées ci-dessous au cas par cas.

#### **Tau :**

- 2 cas positifs (pathologiques) selon LUMIPULSE® (LP) mais négatifs selon INNOTEST® (IT) :

**329** : diagnostic initial : psychiatrique + iatrogénie +/- MA, finalement après PL + suivi à 2 ans et demi : diagnostic en faveur d'une MA.

**338** : diagnostic initial et après PL : psychiatrique.

1 discordance de classification sur 2 est en faveur du LUMIPULSE®.

#### **P-Tau :**

- 1 cas positif (pathologique) selon LP mais négatif selon IT :

**316** : diagnostic initial et final (suivi à 3ans) : MA avec génétique +.

- 3 cas négatifs selon LP mais positifs selon IT:

**323** : diagnostic initial : MA associée à un TCM cérébro-vasculaire, diagnostic après PL : TCM cérébro-vasculaire.

**370** : diagnostic initial et final : psychiatrique, suivi clinique à 7ans confirmant cette hypothèse.

**374** : diagnostic initial de MA, changement diagnostic après PL : hypothèse toxique, finalement réévaluation à 1an en faveur d'une dégénérescence lobaire fronto-temporale.

Les 4 discordances de classification concernant la P-Tau entre les deux techniques, lorsqu'on les confronte aux données cliniques sont en faveur du LUMIPULSE®.

## A $\beta$ 42 :

- 2 cas négatifs (non pathologiques) selon LP en zone grise selon IT :  
**371** : diagnostic initial non MA : paraparésie spastique mais diagnostic final de paraparésie spastique et MA.  
**423** : diagnostic initial de MA, le diagnostic est remis en cause en 2019, car le patient présente une clinique assez stable
- 2 cas en zones grises selon LP, négatifs selon IT :  
**340** : diagnostic initial et final (suivi à 4ans) non MA : retard mental.  
**434** : diagnostic initial de MA et diagnostic final (suivi à 4ans, mutation APP et PSEN négatives) évoquant une paraparésie spastique
- 1 cas en zone grise selon LP, positif (pathologique) selon IT :  
**315** : diagnostic initial et final (suivi à 3ans) de MA

Discordances majoritairement en faveur de l'INNOTEST®.

- 3 cas positifs (pathologiques) selon LP en zone grise selon IT :  
**326** : diagnostic initial psychiatrique, diagnostic final (suivi à deux ans) de dégénérescence lobaire fronto-temporale.  
**369** : diagnostic initial de TCM mixte : MA + vasculaire, diagnostic final : TCM cérébro-vasculaire + angiopathie amyloïde.  
**426** : diagnostic initial et final de MA.

2/3 des discordances en faveur de l'INNOTEST®

## A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 :

- 3 cas positifs (pathologiques) selon LP mais négatifs selon IT :  
**403** : diagnostic initial et final de MA confirmé par suivi clinique de plus de 3 ans.  
**367** : diagnostic initial et après PL de MA, pas de suivi clinique.  
**370** : diagnostic initial et final : psychiatrique, suivi clinique à 7ans confirmant cette hypothèse.

2/3 des discordances de classification sont en faveur du LUMIPULSE®.

- 3 cas négatifs selon LP mais positifs (pathologiques) selon IT :  
**362** : diagnostic initial de MA, après PL : dégénérescence cortico basale et diagnostic final après suivi clinique à 3ans : MCL.

**432** : diagnostic initial : psychiatrique, diagnostic final après suivi clinique à 3ans : MA + psy.

**441** : diagnostic initial et final psychiatrique, suivi clinique à 7ans.

2/3 des discordances de classification sont en faveur du LUMIPULSE®.

#### **Aβ42/P-Tau :**

- 2 cas positifs (pathologiques) selon LP mais négatifs selon IT :

**330** : diagnostic initial de MA, diagnostic final après suivi clinique à 5ans, MCL retenue.

**403** : diagnostic initial et final de MA confirmé par suivi clinique de plus de 3 ans.

- 1 cas négatif LP mais positif selon IT :

**370** : diagnostic initial et final avec suivi clinique à plus de 3 ans : psychiatrique.

2/3 des discordances de classification en faveur du LUMIPULSE®.

Nous observons qu'aucun patient n'est impacté sur plusieurs paramètres en même temps, la majorité des cas discordants en paramètres individuels ne sont pas discordants en ratio. Les discordances sont distribuées de manière aléatoire.

D'une façon générale, la majorité des discordances entre les deux techniques sont observées lorsque les résultats sont proches des valeurs seuils.

## IV. Discussion

L'objectif de ce travail était d'effectuer une validation de méthode des dosages des biomarqueurs Tau, p-Tau, A $\beta$ 42 et A $\beta$ 40 dans le LCS sur l'automate LUMIPULSE® G600II, validation comprenant une vérification des performances analytiques, une comparaison de la méthode automatisée à la méthode manuelle INNOTEST® et parce que cela était nécessaire, une réévaluation des valeurs seuils en faveur du diagnostic de la MA.

### **Vérification analytique des dosages sur LUMIPULSE®**

- Les CV de répétabilité établis au cours de ce travail pour le laboratoire ont été obtenus à partir de 10 passages consécutifs des CIQ pour chacun des biomarqueurs, sur 2 niveaux pour Tau et P-Tau et sur 3 niveaux pour A $\beta$ 42 et A $\beta$ 40, ils sont  $\leq 1,73$  % pour Tau,  $\leq 2,80$  % pour P-Tau,  $\leq 1,16$  % pour A $\beta$ 42 et  $\leq 1,26$  % pour A $\beta$ 40.

Les CV du laboratoire sont inférieurs aux CV fournisseur pour Tau, P-Tau et A $\beta$ 40. Seuls les niveaux 2 et 3 d'A $\beta$ 42 sont supérieurs aux CV fournisseur mais ils sont concordants avec les données de la littérature où des CV de 1,94% et 2,84% sont retrouvés respectivement pour les niveaux 2 et 3 d'A $\beta$ 42 (128). On peut noter que les recommandations de la SFBC et la biological variation database (hébergée sur le site de Westgard ou le site de l'EFLM (European federation of clinical chemistry and laboratory medicine)) n'intègrent pas à ce jour de recommandations pour ces biomarqueurs.

L'étude de répétabilité montre des performances conformes aux attentes du laboratoire pour les 4 biomarqueurs.

- Les CV de reproductibilité ont été obtenus à partir de 10 passages des CIQ sur 10 jours différents avec le même opérateur pour chacun des biomarqueurs, sur 2 niveaux pour Tau et P-Tau et sur 3 niveaux pour A $\beta$ 42 et A $\beta$ 40, ils sont  $\leq 5,07$  % pour Tau,  $\leq 2,61$  % pour P-Tau,  $\leq 3,95$  % pour A $\beta$ 42 et  $\leq 5,05$  % pour A $\beta$ 40. Les CV obtenus sont supérieurs à ceux du fournisseur sauf pour la P-Tau. Faute de recommandations des sociétés savantes sur les CV de reproductibilité souhaitables pour ces marqueurs, nous avons vérifié que ces CV de reproductibilité intra-laboratoire restaient bien inférieurs aux CV inter-laboratoires constatés dans les programmes de qualité externe (tableau XV) et nous les avons comparés à ceux des

études récemment publiées sur le sujet où l'on retrouve des CV  $\leq 5\%$  pour Tau,  $\leq 6,2\%$  pour A $\beta$ 42 et  $\leq 5,5\%$  pour A $\beta$ 40 (128,129,132,133).

A l'issue de l'étude de reproductibilité, nous avons conclu que la méthode était conforme aux attentes du laboratoire.

Par rapport à la méthode INNOTEST®, les CV de reproductibilité du LUMIPULSE® sont comparables aux CV INNOTEST® calculés au laboratoire à partir des EEQ longitudinaux (sur un niveau et 9 passages, A $\beta$ 42=6,6%, Tau=6,4% et P-Tau= 3,5%) et ils sont meilleurs que les CV INNOTEST® retrouvés dans la littérature, aux alentours de 10% pour chacun des biomarqueurs (134), ce qui souligne l'intérêt de l'automatisation qui s'affranchit de la variabilité engendrée par les étapes manuelles de pipetage, agitation et lavages.

Au-delà de nos propres résultats, nous avons également observé les performances de la méthode LUMIPULSE® par rapport à ses concurrentes (INNOTEST® et les autres) par l'interface offerte par le programme de contrôle de qualité externe (EEQ) suédois organisé et promu par Alzheimer's Association Quality Control (AAQC) depuis 2009, regroupant des résultats de laboratoires adhérents du monde entier (90 participants) utilisant la plupart des méthodes dédiées à la recherche ou au diagnostic disponibles sur le marché mondial. Les EEQ permettent de calculer la variabilité inter-laboratoires pour chaque technique. Les résultats d'un des contrôles de qualité externe de l'année 2019 sont répertoriés dans le tableau XV:

Tableau XV : CV interlaboratoires (%) du contrôle de qualité externe 29A - année 2019 du programme Alzheimer's association

|                           | INNOTEST<br>CV % (n) | LUMIPULSE<br>CV % (n) | ELECSYS<br>CV % (n) | MSD<br>CV % (n) | EUROIMMUN<br>CV % (n) | IBL<br>CV % (n) |
|---------------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|
| Tau                       | 15 (48)              | 9,7 (27)              | 5,8 (10)            |                 | 22 (4)                |                 |
| P-Tau                     | 11 (55)              | 7,5 (24)              | 3,2 (10)            |                 | 12 (4)                |                 |
| A $\beta$ 42              | 15 (46)              | 8,3 (28)              | 3 (10)              | 24 (4)          | 5,8 (4)               | 1,1 (3)         |
| A $\beta$ 40              | 18 (19)              | 7,8 (21)              |                     |                 | 15 (3)                | 15 (4)          |
| A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 | 27 (14)              | 5,2                   |                     | 15 (4)          | 2,6 (3)               | 19 (3)          |

On peut noter qu'il y a une nette amélioration du CV inter-laboratoires de tous les biomarqueurs lorsque l'on passe de la technique manuelle INNOTEST® à la technique automatisée LUMIPULSE® et particulièrement pour l'A $\beta$ 40 et le ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40. Globalement, on observe que les CV diffèrent grandement d'une technique et d'un marqueur

à l'autre, par exemple pour l'A $\beta$ 42, le CV varie d'un étonnant 1,1% (IBL) à 22 % (MSD®). On peut remarquer les bonnes performances de l'autre technique automatisée présente dans le tableau, la technique ELECSYS® commercialisée par ROCHE, la plus récemment arrivée sur le marché (qui ne propose pas à ce jour de dosage pour A $\beta$ 40). Les utilisateurs de cette technique sont peu nombreux, mais actuellement on observe une transition des utilisateurs des techniques manuelles vers des techniques automatisées, ce qui permettra d'obtenir des données statistiques plus robustes dans quelques mois.

Les méthodes automatisées semblent à même de réduire la variabilité inter-laboratoires ce qui est souhaitable pour aboutir à des recommandations plus fiables sur l'utilisation des biomarqueurs, étendre leur utilisation dans la pratique clinique, faciliter la collaboration des centres de recherche et accroître la pertinence des études multicentriques. Un travail considérable a déjà été effectué notamment avec le programme de contrôles de qualité externe construit par l'AAQC, même si cet organisme fournit des informations purement descriptives et n'émet aucune recommandation pour améliorer les variations inter-laboratoires. Le développement de matériels de référence certifiés, supervisé par l'IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) est en cours, des CRM sont produits pour l'A $\beta$ 42 depuis 2018 mais ne sont pas encore disponibles pour les autres biomarqueurs.

