

UNIVERSITÉ DE LILLE
FACULTÉ DE MÉDECINE HENRI WAREMBOURG
Année : 2020

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN MÉDECINE

**Les chaînes légères de neurofilaments comme biomarqueur des démences :
mise en place du dosage dans le liquide cébrospinal et étude pilote chez
des patients du Centre Mémoire du CHU de Lille**

Présentée et soutenue publiquement le 14 décembre à 18h
au Pôle Formation
par **Caroline THIOLLET**

JURY

Président :

Madame le Professeur Florence PASQUIER

Assesseur :

Madame le Professeur Malika HAMDANE

Directeur de thèse :

Madame le Docteur Susanna SCHRAEN

**Travail en collaboration avec le Laboratoire de Biochimie des Protéines du
centre hospitalier universitaire de Lille**

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses :
celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Résumé

Contexte : Les chaînes légères de neurofilaments (NfL) sont des constituant du cytosquelette exclusivement exprimés dans les neurones. En cas de lésion de l'axone ou de mort neuronale, ils sont libérés dans le LCS et dans le sang. Ce sont des biomarqueurs prometteurs dans le diagnostic et le pronostic des maladies neurologiques, notamment des démences. L'objectif de ce travail est de choisir un kit des NfL dans le LCS parmi ceux commercialisés, d'évaluer les performances de ce kit et de comparer la concentration de NfL entre différentes étiologies de démences chez des patients du Centre Mémoire du CHU de Lille.

Méthode : Nous avons évalué la répétabilité et la reproductibilité de notre technique de dosage des NfL avec le kit de dosage ELISA UmanDiagnostics (Umea, Suède), et passé deux contrôles de qualité externes. La concentration de NfL dans le LCS a été mesurée dans deux cohortes de patients atteints de troubles cognitifs, l'une avec des diagnostics étiologiques cliniques de ces troubles cognitifs, l'autre avec des diagnostics anatomopathologiques.

Résultats : Nous avons choisi le kit de dosage ELISA UmanDiagnostics (Umea, Suède). Notre évaluation de cette technique au CBP a montré une bonne répétabilité, une bonne reproductibilité et des contrôles de qualité externes conformes. Les concentrations de NfL étaient élevées dans les deux cohortes. Dans la cohorte « clinique », la médiane du taux de NfL était de 1936 pg/ml dans le spectre des DFT, 1550 pg/ml dans les MA et 1348 pg/ml dans les autres diagnostics de démences, sans différence significative entre les groupes ($p = 0.2765$). Dans la cohorte « anatomopathologique », la médiane des NfL était plus élevée dans le groupe des DFT (3116 pg/ml) que dans celui des MA (1037 pg/ml), avec une différence significative entre les 2 groupes ($p < 0.001$).

Conclusion : Notre travail nous a permis de valider le dosage des NfL dans le LCR. Les résultats que nous avons obtenu chez nos patients sont cohérents avec la littérature. Ce dosage n'est pas un bon marqueur diagnostic permettant de différencier les démences entre elles mais pourrait avoir un intérêt pour différencier maladies psychiatriques et DFT, et pourrait avoir un intérêt pronostique. Ces résultats ouvrent des perspectives nouvelles. Il serait par exemple intéressant de déterminer des valeurs de référence dans une population témoin et des valeurs seuil pour différencier maladies psychiatriques et DFT.

Table des matières

1	Introduction.....	1
1.1	Structure et fonction des chaînes légères de neurofilaments	1
1.2	Intérêt de la mesure des NfL.....	4
1.3	Techniques de mesure des NfL.....	4
1.3.1	Principe général des techniques de mesure des NfL : tests immunologiques de type sandwich	4
1.3.2	ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay	5
1.3.3	ECL : électrochimiluminescence	5
1.3.4	Simoa : single molecule Array	6
1.3.5	Performances des différentes techniques	8
1.4	Apport du dosage des NfL pour la prise en charge des démences	9
2	Matériel et méthodes.....	13
2.1	Patients.....	13
2.2	Contrôles de qualité :	13
2.3	Pré-analytique :	13
2.4	Analytique :	14
2.5	Post-analytique, interprétation :	14
2.6	Vérification/validation de méthode	14
2.7	Statistiques	15
3	Résultats.....	15
3.1	Technique.....	15
3.1.1	Choix du kit.....	15
3.1.2	Evaluation du kit	15

3.2	Application du test sur des patients du CHRU de Lille.....	17
3.2.1	Description des 2 cohortes.....	17
3.2.2	Taux de NfL dans les différents groupes de diagnostics.....	19
4	<i>Discussion</i>.....	27
5	<i>Conclusion et perspectives</i>.....	32
6	<i>Bibliographie</i>.....	33

Liste des figures

Figure 1 : Structure des neurofilaments (d'après Gaetani 2019 (3))	2
Figure 2 : Assemblage des neurofilaments (d'après Khalil 2018 (4)).....	3
Figure 3 : Modèle de croissance radiale neurofilament-dépendant (d'après Larivière 2004 (5)).....	3
Figure 4 : Principe de l'ELISA avec révélation indirecte par biotine-streptavidine (d'après Nimse, 2016 (7)).....	5
Figure 5 : Principe de l'électrochimiluminescence (d'après Mesoscale (8)).....	6
Figure 6 : Principe de la technique Simoa (d'après Wu 2019 (10)).....	7
Figure 7 : Libération des neurofilaments lors de lésions axonales (d'après Khalil, 2018 (4))	9
Figure 8 : Description des 2 cohortes.....	17
Figure 9 : Distribution des NfL (en pg/ml) chez l'ensemble des patients inclus : cohorte anatomopathologique et clinique	19
Figure 10 : Concentration des NfL en fonction des diagnostics cliniques	20
Figure 11 : Concentration des NfL en fonction des sous-groupes diagnostics cliniques ..	21
Figure 12 : Concentration des NfL en fonction des diagnostics anatomopathologiques..	23
Figure 13 : Concentration des NfL en fonction des sous-groupes de diagnostics anatomopathologiques	24
Figure 14 : Concentration des NfL en fonction de l'âge et des diagnostics anatomopathologiques.....	26

Liste des tables

Tableau 1 : Performances diagnostiques des principales techniques de détection des NfL	8
Tableau 2 : Valeurs de référence des NfL dans le LCS (pg/ml).....	14
Tableau 3 : Evaluation de la répétabilité	16
Tableau 4 : Evaluation de la reproductibilité	16
Tableau 5 : Contrôles externes	16
Tableau 6 : Description de la cohorte « clinique »	22
Tableau 7 : Description de la cohorte « anatomopathologique »	25
Tableau 8 : Valeurs de référence des NfL dans le LCS (patients de 60 ans et plus).....	31

Liste des abbréviations

A β -42 : protéine β -amyloïde de 42 acides aminés

DCB : dégénérescence cortico-basale

DFT : démence fronto-temporale

DLFT : dégénérescence lobaire fronto-temporale

ECL : électrochimiluminescence

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

LCS : liquide céphalo-spinal

MA : maladie d'Alzheimer

PSP : paralysie supranucléaire progressive

NfH : chaînes lourdes de neurofilaments

NfL : chaînes légères de neurofilaments

NfM : chaînes intermédiaires de neurofilaments

SNC : système nerveux central

Tau-p : Tau phosphorylée

Tau-t : Tau totale

1 Introduction

Les démences sont un problème majeur de santé publique, il est donc important d'identifier et de mettre en place de nouveaux marqueurs diagnostiques et pronostics pour améliorer leur prise en charge. Les chaînes légères de neurofilament sont un biomarqueur prometteur mis en place au CHRU de Lille.

1.1 Structure et fonction des chaînes légères de neurofilaments

Les neurofilaments sont des filaments intermédiaires faisant partie du cytosquelette des neurones dans le système nerveux central. Ils sont composés de 4 sous-unités protéiques: les chaînes légères (NfL), les chaînes intermédiaires (NfM), les chaînes lourdes (NfH) et les alpha-internexines (1)(2). Ces sous-unités protéiques s'associent en hétéro-polymères composés de proportions différentes selon le stade de développement du neurone. Ils sont particulièrement abondants dans l'axone. Chaque sous-unité protéique est constituée d'une tête globulaire, d'une partie en hélice alpha et d'un domaine C terminal de longueur variable (3)(Figure 1). Le domaine central alpha-hélicoïdal est hautement conservé et participe à la polymérisation des sous-unités. Les sous-unités sont assemblées latéralement en dimères, puis tétramères, puis en unités cylindriques de 8 tétramères (4)(Figure 2). Ces unités jointes bout-à-bout permettent l'élongation du neurofilament. Le neurofilament subit enfin une phase de maturation avec compaction radiale. L'assemblage et les interactions des sous-unités avec les autres composants de l'axone peuvent être régulées par phosphorylation (Figure 3). Le turnover des éléments du cytosquelette des neurones est lent. Leur demi-vie est très longue.

Les neurofilaments ont un rôle majeur dans les neurones : ils participent à la croissance radiale de l'axone lors du développement du neurone et au maintien de sa structure et de son diamètre, ce qui est important pour la transmission de l'influx nerveux (3)(5). Les neurofilaments participent à l'organisation et l'amarrage des différents constituants de l'axone

au réseau de microtubules. La tête des sous-unités de neurofilaments inhibe la polymérisation des microtubules (1).

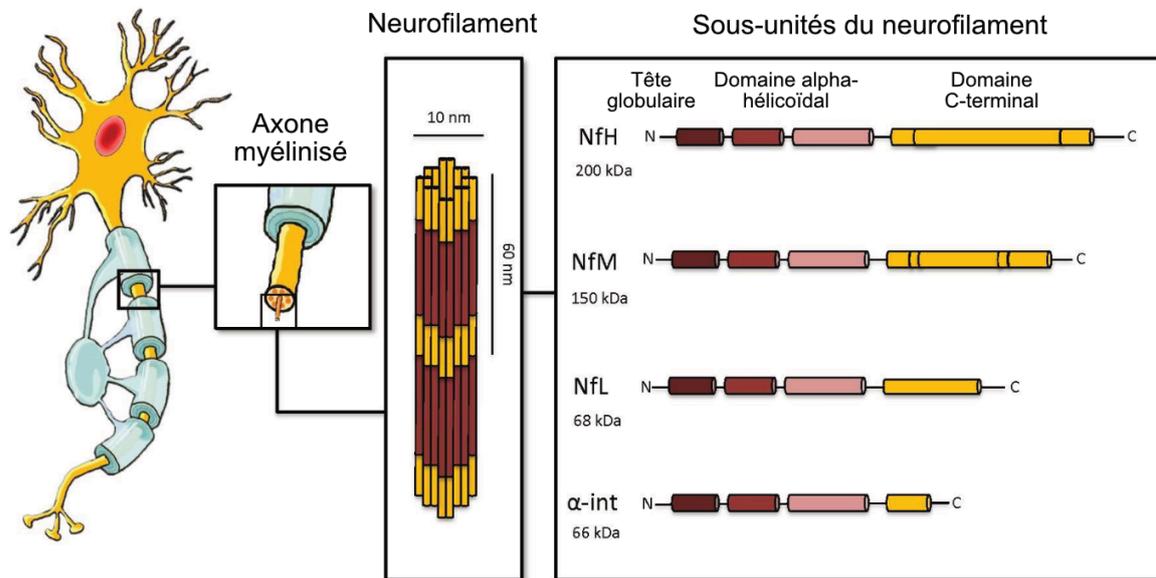


Figure 1 : Structure des neurofilaments (d'après Gaetani 2019 (3))

Les neurofilaments sont exclusivement exprimés dans les neurones, et particulièrement abondants dans l'axone. Ce sont des structures cylindriques de 10 nm de diamètre composées de 4 types de sous-unités dans le SNC : chaînes légères (NfL), chaînes intermédiaires (NfM), chaînes lourdes (NfH) et alpha-internexines. Chaque sous-unité a un domaine N-terminal globulaire variable, un domaine central en hélice alpha hautement conservé, une partie C-terminale variable. La longueur de la partie C-terminale détermine le poids moléculaire des sous-unités.

