

Biomarqueurs du LCR : intérêt diagnostique dans la maladie d'Alzheimer

Dr Jérôme Servan
Service de Neurologie
CH René Dubos, Pontoise

Préalable

- MA : 225 000 nouveaux cas/an
- Efficacité thérapeutique (actuelle et surtout dans l'avenir) reposera sur un diagnostic précoce
- ce diagnostic précoce est difficile

Alzheimer: intérêt d'un diagnostic précoce

- Traitements spécifiques disponible depuis 1993 : inhibiteur de l'acétylcholinestérase, antiglutamatergique
 - Traitements seront d'autant plus efficaces qu'ils seront débutés tôt
 - Traitements symptomatiques des conséquences psychocomportementales
 - Aide médico-sociale (patient et proches) : anticiper, organiser, protéger
 - Connaissance du diagnostic : mieux accepter la maladie, meilleur observance du traitement et un suivi plus régulier
- consultation mémoire de proximité (neurologue, gériatre, psychiatre)

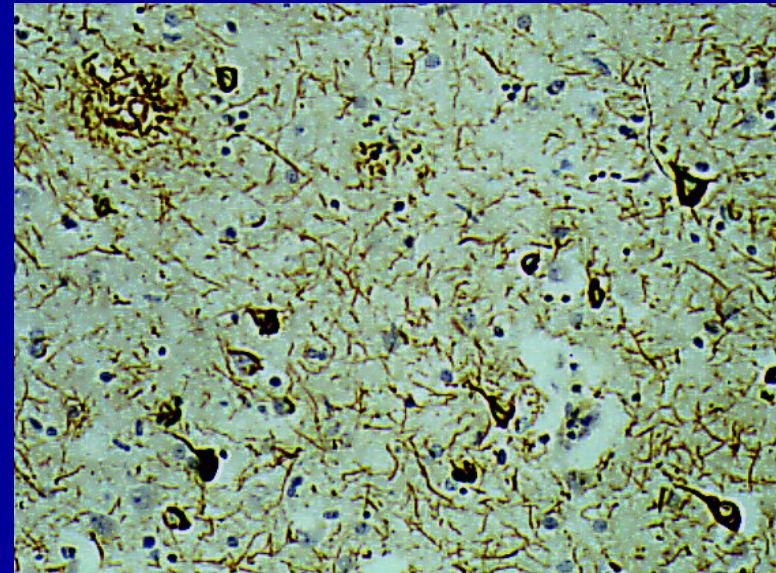
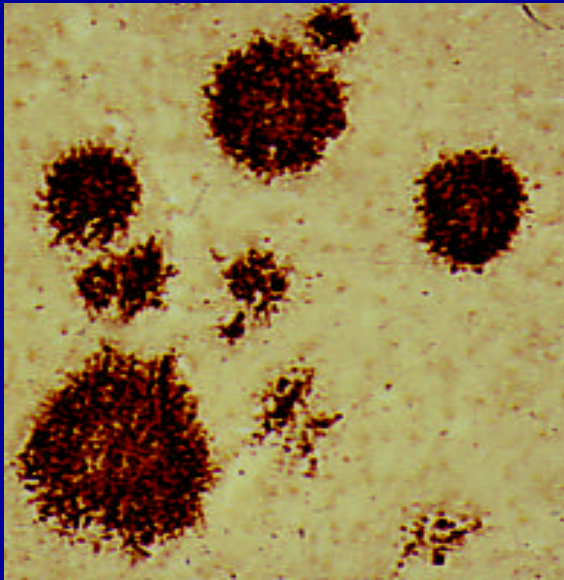
Alzheimer = un diagnostic précoce difficile

- Le diagnostic de MA repose essentiellement sur des signes cliniques
- Au début, les examens complémentaires (imagerie) sont normaux
- Il s'agit toujours d'un diagnostic de probabilité, le diagnostic de certitude rest histologique
- En fin d'évolution d'une démence, il existe encore 15 % d'erreur (par rapport au diagnostic histologique)

Objectif : élaborer un biomarqueur de la MA capable d'aider au diagnostic précoce

Critères d'un bon biomarqueur : fiabilité, précision, reproductibilité, sensibilité (80%), spécificité (80%) et provenant d'un prélèvement jugé non ou modérément invasif (effets secondaires <2 %) et en relation avec la lésion pathologique et s'inspirant de sa physiopathologie

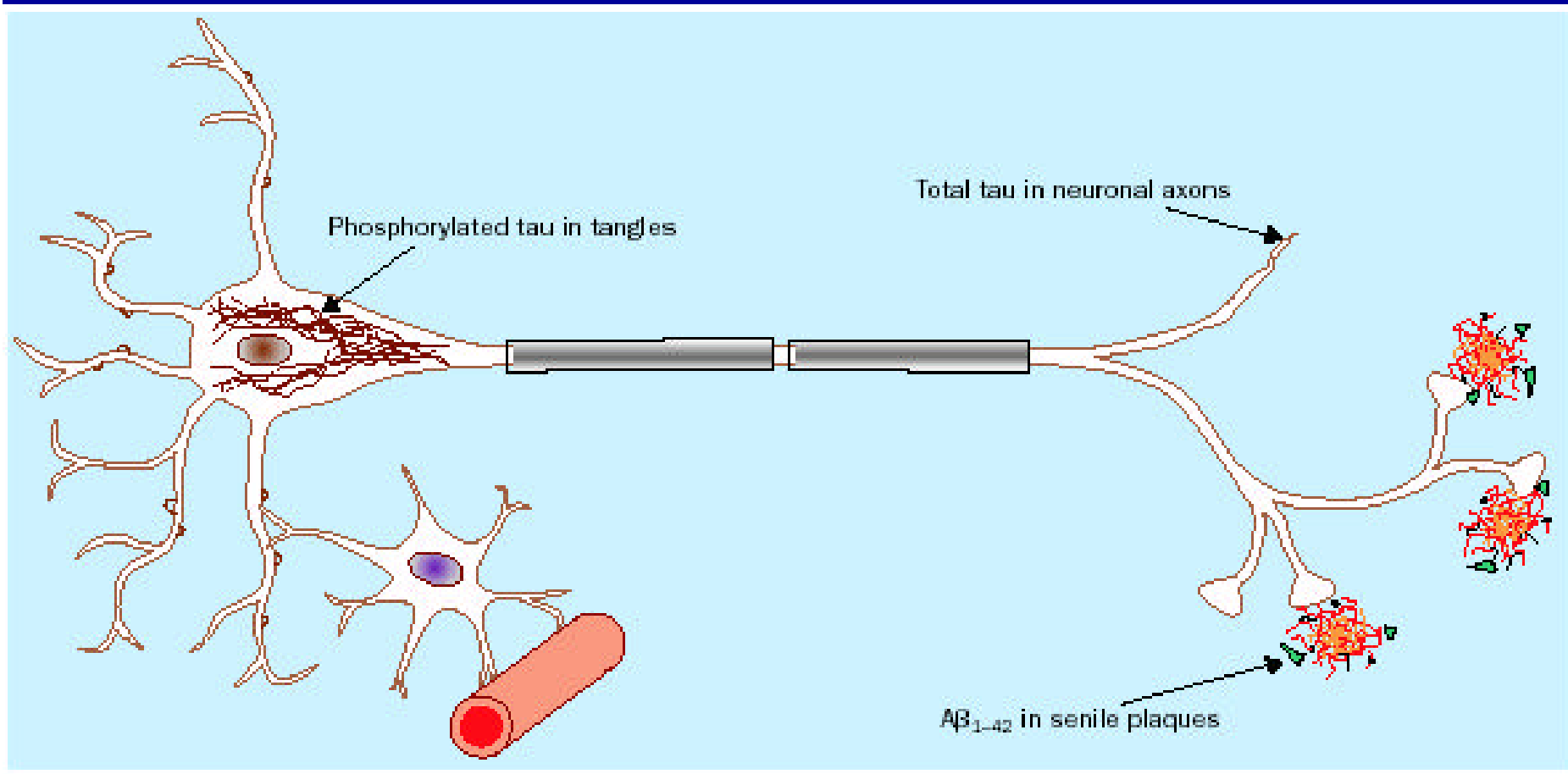
Diagnostic de certitude
Analyse neuropathologique donc post-mortem