### **Comparaison LUMIPULSE® / INNOTEST®**

- L'étude de corrélation menée sur les échantillons de 53 sujets ayant bénéficié de dosages au laboratoire entre 2012 et 2013 montre que les biomarqueurs : A $\beta$ 42, Tau, P-Tau et les ratios A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42/P-Tau évalués en LUMIPULSE® sont très bien corrélés à l'INNOTEST®, les coefficients de corrélation de Pearson  $r$  pour A $\beta$ 42, Tau, P-Tau, A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42/P-Tau sont respectivement de 0,95, 0,988, 0,98, 0,84 et 0,95. L'A $\beta$ 40 est quant à elle corrélée de façon modérée mais satisfaisante, avec  $r = 0,77$ . On sait que pour ce dosage la technique manuelle est moyennement performante, en effet, des repasses de dosages que l'on a été amené à effectuer par le passé l'ont prouvé (résultats non montrés). D'autres études ont évalué la corrélation des biomarqueurs entre les deux méthodes (128,129,132,135) INNOTEST® et LUMIPULSE®, elles ont trouvé que les deux familles de techniques étaient très bien corrélées, les coefficients de corrélation varient de 0,83 à 0,98 selon le biomarqueur et selon l'étude. Concernant la P-Tau, nos résultats sont particulièrement en accord avec ceux



de l'étude de Leitao *et al*, de novembre 2019 (128), en effet, l'allure globale de la régression linéaire est la même, une sous-évaluation de la P-Tau en LUMIPULSE® est constatée pour des concentrations inférieures à 40ng/L et une surévaluation pour les concentrations supérieures à 40 ng/L (dans notre étude la valeur pivot est de 75ng/L). Le même type de différence est également constatée dans un travail de thèse mené au CHU de Lille, avec une valeur pivot à 50 ng/L, cette fois ci (133). Enfin, dans l'étude de Bayart *et al* de mai 2019 les différences observées pour la P-Tau sont moins nettement prononcées et la droite de régression linéaire croise l'axe x=y plutôt aux alentours de 85 ng/L (132). Curieusement, la différence systématiquement observée pour la P-Tau n'est pas retrouvée dans l'étude de comparaison effectuée par FUJIREBIO (136). Concernant l'Aβ42, nous avons observé une sous-évaluation systématique de l'Aβ42 du LUMIPULSE® par rapport à l'INNOTEST®, ce constat est également en accord avec l'étude de Leitao *et al* et l'étude de Bayart *et al* (128,132). D'autres études (129,137) y compris celle du fournisseur, retrouvaient une surévaluation systématique de l'Aβ42 en LUMIPULSE® par rapport au dosage en INNOTEST®, mais ces comparaisons avaient été effectuées avec l'Aβ42 LUMIPULSE® de 1<sup>ère</sup> génération non standardisée sur les CRM d'où ces différences de résultats. Nous constatons également l'existence d'une sous-évaluation systématique et proportionnelle à partir de 3000 ng/L entre INNOTEST® et LUMIPULSE® pour l'Aβ40. Nous avons peu de données de comparaison pour ce paramètre, dans l'étude de Leitao *et al*, on observe une discrète augmentation d'Aβ40 pour des valeurs inférieures à 7500 ng/L et une discrète diminution d'Aβ40 pour des concentrations supérieures à 7500 ng/L. Enfin, pour la Tau, nous avons montré qu'il n'y avait pas de différence systématique significative entre les deux techniques et ces résultats sont aussi comparables à l'étude de Leitao *et al*.

- La comparaison des techniques par la méthode de Bland et Altman retrouvait une moyenne des différences relatives (DR) de 6,2% pour Tau, - 5,9 % pour P-Tau, - 14,7 % pour Aβ42 et - 22,8 % pour Aβ40, toutefois l'importance de ces résultats est à relativiser car on a pu constater que la moyenne des DR représentait parfois mal le comportement des DR d'une extrémité à l'autre du domaine de mesure et c'est notamment le cas pour la P-Tau. Par ailleurs, les représentations graphiques de Bland et Altman confirment l'existence de différences entre les deux méthodes pour P-Tau, Aβ42 et Aβ40, différences déjà suspectées lors des études de corrélation. Ces différences observées entre les deux familles de méthodes impliquent la nécessité de redéfinir de nouveaux seuils de décision cliniques pour la technique automatisée LUMIPULSE®.

### **Réévaluation des valeurs seuils en faveur du diagnostic de MA :**

- Il n'existe pas de consensus français, européen ou international robuste sur les valeurs seuils de décision clinique ou sur des limites de référence pour les biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer dans le LCS. En effet, les cut off diffèrent grandement d'une étude à l'autre, ce qui est un frein à la mutualisation des données ou à l'échange des données d'un centre à l'autre. Ces résultats peuvent s'expliquer par des différences dans la sélection des patients et leurs caractéristiques démographiques (par exemple l'âge et le génotype) et notamment dans le choix des sujets contrôles. Les procédures diagnostiques varient également d'une étude à l'autre, ainsi que les étapes pré-analytiques et les méthodes analytiques des dosages. On peut aussi observer cette variabilité sur les cut-off calculés dans les études effectuées sur le LUMIPULSE®. Pour l'Aβ42 le seuil fluctue de 437 à 615 ng/L, pour la P-Tau, de 50,6 à 73 ng/L, pour la Tau de 335 à 525 ng/L et enfin pour le ratio Aβ42/Aβ40 de 0,056 à 0,069 (125,128,132,133) (Tableau XVI). Par ailleurs, le fournisseur a défini des valeurs usuelles pour les biomarqueurs du LCS dans une étude menée sur 121 sujets sains obtenues par les 10<sup>ème</sup> et 90<sup>ème</sup> percentiles des concentrations en biomarqueurs dans le LCS de cette population. Toutefois, nous ne disposons pas des données démographiques de la population (âge, sexe), ni des données pré-analytiques complètes telles que le nombre de cycles de décongélation (seuls les tubes utilisés étaient mentionnés). Au total, il est délicat de s'approprier ces valeurs usuelles, ce qui nous a conforté dans la décision de définir nos propres valeurs usuelles ou valeurs seuils de décision clinique adaptées à nos conditions de travail au laboratoire et à notre patientèle. Ainsi, deux approches ont été étudiées. La première consistait à translater les valeurs usuelles de la méthode manuelle INNOTEST® actuellement utilisées via les droites de régression linéaire selon Passing Bablok. La seconde consistait à réaliser des courbes ROC à partir des groupes de diagnostics cliniques avant PL : MA vs non MA et d'en déduire des seuils de décision clinique. La moyenne des DR calculée par la méthode de Bland et Altman n'était pas une option à envisager pour la définition des nouveaux seuils car nous avons constaté que les DR variaient d'un bout à l'autre du domaine de mesure. Le Tableau XVI récapitule les résultats de notre travail.

**Tableau XVI** : Récapitulatif des seuils des biomarqueurs de la MA dans le LCS dosés en LUMIPULSE®

|   | Tau     | P-Tau   | A $\beta$ 42 | A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 | A $\beta$ 42/<br>P-Tau |
|---|---------|---------|--------------|---------------------------|------------------------|
| <b>Leitao <i>et al</i></b> (128)  | 335     | 50,6    | 543          | ×                         | ×                      |
| <b>Bayart <i>et al</i></b> (132)  | 381     | ×       | 437          | ×                         | ×                      |
| <b>Fujirebio</b> (124,125)<br>(Valeurs usuelles/seuils de<br>décision clinique*)  | 410/404 | 59/56,5 | 725/599      | 0,068/0,069               | 8,1*                   |
| <b>Etude CHU de Lille</b><br>(133)  | 525     | 73      | 615          | 0,056                     | ×                      |
| <b>Notre étude CHU de<br/>Rouen</b><br>Translation v.u IT selon<br>Passing Bablok | 466     | 55      | 437-635      | 0,057                     | 9,3                    |
| <b>Notre étude CHU de<br/>Rouen</b><br>Seuils courbes ROC                         | 380     | 63,1    | 485,5        | 0,061                     | 5,1                    |

- Disposant de deux séries de valeurs seuils déterminées sur notre population par deux approches différentes (transposition et courbes ROC), nous avons poursuivi l'étude pour choisir la série la plus pertinente. Nous avons testé la concordance clinique des dosages en LUMIPULSE® vs INNOTEST® avec chacune des séries de seuils LUMIPULSE® par le test Kappa selon Cohen et le calcul d'un pourcentage de concordance. Nous avons constaté que les coefficients de Kappa et le pourcentage de concordance entre les méthodes INNOTEST® et LUMIPULSE® étaient plus faibles avec les seuils obtenus par l'étude des courbes ROC, ce que l'allure des courbes ROC pouvait laisser présager. Les coefficients de Kappa calculés en choisissant les seuils traduits étaient meilleurs pour Tau, P-Tau et les ratios A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42/P-Tau (respectivement de 0,93, 0,84, 0,76 et 0,88). Les pourcentages de concordance entre les deux méthodes  $\geq 88,7$  %, révélaient une très forte concordance clinique entre les deux méthodes aux seuils choisis. On peut noter que les discordances observées entre les deux

techniques étaient majoritairement constatées lorsque les résultats étaient proches des valeurs seuils et la plupart du temps en faveur du LUMIPULSE®. En ce qui concerne l'Aβ42, le coefficient de Kappa était de 0,721 et le pourcentage de concordance de 84,9%, ces résultats sont un peu moins bons que pour les précédents biomarqueurs, mais peuvent s'expliquer par le fait que nous avons introduit une classe supplémentaire dite de zone grise pour ce paramètre dans le calcul des paramètres statistiques. Ces résultats révèlent tout de même une forte concordance des deux techniques pour ce paramètre. Au total, ces résultats rendent possible l'utilisation des valeurs transposées à partir des valeurs usuelles actuellement utilisées en INNOTEST® qui finalement sont considérées comme des seuils décisionnels car elles sont comparables aux seuils de décision clinique retrouvés dans la littérature pour cette technique (80) et parce qu'elles fonctionnent bien comme seuils de décision clinique dans la pratique au laboratoire. Etonnement, on peut constater que malgré la standardisation de l'Aβ42 par le CRM mis à disposition par l'IFCC, la variabilité des cut off pour ce biomarqueur reste importante. L'harmonisation des procédures pré-analytiques, des méthodologies d'évaluation des seuils et l'augmentation de la taille des populations étudiées permettraient sans doute de les faire converger. Les cut off, les sensibilités, spécificités, les valeurs prédictives positives et les valeurs prédictives négatives pour les seuils transposés que nous avons choisi d'adopter pour la mise en production de l'automate ont été calculées à partir des diagnostics initiaux avant PL (courbes ROC) et sont récapitulées en annexe 8.

### **Organisation des dosages, place de l'Aβ40 et question des zones d'incertitude**

- Le passage à une méthode de dosage automatisée est l'occasion de faire évoluer la stratégie de dosage des biomarqueurs. En méthode manuelle chaque biomarqueur était dosé en série individuelle réalisée toutes les 4 semaines en moyenne, au total deux jours étaient nécessaires pour effectuer le techniquage complet des 3 types de biomarqueurs (Aβ42, Tau et P-Tau). Les séries de dosage avaient un format rigide (16 patients nécessaires pour programmer les séries). Le délai de rendu des résultats était parfois long (de 15j jusqu'à 2 mois et demi en été). Le dosage de l'Aβ40 lui, était effectué à posteriori pour quelques cas choisis en concertation avec les cliniciens et le rendu du résultat pour ce marqueur était décalé dans le temps. Avec le LUMIPULSE® nous avons la possibilité de doser les 3 ou 4 biomarqueurs à partir d'un seul échantillon de LCS en moins d'une journée, permettant des sessions de dosages plus fréquentes. Le format des séries de patients est libre (et économiquement

acceptable quand  $n \geq 7$ ). L'automatisation permet également d'intégrer plus facilement le dosage de l'A $\beta$ 40 dans la pratique, ce qui nous incite à réfléchir de nouveau sur la place du dosage d'A $\beta$ 40.

