

**MEMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE**

**Soutenu publiquement le 23 juin 2015
Par Caroline BROUTIN**

**Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990 tient lieu de
THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Optimisation du dosage plasmatique de la protéine Tau par
ELISA (anticorps ADx215) : étude pilote de la cohorte Baltazar**

Membres du jury :

Président : M. le Professeur Thierry BROUSSEAU, PU-PH Université Lille 2

**Directeur de Thèse : M^{me} le Docteur Susanna SCHRAEN-MASCHKE, MCU-PH
Université Lille 2**

**Assesseurs : M. le Professeur Bernard SABLONNIERE, PU-PH Université Lille2
: M. le Docteur Luc BUEE, Directeur de Recherches, UMR-S1172
: M. le Docteur Farid ZERIMECH, PH CHRU de Lille**



Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



Université Lille 2 – Droit et Santé

Président :	Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE
Vice-présidents :	Professeur Alain DUROCHER Professeur Régis BORDET Professeur Eric KERCKHOVE Professeur Eric BOULANGER Professeur Frédéric LOBEZ Professeur Damien CUNY Professeur Benoit DEPRez Professeur Murielle GARCIN Monsieur Pierre RAVAUX Monsieur Larbi AIT-HENNANI Monsieur Antoine HENRY
Directeur Général des Services :	Monsieur Pierre-Marie ROBERT

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen :	Professeur Damien CUNY
Vice-Doyen, 1 ^{er} assesseur :	Professeur Bertrand DECAUDIN
Assesseur en charge de la pédagogie	Dr. Annie Standaert
Assesseur en charge de la recherche	Pr. Patricia Melnyk
Assesseur délégué à la scolarité	Dr. Christophe Bochu
Assesseur délégué en charge des relations internationales	Pr. Philippe Chavatte
Assesseur délégué en charge de la vie étudiante	M. Thomas Morgenroth
Chef des services administratifs :	Monsieur Cyrille PORTA

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
M.	DUBREUIL	Luc	Bactériologie
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique 2
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GESQUIERE	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique 2
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHÉRAERT	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique
M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique 2
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie (90%)
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie

M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire (80%)
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie (80%)
Mme	CHARTON	Julie	Chimie Organique (80%)
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie (80%)
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2
Mme	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
Mme	HOUSSIN-THUILLIER	Pascale	Hématologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique 1
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques
M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et déontologie pharmaceutique

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DHANANI	Alban	Droit et déontologie pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M.	FIEVET	Pierre	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	WATRELOS	Michel	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DROUET	Maryline	Pharmacie Galénique
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique

***Faculté des Sciences Pharmaceutiques
et Biologiques de Lille***

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

REMERCIEMENTS

A mon Président de jury,

Monsieur le Professeur Thierry BROUSSEAU

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Biochimie.

Chef de Pôle, Pôle Biologie Pathologie Génétique, CHRU Lille.

Chef de service du laboratoire de Biochimie automatisée, Protéines et Biologie

Prédictive, Centre de Biologie Pathologie Pierre-Marie Degand, CHRU Lille.

Vous avez été l'un de mes premiers professeurs en 1^{ère} année de pharmacie, il y a déjà 10 ans, je suis très honorée que vous ayez accepté la présidence de mon jury de thèse. Je vous remercie pour vos conseils tout au long de mes études et pour votre disponibilité. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A mes juges,

Monsieur le Professeur Bernard SABLONNIERE

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Biochimie et Biologie Moléculaire.

Responsable de l'UF de Neurobiologie et Neurogénétique, Centre de Biologie
Pathologie Pierre-Marie Degand, CHRU Lille.

Equipe Alzheimer & Tauopathies, UMR – S1172, Centre de Recherche JP Aubert.

Je vous suis reconnaissante d'avoir accepté de juger ce travail. Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre laboratoire pour la réalisation des dosages ainsi que pour vos conseils lors de la rédaction du mémoire. Veuillez accepter mes sincères remerciements et soyez assuré de mon profond respect.

Monsieur le Docteur Luc BUEE

Directeur de Recherche au CNRS.

Directeur du Centre de Recherche JP Aubert, UMR – S1172.

Responsable de l'équipe Alzheimer & Tauopathies.

Vous me faites l'honneur d'accepter de faire partie du jury de cette thèse. Veuillez accepter mes sincères remerciements pour le temps que vous m'avez accordé et pour l'aide que vous nous avez apportée notamment pour la partie Discussion. Veuillez accepter mes sincères remerciements et soyez assuré de mon profond respect.