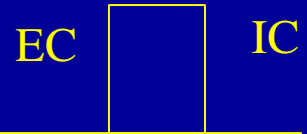
Depôts amyloïdes néocorticaux + Dégénérescence neurofibrillaire néocorticale
Ab42 **Tau**

Les marqueurs tissulaires du SNC

A β , Tau totale et Tau phosphorylée



APP = précurseur du peptide amyloïde



Voie catabolique non amyloïdogène

Voie catabolique amyloïdogène



β sécrétase ? sécrétase

sAPP

α sécrétase

A β monomeres

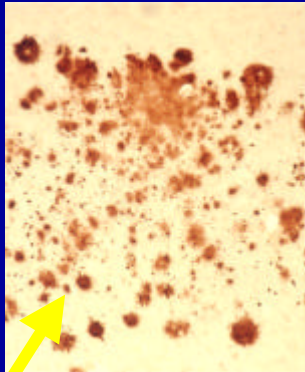
A β oligomeres

Pré-plaques diffuses
+ A β intracellulaire

Plaques séniles

Résidus solubles
trophiques

APP: therapeutic target



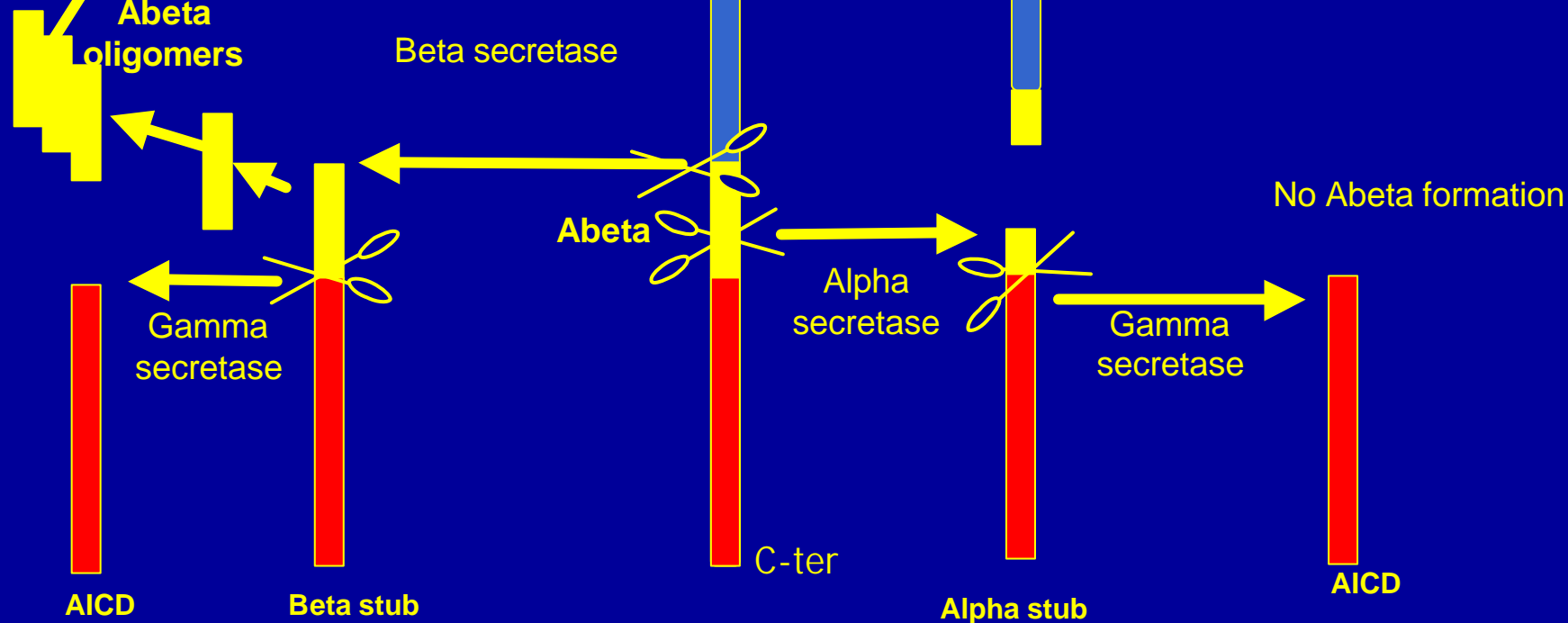
sAPP beta

APP

N-ter

Neuroprotection against taupathy

sAPP_{alpha}: neurotrophic role



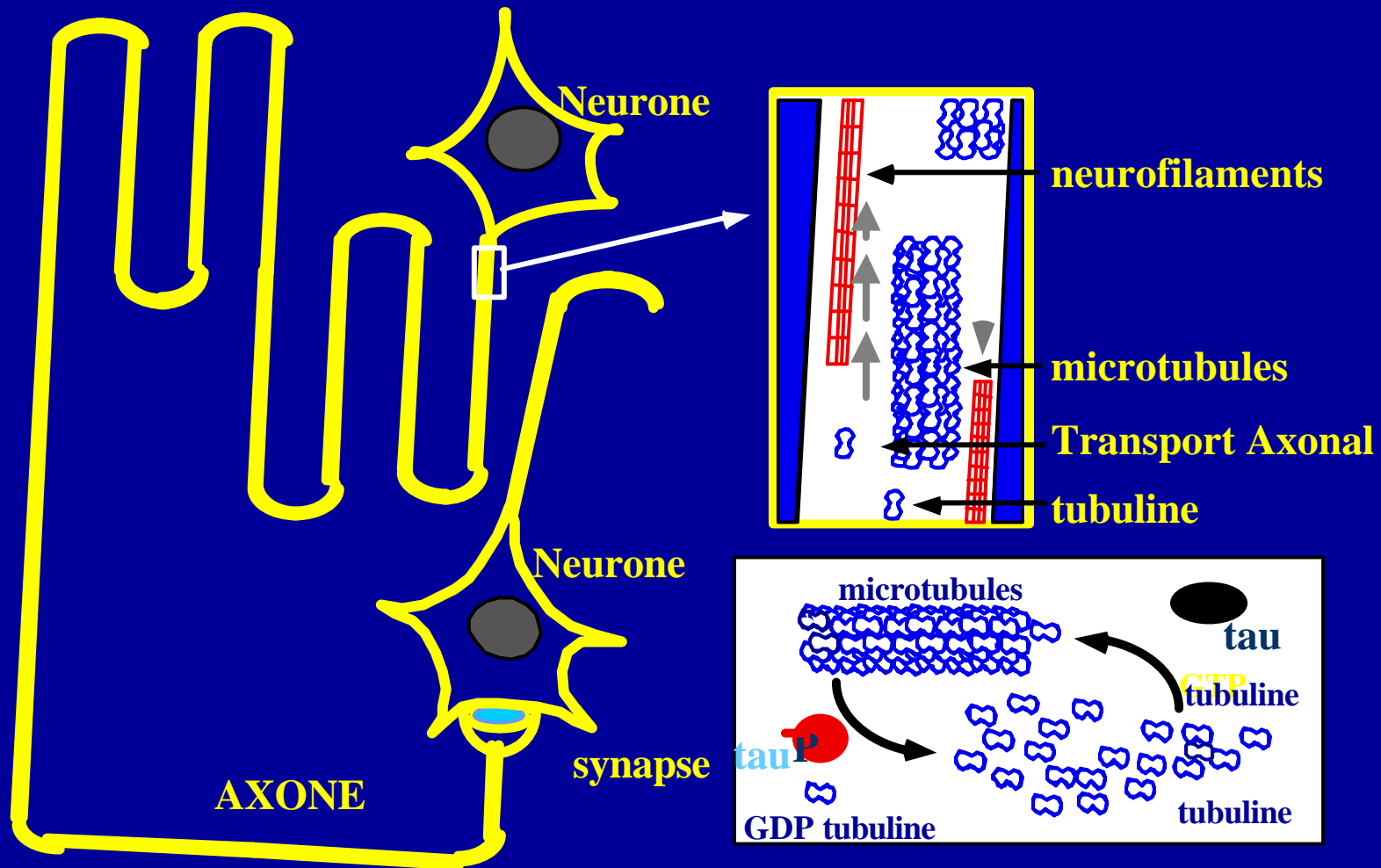
(Nuclear role?)