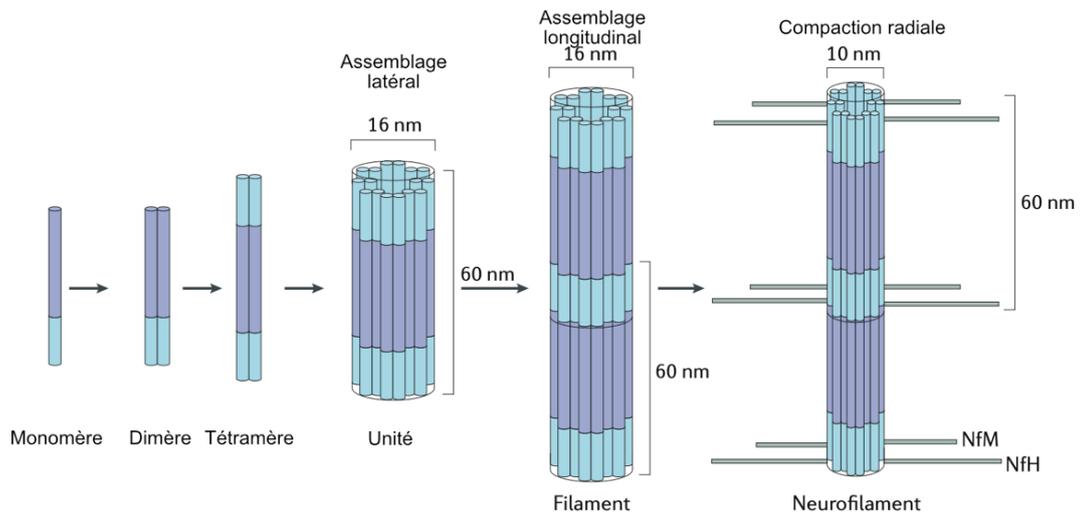


Figure 2 : Assemblage des neurofilaments (d'après Khalil 2018 (4))

Les monomères s'assemblent de façon parallèle en dimères, deux dimères s'assemblent de façon anti-parallèle en tétramères. L'association latérale de 8 tétramères forme une unité cylindrique de 16 nm. L'assemblage longitudinal de ces unités permet l'élongation du neurofilament, dont la compaction forme le neurofilament mature de 10 nm. Les queues C-terminales plus longues des chaînes NfM et NfH se projettent vers l'extérieur des neurofilaments.

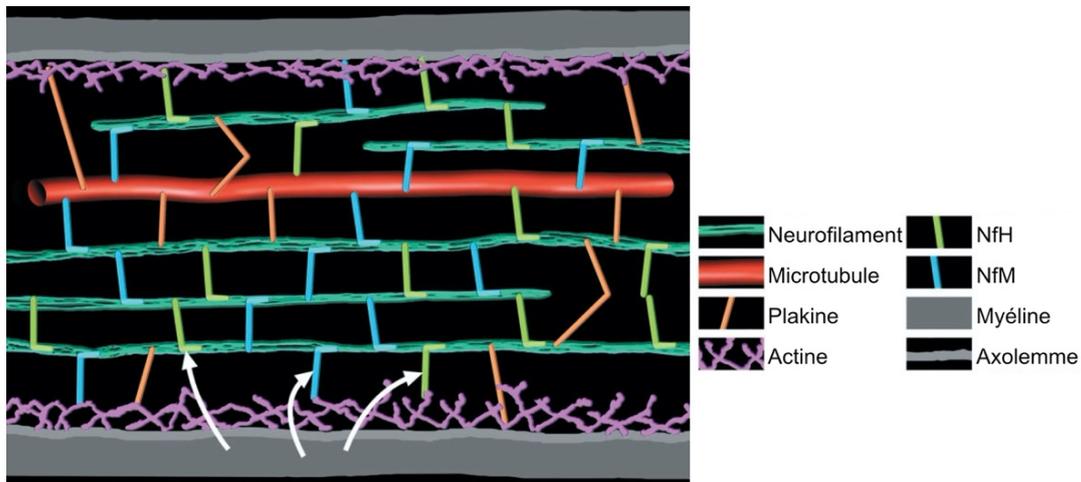


Figure 3 : Modèle de croissance radiale neurofilament-dépendant (d'après Larivière 2004 (5))

Les composants de l'axoplasme sont organisés en réseau tridimensionnel. Les domaines C-terminaux des chaînes de neurofilaments sont liés aux chaînes de neurofilaments voisins et aux autres éléments du cytosquelette (microtubules et filaments d'actine). La gaine de myéline produit des signaux provoquant la phosphorylation des domaines C-terminaux des chaînes de neurofilaments et participant au maintien du diamètre de l'axone.

1.2 Intérêt de la mesure des NfL

En cas de lésion de l'axone ou de mort neuronale, quelle que soit son origine (traumatique, inflammatoire, neurodégénérative ou autre), les chaînes de neurofilaments sont libérées dans le milieu interstitiel du parenchyme cérébral. Le milieu interstitiel est drainé par plusieurs voies (vasculaire, glymphatique, barrière hémato-encéphalique (6)) vers le LCS et le plasma. Les chaînes de neurofilaments atteignent ainsi le LCS, et le plasma en concentration plus faible. Les sous-unités des neurofilaments pourraient donc être de bons marqueurs de la lésion axonale et de la mort neuronale (4).

La plupart des études concernent l'intérêt des chaînes légères des neurofilaments (NfL) en raison de leur relative abondance et de leur solubilité comparativement aux autres sous-unités de neurofilaments (4).

1.3 Techniques de mesure des NfL

On dispose de différentes techniques pour détecter les NfL dans les liquides biologiques. Toutes ces techniques sont des tests immunologiques non compétitifs de type sandwich.

1.3.1 Principe général des techniques de mesure des NfL : tests immunologiques de type sandwich

L'analyte dont on veut mesurer la concentration dans l'échantillon (LCS, plasma ou sérum) se lie à un anticorps de capture spécifique fixé à une phase solide, puis un deuxième anticorps de détection se fixe à un autre épitope de l'analyte. Les anticorps sont en excès par rapport à l'analyte, chaque analyte forme donc un complexe avec les anticorps. L'anticorps de détection est marqué et produit un signal détectable qui augmente avec la quantité d'analyte dans l'échantillon du patient.

Les différentes techniques de dosage commercialisées actuellement diffèrent essentiellement par 1) la nature de la phase solide utilisée 2) la méthode de détection du sandwich.

1.3.2 ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

Les anticorps de capture sont fixés à un puits. L'anticorps de détection est marqué par la biotine, qui se fixe à un conjugué streptavidine-enzyme. Cette enzyme catalyse la transformation d'un substrat incolore en un produit coloré (Figure 4). La détection se fait par spectrophotométrie et l'intensité globale de la coloration dans le puits augmente avec la concentration de l'analyte dans l'échantillon du patient. Cette méthode requiert des volumes élevés et a une sensibilité limitée (pg/ml pour les NFL).

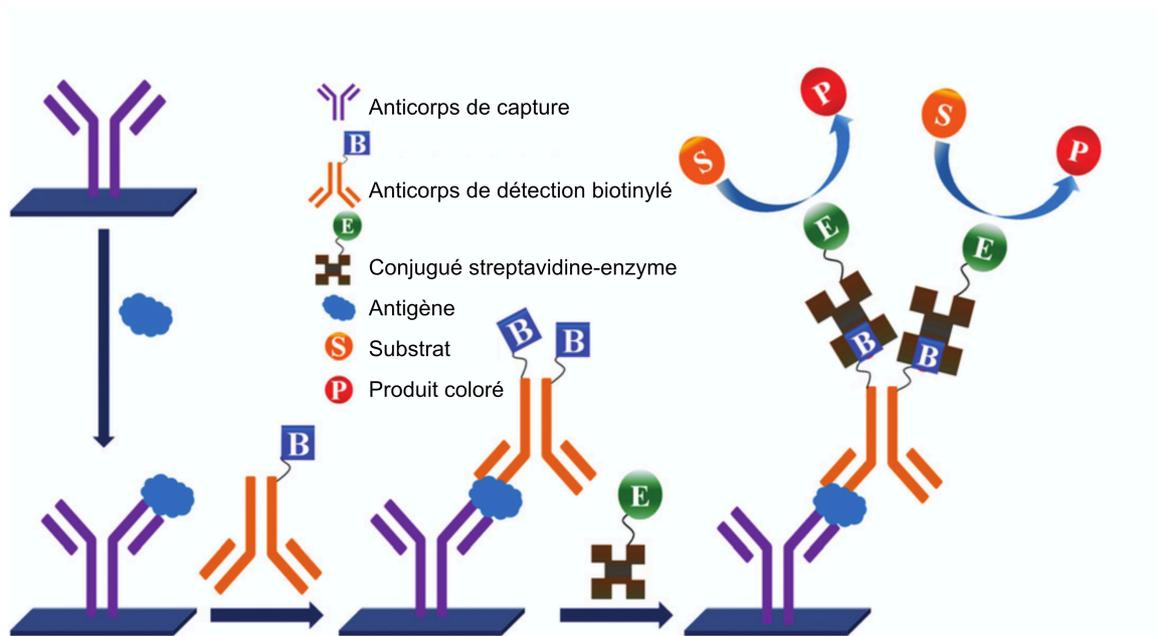


Figure 4 : Principe de l'ELISA avec révélation indirecte par biotine-streptavidine (d'après Nimse, 2016 (7))

L'antigène (l'analyte dont on veut mesurer la concentration) se lie à l'anticorps de capture fixé dans un puits, puis l'anticorps de détection se lie à l'antigène pour former un sandwich. L'anticorps de détection est marqué par la biotine. La biotine se lie avec une forte affinité à la streptavidine, qui est conjuguée à une enzyme catalysant la transformation d'un substrat en un produit coloré détectable par spectrophotométrie. La révélation indirecte par biotine-streptavidine permet d'amplifier le signal car chaque anticorps de détection se lie à de multiples conjugués streptavidine-enzyme. Le signal coloré est proportionnel à la concentration d'antigène dans l'échantillon.

1.3.3 ECL : électrochimiluminescence

Les anticorps de capture sont fixés à des puits intégrant des électrodes (8)(9)(Figure 5). L'anticorps de détection est marqué par une enzyme catalysant la réduction d'un marqueur

chimiluminescent, le ruthénium en présence de tripropylamine (TPA) dans un champ électrique. Le ruthénium émet alors un signal lumineux qui peut être détecté. La réaction peut être contrôlée avec précision par l'application du champ électrique. Le rapport signal/bruit est élevé, et la sensibilité est augmentée par rapport à la méthode ELISA.

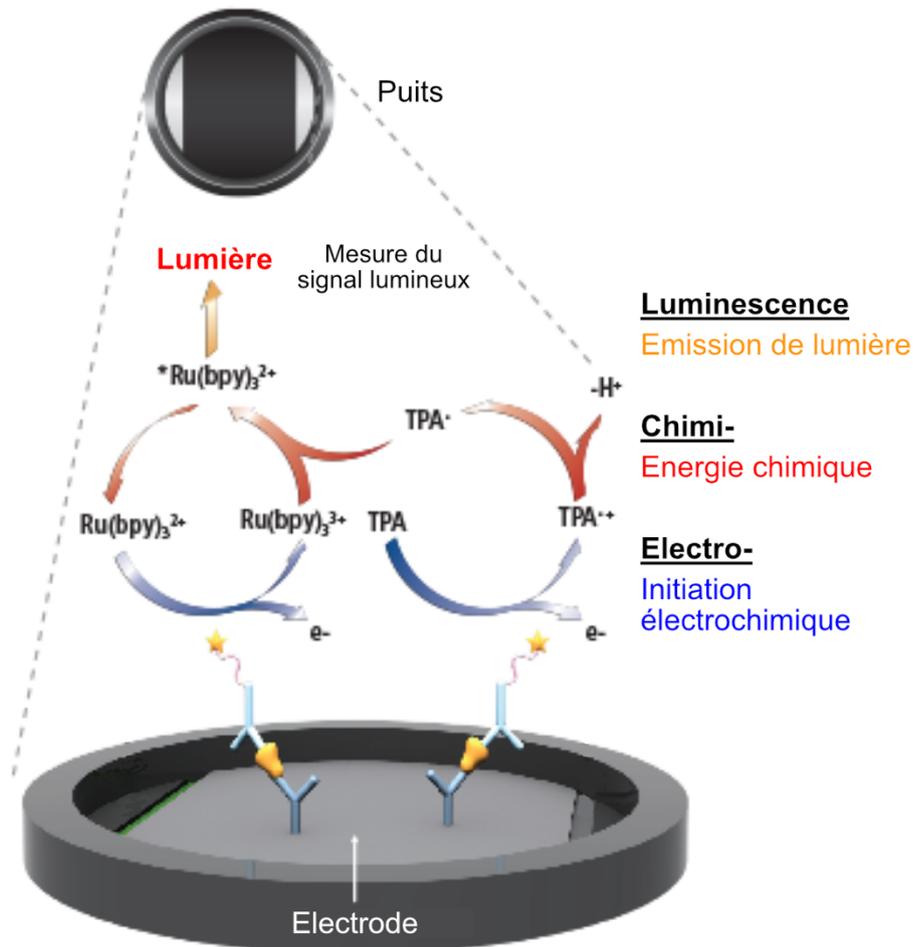


Figure 5 : Principe de l'électrochimiluminescence (d'après Mesoscale (8))

L'analyte est pris en sandwich entre un anticorps de capture fixé dans un puits et un anticorps marqué par une enzyme. Cette enzyme catalyse une réaction produisant un signal lumineux en présence d'un champ électrique. Le puits intègre une électrode, ce qui permet de contrôler la réaction par l'application du champ électrique.