La pertinence du ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 suscite beaucoup d'attention et d'observations depuis quelques années. Plusieurs études ont montré que l'intégration du ratio permettait de diminuer significativement le nombre de profils discordants (c'est-à-dire présentant un ou deux marqueurs normaux en même temps qu'un ou deux marqueurs pathologiques) (68,111,138–140), pour deux raisons, tout d'abord parce qu'il permettrait de minimiser les biais liés aux facteurs pré-analytiques par compensation des variations de concentrations d'A $\beta$  dues au phénomène d'adsorption dans les tubes (141) mais aussi parce qu'il informe sur le niveau de synthèse global de peptides amyloïdes qui diffère d'un sujet à l'autre, ce qui permet de prévenir les erreurs d'interprétations de la concentration en A $\beta$ 42 chez les patients présentant constitutionnellement des concentrations élevées ou faibles de peptides A $\beta$  totaux (142). Certaines études suggèrent que les performances diagnostiques du ratio par rapport à A $\beta$ 42 seule seraient meilleures pour distinguer les patients MA et MCI des patients témoins (128,143,144) mais elles sont nuancées par d'autres études (69,70,145) et par nos propres résultats.

Par ailleurs, le ratio montrerait une meilleure concordance avec le PET amyloïde qu'A $\beta$ 42 seule (63,146).

#### Apport du ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 dans les diagnostics différentiels :

Les TCM sont des maladies complexes, dont les profils se chevauchent, ce qui diminue les performances diagnostiques des biomarqueurs et rend le diagnostic différentiel difficile. L'étude de Slaets *et al*, dont les diagnostics ont été confirmés par autopsie montre que l'ajout du ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 au panel existant (A $\beta$ 42 et P-Tau) peut améliorer la précision du diagnostic différentiel de la MA (TCM cérébro-vasculaire, DFT, DCL) lorsque la concentration en P-Tau est intermédiaire (49,3 – 87,6 ng/L) (70). Dans l'étude de Nutu *et al*, le ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 améliore la différenciation des patients atteints de MA de ceux atteints de la maladie de Parkinson et de MCL par rapport au peptide A $\beta$ 42 seul (147). D'autres études admettent que l'utilisation du ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 au lieu d'A $\beta$ 42 est une valeur ajoutée dans la précision du diagnostic différentiel (148–151). Une étude contraste ces propos et montre que l'incorporation d'A $\beta$ 40 aux principaux marqueurs du LCS (A $\beta$ 42, Tau et P-Tau) n'apporte aucune valeur ajoutée dans la distinction des patients MA, des patients DFT (69).

### Intérêt pronostic du ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 :

Hansson *et al* rapportent que l'utilisation du ratio A $\beta$ 42/40 serait avantageuse, chez les patients MCI pour prédire le déclin et la progression vers le stade de TCM lorsqu'il est intégré au panel de biomarqueurs existant.

Au total, on remarque qu'actuellement il y a un fort engouement pour l'utilisation du ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 dans la littérature, bien que quelques études viennent tempérer cette tendance.

Concernant l'intérêt de doser l'A $\beta$ 40 de façon systématique ou uniquement en cas de profils discordants, la littérature reste partagée. Notons que le nombre de cas discordants est d'environ de 20 à 30% selon les études mais il faut signaler que la définition des profils discordants diffère d'une étude à l'autre.

L'avantage de doser l'A $\beta$ 40 de façon systématique est d'éviter un délai d'attente supplémentaire pour statuer sur les diagnostics clinico-biologiques des patients.

L'inconvénient du dosage systématique est tout d'abord financier, l'inclusion d'A $\beta$ 40 augmentant le cout des analyses d'environ 50 euros. Parfois, il pourrait également brouiller le tableau biologique au lieu de le simplifier, par exemple, lorsqu'il est en zone grise ou qu'il brouille une situation où le profil des 3 biomarqueurs n'était pas équivoque. Dans notre étude, où le dosage de l'A $\beta$ 40 a été effectué en systématique, l'AUC de l'A $\beta$ 42 était de 0,75 et celle du ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 de 0,77, il n'y a pas de différence significative entre les deux paramètres et ce résultat est en accord avec d'autres études (69,70,145).

Il faut ajouter que la commercialisation du dosage d'A $\beta$ 40 est plus récente (2011) que les 3 autres biomarqueurs, nous avons moins de recul sur la pertinence de ce paramètre qui était dosé jusqu'alors dans de rares situations. Les performances de ce dosage étaient moyennes en technique manuelle, ce qui était un frein à l'intégration du dosage d'A $\beta$ 40 de façon plus importante. L'automatisation est l'occasion d'espérer un rendu plus fiable de ce paramètre et nous l'avons constaté avec nos résultats de CV de répétabilité et de reproductibilité bas.

Au CHU de Rouen, si nous écartons l'hypothèse d'un dosage systématique de l'A $\beta$ 40, nous envisageons cependant de doser l'A $\beta$ 40 dans le même temps analytique que les 3 autres biomarqueurs dans les situations suivantes :

- A $\beta$ 42 diminuée ou en zone grise, Tau et P-Tau normales
- A $\beta$ 42 normale ou en zone grise, Tau et P-Tau augmentées
- A $\beta$ 42 normale ou en zone grise, Tau normale et P-Tau augmentée ou en zone grise

Cela sous-entend que le dosage des biomarqueurs se fera en deux temps, mais dans la même journée : A $\beta$ 42, Tau et P-Tau seront initialement dosés, puis après analyse des données et l'identification de profils discordants, les dosages d'A $\beta$ 40 seront réalisés.

Nous envisageons d'appliquer cette stratégie de dosage conditionnée de la façon décrite durant 6 mois d'activité pleine et de réévaluer l'apport vis-à-vis des attentes et bénéfices cliniques, du surcoût et du temps passé de façon à optimiser le schéma stratégique pour la suite.

Pour information, sur les 53 échantillons patients dosés dans notre étude, 21 profils (39,6%) présentaient les profils évoqués ci-dessus.

- Un autre point à soulever est la difficulté d'interprétation des résultats proches des valeurs seuils, une zone grise avait déjà été créée par le passé pour l'A $\beta$ 42 de manière intuitive et collective en réponse à différents problèmes : une instabilité de la calibration des lots de référence chez le fournisseur, la fragilité analytique du paramètre, du fait de son hydrophobie et de ses capacités d'autoagrégation et d'adsorption sur les surfaces contact, notamment les parois des tubes. Pour ces raisons, la limite basse des valeurs usuelles (>500) avait été remplacée par une zone d'incertitude (500-700), un nombre non négligeable de patients MA ont des A $\beta$ 42 comprises entre 500 et 700. Pour Tau et P-Tau, les études de Rosen *et al* (134), de Lewczuk *et al* (152) et le groupe de travail constitué d'experts Européens (53) recommandaient à l'époque de l'utilisation de l'INNOTEST®, l'application d'une zone grise inhérente à la variabilité analytique autour des valeurs seuils de la façon suivante : Valeur seuil +/- 2 ET (en tenant compte d'un CV de reproductibilité de 10%). Idéalement nous aurions souhaité déterminer une zone grise calculée d'après l'incertitude du dosage telle que le SH GTA 14 le définit mais celle-ci n'a pas pu être calculée faute de matériel de référence (méthode CIQ + matériaux de référence) et faute d'EEQ déjà dosés (méthode CIQ/EEQ). A défaut, nous avons repris les recommandations datant des dosages INNOTEST® et nous les avons adaptées pour tenir compte de l'amélioration des performances analytiques associée à l'automatisation et compte tenu de nos CV de reproductibilité intra-laboratoire nous avons choisi d'adapter ces recommandations en adoptant des CV de 5% pour le calcul de la zone grise aux valeurs seuils choisies et nous obtenons ainsi les limites de zones d'incertitude récapitulées dans le tableau XVII.

Tableau XVII : Valeurs seuils obtenues par les droites de régression de Passing Bablok et calcul des zones grises associées en fonction du CV.

|                           | Valeurs seuils<br>translatées | Zone grise IC95<br>(CV 5%) | Zone grise<br>utilisable en<br>pratique |
|---------------------------|-------------------------------|----------------------------|---|
| Tau                       | 466                           | 419,4 - 512,6              | 420 - 513                               |
| P-Tau                     | 55                            | 49,5 - 60,5                | 50 - 60                                 |
| A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 | 0,057                         | 0,0513 - 0,0627            | 0,051 – 0,063                           |
| A $\beta$ 42/P-Tau        | 9,3                           | 8,37 - 10,23               | 8,4 – 10,2                              |

Nous avons constaté sur les graphes de corrélation de la P-Tau que des points s'écartaient notablement de la droite de régression (au-dessus et au-dessous) pour des valeurs proches de 60 ng/L (seuil INNOTEST®). Aussi, l'usage d'une zone grise semble parfaitement adapté pour ce paramètre.

Il semble également prudent d'appliquer une zone grise pour le ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40, afin d'avoir plus de recul sur son interprétation.

En plus de conseiller le calcul de zones d'incertitude, le groupe de travail multidisciplinaire d'experts européens recommande d'interpréter les résultats avec prudence lorsque les résultats des biomarqueurs sont proches des valeurs décisionnelles et si besoin de réaliser des examens complémentaires d'imagerie ou d'effectuer un nouveau prélèvement de LCS.

Notre étude présente quelques limites. Tout d'abord, la classification diagnostique MA vs non MA avant PL est fragile car basée sur les tests neuropsychologiques, l'imagerie quand elle était disponible (scanner ou IRM) et la clinique, éléments qui peuvent s'avérer insuffisants pour poser un diagnostic fiable de MA. L'étude des biomarqueurs dans une population de diagnostics certains aurait été idéale. Or la certitude ne peut être acquise que par confirmation anatomopathologique (aujourd'hui délaissée), ou bien elle peut provenir de situations génétiques particulières telles que la présence d'une mutation à transmission autosomique dominante d'un des gènes impliqués dans les formes familiales de MA, toutefois cette population n'aurait pas été représentative d'un point de vue démographique (âge) de la population habituellement touchée par la MA c'est-à-dire les sujets âgés de plus de 65 ans. Les sujets « non MA » de notre étude faisaient tous l'objet d'une consultation spécialisée de neurologie dans le cadre d'une investigation de troubles cognitifs pouvant faire évoquer une



MA, ce qui limite notre population contrôle en nombre de patients mais lui fait gagner en qualité, réalisme et pertinence (par rapport à un LCS « tout venant »)

Notre étude présente l'avantage de posséder des diagnostics cliniques avant PL qui sont certes perfectibles mais ne sont pas sujets au biais d'incorporation du résultat de la PL dans l'hypothèse diagnostique. Par ailleurs, notre travail présente les résultats de l'étude de performance des marqueurs de MA du LCS sur l'automate LUMIPULSE® jusqu'alors peu étudié et ce, avec les kits d'A $\beta$ 42 standardisés vis-à-vis du CRM ce qui a été encore moins étudié. Ce travail va permettre la mise en route des dosages des biomarqueurs dans le LCS par la technique automatisée LUMIPULSE® au laboratoire ce qui réduira de façon considérable le temps d'analyse, rendra l'analyse moins opérateur dépendante et permettra de mettre en œuvre les dosages dans un délai plus court après la prescription, à performance analytique égale, sinon meilleure.

Avec le temps, nous accumulerons l'expérience d'usage des valeurs seuils que nous avons déterminé vis-à-vis de la clinique, cela nous permettra de les ajuster si besoin.

Après les gros efforts produits depuis 15 ans pour maîtriser la phase pré-analytique du dosage des biomarqueurs dans le LCS, l'accent reste encore à mettre sur la standardisation analytique. L'arrivée de méthodes automatisées (LUMIPULSE® Fujirebio et ELECSYS® Roche) va contribuer à l'amélioration analytique globale. La mise à disposition de matériaux de référence CRM pour la Tau et la P-tau reste quant à elle très attendue. A terme, toutes ces améliorations augmenteront la transférabilité de ces dosages entre laboratoires et/ou centres de recherche et augmenteront leur valeur contributive dans les diagnostics différentiels.

Optimiser et harmoniser toujours plus les biomarqueurs principaux du LCS est important et d'actualité car la relève (marqueurs complémentaires ou alternatifs du LCS ou biomarqueurs sanguins) tarde à émerger.