Monsieur le Docteur Farid ZERIMECH

Praticien Hospitalier, Biochimie et Biologie Moléculaire.

UF Métabolisme Général, Hormonal, Maladies rares, Centre de Biologie Pathologie
Pierre-Marie Degand, CHRU Lille.

Vous me faites l'honneur d'accepter de faire partie du jury de cette thèse. Je vous suis reconnaissante d'avoir pris le temps de répondre à mes nombreuses questions concernant l'analyse statistique des résultats. Je vous adresse mes sincères et respectueux remerciements.

A ma Directrice de Thèse,

Madame le Docteur Susanna SCHRAEN

Maître de Conférence des Universités - Praticien Hospitalier, Biochimie et Biologie
Moléculaire

UF Neurobiologie et Responsable de l'UF Protéines, Centre de Biologie Pathologie
Pierre-Marie Degand, CHRU Lille

Equipe Alzheimer & Tauopathies, UMR – S1172, Centre de Recherche JP Aubert.

Je te remercie pour ce travail que tu m'as confié et pour la confiance que tu m'as accordée. Je confirme la rumeur qui te décrit comme la directrice de thèse rêvée. J'ai été très heureuse de travailler avec toi et je te remercie sincèrement pour tes conseils, ta disponibilité et ton aide quand je n'arrivais plus à avancer. Sois assurée de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Je tiens à remercier,

Madame Amélie Labudeck,
Technicienne de Laboratoire,
Pour m'avoir formée au dosage de la protéine Tau

L'équipe de l'UF Neurobiologie du centre de Biologie Pathologie du CHRU de Lille.

L'équipe de l'UF Protéines du centre de Biologie Pathologie du CHRU de Lille.

L'ensemble des biologistes et techniciens que j'ai eu la chance de rencontrer durant mon internat.

Enfin, je tiens à remercier également,

Mes premiers chefs,
Isabelle Top et Vincent Elsermans,
Pour votre amitié et votre présence, merci de m'avoir appris ce qu'était Pubmed.

Mes amis de l'internat,
Marie Coquet, Audrey, Céline, Thibault, Camille, Gabrielle, Damien, Fanny et
Thomas.
Pour tous ces bons moments passés ensemble.

Mes amis de la Faculté,
Marine, Laura, Sébastien, Magali, François, Valentin, Chloé.
Pour votre amitié qui perdure.

Ma famille,
Ma Mamie, mon parrain, ma marraine, mes oncles et tantes, mes cousins, cousines,
Merci de m'avoir soutenu durant toutes ces années.

Sandra, Antoine, Cibou, Naïs, Matou, Dame Fatoux et Marc Cloquet,
Pour ces quatre années passées ensemble et pour les nombreuses qui arrivent.
Merci pour tout ce que vous m'avez appris, pour tous ces souvenirs qui me sont
chers.

Etienne,
Je te remercie d'avoir été aussi présent pour moi.
Tu es ma plus belle rencontre.

Mon frère,
Petit poussin,
Je suis très fière d'être ta grande sœur.

Mes parents,
Lili et Mick,
Pour m'avoir permis de réaliser ces longues études. Merci pour votre aide et votre
présence durant « les années concours ».
Je vous remercie d'être toujours là pour moi.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	Acide Aminé
Ac	Anticorps
Ag	Antigène
APA	Association Américaine de Psychiatrie
APOE	APOlipoprotéine E
APP	Précurseur de la Protéine Amyloïde
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
AVQ	Activités de la Vie Quotidienne
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
CV	Coefficient de Variation
DNF	Dégénérescence NeuroFibrillaire
DO	Densité Optique
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manuel of Mental Disorders
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
HAS	Haute Autorité de Santé
INSERM	Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
LCS	Liquide Cérébro-Spinal
LDD	Limite De Détection
LDQ	Limite De Quantification
MA	Maladie d'Alzheimer
MAPs	Protéines Associées aux Microtubules
MAPT	Microtubule Associated Protein Tau
MCI	Mild Cognitive Impairment, trouble cognitif léger
MMSE	Mini Mental State Examination
MRC	Matériel de Référence Certifié
MSD	Meso Scale Discovery
MT	MicroTubule
NINCDS-ADRDA	National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Strokeet - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
PHRC	Programme Hospitalier de Recherche Clinique