(Nuclear role?)

Amyloidogenic pathway: the evil

Non amyloidogenic pathway: The good

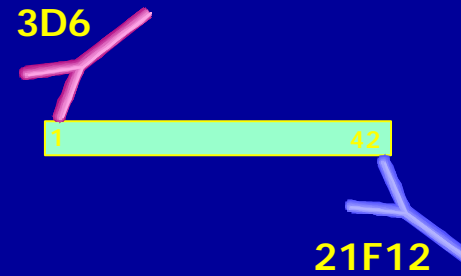
TAU : une proteine associée aux microtubules



INNOTEST b Amyloïde (1-42) (Innogenetics)

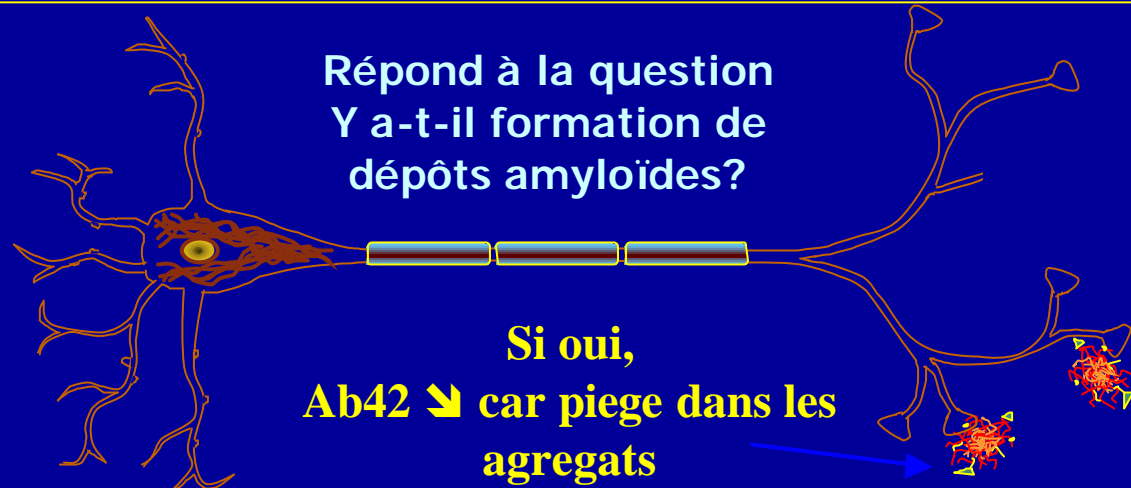
Dépôts de la
protéine B
amyloïde dans les
plaques séniles

Anticorps utilisés pour le dosage de Ab 1-42



Vanderstichele et al, 1998

Répond à la question
Y a-t-il formation de
dépôts amyloïdes?



Si oui,
Ab42 ↘ car piège dans les
agregats

1) Dosage de la protéine amyloïde A β dans le LCR

- La concentration du peptide A β 1-42 est diminuée dans le LCR des patients atteints de MA
- Le peptide serait capté par les plaques séniles et ne passerait pas dans le LCR
- Sur 650 patients et 500 contrôles (13 études)
 - . Sensibilité : 86 %
 - . Spécificité: 89 %

Valeur seuil 500 pg/ml

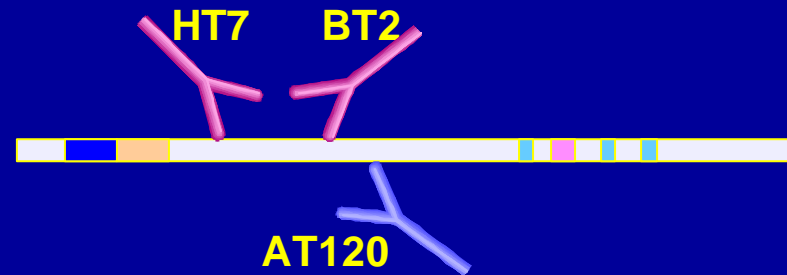
-A β 1-40 n'est pas modifié au début de la maladie, agrégation plus tardive

- Intérêt du ratio AB 1-42/1-40

INNOTEST[®] hTau Ag (tau totale) (Innogenetics)

- ?User-friendly enzyme immunoassay?
- Minimum number of handling steps?
- Small sample volume: 25 µL CSF.
 - Duplicate testing is strongly recommended and requires 2 x 25 µL CSF?
- Reproducible results within the standards range?
- Lowest detection limit: 60 pg/mL
- Standards range: 75 to 1200 pg/mL

Anticorps utilisés pour le dosage des Tau totales



Blennow et al, Mol Chem Neuropathol 1995;26:231

Répond à la question
Y a t il mort
neuronale?

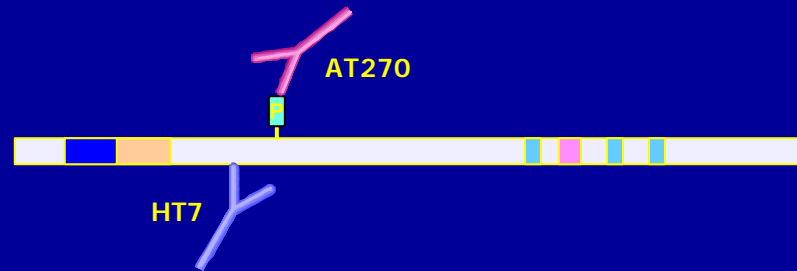


Dosage de la protéine Tau totale dans le LCR

- Augmentation significative de la concentration de Tau totale chez les patients atteints de MA
- Reflète les lésions neuronales (désintégration des microtubules)
- Dans le LCR , la protéine Tau est souvent protéolysée en fragments
- 2 500 patients et 1 300 témoins (50 études)
 - . Sensibilité : 82 %
 - . Spécificité : 88 %
- La protéine Tau peut augmenter un peu avec l'âge chez les contrôles
- Valeur seuil : 300 pg/ml (20-50 ans) ; 450pg/ml (50-70 ans) 500 (>70 ans)