## V. Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons vérifié les performances analytiques des dosages des biomarqueurs Tau, p-Tau, A $\beta$ 42 et A $\beta$ 40 dans le LCS sur l'automate LUMIPULSE® G600II, puis nous avons comparé les résultats des méthodes LUMIPULSE® et INNOTEST® et de nouveaux seuils d'interprétation ont été définis pour la méthode automatisée. L'étude de concordance des deux techniques de dosages avec les nouveaux seuils définis pour LUMIPULSE® a montré que les interprétations des résultats des dosages des biomarqueurs entre les deux techniques étaient concordantes. Le travail réalisé permet de valider le transfert technologique du dosage des biomarqueurs dans le LCS d'une méthode manuelle INNOTEST® vers une méthode automatisée LUMIPULSE® au laboratoire.

L'automatisation contribuera à une intégration plus fluide du dosage de l'A $\beta$ 40 dans notre pratique pour le calcul du ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40, quand un profil biologique discordant est rencontré.

Les nouveaux seuils pourront être confirmés par l'usage dans une cohorte prospective sur un plus grand nombre de patients, l'apport du dosage d'A $\beta$ 40 comme aide au diagnostic de MA en cas de profils biologiques discordants pourrait également être évalué au cours de cette étude.

## VI. Références bibliographiques et sitographiques

1. World Health Organization. La démence [Internet]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
2. The International Federation of Alzheimer's Disease and Related Disorders Societies. World Alzheimer Report 2009 [Internet]. 2009. Disponible sur: <https://www.alz.co.uk/research/files/WorldAlzheimerReport.pdf>
3. HAS. Maladie d'Alzheimer et maladies apparentées : diagnostic et prise en charge [Internet]. 2011 déc. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2011-12/recommandation\\_maladie\\_d\\_alzheimer\\_et\\_maladies\\_apparentees\\_diagnostic\\_et\\_prsie\\_en\\_charge.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2011-12/recommandation_maladie_d_alzheimer_et_maladies_apparentees_diagnostic_et_prsie_en_charge.pdf)
4. La maladie d'Alzheimer en chiffres [Internet]. France Alzheimer. Disponible sur: <https://www.francealzheimer.org/maladie-dalzheimer-vos-questions-nos-reponses/maladie-dalzheimer-chiffres/>
5. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*. 28 janv 2010;362(4):329-44.
6. Maladie d'Alzheimer [Internet]. Inserm - La science pour la santé. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/alzheimer-maladie>
7. Blennow K, Leon MJ de, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *The Lancet*. 29 juill 2006;368(9533):387-403.
8. Fondation Médéric Alzheimer. Combien coûte la maladie d'Alzheimer? [Internet]. 2015 sept. Disponible sur: [https://www.fondation-mederic-alzheimer.org/sites/default/files/2015\\_09\\_28\\_rapport\\_fma\\_cout\\_ma.pdf](https://www.fondation-mederic-alzheimer.org/sites/default/files/2015_09_28_rapport_fma_cout_ma.pdf)
9. Le plan maladies neuro-dégénératives 2014-2019 [Internet]. Gouvernement.fr. [cité 19 déc 2019]. Disponible sur: <https://www.gouvernement.fr/action/le-plan-maladies-neuro-degeneratives-2014-2019>
10. Villain N, Chételat G, Desgranges B, Eustache F. Neuroimagerie de la maladie d'Alzheimer : synthèse et apport à la compréhension des mécanismes physiopathologiques. *Biologie Aujourd'hui*. 2010;204(2):145-58.
11. Duyckaerts C, Panchal M, Delatour B, Potier M-C. Neuropathologie morphologique et moléculaire de la maladie d'Alzheimer. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. mars 2009;67(2):127-35.
12. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. mai 2011;7(3):263-9.

13. Expertise collective de l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm). Maladie d'Alzheimer : enjeux scientifiques médicaux et sociétaux. 2007.
14. Lehmann S, Gabelle A, Delaby C. Protéine tau et peptides amyloïdes. EMC biologie médicale. 2014;9(1):1-15.
15. Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, et al. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol*. mai 2012;71(5):362-81.
16. Lebon V, Duyckaerts C. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. EMC - Savoirs et soins infirmiers. oct 2015;10(3):1-9.
17. DeTure MA, Dickson DW. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 02 2019;14(1):32.
18. 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*. 25 juin 2002;58(12):1791-800.
19. Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, et al. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. janv 2012;8(1):1-13.
20. Chen G-F, Xu T-H, Yan Y, Zhou Y-R, Jiang Y, Melcher K, et al. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin*. sept 2017;38(9):1205-35.
21. Morishima-Kawashima M. Molecular mechanism of the intramembrane cleavage of the  $\beta$ -carboxyl terminal fragment of amyloid precursor protein by  $\gamma$ -secretase. *Front Physiol*. 2014;5:463.
22. Hubin E, van Nuland NAJ, Broersen K, Pauwels K. Transient dynamics of A $\beta$  contribute to toxicity in Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(18):3507-21.
23. Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Meur NL, Laquerrière A, Vital A, et al. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet*. janv 2006;38(1):24-6.
24. Wallon D, Rousseau S, Rovelet-Lecrux A, Quillard-Muraine M, Guyant-Maréchal L, Martinaud O, et al. The French series of autosomal dominant early onset Alzheimer's disease cases: mutation spectrum and cerebrospinal fluid biomarkers. *J Alzheimers Dis*. 2012;30(4):847-56.
25. Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerrière A, Vital A, et al. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet*. janv 2006;38(1):24-6.

26. Société Alzheimer du Canada. Syndrome de Down (ou trisomie 21) et maladie d'Alzheimer [Internet]. 2016 nov. Disponible sur: [https://alzheimer.ca/sites/default/files/files/qc/la maladie/syndrome de down.pdf](https://alzheimer.ca/sites/default/files/files/qc/la%20maladie/syndrome%20de%20down.pdf)
27. Reiss AB, Arain HA, Stecker MM, Siegart NM, Kasselmann LJ. Amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *Reviews in the Neurosciences*. 2018;29(6):613–627.
28. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 1991;82(4):239-59.
29. Ricciarelli R, Fedele E. The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. *Curr Neuropharmacol*. 2017;15(6):926-35.
30. Walker LC. Prion-like mechanisms in Alzheimer disease. *Handb Clin Neurol*. 2018;153:303-19.
31. Amieva H. Signes prédictifs de la maladie d'Alzheimer. *La Revue De Medecine Interne*. juin 2011;32(S1):12-3.
32. Croisile B, Auriacombe S, Etcharry-Bouyx F, Vercelletto M. Les nouvelles recommandations 2011 du National Institute on Aging et de l'Alzheimer's Association sur le diagnostic de la maladie d'Alzheimer : stades précliniques, mild cognitive impairment et démence. *Revue Neurologique*. juin 2012;168(6-7):471-82.
33. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. mai 2011;7(3):280-92.
34. Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. mai 2011;7(3):270-9.
35. van der Flier WM, Pijnenburg YA, Fox NC, Scheltens P. Early-onset versus late-onset Alzheimer's disease: the case of the missing APOE ε4 allele. *Lancet Neurol*. mars 2011;10(3):280-8.
36. Mitchell AJ, Shiri-Feshki M. Rate of progression of mild cognitive impairment to dementia – meta-analysis of 41 robust inception cohort studies. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 2009;119(4):252-65.
37. Knopman DS, DeKosky ST, Cummings JL, Chui H, Corey-Bloom J, Relkin N, et al. Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 8 mai 2001;56(9):1143-53.

38. Bombois S. Diagnostic étiologique des troubles cognitifs et biomarqueurs. Dans quelles situations l'utilisation de l'imagerie moléculaire est-elle indiquée? *Médecine Nucléaire*. 1 mai 2018;42(3):185-9.
39. Jack CR, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Feldman HH, Frisoni GB, et al. A/T/N: An unbiased descriptive classification scheme for Alzheimer disease biomarkers. *Neurology*. 2 août 2016;87(5):539-47.
40. Mahalingam S, Chen M-K. Neuroimaging in Dementias. *Semin Neurol*. avr 2019;39(2):188-99.
41. Clark CM, Pontecorvo MJ, Beach TG, Bedell BJ, Coleman RE, Doraiswamy PM, et al. Cerebral PET with florbetapir compared with neuropathology at autopsy for detection of neuritic amyloid- $\beta$  plaques: a prospective cohort study. *Lancet Neurol*. août 2012;11(8):669-78.
42. Villemagne VL, Doré V, Bourgeat P, Burnham SC, Laws S, Salvado O, et al. A $\beta$ -amyloid and Tau Imaging in Dementia. *Semin Nucl Med*. janv 2017;47(1):75-88.
43. Chételat G, La Joie R, Villain N, Perrotin A, de La Sayette V, Eustache F, et al. Amyloid imaging in cognitively normal individuals, at-risk populations and preclinical Alzheimer's disease. *Neuroimage Clin*. 2013;2:356-65.
44. Consensus report of the Working Group on: « Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease ». The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group. *Neurobiol Aging*. avr 1998;19(2):109-16.
45. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Hampel H, Molinuevo JL, Blennow K, et al. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol*. juin 2014;13(6):614-29.
46. Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TLS, Fagan AM, Goate A, Fox NC, et al. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 30 août 2012;367(9):795-804.
47. Blennow K, Hampel H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*. 1 oct 2003;2(10):605-13.
48. Gauthier S. *Clinical Diagnosis and Management of Alzheimer's Disease*. CRC Press; 2006. 410 p.
49. Engelborghs S, De Vreese K, Van de Castele T, Vanderstichele H, Van Everbroeck B, Cras P, et al. Diagnostic performance of a CSF-biomarker panel in autopsy-confirmed dementia. *Neurobiol Aging*. août 2008;29(8):1143-59.
50. Palmqvist S, Mattsson N, Hansson O, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Cerebrospinal fluid analysis detects cerebral amyloid- $\beta$  accumulation earlier than positron emission tomography. *Brain*. avr 2016;139(Pt 4):1226-36.

51. Jack Jr. CR, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*. 1 avr 2018;14(4):535-62.
52. Herukka S-K, Simonsen AH, Andreasen N, Baldeiras I, Bjerke M, Blennow K, et al. Recommendations for cerebrospinal fluid Alzheimer's disease biomarkers in the diagnostic evaluation of mild cognitive impairment. *Alzheimers Dement*. mars 2017;13(3):285-95.
53. Simonsen AH, Herukka S-K, Andreasen N, Baldeiras I, Bjerke M, Blennow K, et al. Recommendations for CSF AD biomarkers in the diagnostic evaluation of dementia. *Alzheimers Dement*. mars 2017;13(3):274-84.
54. Mouton-Liger F, Wallon D, Troussière A-C, Yatimi R, Dumurgier J, Magnin E, et al. Impact of cerebro-spinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease in clinical practice: a multicentric study. *J Neurol*. janv 2014;261(1):144-51.
55. Magnin E, Dumurgier J, Bouaziz-Amar E, Bombois S, Wallon D, Gabelle A, et al. Les biomarqueurs du liquide cérébro-spinal dans la maladie d'Alzheimer : un outil de recherche utile dans la pratique clinique courante des consultations mémoire pour les cas complexes. *La Revue de Médecine Interne*. 1 avr 2017;38(4):250-5.
56. Hesse C, Rosengren L, Andreasen N, Davidsson P, Vanderstichele H, Vanmechelen E, et al. Transient increase in total tau but not phospho-tau in human cerebrospinal fluid after acute stroke. *Neurosci Lett*. 19 janv 2001;297(3):187-90.
57. Glodzik-Sobanska L, Pirraglia E, Brys M, de Santi S, Mosconi L, Rich KE, et al. The effects of normal aging and ApoE genotype on the levels of CSF biomarkers for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. mai 2009;30(5):672-81.
58. Sjögren M, Vanderstichele H, Agren H, Zachrisson O, Edsbacke M, Wikkelso C, et al. Tau and Abeta42 in cerebrospinal fluid from healthy adults 21-93 years of age: establishment of reference values. *Clin Chem*. oct 2001;47(10):1776-81.
59. Krut JJ, Zetterberg H, Blennow K, Cinque P, Hagberg L, Price RW, et al. Cerebrospinal fluid Alzheimer's biomarker profiles in CNS infections. *J Neurol*. févr 2013;260(2):620-6.
60. Holmberg B, Johnels B, Blennow K, Rosengren L. Cerebrospinal fluid Abeta42 is reduced in multiple system atrophy but normal in Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy. *Mov Disord*. févr 2003;18(2):186-90.
61. Tapiola T, Alafuzoff I, Herukka S-K, Parkkinen L, Hartikainen P, Soininen H, et al. Cerebrospinal fluid {beta}-amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain. *Arch Neurol*. mars 2009;66(3):382-9.
62. Blennow K, Dubois B, Fagan AM, Lewczuk P, de Leon MJ, Hampel H. Clinical utility of cerebrospinal fluid biomarkers in the diagnosis of early Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. janv 2015;11(1):58-69.