PL	Ponction Lombaire
P-Tau	protéine Tau hyperPhosphorylée
SiMoA	Single Molecule Arrays
SNC	Système Nerveux Central
Tau	Tubulin Associated Unit, protéine Tau

SOMMAIRE

I. Généralités	20
A. Maladie d'Alzheimer	20
1. Clinique	20
2. Facteurs de risque / protecteurs	22
B. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer	24
1. La protéine Tau	24
2. Le peptide amyloïde	29
C. Diagnostic	31
1. Critères cliniques cardinaux : MA probable	31
2. Critères de recherche : les biomarqueurs	32
D. Tau : un biomarqueur de la MA	38
1. Tau dans le LCS	38
2. Tau dans le plasma	39
E. Différentes techniques commerciales d'immunoanalyse disponibles pour le dosage de Tau	41
1. ELISA sandwich	42
2. MSD	44
3. Luminex	46
4. Simoa	47
F. ADx215 : objectifs de l'étude	50
1. ADx215	50
2. Objectifs de l'étude	51
3. Conduite de l'étude	52
II. Matériel et méthode	54
A. Les patients : étude BALTAZAR-Pla-Tau	54
1. Présentation	54
2. Procédure	54
3. Objectifs	55
4. Critères d'inclusion	55
5. Critères d'exclusion	56

B.	Le kit commercial INNOTEST hTAU Ag.....	56
1.	Principe du test.....	56
2.	Qualification du test dans le LCS.....	57
3.	Utilisation du kit	57
C.	Optimisation du dosage ADx215.....	58
1.	Test ELISA de départ (protocole D).....	58
2.	Echantillons utilisés pour l'optimisation.....	60
3.	Optimisation des tampons de dilution des conjugués	60
4.	Optimisation du volume de plasma	61
5.	Optimisation de la concentration en ADx215	61
6.	Optimisation du volume de coating ADx215	61
7.	Bilan des étapes d'optimisation	62
8.	Test ELISA final optimisé (protocole C3)	62
D.	Statistiques.....	64
1.	Analyse des dosages de Tau dans le plasma.....	64
2.	Tests de corrélations des dosages de Tau dans le plasma avec les données cliniques et biologiques du LCS.....	65
III.	Résultats	66
A.	Optimisation du dosage ADx215.....	66
1.	1 ^{ère} condition testée : tampons de dilution des conjugués.....	66
2.	2 ^{ème} condition testée : volume de plasma	67
3.	3 ^{ème} condition testée : concentration en ADx215	68
4.	4 ^{ème} condition testée : volume de coating ADx215.....	69
5.	Le blanc et la gamme de calibration	70
6.	Conclusion : meilleure condition pour chaque étape.....	71
B.	Sélection des patients BALTAZAR pour le dosage ADX215..	72
C.	Résultats du dosage plasmatique avec ADx215	74
1.	Corrélation des dosages INNOTEST hTAU avant et après décongélation.....	76
2.	Comparaison des dosages M0 et M24	76
3.	Comparaison des patients MA et MCI-MA.....	78
4.	Corrélation entre les dosages ADx215 et INNOTEST hTAU.....	79
D.	Comparaison des dosages de Tau dans le plasma et le LCS 80	

IV. Discussion	85
V. Conclusion	91
VI. Références bibliographiques	92
VII. Annexe	100

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Seuils normaux des biomarqueurs A β 1-42, Tau et P-Tau dans le LCS .	36
Tableau 2 : principaux examens réalisés aux différentes visites.....	54
Tableau 3 : bilan des étapes d'optimisation	62
Tableau 4 : résultats (DO 450 nm) obtenus selon les différents tampons	66
Tableau 5 : résultats (DO 450 nm) obtenus selon les différents volumes de plasma	67
Tableau 6 : résultats (DO 450 nm) obtenus selon les différentes concentrations en ADX215 (μ g/ml).	68
Tableau 7 : résultats (DO 450nm) obtenus selon les différents volumes de coating d'ADx215	69
Tableau 8 : fidélité intermédiaire (DO 450 nm) du protocole final C3 déterminée à partir de 4 séries	70
Tableau 9 : conditions testées pour chaque étape d'optimisation	71
Tableau 10 : résultats 1 ^{er} dosage INNOTEST hTAU, classification en 3 groupes : non détectables, détectables et quantifiables et selon 3 groupes diagnostiques : MA, MCI et MCI-MA	73
Tableau 11 : résultats des dosages plasmatiques ADx215 et 2 ^{ème} dosage INNOTEST hTAU.....	75
Tableau 12 : résultats du dosage des biomarqueurs (Tau, P-Tau et A β 1-42) dans le LCS, du dosage de Tau plasmatique avec ADx215 et INNOTEST hTAU, âge, sexe et génotype de l'APOE.....	81