1.3.4 Simoa : single molecule Array

La technique est basée sur les nanotechnologies (10) (Figure 6). Les anticorps de capture sont fixés sur des nano-billes paramagnétiques. Comme pour la méthode ELISA, les anticorps de détection sont marqués par une enzyme catalysant la transformation d'un substrat incolore

en produit fluorescent. Les billes sont en excès par rapport à l'analyte, elles fixent donc au plus une seule molécule de l'analyte dont on veut mesurer la concentration. Les billes sont ensuite placées dans des nano-puits, chaque puits ne contient qu'une bille maximum et un volume de quelques femto-litres de substrat. Une caméra est capable de distinguer les puits vides, de ceux qui contiennent une bille avec un sandwich marqué, des billes nues. Le ratio du nombre de puits contenant une bille fluorescente sur le nombre de puits contenant une bille nue permet de quantifier la concentration de l'analyse dans l'échantillon.

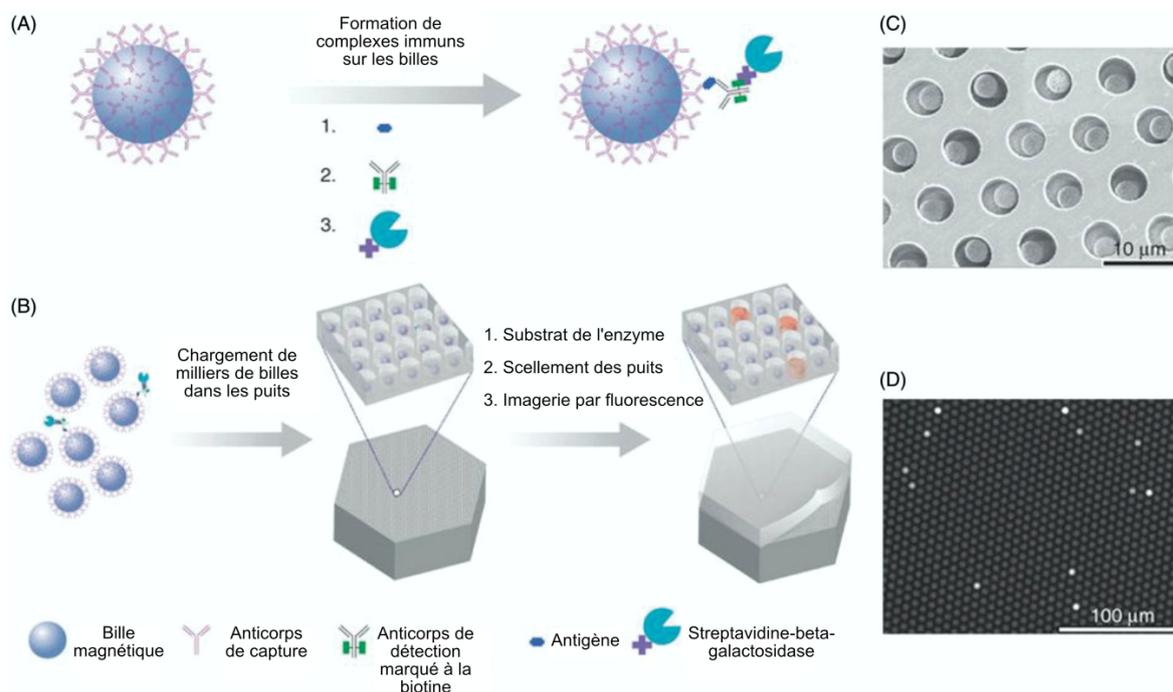


Figure 6 : Principe de la technique Simoa (d'après Wu 2019 (10))

(A) Chaque analyte est pris en sandwich entre une bille paramagnétique recouverte d'anticorps spécifiques et un anticorps marqué par la streptavidine-beta-galactosidase. (B) Les billes sont chargées dans des micro-puits puis de quelques femtolitres avec un substrat fluorogénique. Le signal est lu par une caméra. (C) Vue au microscope électronique des puits, certains contiennent des billes. (D) Signal fluorescent produit par les quelques billes portant un complexe immun

1.3.5 Performances des différentes techniques

L'ELISA et l'électrochimiluminescence (ECL) ont des performances comparables bien que l'ECL ait une sensibilité un peu supérieure à l'ELISA (Tableau 1). La technique Simoa (single molecule Array) est plus récente, elle utilise les nanotechnologies et a permis un gain de sensibilité très important, de l'ordre de 10 fois celle de l'ELISA, grâce à une diminution du bruit de fond liée à l'utilisation de dilutions importantes de l'échantillon et des anticorps. Ce gain de sensibilité permet de détecter et mesurer les NfL dans le sang de façon fiable (Figure 7).

La technique ELISA peut être automatisée, Quanterix propose aussi plusieurs automates permettant d'automatiser sa technique Simoa (HD-X, HD-1).

Tableau 1 : Performances diagnostiques des principales techniques de détection des NfL

Technique	Sensibilité analytique (LOD)	Limite de quantification (LOQ)	Précision	Gamme de linéarité	Taille de l'échantillon requis
ELISA (Notice UmanDiagnostics)	33 pg/ml	81 pg/ml	CV intra-essai : < 5 % (LCS)	100-10 000 pg/ml	50 microL
Anticorps : mAb 47:3, mAb 2:1			CV inter-essai : < 10 %		
ECL d'après Gaiottino (9) (plaques MSD)	15.6 pg/ml	Non précisé	CV intra-essai : 2.7 à 6.8 % (LCS)	15,6-10 000 pg/ml	25 microL
Anticorps : mAb 47 :3, mAb 2 :1			CV inter-essai : 10.3 à 11.7 % (LCS)		
Simoa (Notices Quanterix NF-Light data sheet HD-1/HD-X, Simoa Neurology Assays)	0.038 pg/ml	0.174 pg/ml	CV intra-essai : 3.5 à 7.3 % (plasma)	0- ~450 pg/ml	50 microL (LCS)
			CV inter-essai : 0 à 7.7% (plasma)		50 microL (plasma)

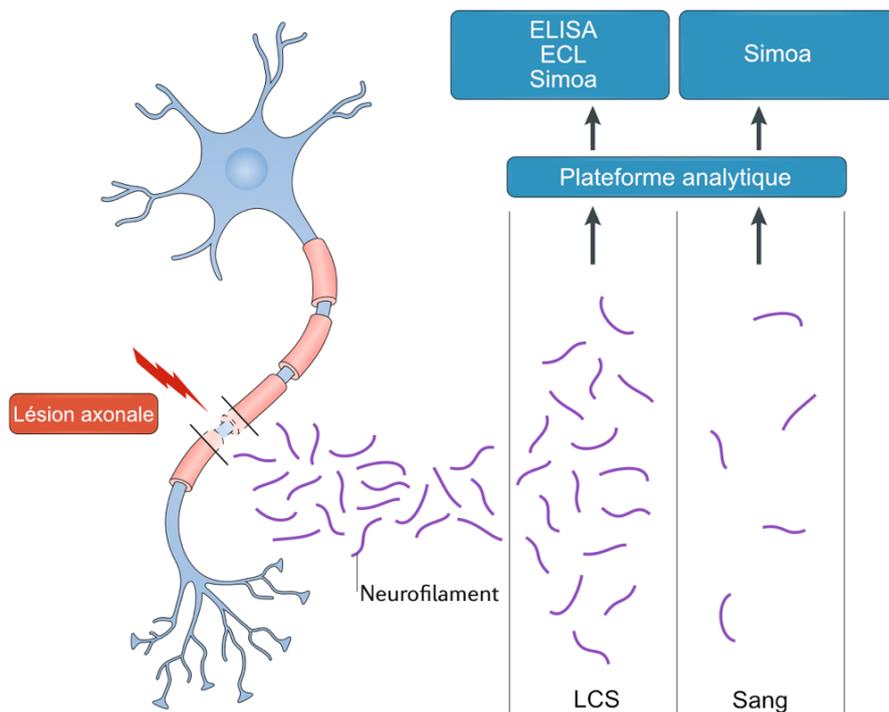


Figure 7 : Libération des neurofilaments lors de lésions axonales (d'après Khalil, 2018 (4))

Quand l'axone est lésé, il libère dans le liquide interstitiel les composants du cytosquelette, dont les NfL, qui passent ensuite dans le LCS, et en moindre concentration, dans le sang. Les techniques de ELISA et ECL permettent de détecter les NfL dans le LCS, mais sont d'une sensibilité trop limitée pour les détecter dans le sang. La technique Simoa est suffisamment sensible pour détecter les NfL dans le sang.

1.4 Apport du dosage des NfL pour la prise en charge des démences

Les démences sont définies par l'altération de fonctions cognitives et/ou comportementales suffisamment sévère pour entraîner une altération de l'autonomie dans la vie quotidienne (11,12). C'est un syndrome dont les causes peuvent être classées en maladies dégénératives et non-dégénératives. La neurodégénérescence est la perte lente et inexorable des cellules nerveuses. La plupart des démences ont au moins une part neurodégénérative, cependant différentes étiologies s'associent et interagissent souvent chez un même patient. Parmi les étiologies non-dégénératives on trouve fréquemment les démences vasculaires (13) et les hydrocéphalies à pression normale. Les symptômes peuvent aussi être causés par des

maladies métaboliques (carences en B12/folates), endocriniennes (hypothyroïdie), infectieuses, ou être des séquelles de traumatisme crânien.

La cause de démence la plus fréquente est la maladie d'Alzheimer. Elle touche un million de personnes en France (14) et sa prévalence, liée à l'âge, est en augmentation régulière. La seconde cause de démence neurodégénérative est la démence fronto-temporale chez les patients de moins de 60 ans, et la démence à corps de Lewy chez les plus de 60 ans.

Le diagnostic de ces maladies est un diagnostic probabiliste qui repose sur le déclin cognitif et l'examen clinique neurologique, l'imagerie, et le dosage de biomarqueurs (11,15). L'examen clinique permet de déterminer le profil des troubles cognitifs, la neuro-imagerie permet de montrer une atrophie des zones du cerveau et d'en déterminer la topographie dans les démences neurodégénératives (par exemple l'atrophie des hippocampes et du cortex temporal proche dans la maladie d'Alzheimer), et d'éliminer certains diagnostics différentiels des démences neurodégénératives (séquelle d'AVC, hydrocéphalie à pression normale, processus expansif). Le bilan biologique plasmatique permet d'éliminer les causes de troubles cognitifs curables (hypothyroïdie, carence en vitamines B12/folates). Dans le cas des diagnostics difficiles, on peut y ajouter la neuro-imagerie métabolique, qui peut montrer un hypométabolisme de régions spécifiques de l'encéphale, la recherche de mutations génétiques responsables de démences héréditaires, et les biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer dans le LCS. La diminution de la protéine β -amyloïde de 42 acides aminés ($A\beta$ -42) et l'augmentation des protéines Tau phosphorylée (Tau-p) et Tau totale (Tau-T) dans le LCS sont le reflet des plaques beta-amyloïdes et neurodégénérescence neurofibrillaire caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.(16) Le profil de ces biomarqueurs permet donc de différencier la maladie d'Alzheimer des autres étiologies de démence.

Le diagnostic de certitude des maladies neurodégénératives repose sur la neuropathologie post-mortem (15). Cependant, les lésions cérébrales apparaissent plusieurs années avant la survenue des premiers symptômes. Ces lésions sont une atrophie due à une mort neuronale de topographie spécifique à l'étiologie sous-jacente : hippocampes et lobes temporaux pour la

maladie d'Alzheimer (17), cortex frontal et temporal pour la démence fronto-temporale (18), régions associatives pour la maladie à corps de Lewy. Il y a également des lésions spécifiques liées à chaque étiologie : plaques beta-amyloïdes et neurodégénérescence neurofibrillaire dans la maladie d'Alzheimer, les corps de Léwy et la synucléopathie dans la démence à corps de Léwy (19).