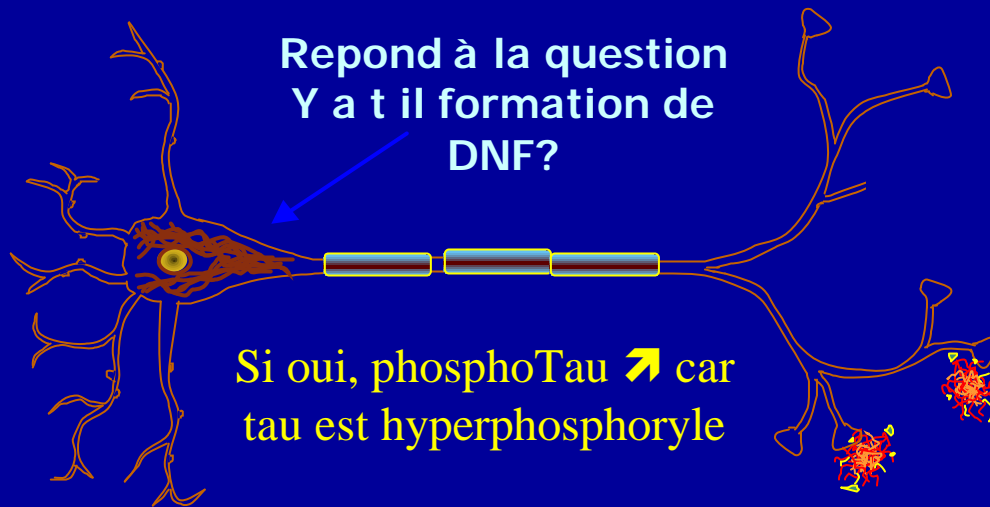
INNOTEST phospho Tau (181P)

ELISA for CSF phospho tau (P-Thr181)



Vanmechelen et al, Neurosci Lett 2000;285:49

Repond à la question
Y a t il formation de
DNF?



Si oui, phosphoTau ↗ car
tau est hyperphosphoryle

Dosage de la protéine Tau phosphorylée dans le LCR

- La protéine Tau phosphorylée (sur différents sites) est augmentée dans le LCR des patients atteints de MA
- Plus spécifique de la MA
- 1 000 patients et 500 contrôles
 - . Sensibilité: 80 %
 - . Spécificité: 92 %
- Variation avec l'âge
- Valeur seuil de référence : 60 pg/ml

Tau, Ab42 et Phospho-Tau : valeurs de référence dans le LCR

Age	INNOTEST Tau	INNOTEST Aβ42 (pg/ml)	INNOTEST Phospho-Tau* (pg/ml)
61±18	263 ± 164	794 ± 218	35 (18-87)
21-50 ans	136 ± 89	792 ± 182	
51-70ans	243 ± 127	790 ± 228	

MMSE = 29.2 ± 0.92

Sjögren et al : *Tau and Aβ42 in CSF during Aging (2001) ClinicalChemistry 47:10*

*Schoonenboom et al : *Ab42 and phosphorylated Tau in CSF as markers for early-onset Alzheimer disease (2004) Neurology 62 : 1580*

Variations des concentrations des protéines Tau et Ab42 dans le LCR de patients Alzheimer

l'étude des 3 marqueurs simultanément est plus spécifique et plus sensible (jusqu'à 96% et 94 %) :

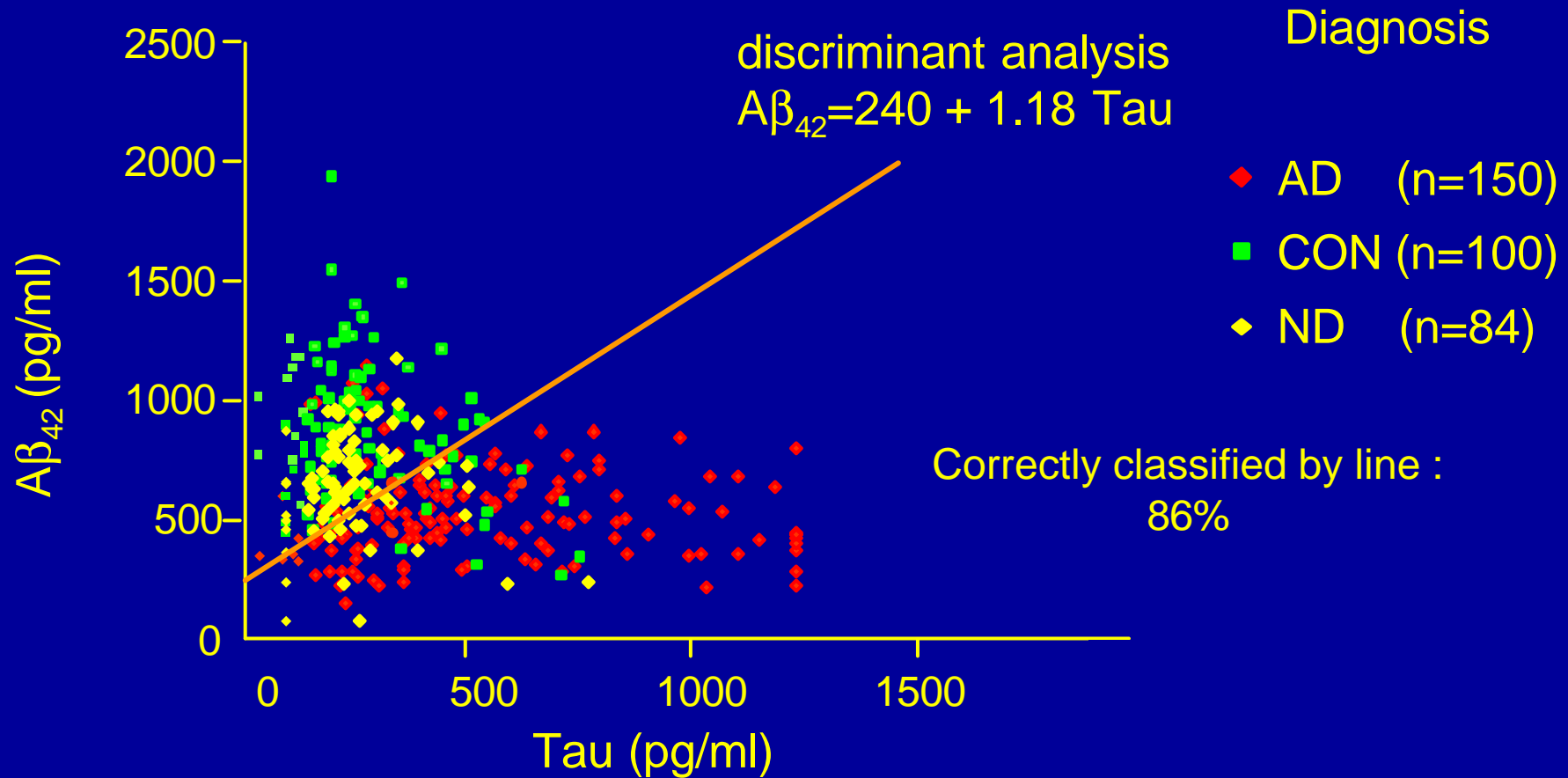
- pour le dg de MA que chaque marqueur isolé (*Blennow, 2006 ; Formichi, 2006 ; Parnetti, 2006*)