63. Alcolea D, Pegueroles J, Muñoz L, Camacho V, López-Mora D, Fernández-León A, et al. Agreement of amyloid PET and CSF biomarkers for Alzheimer's disease on Lumipulse. *Annals of Clinical and Translational Neurology*. 2019;6(9):1815-24.
64. Buerger K, Ewers M, Pirttilä T, Zinkowski R, Alafuzoff I, Teipel SJ, et al. CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain*. nov 2006;129(Pt 11):3035-41.
65. Chhatwal JP, Schultz AP, Marshall GA, Boot B, Gomez-Isla T, Dumurgier J, et al. Temporal T807 binding correlates with CSF tau and phospho-tau in normal elderly. *Neurology*. 30 août 2016;87(9):920-6.
66. Brier MR, Gordon B, Friedrichsen K, McCarthy J, Stern A, Christensen J, et al. Tau and A $\beta$  imaging, CSF measures, and cognition in Alzheimer's disease. *Sci Transl Med*. 11 2016;8(338):338ra66.
67. Lehmann S, Gabelle A, Paquet C. Can we rely only on ratios of cerebrospinal fluid biomarkers for AD biological diagnosis? *Alzheimer's and Dementia*. 2014;11(9):1-2.
68. Pouclet-Courtemanche H, Nguyen T-B, Skrobala E, Boutoleau-Bretonnière C, Pasquier F, Bouaziz-Amar E, et al. Frontotemporal dementia is the leading cause of « true » A-/T+ profiles defined with A $\beta$ 42/40 ratio. *Alzheimers Dement (Amst)*. déc 2019;11:161-9.
69. Baldeiras I, Santana I, Leitão MJ, Ribeiro MH, Pascoal R, Duro D, et al. Cerebrospinal fluid A $\beta$ 40 is similarly reduced in patients with Frontotemporal Lobar Degeneration and Alzheimer's Disease. *J Neurol Sci*. 15 nov 2015;358(1-2):308-16.
70. Slaets S, Le Bastard N, Martin J-J, Slegers K, Van Broeckhoven C, De Deyn PP, et al. Cerebrospinal fluid A $\beta$ 1-40 improves differential dementia diagnosis in patients with intermediate P-tau181P levels. *J Alzheimers Dis*. 2013;36(4):759-67.
71. Jack CR, Holtzman DM. Biomarker Modeling of Alzheimer's Disease. *Neuron*. 18 déc 2013;80(6):1347-58.
72. Vanderstichele H, Bibl M, Engelborghs S, Le Bastard N, Lewczuk P, Molinuevo JL, et al. Standardization of preanalytical aspects of cerebrospinal fluid biomarker testing for Alzheimer's disease diagnosis: a consensus paper from the Alzheimer's Biomarkers Standardization Initiative. *Alzheimers Dement*. janv 2012;8(1):65-73.
73. Fourier A, Portelius E, Zetterberg H, Blennow K, Quadrio I, Perret-Liaudet A. Pre-analytical and analytical factors influencing Alzheimer's disease cerebrospinal fluid biomarker variability. *Clin Chim Acta*. 20 sept 2015;449:9-15.
74. Bateman RJ, Wen G, Morris JC, Holtzman DM. Fluctuations of CSF amyloid-beta levels: implications for a diagnostic and therapeutic biomarker. *Neurology*. 27 févr 2007;68(9):666-9.
75. Lucey BP, Gonzales C, Das U, Li J, Siemers ER, Slemmon JR, et al. An integrated multi-study analysis of intra-subject variability in cerebrospinal fluid amyloid- $\beta$



concentrations collected by lumbar puncture and indwelling lumbar catheter. *Alzheimers Res Ther.* 2015;7(1):53.

76. Cicognola C, Chiasserini D, Eusebi P, Andreasson U, Vanderstichele H, Zetterberg H, et al. No diurnal variation of classical and candidate biomarkers of Alzheimer's disease in CSF. *Mol Neurodegener.* 07 2016;11(1):65.

77. Slats D, Claassen JAHR, Spies PE, Borm G, Besse KTC, van Aalst W, et al. Hourly variability of cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease subjects and healthy older volunteers. *Neurobiol Aging.* avr 2012;33(4):831.e1-9.

78. Moghekar A, Goh J, Li M, Albert M, O'Brien RJ. Cerebrospinal fluid A $\beta$  and tau level fluctuation in an older clinical cohort. *Arch Neurol.* févr 2012;69(2):246-50.

79. Hansson O, Mikulskis A, Fagan AM, Teunissen C, Zetterberg H, Vanderstichele H, et al. The impact of preanalytical variables on measuring cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease diagnosis: A review. *Alzheimers Dement.* 2018;14(10):1313-33.

80. Lehmann S, Schraen S, Quadrio I, Paquet C, Bombois S, Delaby C, et al. Impact of harmonization of collection tubes on Alzheimer's disease diagnosis. *Alzheimers Dement.* oct 2014;10(5 Suppl):S390-S394.e2.

81. Leitão MJ, Baldeiras I, Herukka S-K, Pikkarainen M, Leinonen V, Simonsen AH, et al. Chasing the Effects of Pre-Analytical Confounders - A Multicenter Study on CSF-AD Biomarkers. *Front Neurol.* 2015;6:153.

82. Perret-Liaudet A, Pelpel M, Tholance Y, Dumont B, Vanderstichele H, Zorzi W, et al. Risk of Alzheimer's disease biological misdiagnosis linked to cerebrospinal collection tubes. *J Alzheimers Dis.* 2012;31(1):13-20.

83. Bjerke M, Portelius E, Minthon L, Wallin A, Anckarsäter H, Anckarsäter R, et al. Confounding Factors Influencing Amyloid Beta Concentration in Cerebrospinal Fluid. *Int J Alzheimers Dis.* 15 juill 2010;2010.

84. Le Bastard N, De Deyn PP, Engelborghs S. Importance and impact of preanalytical variables on Alzheimer disease biomarker concentrations in cerebrospinal fluid. *Clin Chem.* mai 2015;61(5):734-43.

85. Paterson RW, Toombs J, Chapman MD, Nicholas JM, Heslegrave AJ, Slattery CF, et al. Do cerebrospinal fluid transfer methods affect measured amyloid  $\beta$ 42, total tau, and phosphorylated tau in clinical practice? *Alzheimers Dement (Amst).* 2 juill 2015;1(3):380-4.

86. Zimmermann R, Lelental N, Ganslandt O, Maler JM, Kornhuber J, Lewczuk P. Preanalytical sample handling and sample stability testing for the neurochemical dementia diagnostics. *J Alzheimers Dis.* 2011;25(4):739-45.

87. Schoonenboom NSM, Mulder C, Vanderstichele H, Elk E-JV, Kok A, Kamp GJV, et al. Effects of Processing and Storage Conditions on Amyloid  $\beta$  (1-42) and Tau

Concentrations in Cerebrospinal Fluid: Implications for Use in Clinical Practice. *Clinical Chemistry*. 1 janv 2005;51(1):189-95.

88. del Campo M, Mollenhauer B, Bertolotto A, Engelborghs S, Hampel H, Simonsen AH, et al. Recommendations to standardize preanalytical confounding factors in Alzheimer's and Parkinson's disease cerebrospinal fluid biomarkers: an update. *Biomark Med*. août 2012;6(4):419-30.

89. Teunissen CE, Petzold A, Bennett JL, Berven FS, Brundin L, Comabella M, et al. A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking. *Neurology*. 1 déc 2009;73(22):1914-22.

90. Willemse EAJ, van Uffelen KWJ, van der Flier WM, Teunissen CE. Effect of long-term storage in biobanks on cerebrospinal fluid biomarker A $\beta$ 1-42, T-tau, and P-tau values. *Alzheimers Dement (Amst)*. 2017;8:45-50.

91. Fujirebio. Fiche technique INNOTEST®  $\beta$ -AMYLOID(1-42), B31150 V5. 2018 sept.

92. fujirebio. Fiche technique INNOTEST® PHOSPHO-TAU(181P), B31135 V5. 2018 sept.

93. Fujirebio. Fiche technique INNOTEST® hTAU Ag, B31105 V3. 2016 avr.

94. Fujirebio. Fiche technique INNOTEST®  $\beta$ -AMYLOID(1-40), 25638 V1. 2015 nov.

95. Vanderstichele H, Van Kerschaver E, Hesse C, Davidsson P, Buyse MA, Andreasen N, et al. Standardization of measurement of beta-amyloid(1-42) in cerebrospinal fluid and plasma. *Amyloid*. déc 2000;7(4):245-58.

96. Goedert M, Jakes R, Crowther RA, Cohen P, Vanmechelen E, Vandermeeren M, et al. Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease: identification of phosphorylation sites in tau protein. *Biochem J*. 1 août 1994;301(Pt 3):871-7.

97. Vanmechelen E, Vanderstichele H, Davidsson P, Van Kerschaver E, Van Der Perre B, Sjögren M, et al. Quantification of tau phosphorylated at threonine 181 in human cerebrospinal fluid: a sandwich ELISA with a synthetic phosphopeptide for standardization. *Neurosci Lett*. 5 mai 2000;285(1):49-52.

98. Hampel H, Buerger K, Zinkowski R, Teipel SJ, Goernitz A, Andreasen N, et al. Measurement of phosphorylated tau epitopes in the differential diagnosis of Alzheimer disease: a comparative cerebrospinal fluid study. *Arch Gen Psychiatry*. janv 2004;61(1):95-102.

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

100. Mercken M, Vandermeeren M, Lübke U, Six J, Boons J, Vanmechelen E, et al. Affinity Purification of Human  $\tau$  Proteins and the Construction of a Sensitive Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Human  $\tau$  Detection. *Journal of Neurochemistry*. 1992;58(2):548-53.
101. Fujirebio. Fiche technique Lumipulse® PTau 181, 25D02TF - B32620v1. 2019 avr.
102. Fujirebio. Fiche technique Lumipulse®  $\beta$ -amyloid 1-40, 24Y02TF - B32584v1. 2019 mars.
103. Fujirebio. Fiche technique Lumipulse® Total Tau, 26B03TF - B31742v2. 2019 juin.
104. Fujirebio. Fiche technique Lumipulse®  $\beta$ -amyloid 1-42, 27Z05TF - B31618v5. 2019 juill.
105. Kuhlmann J, Boulo S, Andreasson U, Bjerke M, Pannee J, Charoud-Got J, et al. CERTIFICATION REPORT: The certification of Amyloid  $\beta$ 1-42 in CSF in ERM®-DA480/IFCC, ERM®-DA481/IFCC and ERM®-DA482/IFCC [Internet]. EU Science Hub - European Commission. 2017. Disponible sur: <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/certification-report-certification-amyloid-1-42-csf-erm-da480ifcc-erm-da481ifcc-and-erm>
106. Fujirebio. Re standardisation du Lumipulse G  $\beta$ -Amyloid 1-42. Belgique; 2018 déc. Report No.: réf 00003.
107. Hulstaert F, Blennow K, Ivanoiu A, Schoonderwaldt HC, Riemenschneider M, De Deyn PP, et al. Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid(1-42) and tau levels in CSF. *Neurology*. 12 mai 1999;52(8):1555-62.
108. Tapiola T, Alafuzoff I, Herukka S-K, Parkkinen L, Hartikainen P, Soininen H, et al. Cerebrospinal fluid {beta}-amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain. *Arch Neurol*. mars 2009;66(3):382-9.
109. Lehmann S, Dumurgier J, Schraen S, Wallon D, Blanc F, Magnin E, et al. A diagnostic scale for Alzheimer's disease based on cerebrospinal fluid biomarker profiles. *Alzheimers Res Ther*. 26 juin 2014;6(3):38.
110. Spies PE, Claassen JAHR, Peer PGM, Blankenstein MA, Teunissen CE, Scheltens P, et al. A prediction model to calculate probability of Alzheimer's disease using cerebrospinal fluid biomarkers. *Alzheimers Dement*. mai 2013;9(3):262-8.
111. Lehmann S, Delaby C, Boursier G, Catteau C, Ginestet N, Tiers L, et al. Relevance of A $\beta$ 42/40 Ratio for Detection of Alzheimer Disease Pathology in Clinical Routine: The PLMR Scale. *Front Aging Neurosci*. 28 mai 2018;10.
112. Skillbäck T, Rosén C, Asztely F, Mattsson N, Blennow K, Zetterberg H. Diagnostic performance of cerebrospinal fluid total tau and phosphorylated tau in Creutzfeldt-Jakob disease: results from the Swedish Mortality Registry. *JAMA Neurol*. avr 2014;71(4):476-83.