Il y a actuellement peu de marqueurs biologiques de routine permettant de détecter ces lésions, à l'exception de la maladie d'Alzheimer (15). Plusieurs études ont évalué l'intérêt des chaînes légères de neurofilaments dans le diagnostic des démences (20,21). On observe une augmentation modérée des NfL dans le LCS dans la maladie d'Alzheimer, et une augmentation plus importante dans la démence fronto-temporale. La spécificité des NfL dans le diagnostic de la maladie d'Alzheimer est plus faible que celle des autres marqueurs (peptide bêta-amyloïde A β 1-42, protéines Tau totale et Tau hyperphosphorylée) (16). Les NfL sont libérés dans le parenchyme cérébral, puis dans le LCS et dans le sang de manière non spécifique dès qu'il y a mort neuronale. Des études montrent une augmentation de la concentration des neurofilaments dans le LCS dans de nombreuses maladies neurologiques, qu'elles soient d'origine traumatique, vasculaire, inflammatoire, infectieuse ou neurodégénérative (20). Cependant, dans le cas des démences, elle aurait une bonne valeur pronostique pour prédire la sévérité de l'atrophie cérébrale et des troubles cognitifs (22,23).

Les NfL pourraient également avoir un intérêt particulier dans le diagnostic différentiel des maladies neurologiques et neurodégénérative avec les maladies psychiatriques. Les symptômes cognitifs sont souvent présents dans les maladies psychiatriques telles que la schizophrénie, la dépression majeure et les troubles bipolaires, tandis que les symptômes psychiatriques sont souvent présents dans les maladies neurologiques (24). En particulier, il peut être difficile de distinguer variante comportementale de DFT et schizophrénie (25), or la progression et la prise en charge de ces maladies est très différente d'où l'importance d'un diagnostic correct. Des études ont montré que la concentration de NfL dans le LCS était plus élevée dans les maladies neurologiques que dans les maladies psychiatriques (26). Les NfL

pourraient avoir un intérêt dans le diagnostic des démences fronto-temporales, car leur niveau est particulièrement haut dans le LCS des patients ayant une DFT, alors qu'il est proche de celui des sujets sains dans les maladies psychiatriques (27).

Au vu des études récentes nous avons voulu mettre en place et évaluer ce nouveau biomarqueur au CHRU.

L'objectif de ce travail est :

- de choisir un kit de dosage parmi ceux commercialisés
- d'évaluer les performances de ce kit de dosage au laboratoire et de valider sa mise en place au laboratoire
- de comparer le taux NfL entre différentes étiologies de démences dans deux cohortes de patients atteints de troubles cognitifs, l'une avec des diagnostics étiologiques cliniques de ces troubles cognitifs, l'autre avec des diagnostics anatomopathologiques

2 Matériel et méthodes

2.1 Patients

On inclut dans cette étude rétrospective des patients ayant eu un prélèvement de LCS de routine dans le service de neurologie C et le CMRR du CHRU de Lille (Pr. F. Pasquier). Pour un premier groupe de 25 patients, qu'on nommera « cohorte anatomopathologique », on dispose d'un diagnostic de certitude anatomopathologique de dégénérescence lobaire fronto-temporale (DLFT), de dégénérescence cortico-basale (DCB), de paralysie supra-nucléaire (PSP) ou de maladie d'Alzheimer (MA). Les analyses anatomopathologiques ont été réalisées dans le service d'anatomopathologie du CHRU de Lille (Pr. CA. Maurage, Pr. V. Deramecourt). Le second groupe, dénommé « cohorte clinique » a été sélectionné au hasard parmi ceux ayant bénéficié d'un dosage des marqueurs de la maladie d'Alzheimer dans le LCS. Parmi ces patients, 34 ont été sélectionnés parmi ceux dont les dosages de protéine t-Tau et p-Tau étaient élevés, et 46 autres parmi ceux dont les dosages de protéine t-Tau et p-Tau étaient normaux. Cela permet de constituer un groupe de patients ayant probablement une maladie d'Alzheimer, et un groupe ayant probablement d'autres types de démences, dont les démences fronto-temporales (DFT). Ces patients ont ensuite été classés selon le diagnostic de probabilité établi par les neurologues en fonction de la clinique, de l'imagerie et des biomarqueurs.

2.2 Contrôles de qualité :

Les contrôles internes sont des pools de LCS de patients du CHU, les contrôles externes sont fournis par l'Alzheimer's Association QC Program (Round 31 A B QC-L et round 33 A B QC-L).

2.3 Pré-analytique :

Les échantillons de LCS ont été prélevés selon le protocole habituel pour le dosage des biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer du CHRU de Lille. Ils sont prélevés dans un tube

TUBE Sarstedt 10 ml en polypropylène, transférés dans la glace au laboratoire, centrifugés, aliquotés et conservés à -80°C.

2.4 Analytique :

Les dosages ont été réalisés au CBP dans l'UF de Neurobiologie (Pr. B. Sablonnière). Les NfL ont été dosés quantitativement dans le LCS de tous les patients inclus, par technique immuno-enzymatique (ELISA) avec le kit de réactifs UmanDiagnostics NF-light (Neurofilament light) ELISA (10-7001 CE, Umea, Suède). La plaque a été préparée selon les instructions du manuel. L'étalonnage a été réalisé avec la solution fournie dans le kit (transformation à 4 paramètres de Marquardt, avec les niveaux d'étalonnage : 0, 100, 500, 1000, 2500, 10000 pg/ml), et la plaque lue avec un lecteur de plaque de microtitration capable de lire l'absorbance à 450 nm (Eon de Biotek avec le logiciel Gen5). Les résultats sont rendus en pg/ml.

2.5 Post-analytique, interprétation :

Des intervalles de de références sont définis par le fournisseur (Tableau 2) :

- sur un échantillon de 50 sujets sains ne montrant aucun signe de maladie neurologique et répartis selon trois classes d'âge,
- comme la moyenne du taux NfL dans chaque classe d'âge + 2 écarts-types.

Tableau 2 : Valeurs de référence des NfL dans le LCS (pg/ml)

Age	Taux de référence
< 30 ans	< 290 pg/ml (n= 17)
30 – 39 ans	< 380 pg/ml (n = 15)
40- < 60 ans	< 830 pg/ml (n = 18)

2.6 Vérification/validation de méthode

Le kit UmanDiagnostics (Umea, Suède) pour le dosage des NfL est marqué CE, et sera utilisé dans les conditions préconisées par le fabricant, nous ferons donc une vérification des performances de cette méthode (selon la norme NF EN ISO 15189).

2.7 Statistiques

Les niveaux de NfL ont été comparés avec un test de Wilcoxon-Mann-Whitney pour les comparaisons entre 2 groupes, et avec le test de Kruskal-Wallis pour les comparaisons entre groupes multiples. Ces tests ont été choisis en raison de leur bonne robustesse compte tenu du faible nombre d'observations dans les groupes comparés.

3 Résultats

3.1 Technique

3.1.1 Choix du kit

3 techniques majeures sont utilisées pour doser les NfL : l'ELISA, l'électrochimiluminescence, et le Simoa (28). Nous avons choisi le kit NF-light ELISA fourni par UmanDiagnostics (Umea, Suède) parce qu'il est robuste et validé (29)(30), parce qu'il existe des contrôles de qualité externes pour l'évaluer et parce que c'est le kit le plus utilisé dans la littérature (31). Il ne nécessite que du matériel déjà présent dans les laboratoires hospitaliers (lecteur et agitateur pour plaque ELISA, micropipettes, tube...) en complément des composants fournis dans le kit. Cependant, en raison d'un manque de sensibilité, il se limite au dosage des NfL dans le LCS. Le dosage des NfL dans le sang, où leur concentration est plus faible que dans le LCS (28), nécessiterait le passage à la technique Simoa, qui nécessite un automate spécifique (HD-X, HD-1 ou SR-X de Quanterix), qui est non disponible au CHRU de Lille.

3.1.2 Evaluation du kit

Le kit de dosage des NfL Uman Diagnostics est marqué CE.

3.1.2.1 Répétabilité

La répétabilité a été évaluée avec un pool de LCS. On obtient CV de 6.7% sur 8 mesures.

Tableau 3 : Evaluation de la répétabilité

Echantillon	Nombre de valeurs	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire	Conclusion
LCS	8	1393	93	6.7	< 5%	ND	Acceptable

ND : données non disponibles

3.1.2.2 Fidélité intermédiaire :

La fidélité intermédiaire a été évaluée avec 2 pools de LCS. Le premier pool a un CV de 11.4% pour une moyenne à 644 pg/ml sur 10 mesures. Le second a un CV de 11.3% pour une moyenne à 650 pg/ml sur 12 mesures.

Tableau 4 : Evaluation de la reproductibilité

Echantillon	Nombre de valeurs	Moyenne (pg/ml)	Ecart-type (pg/ml)	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire	Conclusion
LCS	10	644	73.4	11.4	< 5%	13%	Conforme
	12	650	73.5	11.3	< 5%	13%	Conforme

CV retenu par le laboratoire : citer le programme (forme ?) selon programme européen de contrôle externe de Qualité : « www.neurochem.gu.se/theAlzAssQCprogram »

3.1.2.3 Contrôles externes

Les contrôles externes sont comparés au groupe de pairs et sont conformes (inclus dans l'intervalle +/- 1ET).

Tableau 5 : Contrôles externes

Echantillon	Contrôle	Valeur labo (pg/ml)	Cible (groupe de pairs) (pg/ml)	Ecart-type (groupe de pairs) (pg/ml)	CV (groupe de pairs) (%)	Biais (%) / groupe de pairs	Conclusion
LCS	31A	803	916	170	19%	-12	Conforme
	31B	1536	1922	524	27%	-20	Conforme
LCS	33A	990	969	127	13%	-2.2	Conforme
	33B	1979	2021	181	9%	-2.1	Conforme

3.2 Application du test sur des patients du CHRU de Lille

3.2.1 Description des 2 cohortes

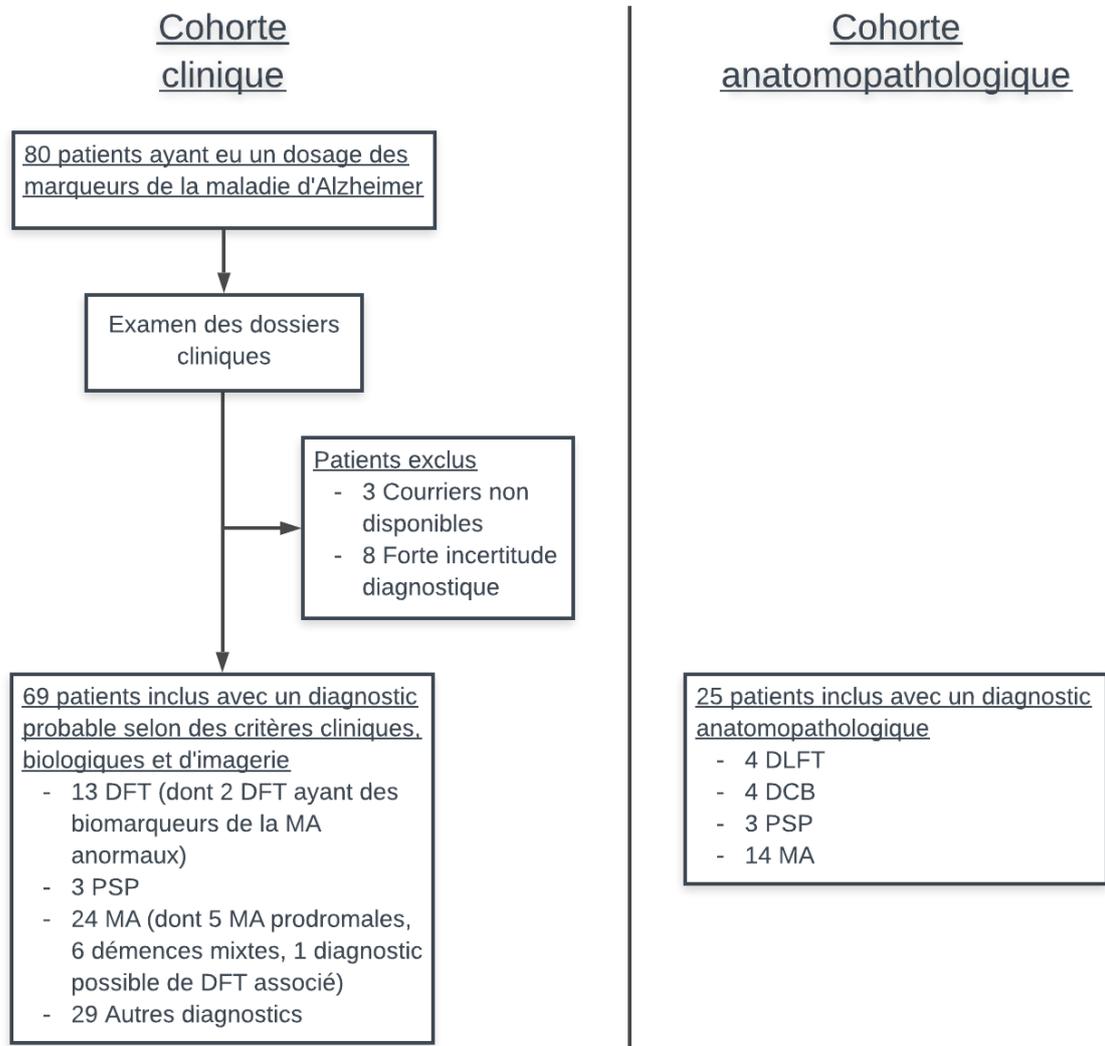


Figure 8 : Description des 2 cohortes

DCB : dégénérescence cortico-basale, DFT : démence fronto-temporale, DLFT : dégénérescence lobaire fronto-temporale, MA : maladie d'Alzheimer, PSP : paralysie supra-supranucléaire progressive

80 patients ont été sélectionné parmi ceux ayant eu un dosage des biomarqueurs de MA : 46 avec des concentrations de T-Tau et P-Tau normaux dans le LCS et 34 avec des concentrations élevées. Parmi ces 80 patients, 69 ont été inclus avec un diagnostic probable

établi par un neurologue selon des critères cliniques, biologiques et d'imagerie. 25 patients ont été inclus avec un diagnostic anatomopathologique : 4 DLFT, 4 DCB, 3 PSP, 14 MA.