- pour prédire l'évolution d'un trouble cognitif léger vers une MA ds les 5 ans (respectivement 87 %, 96 %) (*Hansson, 2006*). Si MCI avec Abétau+Tau-T+Tau-P Normale → pas de MA dans les 5 ans. Si au moins 2 facteurs perturbés → MA dans les 5 ans

Ces 3 marqueurs ont été validés par des études dans des cas de MA confirmés par études histologiques en 2005

Ils répondent aux critères des bio-marqueurs énoncés

Amélioration de la sensibilité du test = seuil Ab variable



* Composite Figure from Hulstaert et al.
Neurology 1999;52:1555-1562

IATI = Innotest Amyloid Tau Index

On compare la concentration de Ab42 mesurée (xxx pg/ml) à la référence relative de Ab42 calculée à partir des concentrations de Tau (yyy pg/ml) :

$IATI = \text{Ab42 mesurée} / \text{référence relative}$

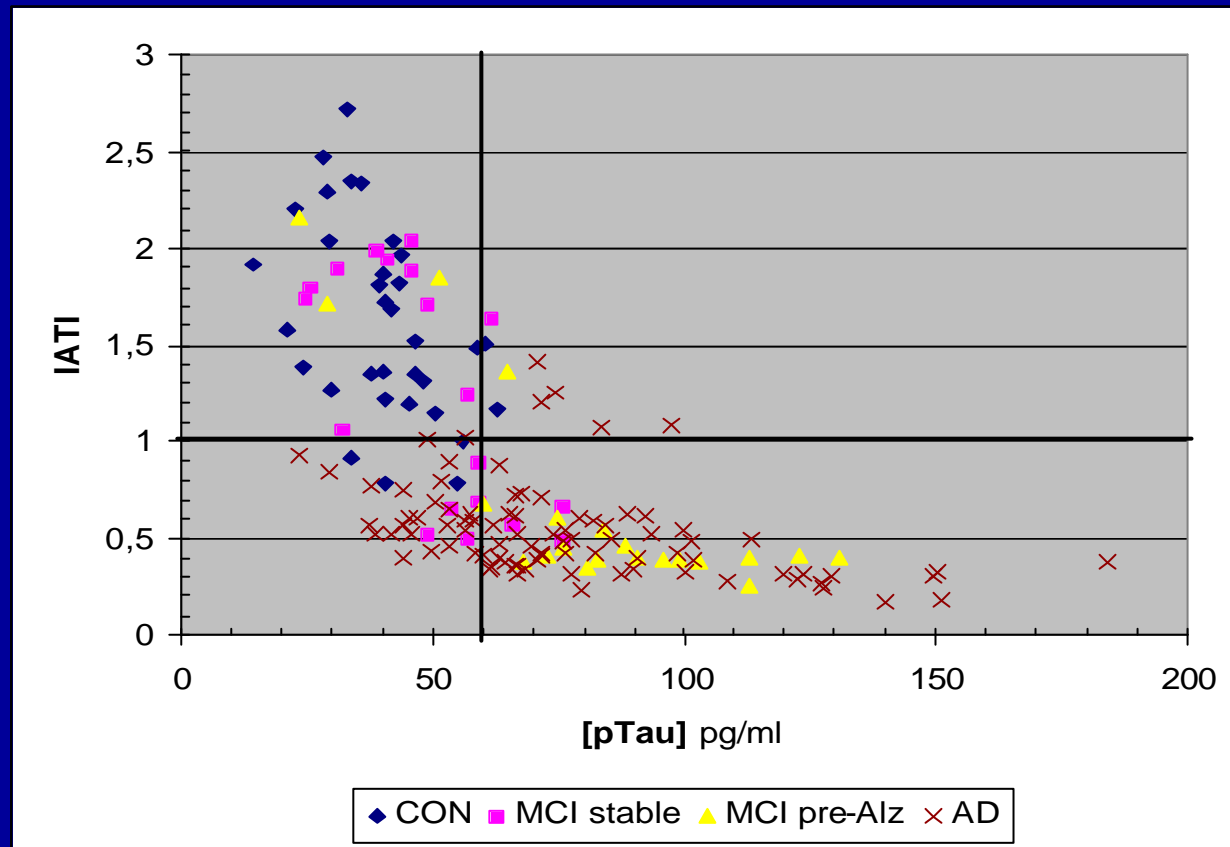
Ou la référence relative Ab42 := $240 + 1.18[\text{Tau}]$

IATI Index > 1 Normal

(Neurology 1999;52:1555-1562)

Combinaison IATI et phosphoTau

- IATI > 1.2
pronostic favorable
- IATI < 0.8
dégénérescence
neuronale anormale
- IATI < 0.8 & [pTau] > 60
Profil pathologique
Alzheimer possible