113. Vos SJB, Verhey F, Frölich L, Kornhuber J, Wiltfang J, Maier W, et al. Prevalence and prognosis of Alzheimer's disease at the mild cognitive impairment stage. *Brain*. 1 mai 2015;138(5):1327-38.
114. Olsson B, Lautner R, Andreasson U, Öhrfelt A, Portelius E, Bjerke M, et al. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. juin 2016;15(7):673-84.
115. Hugon J, Dumurgier J, Cognat E. Cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease. *Bulletin académie nationale de médecine*. 2018;202(1-2):14.
116. Wellington H, Paterson RW, Portelius E, Törnqvist U, Magdalinou N, Fox NC, et al. Increased CSF neurogranin concentration is specific to Alzheimer disease. *Neurology*. 1 mars 2016;86(9):829.
117. Quanterix Corp. Scientific Principle of Simoa™ (Single Molecule Array) Technology [Internet]. 2013. Disponible sur: [http://www.healthtech.com/uploadedFiles/Conferences/White\\_Papers/MXA/Scientific-Principles-of-Simo-Technology.pdf](http://www.healthtech.com/uploadedFiles/Conferences/White_Papers/MXA/Scientific-Principles-of-Simo-Technology.pdf)
118. Janelidze S, Stomrud E, Palmqvist S, Zetterberg H, van Westen D, Jeromin A, et al. Plasma  $\beta$ -amyloid in Alzheimer's disease and vascular disease. *Sci Rep*. 31 2016;6:26801.
119. Nakamura A, Kaneko N, Villemagne VL, Kato T, Doecke J, Doré V, et al. High performance plasma amyloid- $\beta$  biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature*. févr 2018;554(7691):249-54.
120. Ovod V, Ramsey KN, Mawuenyega KG, Bollinger JG, Hicks T, Schneider T, et al. Amyloid  $\beta$  concentrations and stable isotope labeling kinetics of human plasma specific to central nervous system amyloidosis. *Alzheimers Dement*. août 2017;13(8):841-9.
121. Mattsson N, Zetterberg H, Janelidze S, Insel PS, Andreasson U, Stomrud E, et al. Plasma tau in Alzheimer disease. *Neurology*. 25 oct 2016;87(17):1827-35.
122. Mattsson N, Cullen NC, Andreasson U, Zetterberg H, Blennow K. Association Between Longitudinal Plasma Neurofilament Light and Neurodegeneration in Patients With Alzheimer Disease. *JAMA Neurol*. 1 juill 2019;76(7):791-9.
123. Sjögren M, Vanderstichele H, Agren H, Zachrisson O, Edsbacke M, Wikkelsø C, et al. Tau and Abeta42 in cerebrospinal fluid from healthy adults 21-93 years of age: establishment of reference values. *Clin Chem*. oct 2001;47(10):1776-81.
124. Fujirebio Europe. Expected values for Alzheimer biomarkers in healthy controls. Belgium; 2018 1010.
125. Fujirebio Europe. Diagnostic sensitivity and specificity of Lumipulse Alzheimer biomarkers using clinical diagnosis and follow-up as golden standard. Belgium; 2018 déc.

126. Comité français d'accréditation. SH-GTA-04 [Internet]. 2011 déc. Disponible sur: <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>
127. Efron B. Better Bootstrap Confidence Intervals. *Journal of the American Statistical Association*. 1987;82(397):171-85.
128. Leitão MJ, Silva-Spínola A, Santana I, Olmedo V, Nadal A, Le Bastard N, et al. Clinical validation of the Lumipulse G cerebrospinal fluid assays for routine diagnosis of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*. 23 nov 2019;11(1):91.
129. Zecca C, Brescia V, Piccininni M, Capozzo R, Barone R, Barulli MR, et al. Comparative evaluation of two immunoassays for cerebrospinal fluid  $\beta$ -Amyloid1-42 measurement. *Clinica Chimica Acta*. 1 juin 2019;493:107-11.
130. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 8 févr 1986;1(8476):307-10.
131. Delacour H, Servonnet A, Perrot A, Vigezzi JF, Ramirez JM. La courbe ROC (receiver operating characteristic) : principes et principales applications en biologie clinique. *Ann Biol Clin*. 2005;63:10.
132. Bayart J-L, Hanseeuw B, Ivanoiu A, van Pesch V. Analytical and clinical performances of the automated Lumipulse cerebrospinal fluid A $\beta$ 42 and T-Tau assays for Alzheimer's disease diagnosis. *J Neurol*. 1 sept 2019;266(9):2304-11.
133. Vaudran L. Dosage des biomarqueurs Tau et A $\beta$  dans le liquide cérebrospinal sur l'automate Lumipulse® G600II : comparaison de méthodes, validation analytique et détermination de valeurs seuils en faveur du diagnostic de maladie d'Alzheimer. Lille; 2019.
134. Rosén C, Farahmand B, Skillbäck T, Nägga K, Mattsson N, Kilander L, et al. Benchmarking biomarker-based criteria for Alzheimer's disease: Data from the Swedish Dementia Registry, SveDem. *Alzheimer's & Dementia*. 1 déc 2015;11(12):1470-9.
135. Paciotti S, Sepe FN, Eusebi P, Farotti L, Cataldi S, Gatticchi L, et al. Diagnostic performance of a fully automated chemiluminescent enzyme immunoassay for Alzheimer's disease diagnosis. *Clin Chim Acta*. juill 2019;494:74-8.
136. Dekeyser F, Van Hecke P, Geyter KD, Vandepoosele P, Dekeersmaeker N, Moonen R, et al. Analytical performance of a fully automated chemiluminescent pTau 181 assay on the Lumipulse® G Series. Belgium: Fujirebio Europe; 2018 juill. Report No.: 146.
137. Dauwe M, Dekeyser F, Dumont T, Moonen R, Huyck E, Vandijck M, et al. Lumipulse® G  $\beta$ -amyloid 1-42: key performances of a fully automated chemiluminescent immunoassay. Fujirebio Europe; 2016 nov. Report No.: 099.
138. Dumurgier J, Schraen S, Gabelle A, Vercauysse O, Bombois S, Laplanche J-L, et al. Cerebrospinal fluid amyloid- $\beta$  42/40 ratio in clinical setting of memory centers: a multicentric study. *Alzheimer's Research & Therapy*. 1 juin 2015;7(1):30.

139. Lewczuk P, Esselmann H, Otto M, Maler JM, Henkel AW, Henkel MK, et al. Neurochemical diagnosis of Alzheimer's dementia by CSF Abeta42, Abeta42/Abeta40 ratio and total tau. *Neurobiol Aging*. mars 2004;25(3):273-81.
140. Sauvée M, DidierLaurent G, Latache C, Escanyé M-C, Olivier J-L, Malaplate-Armand C. Additional use of A $\beta$ <sub>42</sub>/A $\beta$ <sub>40</sub> ratio with cerebrospinal fluid biomarkers P-tau and A $\beta$ <sub>42</sub> increases the level of evidence of Alzheimer's disease pathophysiological process in routine practice. *J Alzheimers Dis*. 2014;41(2):377-86.
141. Vanderstichele HMJ, Janelidze S, Demeyer L, Coart E, Stoops E, Herbst V, et al. Optimized Standard Operating Procedures for the Analysis of Cerebrospinal Fluid A $\beta$ <sub>42</sub> and the Ratios of A $\beta$  Isoforms Using Low Protein Binding Tubes. *J Alzheimers Dis*. 31 2016;53(3):1121-32.
142. Wiltfang J, Esselmann H, Bibl M, Hüll M, Hampel H, Kessler H, et al. Amyloid beta peptide ratio 42/40 but not A beta 42 correlates with phospho-Tau in patients with low- and high-CSF A beta 40 load. *J Neurochem*. mai 2007;101(4):1053-9.
143. Lewczuk P, Lelental N, Spitzer P, Maler JM, Kornhuber J. Amyloid- $\beta$  42/40 cerebrospinal fluid concentration ratio in the diagnostics of Alzheimer's disease: validation of two novel assays. *J Alzheimers Dis*. 2015;43(1):183-91.
144. Lehmann S, Delaby C, Boursier G, Catteau C, Ginestet N, Tiers L, et al. Relevance of A $\beta$ <sub>42</sub>/40 Ratio for Detection of Alzheimer Disease Pathology in Clinical Routine: The PLMR Scale. *Front Aging Neurosci*. 2018;10:138.
145. Gabelle A, Roche S, Génys C, Bennys K, Labauge P, Tholance Y, et al. Decreased sA $\beta$ PP $\beta$ , A $\beta$ <sub>38</sub>, and A $\beta$ <sub>40</sub> cerebrospinal fluid levels in frontotemporal dementia. *J Alzheimers Dis*. 2011;26(3):553-63.
146. Janelidze S, Pannee J, Mikulskis A, Chiao P, Zetterberg H, Blennow K, et al. Concordance Between Different Amyloid Immunoassays and Visual Amyloid Positron Emission Tomographic Assessment. *JAMA Neurol*. 01 2017;74(12):1492-501.
147. Nutu M, Zetterberg H, Londos E, Minthon L, Nägga K, Blennow K, et al. Evaluation of the cerebrospinal fluid amyloid- $\beta$ <sub>1-42</sub>/amyloid- $\beta$ <sub>1-40</sub> ratio measured by alpha-LISA to distinguish Alzheimer's disease from other dementia disorders. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2013;36(1-2):99-110.
148. Struyfs H, Van Broeck B, Timmers M, Fransen E, Slegers K, Van Broeckhoven C, et al. Diagnostic Accuracy of Cerebrospinal Fluid Amyloid- $\beta$  Isoforms for Early and Differential Dementia Diagnosis. *J Alzheimers Dis*. 2015;45(3):813-22.
149. Spies PE, Slats D, Sjögren JMC, Kremer BPH, Verhey FRJ, Rikkert MGMO, et al. The cerebrospinal fluid amyloid beta42/40 ratio in the differentiation of Alzheimer's disease from non-Alzheimer's dementia. *Curr Alzheimer Res*. août 2010;7(5):470-6.

150. Janelidze S, Zetterberg H, Mattsson N, Palmqvist S, Vanderstichele H, Lindberg O, et al. CSF A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42/A $\beta$ 38 ratios: better diagnostic markers of Alzheimer disease. *Ann Clin Transl Neurol.* 2016;3(3):154-65.
151. Bousiges O, Cretin B, Lavaux T, Philippi N, Jung B, Hezard S, et al. Diagnostic Value of Cerebrospinal Fluid Biomarkers (Phospho-Tau181, total-Tau, A $\beta$ 42, and A $\beta$ 40) in Prodromal Stage of Alzheimer's Disease and Dementia with Lewy Bodies. *J Alzheimers Dis.* 2016;51(4):1069-83.
152. Lewczuk P, Kornhuber J, Toledo JB, Trojanowski JQ, Knapik-Czajka M, Peters O, et al. Validation of the Erlangen Score Algorithm for the Prediction of the Development of Dementia due to Alzheimer's Disease in Pre-Dementia Subjects. *J Alzheimers Dis.* 2015;48(2):433-41.