3.2.1.1 Classification des patients de la cohorte « clinique » selon leur diagnostic

Parmi les 34 patients sélectionnés pour leurs niveaux de marqueurs de MA anormaux, 24 avaient effectivement un diagnostic de maladie d'Alzheimer, 2 avaient une DFT, 2 avaient d'autres diagnostics (angiopathie amyloïde, hydrocéphalie à pression normale associée à des lésions vasculaires), 4 n'avaient pas de diagnostic probable et il n'y avait pas de courriers disponibles pour classer les 2 patients restants.

Parmi les 46 patients sélectionnés pour leurs niveaux de marqueurs de MA normaux, il n'y avait aucun patient ayant une maladie d'Alzheimer, 11 patients avaient une DFT, 3 avaient une PSP, 27 patients avaient d'autres diagnostics (hydrocéphalie à pression normale, démence vasculaire, démence à corps de Léwy, séquelle traumatisme crânien, troubles cognitifs légers, démence pugilistique, dépression), de 4 n'avaient pas de diagnostic probable, et il n'y avait pas de courrier disponible pour le patient restant.

Au total, dans ce groupe, on trouve 24 MA, 13 DFT, 3 PSP et 29 autres diagnostics.

3.2.2 Taux de NfL dans les différents groupes de diagnostics

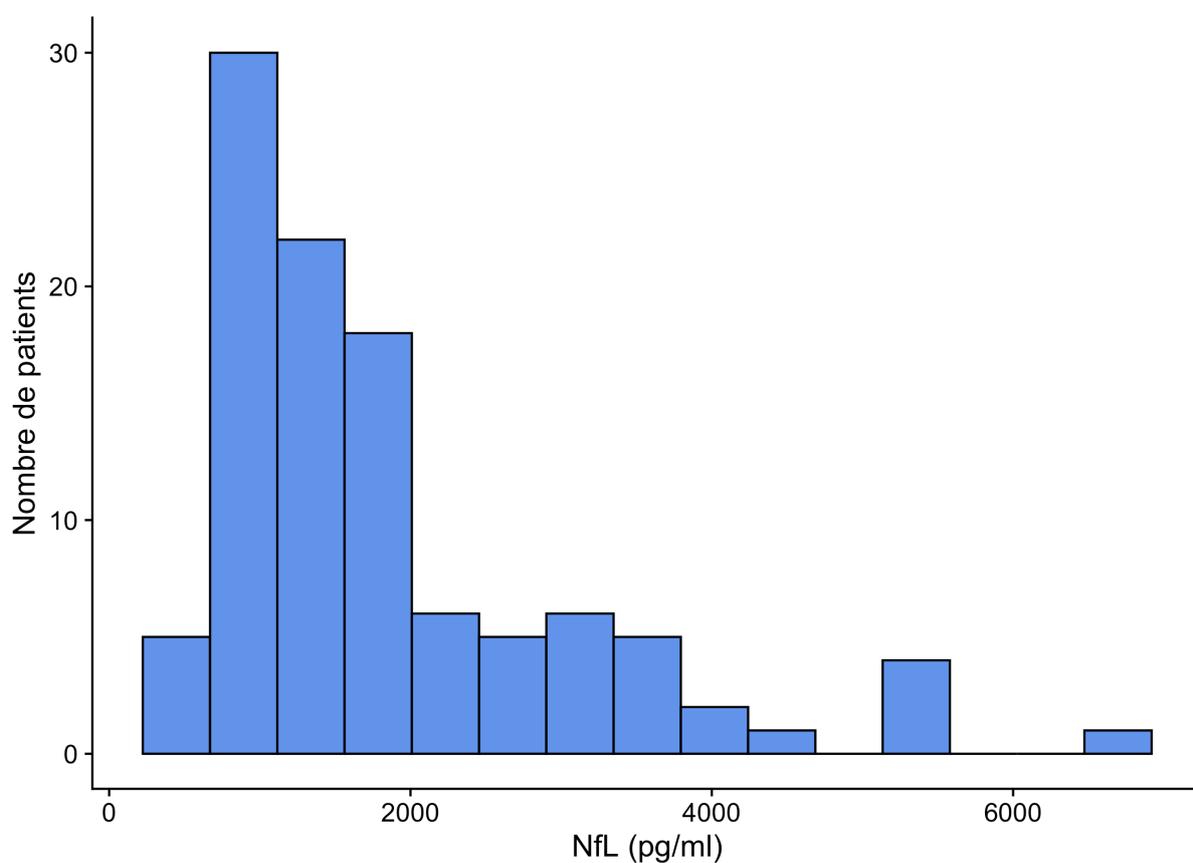


Figure 9 : Distribution des NfL (en pg/ml) chez l'ensemble des patients inclus : cohorte anatomopathologique et clinique

La médiane du taux de NfL est à 1530 pg/ml chez l'ensemble des patients (Figure 9). La distribution du taux de NfL est asymétrique à droite : la majorité des patients (72%) a un taux de NfL inférieur à 2000 pg/ml, 24 % de 2000 à 4500 et on observe quelques valeurs élevées, entre 4500 et 6500 pg/ml.

3.2.2.1 Cohorte « clinique »

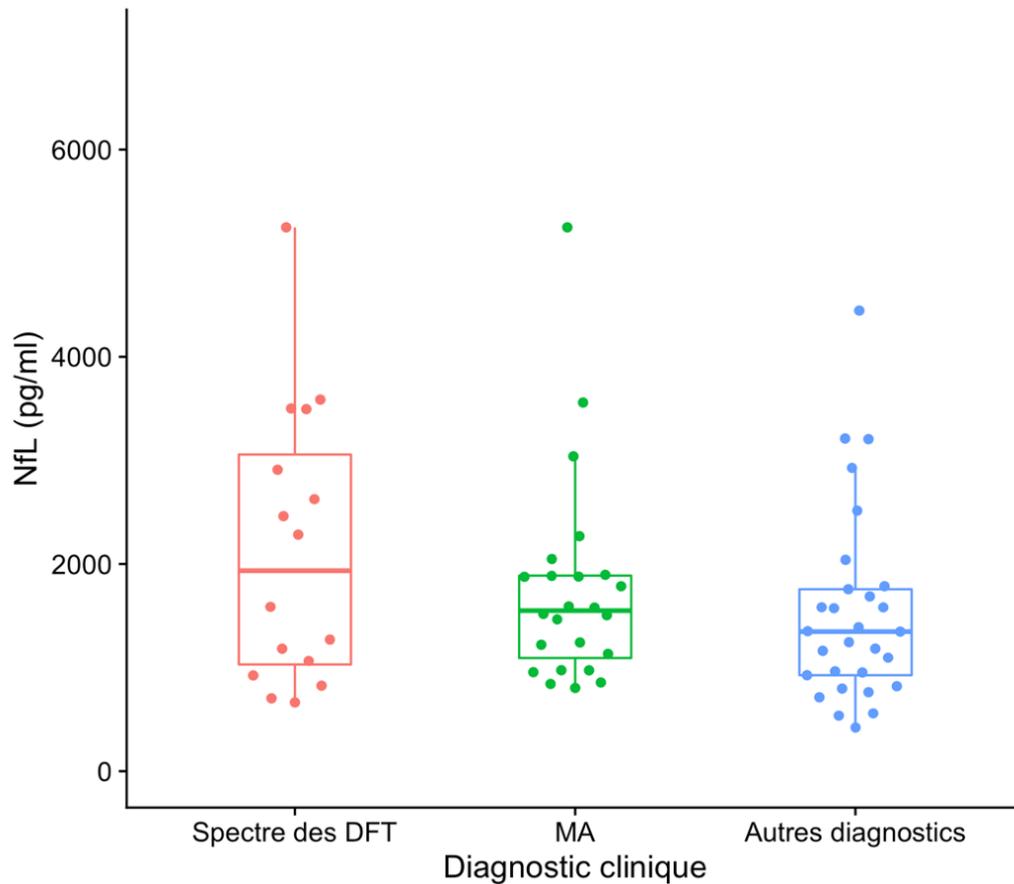


Figure 10 : Concentration des NfL en fonction des diagnostics cliniques

Spectre des DFT : démences fronto-temporales, MA : maladie d'Alzheimer, Autres diagnostics : Autres étiologies de démence. Le groupe des DFT inclut les DFT et les PSP (paralysies supra-nucléaires progressives).

Dans la cohorte « clinique », la médiane du taux de NfL est de 1936 pg/ml dans le spectre des DFT (incluant les DFT et les PSP), 1550 pg/ml dans les MA, 1348 pg/ml dans les autres diagnostics, sans différence significative retrouvée entre les groupes ($p = 0.2765$).

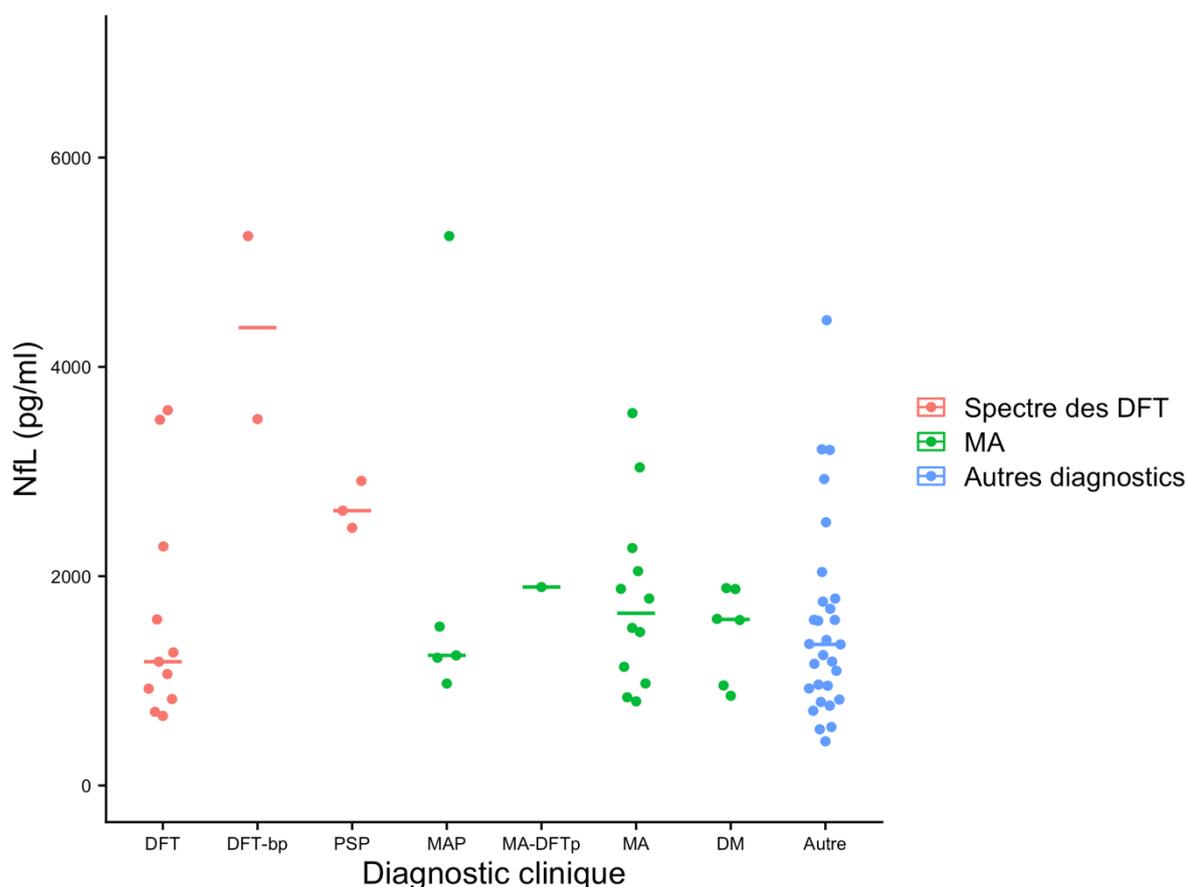


Figure 11 : Concentration des NfL en fonction des sous-groupes diagnostics cliniques

DFT : démence fronto-temporale, DFT-bp : démence fronto-temporale avec biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer positifs, PSP : paralysie supra-nucléaire progressive, MAP : maladie d'Alzheimer prodromale, MA : maladie d'Alzheimer, DM : démences mixtes, Autre : Autres étiologies de démence. Barres horizontales : médianes.