Données non publiées - résultats d'études multicentriques

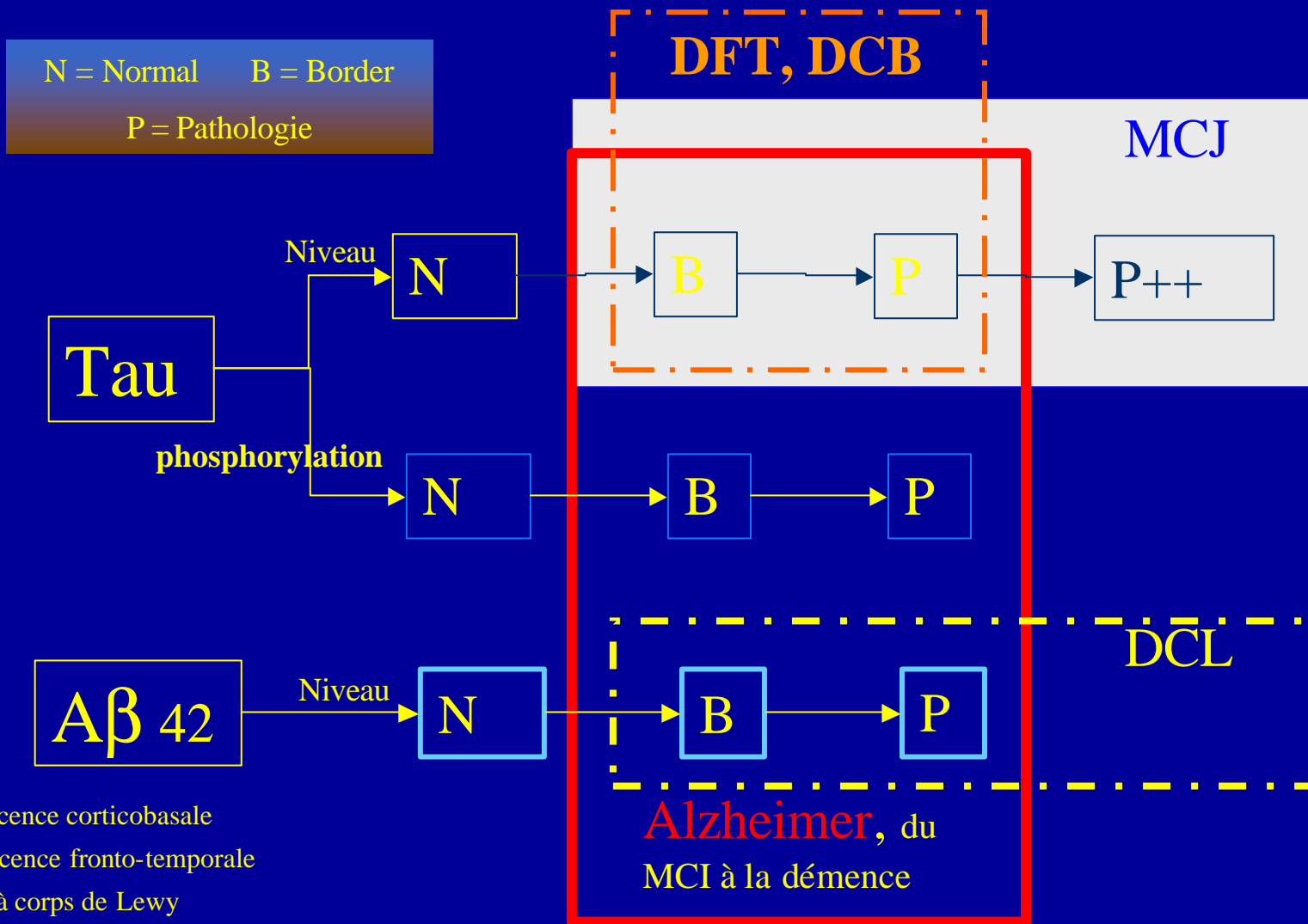
Diagnostic différentiel

Dr Blenow, Clinical Laboratory International, Oct.2001: 8-10

<i>Pathologie</i>	<i>hTau total</i>	<i>Tau -181P</i>	<i>Beta-amyloid(1-42)</i>
Senescence normal	Normal (< 450 pg/ml)	Normal (< 60 pg/ml)	Normal (> 500 pg/ml)
Mal.Alzheimer ou MCI	▲ modéré	▲ modéré	▼ ▼
Depression	N	N	N
Mal. Parkinson	N	N	N
Demence alcoolique	N	N	N
DFT ou DCB ou PSP	N ou ▲ faible	N ou ▲ faible	N ou ▼ faible
Dem. Corps Lewy	N ou ▲ faible	N	▼ faible à modéré
Creutzfeldt-Jakob*	▲ ▲ ▲	N ou ▲	▼
Acc.Vascul.Cerebral	▲ ▲ transitoire	N	N
Dem. vasculaire	<i>Data divergentes</i>	N	N ou ▼ faible

* : Protéine 14.3. 3; NSE, S100

Diagnostic Différentiel



DCB: dégénérescence corticobasale
 DFT: Dégénérescence fronto-temporale
 DCL: Démence à corps de Lewy
 MCI: troubles cognitifs débutants
 MCI: maladie de Creutzfeld-Jacob

Limite : règles de prélèvement

- 3-5 ml de LCR dans un tube en polypropylène (AB 1-42 hydrophobe)
- Centrifuger et décanter dans un tube semblable
- Ne pas envoyer un LCR traumatique (risque d'interférences)
- Conserver à -80°C (chaleur perturbe le dosage du peptide $\text{A}\beta$).
- Délai d'acheminement < 4 heures (délai trop long avant traitement perturbe dosage de la protéine Tau)



Limite : variabilité

- Pas de normes universellement admises pour chaque marqueur. Chaque laboratoire doit établir ces normes
- Haute variabilité interindividuelle, liée à l'âge mais aussi à l'horaire du prélèvement (protéine amyloïde Béta 42) : de préférence à la même heure le matin
- Haute reproductibilité chez le même individu et peu de modification avec la progression de la maladie

Limite : interférences analytiques

- Pertes synaptiques → augmentation du taux d'oligomères du peptide A Béta
- Dosage du peptide A Béta par des AC qui reconnaissent uniquement les monomères de peptide A Béta
- Les monomères de peptide A Béta sont masqués par les oligomères augmentés en cas de pertes synaptiques
- → sous estimation des concentrations réelles de peptide A Béta
- → intérêt de doser les oligomères du peptide A Béta voire d'autres sous-unités (APP Alpha et Béta)

Limite : peu de certitude diagnostic

- La très grande majorité des études incluent des patients diagnostiqués cliniquement par les tests neuropsychologiques
- 1 seule étude (Engelbors, 2008) avec 100 patients MA / 100 témoins confirmés *post mortem* :
 - = concordance 81,6 % avec les tests versus 82,7 % avec la vérification

D'où l'intérêt des dosages quand les test cliniques sont peu sensibles au début de la maladie

Que faut-il en penser ?

- Pour le NINCDS-ADRA : l'étude des biomarqueurs dans le LCR est incluse dans les critères de MA révisés en 2007
- Pour l'HAS :
 - Analyse standard du LCR (cellules, protéine, glucose, électrophorèse des protéines) est recommandée chez les patients avec une **présentation clinique atypique inquiétante et/ou rapidement évolutive** (suspicion de maladie inflammatoire, infectieuse, paranéoplasique ou de Creutzfeldt-Jakob – dosage de la protéine 14-3-3).
 - En cas de doute diagnostique et en particulier chez les patients jeunes, le dosage dans le LCR des protéines *Tubulin Associated Unit* (TAU) totale, Phospho-TAU et A β 42

L'étude du LCR semble utile :

1) Pour orienter un diagnostic de démence débutante ou prévoir l'évolution d'un MCI afin d'instituer une prise en charge précoce (traitement et autres)

*mais il faut réaliser une ponction lombaire....
mais il faut réfléchir sur les conséquences de
l'annonce du diagnostic d'une maladie grave,
chronique, évolutive sans traitement réellement efficace
chez un patient peu invalidé....*

2) Pour aider au diagnostic différentiel entre les démences si les signes cliniques sont atypiques ou ininterprétables (pathologie psychiatrique associée, médicaments, alcool) surtout chez le sujet jeune

mais les perturbations dans le LCR doivent être franches

Conclusion

- Evolution vers la généralisation du dosage des biomarqueurs (LCR ou autres fluides). Dans l'avenir, on s'achemine vers la nécessité d'étudier ces marqueurs avant d'inclure les patients dans les études voire avant de débuter un traitement (MCI ou MA débutante) ?
- Pas d'interprétation isolée mais en fonction des données cliniques, neuropsychologiques et d'imagerie fonctionnelle.

- Depuis mai 2006 à mars 2010 : 49 prélèvements
- Âge moyen : 65 ans (34-87)
- Indications par ordre de fréquence décroissante :
 - Atypies cliniques MA ou MA du sujet jeune
 - Comorbidité psy, alcool, épilepsie, psychotropes
 - Atypies DFT
 - Troubles cognitifs + maladies neurologiques n'expliquant pas les signes (Behcet, SEP, PSP, AVC...)
- 0-1 marqueur altéré : 47 % → pas d'Alzheimer
- 2-3 marqueurs altérés : 41 % → Alzheimer
- Ininterprétable : 12 %

Cas clinique 1

Mr G, 58 ans, depuis 5 ans suivi pour repli sur soi, passivité, inertie. Dg : dépression. Traitement antidépresseur inefficace.

Aggravation rapide des signes en 6 mois.

Fluence verbale réduite. Score de MMS = 12 mais lenteur et troubles attentionnels +++. Horloge irréalisable.

Répercussion +++ sur la vie quotidienne.

IRM cérébrale : atrophie frontale et temporale (externe).

Dg : DFT

LCR = 0,65 g/l de protéines

Ab42 = 465 pg/ml, Tau = 700 pg/ml, PTau > 150 pg/ml

Cas Clinique 2

Mme B., médecin, 62 ans, a du mal à se souvenir du contenu d'une consultation, confond les patients, angoissée. Aucune répercussion dans la vie quotidienne.

MMS à 28 / 30 (2 points sur items mémoire)

Evolution : difficultés visuo-spatiales. Ataxie optique. Héli négligence. Apraxie idéo-motrice; Syndrome de Balint.