## VII. Annexes

### Annexe 1 : Critères diagnostiques de la démence de type Alzheimer, DSM IV-TR

- A. Apparition de déficits cognitifs multiples, comme en témoignent à la fois :
1. une altération de la mémoire (altération de la capacité à apprendre des informations nouvelles ou à se rappeler les informations apprises antérieurement) ;
  2. une (ou plusieurs) des perturbations cognitives suivantes :
    - a. aphasie (perturbation du langage)
    - b. apraxie (altération de la capacité à réaliser une activité motrice malgré des fonctions motrices intactes)
    - c. agnosie (impossibilité de reconnaître ou d'identifier des objets malgré des fonctions sensorielles intactes)
    - d. perturbation des fonctions exécutives (faire des projets, organiser, ordonner dans le temps, avoir une pensée abstraite).
- B. Les déficits cognitifs des critères A1 et A2 sont tous les deux à l'origine d'une altération significative du fonctionnement social ou professionnel et représentent un déclin significatif par rapport au niveau de fonctionnement antérieur.
- C. L'évolution est caractérisée par un début progressif et un déclin cognitif continu.
- D. Les déficits cognitifs des critères A1 et A2 ne sont pas dus :
1. à d'autres affections du système nerveux central qui peuvent entraîner des déficits progressifs de la mémoire et du fonctionnement cognitif (par exemple : maladie cérébrovasculaire, maladie de Parkinson, maladie de Huntington, hématome sous-dural, hydrocéphalie à pression normale, tumeur cérébrale) ;
  2. à des affections générales pouvant entraîner une démence (par exemple : hypothyroïdie, carence en vitamine B12 ou en folates, pellagre, hypercalcémie, neurosyphilis, infection par le VIH) ;
  3. à des affections induites par une substance.
- E. Les déficits ne surviennent pas de façon exclusive au cours de l'évolution d'un syndrome confusionnel.
- F. La perturbation n'est pas mieux expliquée par un trouble de l'Axe I (par exemple : trouble dépressif majeur, schizophrénie).

Codification fondée sur la présence ou l'absence d'une perturbation cliniquement significative du comportement :

**Sans perturbation du comportement** : si les troubles cognitifs ne s'accompagnent d'aucune perturbation cliniquement significative du comportement.

**Avec perturbation du comportement** : si les troubles cognitifs s'accompagnent d'une perturbation cliniquement significative (par exemple : errance, agitation) du comportement.

Préciser le sous-type :

**À début précoce** : si le début se situe à 65 ans ou avant.

**À début tardif** : si le début se situe après 65 ans.



## Annexe 2 : Critères diagnostiques de la maladie d'Alzheimer remis en forme d'après NINCDS-ADRDA

### 1) Le diagnostic clinique de la maladie d'Alzheimer possible :

- peut être porté sur la base du syndrome démentiel, en l'absence d'autre désordre neurologique, psychiatrique ou systémique susceptible de causer une démence, en présence de variante dans la survenue, la présentation ou le cours de la maladie ;
- peut être porté en présence d'une seconde maladie systémique ou cérébrale susceptible de produire un syndrome démentiel mais qui n'est pas considérée comme la cause de cette démence ;
- et pourrait être utilisé en recherche clinique quand un déficit cognitif sévère progressif est identifié en l'absence d'autre cause identifiable.

### 2) Critères de maladie d'Alzheimer probable :

- syndrome démentiel établi sur des bases cliniques et documenté par le *Mini-Mental State Examination*, le *Blessed Dementia Scale* ou tout autre test équivalent et confirmé par des preuves neuropsychologiques
- déficit d'au moins deux fonctions cognitives
- altérations progressives de la mémoire et des autres fonctions cognitives
- absence de trouble de conscience
- survenue entre 40 et 90 ans, le plus souvent au-delà de 65 ans
- en l'absence de désordres systémiques ou d'une autre maladie cérébrale pouvant rendre compte par eux-mêmes, des déficits mnésiques et cognitifs progressifs

Ce diagnostic de maladie d'Alzheimer probable est renforcé par :

- la détérioration progressive des fonctions telles que le langage (aphasie), les habilités motrices (apraxie) et perceptives (agnosie)
- la perturbation des activités de la vie quotidienne et la présence de troubles du comportement
- une histoire familiale de troubles similaires surtout si confirmés histologiquement
- le résultat aux examens standards suivants :
- normalité du liquide céphalo-rachidien
- EEG normal ou siège de perturbations non spécifiques comme la présence d'ondes lentes
- présence d'atrophie cérébrale d'aggravation progressive

Autres caractéristiques cliniques compatibles avec le diagnostic de maladie d'Alzheimer probable après exclusion d'autres causes :

- période de plateaux au cours de l'évolution
- présence de symptômes tels que dépression, insomnie, incontinence, idées délirantes, illusions, hallucinations, réactions de catastrophe, désordres sexuels et perte de poids. Des anomalies neurologiques sont possibles surtout aux stades évolués de la maladie, notamment des signes moteurs tels qu'une hypertonie, des myoclonies ou des troubles de la marche.
- crises comitiales aux stades tardifs
- scanner cérébral normal pour l'âge

### 3) Les critères pour le diagnostic de maladie d'Alzheimer certaine sont :

- les critères cliniques de la maladie d'Alzheimer probable ;
- et la preuve histologique apportée par la biopsie ou l'autopsie.

### 4) Signes rendant le diagnostic de maladie d'Alzheimer probable incertain ou improbable :

- début brutal
- déficit neurologique focal tel que hémiparésie, hypoesthésie, déficit du champ visuel, incoordination motrice à un stade précoce
- crises convulsives ou troubles de la marche en tout début de maladie

Annexe 3 : Exemple de tests neuropsychologiques effectués au CHU de Rouen

|                             |                                  | MAX |  |
|-----------------------------|----------------------------------|-----|--|
| <b>ECHELLES GLOBALES</b>    | <b>MMS</b>                       | 30  |  |
|                             | <b>MATTIS</b>                    | 144 |  |
|                             | Attention                        | 37  |  |
|                             | Initiation Verbale               | 30  |  |
|                             | Motrice                          | 7   |  |
|                             | Construction                     | 6   |  |
|                             | Concept                          | 39  |  |
|                             | Mémoire                          | 25  |  |
|                             | <b>HORLOGE</b>                   | 7   |  |
| <b>PRAXIES</b>              | <b>PRAXIES GESTUELLES</b>        | 8   |  |
|                             | <b>COPIE DE LA FIGURE DE REY</b> | 36  |  |
| <b>MEMOIRE</b>              | <b>GROBER ET BUSCHKE</b>         |     |  |
|                             | R. Immédiat                      | 16  |  |
|                             | R. Libre 1                       | 16  |  |
|                             | R. Total 1                       | 16  |  |
|                             | R. Libre 2                       | 16  |  |
|                             | R. Total 2                       | 16  |  |
|                             | R. Libre 3                       | 16  |  |
|                             | R. Total 3                       | 16  |  |
|                             | R. Libre différé                 | 16  |  |
|                             | R. Total différé                 | 16  |  |
|                             | <b>PORTES</b>                    |     |  |
|                             | Forme A                          | 12  |  |
|                             | Forme B                          | 12  |  |
| <b>FONCTIONS EXECUTIVES</b> | <b>BREF</b>                      | 18  |  |
|                             | <b>FLUENCES (2 mn)</b>           |     |  |
|                             | « p »                            |     |  |
|                             | « animaux »                      |     |  |
| <b>LANGAGE</b>              | <b>DENOMINATION</b>              | 80  |  |
| <b>RETENTISSEMENT</b>       | <b>IADL</b>                      | 4   |  |
| <b>DEPRESSION</b>           | <b>MINI GDS</b>                  | 4   |  |

## Annexe 4 : Critères diagnostiques de la maladie d'Alzheimer par l'International Working Group (IWG) 2007

### **Proposition de nouveaux critères diagnostiques de la maladie d'Alzheimer probable (d'après Dubois et coll., 2007)**

---

Maladie d'Alzheimer probable  
(Critère A + l'un ou plusieurs des critères secondaires B, C, D ou E)

---

#### **Critère majeur**

A. Un trouble de mémoire épisodique initial, constitué par :  
Des troubles de mémoire fonctionnels progressifs rapportés par le patient ou l'entourage depuis au moins six mois  
La mise en évidence d'un trouble de mémoire épisodique significatif dans les tests avec un déficit de rappel non significativement amélioré ou non normalisé en situation d'indication ou de reconnaissance, alors que l'encodage initial de l'information a été contrôlé  
Les troubles de la mémoire épisodique peuvent être isolés ou associés à d'autres troubles cognitifs

#### **Critères secondaires**

B. Une atrophie des structures temporales internes :  
Atrophie hippocampique, entorhinal ou amygdalienne  
Mise en évidence en IRM par échelle visuelle qualitative ou par volumétrie quantitative, en référence à des sujets contrôles de même âge  
C. Une modification du taux de biomarqueurs dans le LCR :  
Diminution des taux d'A $\beta$  1-42 et/ou augmentation de la concentration totale de protéine Tau ou de phospho-Tau  
Modification de tout autre marqueur validé dans le futur  
D. Un profil spécifique à la TEMP ou à la TEP :  
Diminution du métabolisme du glucose dans les régions temporo-pariétales bilatérales  
Toute autre anomalie de distribution de ligand validé dans l'avenir  
E. Une mutation autosomale dominante dans la famille directe

#### **Critères d'exclusion**

Ils peuvent être liés :  
Au mode d'installation :  
- Début brutal  
- Survenue précoce de troubles de la marche, de crises comitiales, de troubles comportementaux  
À la présentation clinique :  
- Déficit neurologique focal : hémiparésie, troubles sensoriels, déficit du champ visuel  
- Signes extrapyramidaux précoces  
À l'existence de conditions médicales pouvant rendre compte, à elles seules, des troubles de mémoire ou cognitifs :  
- Démences non Alzheimer  
- Dépression majeure  
- Pathologie cérébrovasculaire  
- Troubles métaboliques ou toxiques  
- Anomalies IRM en FLAIR ou en T2 dans la région temporale interne, évoquant une atteinte infectieuse ou vasculaire

#### **Critères pour la maladie d'Alzheimer définie**

La maladie d'Alzheimer est considérée comme définie si les deux critères suivants sont présents :

Le critère majeur A

L'existence d'une preuve histologique (biopsie corticale ou autopsie) ou génétique (mutation génique sur le chromosome 1, 14 ou 21) de maladie d'Alzheimer

## Annexe 5 : Critères diagnostiques de la maladie d'Alzheimer par l'International Working Group 2 (IWG 2) 2014 d'après (32)

Critère majeur A identique qu'en 2007 + critère B de mise en évidence de la pathologie in vivo

### Marqueurs pathophysiologiques

- ↓  $A\beta_{42}$  + ↑ T-tau ou P-tau dans le LCR
- ↑ de la rétention du traceur à la TEP amyloïde

### Marqueurs topographiques

- Atrophie de type MA à l'IRM cérébrale
- Hypométabolisme de type MA à la TEP-FDG

### Mutation autosomique dominante

- PSEN1, PSEN2 ou APP

|                               | <i>Cognition</i>              | <i>Biomarqueurs</i>  |
|-------------------------------|-------------------------------|--|
| <i>STADES PRÉCLINIQUES</i>    |                               |  |
| <i>IWG-2</i>                  |                               |  |
| Asymptomatique à risque de MA | Aucune atteinte               | Tout marqueur pathophysiologique                                   |
| MA présymptomatique           | Aucune atteinte               | Mutation autosomique dominante ou tout autre gène causal           |
| <i>STADES CLINIQUES</i>       |                               |  |
| <i>IWG-2</i>                  |                               |  |
| MA typique ou atypique        | Phénotype clinique spécifique | Tout marqueur pathophysiologique ou mutation autosomique dominante |

Dans cette révision des critères diagnostiques, les marqueurs topographiques sont maintenant réservés à l'évaluation de la progression de la maladie et ont été retranchés de l'algorithme diagnostique.