Parmi les patients classés dans le spectre des DFT, nous avons séparé les patients en plusieurs sous-groupes (Figure 11)(32):

- les DFT (comportant les DFT à variante comportementale et les aphasies primaires progressives)
- les DFT avec biomarqueurs de la MA positifs (DFT-bp)
- les paralysies supra-nucléaires progressives (PSP)

Ces 3 sous-groupes ont des concentrations moyennes en NfL différentes. La médiane du taux de NfL est de 1183 pg/ml dans les DFT (Tableau 6). Les deux patients ayant des DFT et des biomarqueurs de la MA positifs ont des concentrations de NfL particulièrement élevées, avec un maximum supérieur à 5250 pg/ml. Les PSP ont également des concentrations de NfL élevées, de 2462 pg/ml à 2910 pg/ml.

Les patients ayant une MA ont également été divisés en 4 sous-groupes :

- MA prodromale
- MA probable avec un diagnostic possible de DFT
- MA n'entrant pas dans les 3 autres catégories
- Démences mixtes

Ces 4 sous-groupes ont des concentrations moyennes de NfL relativement proches. Parmi les MA, les MA prodromales ont les concentrations les plus faibles avec une médiane à 1243 pg/ml, il y a cependant une valeur supérieure à 5250 pg/ml dans ce groupe. Les MA et les démences mixtes ont des concentrations de NfL comparables, avec des médianes proches de 1600 pg/ml, le patient ayant une MA probable avec un diagnostic possible de DFT est aussi comparable à ces groupes avec un taux de 1896 pg/ml.

Enfin le groupe « Autres diagnostics » est très hétérogène, avec des concentrations de 422 à 4446 pg/ml.

Les distributions des taux de NfL dans tous les groupes est asymétrique, avec quelques valeurs très élevées. Certains groupes de diagnostic n'ont que très peu de patients ce qui rendrait l'interprétation d'éventuels tests statistiques difficile.

Tableau 6 : Description de la cohorte « clinique »

Diagnostic	Nombre de patients	Age médian (années)	NfL (pg/ml)		
			Minimum	Maximum	Médiane
DFT	11	72	665	3586	1183
DFT-bp	2	73	3501	5250	4376
PSP	3	82	2462	2910	2626
MAP	5	68	974	5250	1243
MA-DFTp	1	83	1896	1896	1896
MA	12	71	804	3558	1646
DM	6	79	857	1886	1586
Autre	29	78	422	4446	1348

DFT : démence fronto-temporale, DFT-bp : démence fronto-temporale avec biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer positifs, PSP : paralysie supra-nucléaire progressive, MAP : maladie d'Alzheimer prodromale, MA : maladie d'Alzheimer, DM : démences mixtes, Autre : Autres étiologies de démence.

3.2.2.2 Cohorte « anatomopathologique »

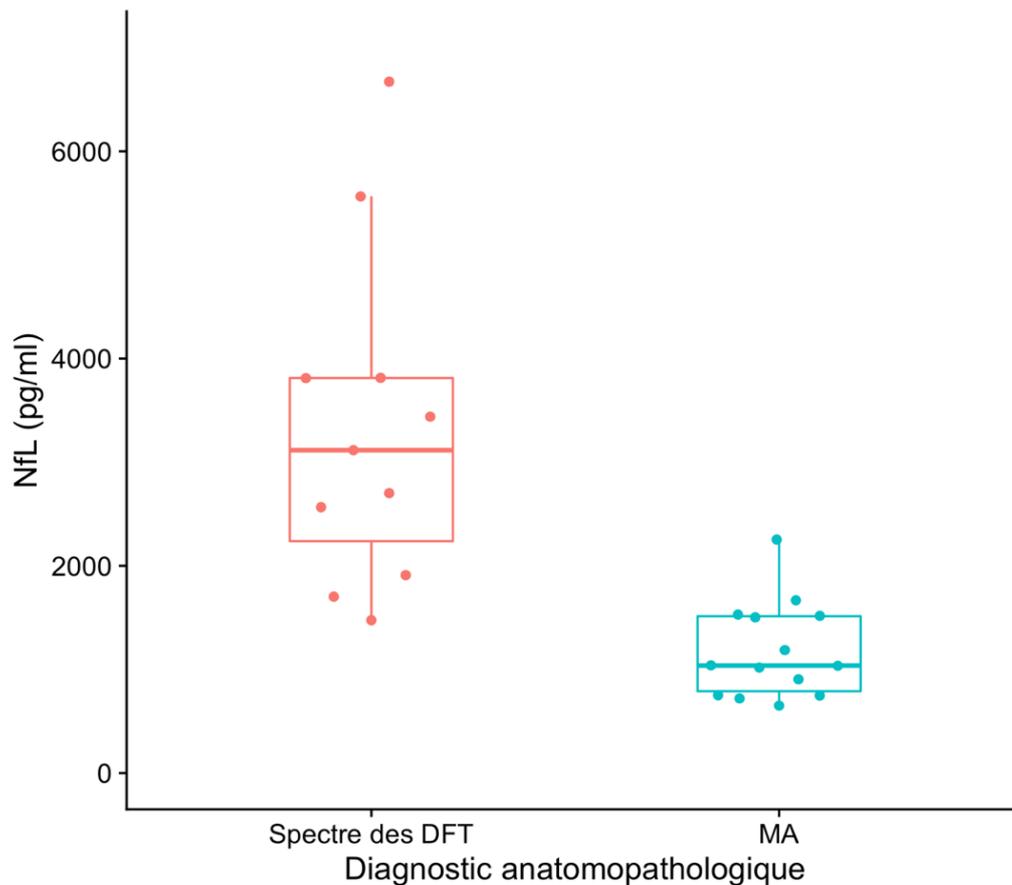


Figure 12 : Concentration des NfL en fonction des diagnostics anatomopathologiques

DFT : démence fronto-temporale, MA : maladie d'Alzheimer. Le groupe du spectre des DFT inclut les DFT, PSP (paralysies supra-nucléaires progressives) et DCB (dégénérescences cortico-basales)

Dans la cohorte « anatomopathologique » (Figure 12), la médiane des NfL est plus élevée dans le groupe du spectre des DFT que dans celui des MA, avec un taux de 3116 pg/ml dans le groupe des DFT (qui inclut les PSP et DCB) et de 1037 pg/ml dans le groupe des MA. Il existe une différence significative dans les 2 groupes ($p < 0.001$).

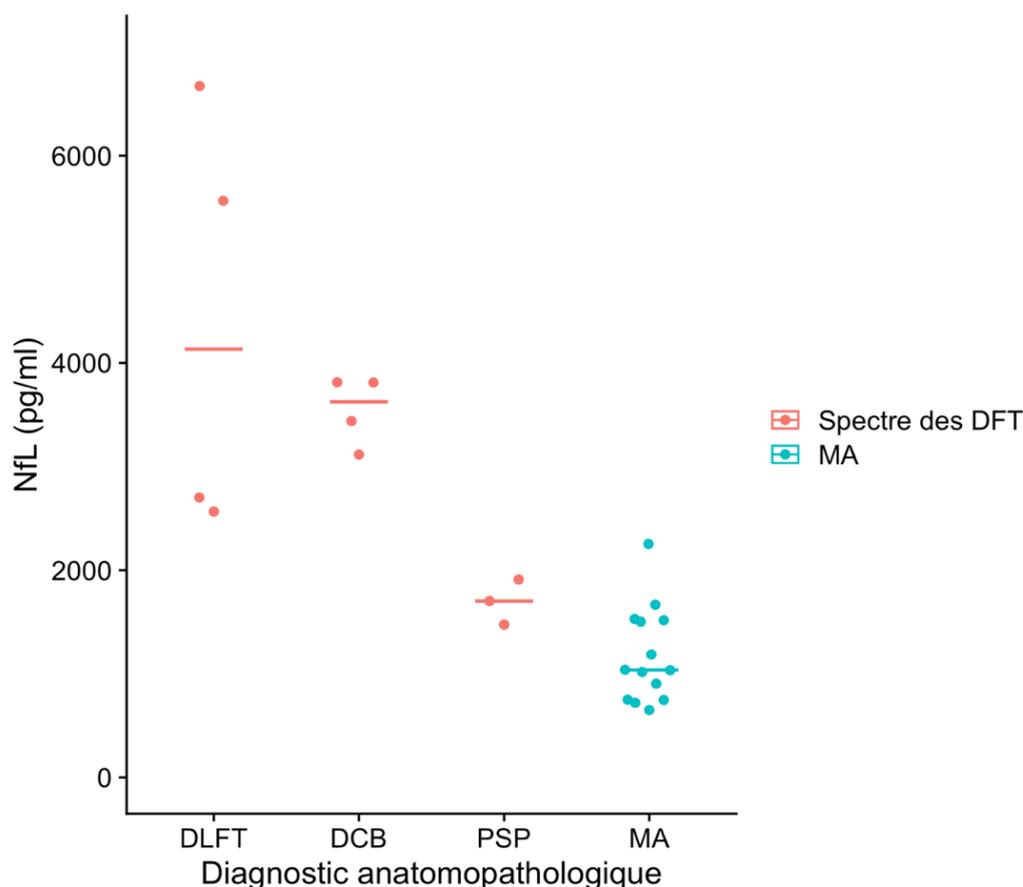


Figure 13 : Concentration des NfL en fonction des sous-groupes de diagnostics anatomopathologiques

DLFT : dégénérescence lobaire fronto-temporale, DCB : dégénérescence cortico-basale, PSP : paralysie supra-nucléaire progressive, MA : maladie d'Alzheimer. Barres horizontales : médianes.

Le groupe de DFT peut être scindé en 3 sous groupes (Figure 13):

- dégénérescences lobaires fronto-temporales (DLFT)
- dégénérescence cortico-basale (DCB)
- paralysie supra-nucléaire progressive (PSP)

Les taux de NfL sont plus élevés dans le groupe des DLFT et des DCB que dans celui des PSP et des MA, avec une médiane à 4133 pg/ml pour les DLFT et à 3625 pg/ml pour les DCB, tandis que celle des PSP est à 1702 pg/ml et celle des MA à 1586 pg/ml (Tableau 7 : Description de la cohorte « anatomopathologique ». Malgré son faible effectif, le groupe des DFT comporte 2 valeurs très élevées : 5565pg/ml et 6672 pg/ml : il s'agit de DLFT-TDP (forme

de DLFT avec agrégats de protéines TDP). Les deux valeurs les plus basses correspondent à un diagnostic de DLFT-TDP et un diagnostic de FTDL-FUS.