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : classification et évolution clinico-pathologique de la Maladie d'Alzheimer	21
Figure 2 : le gène de la protéine Tau.....	24
Figure 3 : séquence d'AA de la protéine Tau isoforme la plus longue, 441 AA.	25
Figure 4 : interaction entre la protéine Tau et les microtubules.....	26
Figure 5 : dégénérescence neurofibrillaire.....	27
Figure 6 : résumé du processus physiopathologique conduisant à la dégénérescence neurofibrillaire.	28
Figure 7 : métabolisme de l'APP.	29
Figure 8 : métabolisme de l'APP chez le sujet MA.	30
Figure 9 : interprétation des variations des 3 biomarqueurs dans le LCS au cours de la MA.....	34
Figure 10 : dosages des biomarqueurs Tau, P-Tau et A β 1-42 dans le LCS.	36
Figure 11 : représentation des différences entre les dosages ELISA.....	41
Figure 12 : principe général de formation du sandwich par technique ELISA.	42
Figure 13 : principe de l'électrochimiluminescence.....	44
Figure 14 : principe de la technologie MSD.	45
Figure 15 : principe de la technologie Luminex.....	46
Figure 16 : principe de la technique d'immunoanalyse Simoa.	48
Figure 17 : épitopes reconnus par les différents Ac dirigés contre Tau.....	51
Figure 18 : conduite de l'étude	52
Figure 19 : principe du dosage INNOTEST hTAU Ag.....	57
Figure 20 : principe du dosage ADx215.....	58
Figure 21 : sélection des plasmas BALTAZAR.....	73
Figure 22 : dosage des plasmas sélectionnés avec ADx215.....	74
Figure 23 : concentrations de Tau plasmatique déterminées avec le dosage ADx215 à M0 et M24 chez les 40 sujets BALTAZAR sélectionnés	76
Figure 24 : concentrations de Tau plasmatique déterminées avec le dosage INNOTEST hTAU à M0 et M24 chez les 40 sujets BALTAZAR sélectionnés	77
Figure 25 : concentrations de Tau plasmatique déterminées avec le dosage ADX215 chez les sujets MA et MCI-MA sélectionnés	78
Figure 26 : concentrations de Tau plasmatique déterminées avec le dosage INNOTEST hTAU chez les sujets MA et MCI-MA sélectionnés	78

Figure 27 : résultats de la corrélation entre les dosages ADX215 et INNOTEST hTAU	79
Figure 28 : concentrations de Tau plasmatique déterminées avec le dosage INNOTEST hTAU en fonction de l'âge des 20 patients BALTAZAR	82
Figure 29 : concentrations de Tau plasmatique déterminées avec le dosage ADx215 en fonction de l'âge des 20 patients BALTAZAR	82
Figure 30 : résultats de la corrélation entre Tau plasmatique dosé avec ADx215 et Tau dans le LCS	83
Figure 31 : résultats de la corrélation entre Tau plasmatique dosage ADx215 et P-Tau dans le LCS	83
Figure 32 : représentation théorique des formes de Tau détectables avec les dosages ADx215 et INNOTEST hTAU (AT120)	87

RESUME

La maladie d'Alzheimer (MA) est la cause la plus fréquente de démence. Cette maladie est caractérisée, d'un point de vue histologique, par la présence de deux lésions cérébrales caractéristiques, la dégénérescence neurofibrillaire et les plaques séniles, correspondant respectivement à l'agrégation de protéines Tau et de peptides amyloïde A β 1-42. Trois biomarqueurs biologiques, le peptide A β 1-42, la protéine Tau totale et hyperphosphorylée ont été validés dans le liquide cérébro-spinal comme aide au diagnostic de la MA. Le dosage des biomarqueurs nécessite néanmoins la réalisation d'une ponction lombaire, un geste invasif. La recherche de nouveaux biomarqueurs sanguins est donc en plein développement. L'objectif de ce travail consistait en la mise au point d'un nouveau dosage plasmatique de Tau utilisant une technique ELISA sandwich sensible avec l'anticorps ADx215 d'une très haute affinité pour la protéine Tau. Une fois l'optimisation terminée, nous avons réalisé une étude pilote en appliquant ce dosage à 20 patients atteints de MA (cohorte Baltazar), 6 au stade MCI (MCI-MA) et 14 au stade de démence (MA). Pour chaque patient, nous disposons de deux plasmas prélevés à 2 ans d'intervalle (M0 et M24). Nos résultats montrent que les concentrations de Tau plasmatique sont stables sur 2 ans. On n'observe pas de différence significative entre les concentrations de Tau plasmatique chez les patients MA et MCI-MA. Des analyses complémentaires de corrélation ont été réalisées avec les concentrations plasmatiques obtenues avec un autre kit commercial, INNOTEST hTAU et les biomarqueurs du LCS.