Score de Dubois = 10/10 erreur rappel libre et différé, tjs améliorée par l'indigage, une intrusion

Autres tests neuropsychologiques normaux

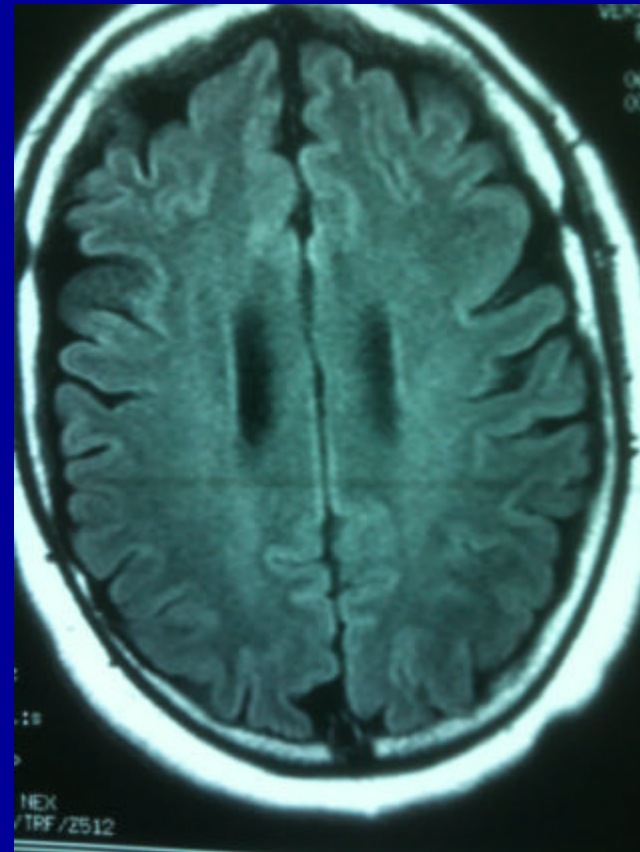
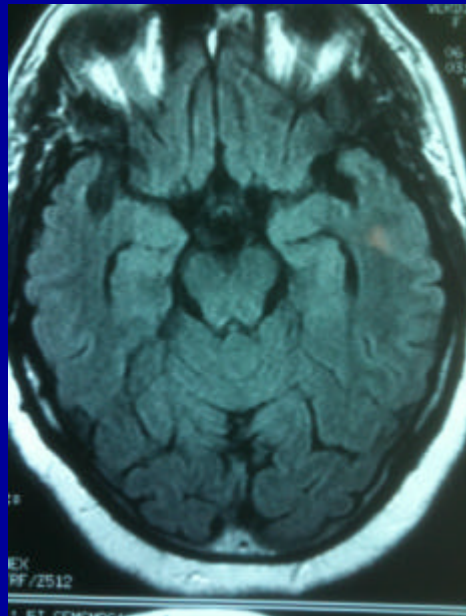
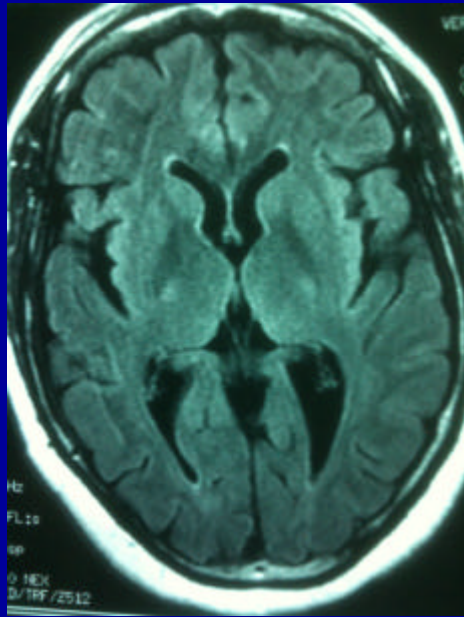
IRM cérébrale : atrophie pariétale postérieure

Dg : Atrophie de Benson

AB= 307 pg/ml Tau = 304 pg/ml PTau = 67 pg/ml

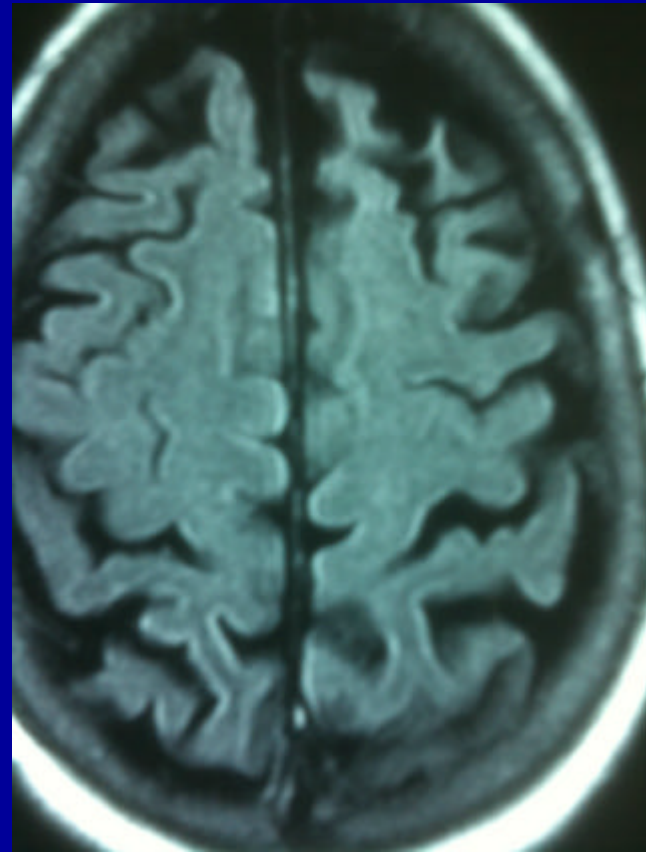
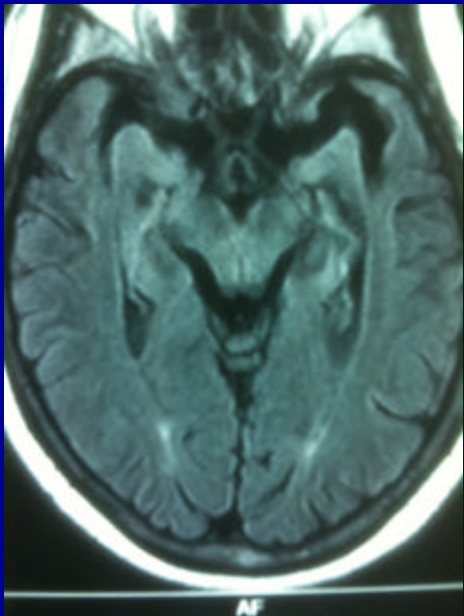
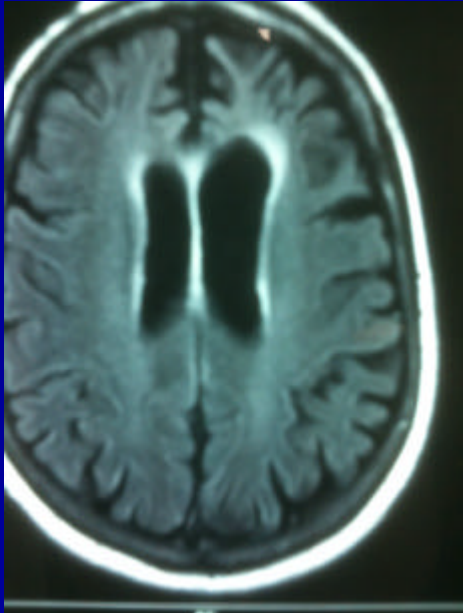
Cas clinique 3