**Annexe 6 : Critères diagnostiques de MCI et de démence de la maladie d'Alzheimer intégrant les biomarqueurs selon le National Institute on Aging and the Alzheimer's Association (NIA AA) tirés de (32).**

Les critères cliniques cardinaux de MCI et de démence par MA probable et possible sont disponibles dans la publication de McKhann et al, 2011

| <b>Critères de mild cognitive impairment intégrant les biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer (MA).<br/>Mild cognitive impairment criteria incorporating biomarkers of Alzheimer's disease.</b> |  |   |  |
|---|--|---|--|
| Catégories diagnostiques  | Apport des biomarqueurs à la probabilité étiologique de MA | Biomarqueurs physiopathologiques : amyloïde A $\beta$ (PET au PIB ou LCR) | Biomarqueurs structurels (lésions neuronales) : tau, FDG, IRM structurelle |
| Critères cliniques cardinaux de MCI   | Non informatifs  | Conflictuels, non déterminants, non testés                                | Conflictuels, non déterminants, non testés                                 |
| MCI dû à la MA : probabilité intermédiaire  | Intermédiaire  | Non testés  | Non testés   |
| MCI dû à la MA : probabilité élevée   | Très élevé   | +   | +  |
| MCI non dû à la MA  | Très faible  | -   | -  |

D'après Albert et al., 2011.

| <b>Critères de démence par maladie d'Alzheimer (MA) utilisant les biomarqueurs.<br/>AD dementia criteria incorporating biomarkers.</b> |  |   |  |
|--|--|---|--|
| Catégories diagnostiques   | Apport à la probabilité diagnostique de MA           | Biomarqueur physiopathologique Amyloïde A $\beta$ (PET au PIB ou LCR) | Biomarqueur structurel (mort neuronale) (Tau dans le LCR, FDG-PET, IRM structurelle) |
| <i>Démence par MA probable</i>   |  |   |  |
| Basée sur les critères cliniques   | Inchangé   | Non contributif <sup>a</sup>  | Non contributif <sup>a</sup>   |
| Avec 3 niveaux de preuve du processus physiopathologique de MA   | Modéré   | Non contributif   | Positif  |
|  | Modéré   | Positif   | Non contributif  |
|  | Élevé  | Positif   | Positif  |
| <i>Démence par MA possible (présentation clinique atypique)</i>  |  |   |  |
| Basée sur les critères cliniques   | Inchangé   | Non contributif   | Non contributif  |
| Avec preuve du processus physiopathologique de MA  | Élevé mais n'exclut pas une autre étiologie associée | Positif   | Positif  |
| <i>Démence de type non Alzheimer</i>   |  |   |  |
|  | Très faible  | Négatif   | Négatif  |

D'après McKhann et al., 2011.

<sup>a</sup> Résultats discordants entre les biomarqueurs, ou résultats normaux, ou résultats indisponibles (examens non réalisés).

Annexe 7 : Avantages/inconvénients et différences notables entre les techniques INNOTEST® et LUMIPULSE®

|               | INNOTEST®   | LUMIPULSE®  |
|---------------|---|---|
| Avantages     | <p>Bibliographie abondante</p> <p>Recul sur les seuils de décision clinique au laboratoire (pratique &gt; 13 ans)</p> <p>Limite de quantification pour Tau totale plus basse</p> <p>Standards et contrôles prêts à l'emploi</p>   | <p>Rapidité du rendu des résultats</p> <p>Automatisation ; amélioration attendue des performances analytiques (CV répétabilité et reproductibilité)</p> <p>Diminution de la variabilité inter-opérateur, moindre dépendance d'une dextérité individuelle.</p> <p>Faible volume de prise d'essai</p> <p>Aβ42 standardisée vis-à-vis du CRM disponible pour LP</p> <p>Format plus flexible des séries de dosages</p> <p>Calibration 1 fois/mois ou lors d'un changement de lot de CIQ</p> |
| Inconvénients | <p>Absence de consensus définitif concernant les seuils de décision cliniques</p> <p>Volume de prise d'essai important du fait d'un dosage en duplicate</p> <p>Temps d'analyse long</p> <p>Travail par séries (plaques ELISA de 16 patients max), délais analytiques allongés l'été</p> <p>Calibration à chaque série</p> <p>Connaissance des résultats des CIQ en fin de manipulation, risque de disqualification des résultats d'une série entière de patients.</p> <p>Domaine de mesure plus limités</p> | <p>Absence de consensus concernant les seuils de décision cliniques</p> <p>Pas de recul sur les seuils de décision clinique</p> <p>Peu de publications</p> <p>Standards et contrôles à reconstituer</p>   |

- Différences notables :

Enzymes révélatrices différentes : ALP (LP) vs peroxydase (IT)

Méthode de détection différente : Détection colorimétrique (IT) et détection par luminescence (LP)

Biotine présente dans les 4 dosages IT contre 2 pour LP (diminution de l'interférence potentielle liée à la biotine pour les patients qui seraient traités avec de fortes doses de cette vitamine)

Annexe 8 : Récapitulatif des sensibilités (Se), spécificités (Sp), valeurs prédictives positives, valeurs prédictives négatives et indices de youden pour chaque paramètre.

La valeur prédictive positive (VPP) correspond à la proportion de vrais positifs parmi les sujets dont le test est positif. Il s'agit du rapport des vrais positifs sur la somme des vrais positifs et des faux positifs. La valeur prédictive négative (VPN) correspond à la proportion de vrais négatifs parmi les sujets dont le test est négatif. Il s'agit du rapport des vrais négatifs sur la somme des vrais négatifs et des faux négatifs.

|                                     | Se [IC95]                         | Sp [IC95]                         | VPP [IC95]                        | VPN [IC95]                        | Y    |
|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------|
| Tau > 466                           | 60,6 % (20/33)<br>[42,1% ; 77,1%] | 66,7 % (10/15)<br>[38,4% ; 88,2%] | 80 % (20/25)<br>[59,3% ; 93,2%]   | 43,5 % (10/23)<br>[23,2% ; 65,5%] | 0.27 |
| P-Tau > 55                          | 69,7 % (23/33)<br>[51,3% ; 84,4%] | 66,7 % (10/15)<br>[38,4% ; 88,2%] | 82,1 % (23/28)<br>[63,1% ; 93,9%] | 50 % (10/20)<br>[27,2% ; 72,8%]   | 0.36 |
| A $\beta$ 42 < 437                  | 60,6 % (20/33)<br>[42,1% ; 77,1%] | 86,7 % (13/15)<br>[59,5% ; 98,3%] | 90,9 % (20/22)<br>[70,8% ; 98,9%] | 50 % (13/26)<br>[29,9 % ;70,1 %]  | 0.47 |
| A $\beta$ 42 < 635                  | 81,8 % (27/33)<br>[64,5% ; 93%]   | 60 % (9/15)<br>[32,3% ; 83,7%]    | 81,8 % (27/33)<br>[64,5% ; 93%]   | 60 % (9/15)<br>[32,3% ; 83,7%]    | 0.42 |
| A $\beta$ 42/A $\beta$ 40<br><0,057 | 75,8 % (25/33)<br>[57,7% ; 88,9%] | 73,3 % (11/15)<br>[44,9% ; 92,2%] | 86,2 % (25/29)<br>[68,3% ; 96,1%] | 57,9 % (11/19)<br>[33,5% ; 79,7%] | 0.49 |
| A $\beta$ 42/P-Tau<br>< 9.3         | 78,8 % (26/33)<br>[61,1% ; 91%]   | 73,3 % (11/15)<br>[44,9% ; 92,2%] | 86,7 % (26/30)<br>[69,3% ; 96,2%] | 61,1 % (11/18)<br>[35,7% ; 82,7%] | 0.52 |

## SERMENT DE GALIEN

Je jure d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer dans l'intérêt de la Santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.



**GESLAND Aurélie**

**Date de soutenance : Mardi 28 Avril 2020**

**Evaluation des performances analytique et diagnostique du dosage des biomarqueurs Tau, P-Tau, A $\beta$ 42 et A $\beta$ 40 dans le liquide cérebrospinal sur l'automate LUMIPULSE® G600II au CHU de Rouen.**  
Thèse pour le Doctorat en Pharmacie, Rouen, 2020, 145p.

---

**Contexte :** Les biomarqueurs (BM) du liquide cérebrospinal (LCS) ont largement confirmé leur utilité dans le diagnostic de la maladie d'Alzheimer (MA) dans le monde entier. Après 20 ans de techniques d'immunoanalyse manuelles, des techniques de dosage automatisées aujourd'hui disponibles pourront contribuer aux efforts de standardisation. L'objectif de cette étude est d'effectuer une validation de méthode des biomarqueurs Tau, p-Tau, A $\beta$ 42 (standardisée) et A $\beta$ 40 dans le LCS sur l'automate LUMIPULSE® (LP) G600II, comprenant une comparaison avec à la méthode manuelle INNOTEST® (IT) et une réévaluation des valeurs seuils en faveur du diagnostic de la MA.

**Méthode :** 53 échantillons de patients ayant bénéficié d'une ponction lombaire (PL) lors d'une consultation de neurologie au CHU de Rouen entre Janvier 2012 et Février 2013 ont été inclus, les diagnostics avant et après PL ont été recueillis. En 2019, nous avons un diagnostic final basé sur le suivi clinique pour 39 d'entre eux. La comparaison des deux méthodes (n=53) repose sur une étude de corrélation et sur des graphes de Bland et Altman. Une translation des seuils actuels IT a été effectuée à partir des droites de régression linéaire selon Passing Bablok et une étude de réévaluation des seuils par courbe ROC a également été réalisée sur 48 patients.

**Résultats :** Les coefficients de variation maximaux obtenus sur des CIQ pour la fidélité intermédiaire (n=10) étaient respectivement  $\leq 5,07$  % pour Tau,  $\leq 2,61$  % pour P-Tau,  $\leq 3,95$  % pour A $\beta$ 42 et  $\leq 5,05$  % pour A $\beta$ 40. Les méthodes IT et LP sont bien corrélées, les coefficients de corrélation de Pearson étaient respectivement de 0,988 pour Tau, 0,98 pour P-Tau, 0,95 pour A $\beta$ 42 et 0,77 pour A $\beta$ 40, mais l'observation de différences entre les deux méthodes justifiait la définition de nouveaux seuils. Les valeurs seuils en faveur du diagnostic de MA transposées à partir des seuils actuels IT, validées par l'étude de concordance selon le test kappa sont : Tau > 466 ng/L, P-Tau > 55 ng/L, A $\beta$ 42 < 437 ng/L, A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 < 0,057 et A $\beta$ 42/P-Tau < 9,3.

**Conclusion :** Le LP montre de bonnes performances analytiques, l'interprétation des résultats des biomarqueurs est concordante entre les méthodes IT et LP avec les nouveaux seuils définis. L'utilisation du LP au laboratoire fluidifiera et sécurisera l'organisation de cette activité et permettra de rendre les résultats plus rapidement au prescripteur.

---

**MOTS CLES :** Alzheimer – Biomarqueurs – Liquide cérebrospinal – INNOTEST® - LUMIPULSE®

---

**JURY**

Président : Professeur Loïc FAVENNEC, PU-PH – Parasitologie – CHU Rouen

Membres : Dr Muriel QUILLARD MURAINÉ, MCU-PH – Biochimie – CHU Rouen

Pr Oliver MARTINAUD, PU-PH – Neurologie – CHU Rouen

Dr Valéry BRUNEL, PH – Biochimie – CHU Rouen

Dr David WALLON, MCU-PH – Neurologie – CHU Caen