I. Généralités

A. Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative d'origine multifactorielle qui met en jeu des facteurs environnementaux et génétiques. C'est la cause la plus fréquente de démence. En France environ 900000 personnes sont touchées par la MA et, compte tenu de l'augmentation de l'espérance de vie, la prévalence est estimée à 1,3 million en 2020 (INSERM, 2014). La maladie d'Alzheimer est rare avant 65 ans, moins de 2% des MA surviennent avant cet âge, il s'agit le plus souvent de patients atteints de formes familiales héréditaires. Après 65 ans, la MA touche 2 à 4 % de la population générale et 15 % de la population âgée de 80 ans (INSERM, 2014).

1. Clinique

« La démence est caractérisée par l'apparition de déficits cognitifs multiples qui comportent une altération de la mémoire et au moins l'une des perturbations cognitives suivantes : aphasie, apraxie, agnosie ou perturbation des fonctions exécutives. Les déficits doivent être suffisamment sévères pour entraîner une altération significative du fonctionnement professionnel ou social et doivent représenter un déclin par rapport au fonctionnement antérieur » DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders)

La forme sporadique de MA, à début tardif (après 65 ans), est beaucoup plus fréquente que la forme génétique, à début précoce. La forme sporadique, tardive, est caractérisée par une évolution lente et progressive avec une prédominance des troubles mnésiques par rapport aux troubles intellectuels alors que dans la forme génétique, précoce, l'évolution est beaucoup plus rapide avec une altération cognitive caractéristique comme l'aphasie (DSM-IV).