- Mme V. 53 ans, ancienne traductrice, schizophrénie délirante avec hallucinations auditives et visuelles depuis 20 ans
- Trouble mnésique depuis 1 an, MMS 24/30
- Trouble de l'attention (pathologie psychiatrique et traitement)
- Troubles mnésiques antérogrades et praxiques
- IRM : minime atrophie cortico-sous corticale
- Dg : ALZ débutant
- AB = 372 pg/ml, Tau = 87 pg/ml, Ptau < 25 pg/ml IATI 1,1



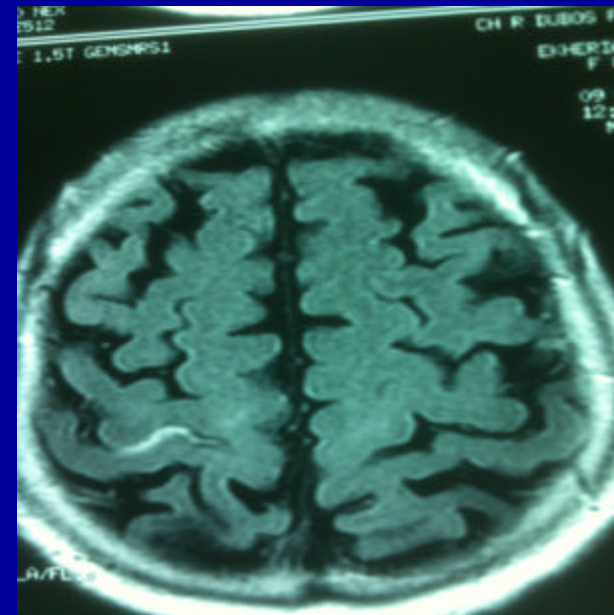
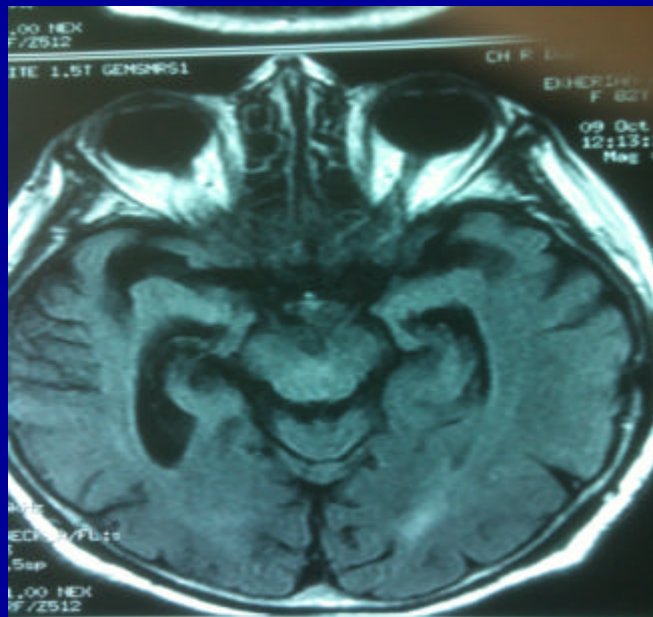
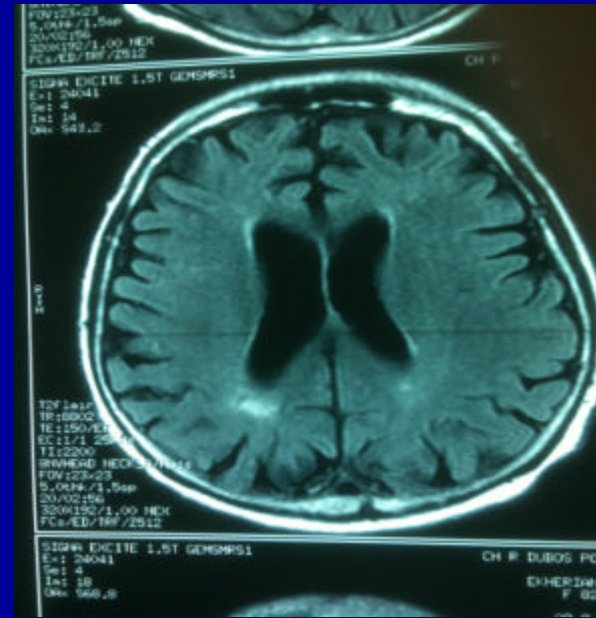
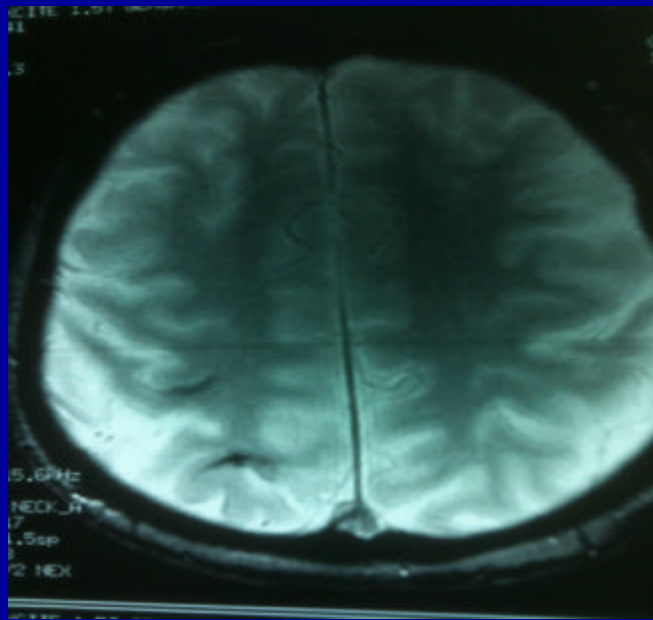
Cas clinique 4

- Mme M, 61 ans, journaliste, progressivement sur 2 ans : diminution de la fluence verbale lexicale, apathie, incurie, déambulation, agressivité, écholalie
- DG : DFT
- LCR : 0,56 g/l
- BA : 217 pg/ml, Tau : 141 pg/ml, PTau : 28pg/ml



Cas clinique 5

- Mme E, 82 ans, dyslipidémie, AIT avec trouble visuel et déficit du MSG. 7 mois plus tard AVC ischémique constitué même territoire avec petite lame hémorragique prérolindique G. Bilan étiologique : normal. Puis installation dans l'année suivante d'un trouble de mémoire. Score au MMS : 16 /30. Troubles mnésiques (rappel immédiat, intrusions).
- LCR : Normal
- AB : 131 pg/ml ; TTau : 689 pg/ml ; Tau P : 117 pg/ml



Cas clinique 7

- Mr R., 69 ans, agriculteur, apparition progressive de troubles de la sensibilité au niveau des mains, d'un syndrome cérébelleux et des mouvements involontaires aux membres supérieurs
- Ralentissement, insomnie, hallucinations visuelles.
- EEG : activité pseudopériodique
- IRM cérébrale : atrophie du cervelet. Hypersignal en diffusion dans les NGC et cortex de la convexité D>G
- LCR : AB : 176pg/ml, Tau total : 1201 pg/ml, TauP : 68 pg/ml