Tableau 7 : Description de la cohorte « anatomopathologique »

Diagnostic	Nombre de patients	Age médian (années)	NfL (pg/ml)		
			Minimum	Maximum	Médiane
DLFT	4	54,5	2566	6672	4133
DCB	4	64,5	3116	3814	3625
PSP	3	63	1475	1910	1702
MA	14	61	651	2253	1037

DLFT : dégénérescence lobaire fronto-temporale, DCB : dégénérescence cortico-basale, PSP : paralysie supra-nucléaire progressive, MA : maladie d'Alzheimer

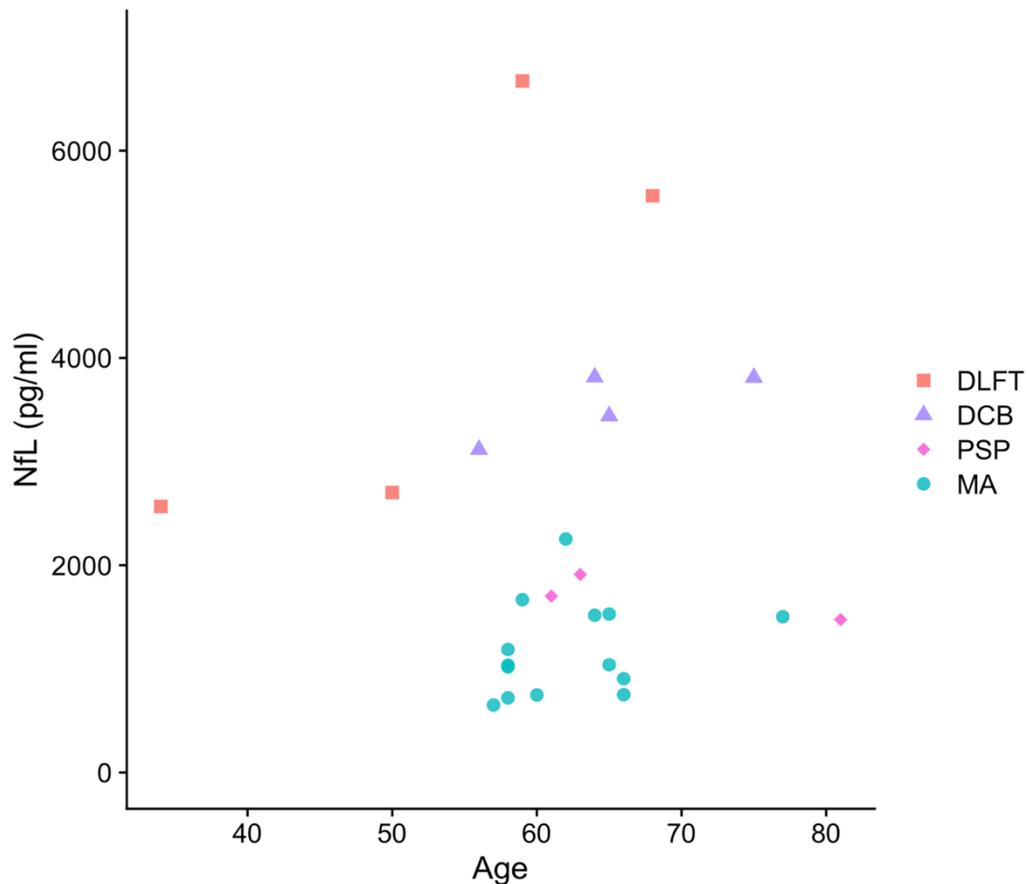


Figure 14 : Concentration des NfL en fonction de l'âge et des diagnostics anatomopathologiques

DLFT : dégénérescence lobaire fronto-temporale, DCB : dégénérescence cortico-basale, PSP : paralysie supra-nucléaire progressive, MA : maladie d'Alzheimer.

Notre cohorte comporte des patients d'âges variés dans le groupe des DFT (Figure 14), avec les patients les plus jeunes dans le groupe des DLFT (34 et 50 ans), alors que les patients du groupe des patients ayant une MA avaient tous plus de 55 ans lors du prélèvement. On n'observe pas de valeurs plus élevées des concentrations de NfL avec l'âge dans le groupe des MA et des PSP. Dans celui des DCB et des DLFT, la concentration de NfL est plus élevée chez les patients les plus âgés. Un seuil proche de 2200-2400 pg/ml permettrait de séparer le groupe des DLFT et des DCB de celui des PSP et MA quel que soit l'âge.

4 Discussion

Dans notre étude, nous avons mis en place au laboratoire la technique de dosage des NfL dans le LCS avec le kit UmanDiagnostics (Umea, Suède). Ce kit est le plus utilisé dans la littérature pour le dosage des NfL dans le LCS (21)(31).

Notre évaluation de cette technique au CBP a montré une bonne répétabilité, une bonne reproductibilité et des contrôles de qualité externes conformes, ce qui permet de la valider. Ses performances sont bien connues, une étude multicentrique (30) incluant 6 laboratoires a évalué le CV de répétabilité à 3.7% en moyenne, avec un maximum de 7.1%, le CV de reproductibilité à 13.5% en moyenne. Ces CV sont comparables à ceux que nous avons trouvés dans notre étude. D'autre part, 2 EEQ conformes ont permis de valider ces dosages dans la perspective d'une éventuelle pratique clinique.

Le choix du kit le plus fréquemment utilisé dans la littérature nous a aussi permis de vérifier la cohérence avec la littérature de nos résultats de dosage dans nos deux cohortes. En effet les taux de NfL ne peuvent être comparés entre eux s'ils sont mesurés par des techniques différentes, car il n'existe pas d'étalon international pour les NfL. On ne comparera donc nos résultats qu'à des études utilisant le kit UmanDiagnostics.

Dans la cohorte clinique, le taux de NfL est plus élevé dans les DFT que dans les MA, et plus élevé dans ces deux groupes que dans le groupe « Autres diagnostics ». Cette différence entre les groupes n'est cependant pas significative. Une méta-analyse (20) comparant le taux de NfL dans différents groupes de patients classés selon un diagnostic clinique de maladie neurologique a montré un taux de NfL deux fois plus élevé en moyenne dans les DFT comparé aux MA, avec un taux médian pour les DFT comparable à celui de notre étude, et un taux médian pour les MA plus bas que dans notre étude, autour de 1000 pg/ml. Cette différence pourrait s'expliquer par le faible nombre de patients dans notre cohorte, ou par des démences

à un stade plus sévère dans notre groupe des MA. Les MA et démences mixtes avaient des concentrations de NfL similaires dans cette méta-analyse, et plus élevées que dans les troubles cognitifs légers. Nous avons observé des concentrations de NfL proches entre les sous-groupes des MA et des démences mixtes dans notre étude, et des concentrations en moyenne plus faibles dans le sous-groupe des MA prodromales. Nous avons observé un taux de NfL dans les PSP un peu plus élevé que dans les autres DFT, ce qu'on ne retrouve pas dans la méta-analyse, cependant les distributions de ces 2 groupes sont proches et notre différence pourraient être due au très faible nombre d'observations dans le groupe des PSP.

Dans la cohorte des diagnostics anatomopathologiques, le taux de NfL est plus élevé dans DLFT que dans les DCB, plus élevé dans les DCB que dans les PSP, et ces 3 groupes sont plus élevés que dans les MA. Nous n'avons pas trouvé d'étude comparant le taux de NfL entre DFT et MA avec des diagnostics anatomopathologiques. Une étude incluant 10 patients avec un diagnostic anatomopathologique de DLFT (33) a montré des taux de NfL plus élevés dans les DLFT-TDP que dans DLFT-FUS, et des taux plus élevés dans ces deux groupes que dans les DLFT-Tau. Une autre étude (34), incluant des diagnostics certains (anatomopathologiques ou biomoléculaires) de DLFT a également montré que le taux de NfL était plus élevé dans les DLFT-TDP que dans les DLFT-Tau. Néanmoins on observe aussi des valeurs faibles dans le groupe des DLFT-TDP, qui est un groupe hétérogène en taux de NfL. Dans ces deux études, les NfL étaient mesurés avec un kit ELISA différent du nôtre ce qui ne permet pas de comparaison directe des taux avec notre technique. Cependant, nous avons observé que nos valeurs élevées de NfL correspondaient à des FTLD-TDP, et que les 2 valeurs plus faibles correspondaient à un diagnostic de FTLD-TDP et un diagnostic de FTLD-FUS. Ces résultats sont donc semblables à ceux des 2 études.

L'ensemble de nos résultats pour les 2 cohortes sont donc cohérents avec la littérature. Cependant pour interpréter les taux de NfL, la question se pose de définir des valeurs de référence. Le taux de NfL est plus élevé dans les démences que chez les sujets sains (20).

Nous n'avions pas de groupe contrôle de patients sains pour à comparer aux patients atteints de démence.

Le taux de NfL augmente également avec l'âge chez les patients atteints de démence, à l'exception des DFT où le taux de NfL est élevé chez les patients jeunes et où on observe peu de variation avec l'âge.(20). Ce n'est pas ce qu'on observe dans notre cohorte anatomopathologique, où le taux de NfL varie peu avec l'âge ans le groupe des MA, et où il est plus élevé chez les patients plus âgés dans le groupe des DFT. Ces groupes incluent toutefois très peu de patients.

Dans notre cohorte anatomopathologique, il est possible de définir un seuil ne dépendant pas de l'âge, à 2200-2400 pg/ml, permettant de séparer les sous-groupes des DLFT et DCB des sous-groupes des PSP et MA. Cependant la distribution du taux de NfL des groupes MA et du spectre des DFT-incluant DLFT, DCB et PSP-se chevauche. Dans la cohorte clinique, le taux de NfL ne permet pas non plus de séparer DFT, MA et autres diagnostics. Les NfL sont donc d'un intérêt limité pour identifier les démences entre elles en raison de distributions mal séparées les unes des autres dans les différents diagnostics (21). Ce n'est pas un bon marqueur diagnostic pour différencier les causes de neurodégénérescences entre elles. Étant exprimé exclusivement dans les neurones, c'est un marqueur spécifique qui s'élève avec la mort des neurones, mais qui n'est pas spécifique de l'étiologie de cette lésion neuronale.

Les NfL pourraient cependant avoir un intérêt pronostique. Quel que soit le groupe de diagnostic, on observe une assez grande variabilité intra-groupe des taux de NfL. Le taux de NfL est corrélé à la sévérité de la maladie dans les DFT (35). Des taux élevés de NfL dans le LCS sont associés à un plus grand déficit cognitif et à une survie plus faible dans les démences neurodégénératives (23). La grande variabilité observée dans chaque groupe pourrait correspondre à une variabilité dans la sévérité de l'atteinte neurologique. Pour vérifier cela, il serait intéressant de faire une étude longitudinale, avec un suivi de l'évolution des patients après le dosage des NfL.

Les groupes sont plus hétérogènes dans la cohorte clinique que dans la cohorte anatomopathologique : les variances du taux de NfL sont plus élevées dans chaque groupe de diagnostic, et les groupes de diagnostics moins séparés. Il pourrait exister un biais de sélection entre ces deux cohortes. La cohorte clinique représente l'ensemble des patients du Centre Mémoire, alors que la cohorte anatomopathologique pourrait inclure des cas plus particuliers de démence, elle inclut notamment des patients en moyenne plus jeune que la première cohorte.

Les maladies neurodégénératives coexistent souvent entre elles, surtout chez les patients plus âgés (15). Les patients de la cohorte clinique ont été classés en fonction de leur diagnostic le plus probable, mais d'autres étiologies possibles s'y ajoutent et pourraient expliquer une partie de l'hétérogénéité observée. Dans la cohorte anatomopathologique, il existe une association avec une deuxième étiologie dans la moitié des cas, le plus souvent entre diagnostic de MA et angiopathie amyloïde cérébrale. Les diagnostics pourraient être cependant plus purs et plus certains dans cette cohorte, ce qui expliquerait en partie une plus faible variabilité intra-groupe.

Or l'un des intérêts émergents du dosage des NfL est son usage comme biomarqueur dans le diagnostic différentiel des DFT versus les maladies psychiatriques (26,27). Ces maladies peuvent partager des symptômes similaires, avec des troubles du comportement. Ces similarités cliniques rendent le diagnostic différentiel difficile. Cependant les DFT sont des maladies neurodégénératives, contrairement aux maladies psychiatriques dans lesquelles on observe peu ou pas de mort neuronale. Par conséquent, on observe un taux de NfL élevé dans les DFT, alors qu'il est proche de celui des sujets sains dans les maladies psychiatriques. Il y a peu de chevauchement entre les distributions des taux de NfL entre les DFT et les maladies psychiatriques. Le taux de NfL augmente avec l'âge chez les patients sains, d'environ 3% par an (36)(20). Les valeurs de références doivent donc être définies en fonction de l'âge. Le manuel du kit les fournit pour les patients de moins de 60 ans. Pour les patients plus âgés on peut retenir les valeurs suivantes (36) :

Tableau 8 : Valeurs de référence des NfL dans le LCS (patients de 60 ans et plus)

Age	Taux de référence
60 ans	< 1313 pg/ml
70 ans	< 1781 pg/ml
80 ans	< 2417 pg/ml

Notre étude n'incluait pas de contrôles sains, ce qui ne nous permet pas de définir des valeurs de référence pour le taux de NfL dans cette population.

Pour utiliser le taux de NfL dans ce cadre au CHU de Lille, il faudrait définir un seuil de NfL séparant les DFT des maladies psychiatriques. Cela nécessiterait la constitution d'une cohorte de patients ayant des maladies psychiatriques avec une bonne sensibilité et une bonne spécificité. La mesure du taux de NfL dans le LCS nécessite de faire une ponction lombaire, qui est un examen invasif. Le taux de NfL dans le sang est bien corrélé avec celui dans le LCR, et pourrait donc se substituer au taux de NfL dans le LCS (28), mais sa mesure nécessiterait l'utilisation de la technique Simoa, et des automates spécifiques.

Le dosage des NfL dans le sang rendrait également plus facile la réalisation d'étude longitudinale. Ce type d'étude permettrait d'évaluer l'intérêt de suivre la cinétique des NfL dans l'évaluation du pronostic chez les patients (37).

Les points faibles de notre étude sont : l'absence de groupe témoin constitué de sujets sains, le nombre limité de patients dans chaque groupe et le caractère rétrospectif de l'étude qui l'expose à un biais de sélection et d'information. Nous avons évalué la répétabilité et la reproductibilité du kit, et validé 2 contrôles externes. Pour finaliser sa validation dans le but d'accréditer cette analyse, il faudrait également évaluer la justesse et l'exactitude de la méthode, ainsi que les interférences possibles.

Le point fort est la présence d'une cohorte anatomopathologique comportant des diagnostics de MA, FTD, PSP et DCB. Le dosage des NfL chez des patients dont le diagnostic est prouvé par l'anatomopathologie est rare dans la littérature.

5 Conclusion et perspectives

Notre travail nous a permis de valider le dosage des NfL dans le LCR. Les résultats que nous avons obtenu chez nos patients sont cohérents avec la littérature et ouvrent des perspectives nouvelles pour l'utilisation de ce dosage pour le diagnostic et le pronostic des démences.

A l'avenir, il serait intéressant de déterminer des valeurs seuils pour le diagnostic différentiel des DFT avec les maladies psychiatriques, ce qui nécessiterait la constitution d'une cohorte de patients ayant des maladies psychiatriques. La détermination d'intervalles de référence locaux chez les sujets sains nécessiterait également une nouvelle cohorte. et de mettre en place le dosage des NfL dans le sang, ce qui nécessiterait l'acquisition d'équipements spécifiques.

6 Bibliographie

1. Yuan A, Rao MV, Veeranna, Nixon RA. Neurofilaments at a glance. *J Cell Sci.* 15 juill 2012;125(14):3257-63.
2. Yuan A, Rao MV, Veeranna null, Nixon RA. Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3 avr 2017;9(4).
3. Gaetani L, Blennow K, Calabresi P, Di Filippo M, Parnetti L, Zetterberg H. Neurofilament light chain as a biomarker in neurological disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* août 2019;90(8):870-81.
4. Khalil M, Teunissen CE, Otto M, Piehl F, Sormani MP, Gatteringer T, et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat Rev Neurol.* 2018;14(10):577-89.
5. Lariviere RC, Julien J-P. Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *Journal of Neurobiology.* 2004;58(1):131-48.
6. Nakada T, Kwee IL. Fluid Dynamics Inside the Brain Barrier: Current Concept of Interstitial Flow, Glymphatic Flow, and Cerebrospinal Fluid Circulation in the Brain. *Neuroscientist.* 2019;25(2):155-66.
7. Nimse SB, Sonawane MD, Song K-S, Kim T. Biomarker detection technologies and future directions. *Analyst.* 2016;141(3):740-55.
8. Why Electrochemiluminescence | Meso Scale Discovery [Internet]. [cité 11 mai 2020]. Disponible sur: https://www.mesoscale.com/en/technical_resources/our_technology/ecl
9. Gaiottino J, Norgren N, Dobson R, Topping J, Nissim A, Malaspina A, et al. Increased Neurofilament Light Chain Blood Levels in Neurodegenerative Neurological Diseases. *PLOS ONE.* 20 sept 2013;8(9):e75091.
10. Wu C, Maley AM, Walt DR. Single-molecule measurements in microwells for clinical applications. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences.* 22 déc 2019;0(0):1-21.
11. Gale SA, Acar D, Daffner KR. Dementia. *Am J Med.* 2018;131(10):1161-9.

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. Paradise MB, Sachdev PS. Vascular Cognitive Disorder. *Semin Neurol.* avr 2019;39(2):241-50.
14. Maladie d'Alzheimer et autres démences [Internet]. [cité 30 nov 2020]. Disponible sur: /maladies-et-traumatismes/maladies-neurodegeneratives/maladie-d-alzheimer-et-autres-demences
15. Elahi FM, Miller BL. A clinicopathological approach to the diagnosis of dementia. *Nat Rev Neurol.* août 2017;13(8):457-76.
16. Blennow K, Zetterberg H. Biomarkers for Alzheimer's disease: current status and prospects for the future. *J Intern Med.* 2018;284(6):643-63.
17. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *The Lancet.* 29 juill 2006;368(9533):387-403.
18. Bang J, Spina S, Miller BL. Frontotemporal dementia. *The Lancet.* oct 2015;386(10004):1672-82.
19. McKeith IG, Boeve BF, Dickson DW, Halliday G, Taylor J-P, Weintraub D, et al. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: Fourth consensus report of the DLB Consortium. *Neurology.* 4 juill 2017;89(1):88-100.
20. Bridel C, van Wieringen WN, Zetterberg H, Tijms BM, Teunissen CE, and the NFL Group, et al. Diagnostic Value of Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light Protein in Neurology: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurol.* 17 juin 2019;
21. Zhao Y, Xin Y, Meng S, He Z, Hu W. Neurofilament light chain protein in neurodegenerative dementia: A systematic review and network meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev.* 2019;102:123-38.
22. Olsson B, Portelius E, Cullen NC, Sandelius Å, Zetterberg H, Andreasson U, et al. Association of Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light Protein Levels With Cognition in Patients With Dementia,

Motor Neuron Disease, and Movement Disorders. *JAMA Neurol.* 01 2019;76(3):318-25.

23. Skillbäck T, Farahmand B, Bartlett JW, Rosén C, Mattsson N, Nägga K, et al. CSF neurofilament light differs in neurodegenerative diseases and predicts severity and survival. *Neurology.* 18 nov 2014;83(21):1945-53.

24. Woolley JD, Khan BK, Murthy NK, Miller BL, Rankin KP. The diagnostic challenge of psychiatric symptoms in neurodegenerative disease: rates of and risk factors for prior psychiatric diagnosis in patients with early neurodegenerative disease. *J Clin Psychiatry.* févr 2011;72(2):126-33.

25. Lanata SC, Miller BL. The behavioural variant frontotemporal dementia (bvFTD) syndrome in psychiatry. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* mai 2016;87(5):501-11.

26. Fourier A, Formaglio M, Kaczorowski F, Mollion H, Perret-Liaudet A, Sauvee M, et al. A combination of total tau and neurofilaments discriminates between neurodegenerative and primary psychiatric disorders. *Eur J Neurol.* 3 avr 2020;

27. Vijverberg EGB, Dols A, Krudop WA, Del Campo Milan M, Kerssens CJ, Gossink F, et al. Cerebrospinal fluid biomarker examination as a tool to discriminate behavioral variant frontotemporal dementia from primary psychiatric disorders. *Alzheimers Dement (Amst).* 2017;7:99-106.

28. Kuhle J, Barro C, Andreasson U, Derfuss T, Lindberg R, Sandelius Å, et al. Comparison of three analytical platforms for quantification of the neurofilament light chain in blood samples: ELISA, electrochemiluminescence immunoassay and Simoa. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* [Internet]. 1 janv 2016 [cité 14 mars 2020];54(10). Disponible sur: <https://www.degruyter.com/view/j/cclm.2016.54.issue-10/cclm-2015-1195/cclm-2015-1195.xml>

29. Petzold A, Altintas A, Andreoni L, Bartos A, Berthele A, Blankenstein MA, et al. Neurofilament ELISA validation. *J Immunol Methods.* 31 janv 2010;352(1-2):23-31.

30. Miller A-M, Rutkowska A, Bahl JM, Herukka S-K, Koel-Simmelink MJ, Kruse N, et al. Multicenter immunoassay validation of cerebrospinal fluid neurofilament light: a biomarker for neurodegeneration. *Bioanalysis.* nov 2016;8(21):2243-54.

31. Forgrave LM, Ma M, Best JR, DeMarco ML. The diagnostic performance of neurofilament light chain in CSF and blood for Alzheimer's disease, frontotemporal dementia, and amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Alzheimers Dement (Amst)*. déc 2019;11:730-43.
32. Sivasathiaselan H, Marshall C, Agustus J, Benhamou E, Bond R, van Leeuwen J, et al. Frontotemporal Dementia: A Clinical Review. *Semin Neurol*. avr 2019;39(02):251-63.
33. Landqvist Waldö M, Frizell Santillo A, Passant U, Zetterberg H, Rosengren L, Nilsson C, et al. Cerebrospinal fluid neurofilament light chain protein levels in subtypes of frontotemporal dementia. *BMC Neurol*. déc 2013;13(1):54.
34. Abu-Rumeileh S, Mometto N, Bartoletti-Stella A, Polischi B, Oppi F, Poda R, et al. Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Patients with Frontotemporal Dementia Spectrum: A Single-Center Study. *Engelborghs S, éditeur. JAD*. 30 oct 2018;66(2):551-63.
35. Scherling CS, Hall T, Berisha F, Klepac K, Karydas A, Coppola G, et al. Cerebrospinal fluid neurofilament concentration reflects disease severity in frontotemporal degeneration. *Ann Neurol*. janv 2014;75(1):116-26.
36. Yilmaz A, Blennow K, Hagberg L, Nilsson S, Price RW, Schouten J, et al. Neurofilament light chain protein as a marker of neuronal injury: review of its use in HIV-1 infection and reference values for HIV-negative controls. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 3 août 2017;17(8):761-70.
37. Preische O, Schultz SA, Apel A, Kuhle J, Kaeser SA, Barro C, et al. Serum neurofilament dynamics predicts neurodegeneration and clinical progression in presymptomatic Alzheimer's disease. *Nat Med*. 2019;25(2):277-83.

AUTEUR : Nom : THIOLLET

Prénom : Caroline

Date de soutenance : 14 décembre 2020

Titre de la thèse : Les chaînes légères de neurofilaments comme biomarqueur des démences : mise en place du dosage dans le liquide cébrospinal et étude pilote chez des patients du Centre Mémoire du CHU de Lille

Thèse - Médecine - Lille - 2020

Cadre de classement : Biochimie

DES + spécialité : Biologie médicale

Mots-clés : chaînes légères de neurofilaments – démences – MA – DFT

Résumé :

Contexte : Les chaînes légères de neurofilaments (NfL) sont des constituant du cytosquelette exclusivement exprimés dans les neurones. En cas de lésion de l'axone ou de mort neuronale, ils sont libérés dans le LCS et dans le sang. Ce sont des biomarqueurs prometteurs dans le diagnostic et le pronostic des maladies neurologiques, notamment des démences. L'objectif de ce travail est de choisir un kit des NfL dans le LCS parmi ceux commercialisés, d'évaluer les performances de ce kit et de comparer la concentration de NfL entre différentes étiologies de démences chez des patients du Centre Mémoire du CHU de Lille.

Méthode : Nous avons évalué la répétabilité et la reproductibilité de notre technique de dosage des NfL avec le kit de dosage ELISA UmanDiagnostics (Umea, Suède), et passé deux contrôles de qualité externes. La concentration de NfL dans le LCS a été mesurée dans deux cohortes de patients atteints de troubles cognitifs, l'une avec des diagnostics étiologiques cliniques de ces troubles cognitifs, l'autre avec des diagnostics anatomopathologiques.

Résultats : Nous avons choisi le kit de dosage ELISA UmanDiagnostics (Umea, Suède). Notre évaluation de cette technique au CBP a montré une bonne répétabilité, une bonne reproductibilité et des contrôles de qualité externes conformes. Les concentrations de NfL étaient élevées dans les deux cohortes. Dans la cohorte « clinique », la médiane du taux de NfL était de 1936 pg/ml dans le spectre des DFT, 1550 pg/ml dans les MA et 1348 pg/ml dans les autres diagnostics de démences, sans différence significative entre les groupes ($p = 0.2765$). Dans la cohorte « anatomopathologique », la médiane des NfL était plus élevée dans le groupe des DFT (3116 pg/ml) que dans celui des MA (1037 pg/ml), avec une différence significative entre les 2 groupes ($p < 0.001$).

Conclusion : Notre travail nous a permis de valider le dosage des NfL dans le LCR. Les résultats que nous avons obtenu chez nos patients sont cohérents avec la littérature. Ce dosage n'est pas un bon marqueur diagnostic permettant de différencier les démences entre elles mais pourrait avoir un intérêt pour différencier maladies psychiatriques et DFT, et pourrait avoir un intérêt pronostique. Ces résultats ouvrent des perspectives nouvelles. Il serait par exemple intéressant de déterminer des valeurs de référence dans une population témoin et des valeurs seuil pour différencier maladies psychiatriques et DFT.

Composition du Jury :

Président : Madame le Professeur Florence PASQUIER

Assesseurs : Madame le Professeur Malika HAMDANE

Directeur de thèse : Madame le Docteur Susanna SCHRAEN