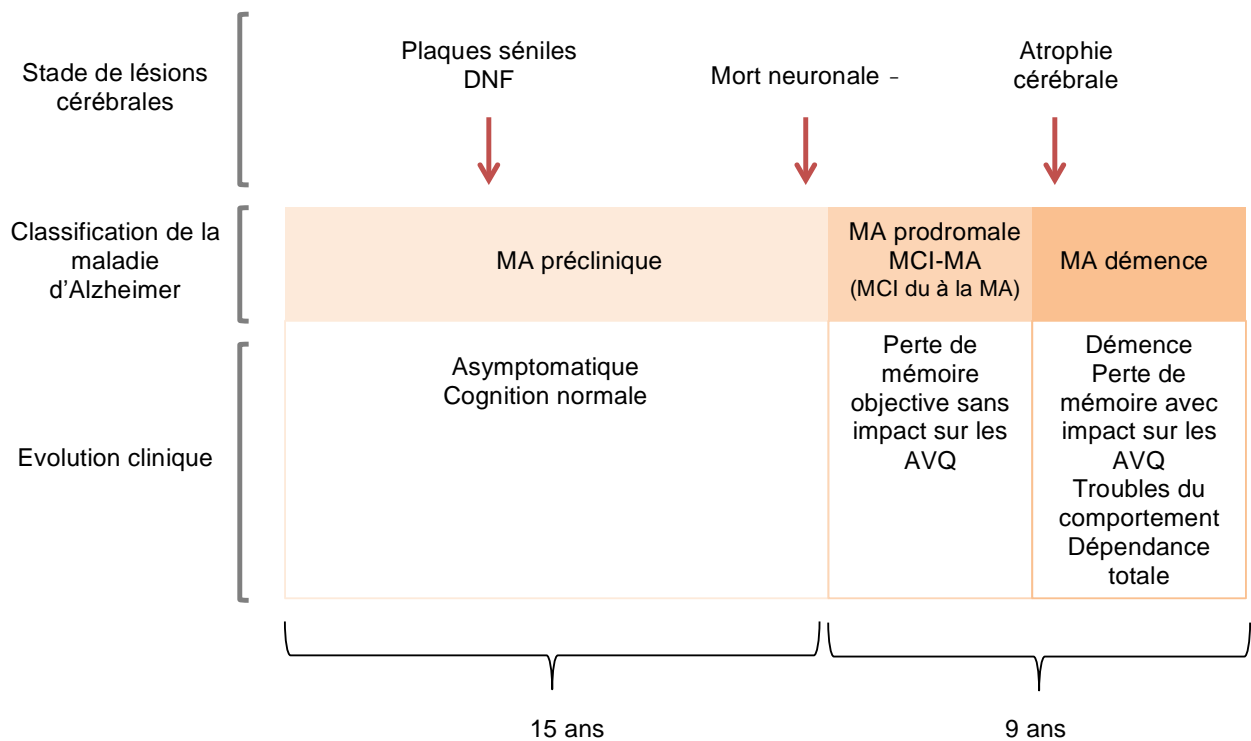


Figure 1 : classification et évolution clinico-pathologique de la Maladie d'Alzheimer

AVQ : Activité de la Vie Quotidienne

La maladie d'Alzheimer se décompose en 3 phases (1,2). (Fig 1)

La plus précoce, la phase préclinique est asymptomatique. Elle correspond à l'apparition des deux lésions cérébrales caractéristiques de la MA, les plaques séniles et la dégénérescence neurofibrillaire (DNF). L'accumulation de ces lésions va entraîner une mort neuronale responsable de l'apparition des premiers symptômes, il s'agit de la phase prodromale aussi appelée phase de troubles cognitifs légers (MCI : Mild Cognitive Impairment). Le MCI est caractérisé par un début insidieux avec un déficit précoce de la mémoire épisodique (porte sur les faits ou événements qui proviennent de différentes périodes de la vie) sans perte d'autonomie dans les activités de la vie quotidienne, donc sans démence.

Enfin la dernière phase est la démence de type Alzheimer.

Aux troubles mnésiques s'ajoutent d'autres déficits cognitifs tels que :

- ✓ L'apraxie : trouble de l'exécution et de la coordination des mouvements.
- ✓ L'agnosie : trouble de la reconnaissance.
- ✓ L'aphasie : trouble du langage écrit et oral, trouble de l'expression et de la compréhension.

- ✓ Les troubles des fonctions exécutives : trouble de la planification de tâches, de la pensée abstraite et de l'attention.

On retrouve aussi des troubles du comportement tels que la dépression, l'irritabilité ou la modification de la personnalité qui apparaissent au cours de la démence et s'accroissent avec l'évolution. Ces déficits entraînent une altération significative du fonctionnement professionnel et social.

Dans les premières années de la démence, les signes neurologiques moteurs et sensitifs sont peu nombreux mais avec l'évolution de la maladie, des myoclonies et des troubles de la marche peuvent apparaître. Des crises d'épilepsie surviennent dans 10 % des cas (DSM-IV).

Il n'existe pas encore de traitement curatif de la maladie d'Alzheimer. Son évolution conduit irrémédiablement au décès du patient du fait de complications liées à la perte d'autonomie et à l'affaiblissement. A un stade avancé, on observe des troubles de la déglutition conduisant à des pneumopathies d'inhalation par fausses routes ainsi qu'à des troubles de l'équilibre provoquant des chutes. Il s'écoule en moyenne 8 à 10 ans entre l'apparition des symptômes et le décès.

2. Facteurs de risque / protecteurs

▪ Facteurs de risque

L'âge est le principal facteur de risque de la MA (3). L'incidence de la maladie double tous les 5 ans après 65 ans (4). Le principal facteur de risque génétique de la forme sporadique de la MA est l'allèle $\epsilon 4$ du gène codant pour l'apolipoprotéine E (APOE). Cette protéine possède trois allèles dans la population générale : $\epsilon 2$ $\epsilon 3$ $\epsilon 4$, elle permet le transport des lipides dans la circulation sanguine (LDL-cholestérol). Dans le cerveau, elle permet le transport du cholestérol nécessaire à la réparation neuronale ainsi que le passage du peptide amyloïde du cerveau vers le sang via la barrière hémato-encéphalique (BHE) (4). De nombreuses études ont montré l'association entre l'APOE4 et le risque de développer la maladie d'Alzheimer. Ce risque augmente d'un facteur 4 pour les porteurs d'un allèle $\epsilon 4$ et d'un facteur 19 pour les porteurs homozygotes (5).

L'APOE4 s'opposerait moins facilement à la phosphorylation de Tau, elle serait moins performante dans la réparation cellulaire mais surtout, elle favoriserait l'agrégation du peptide amyloïde au sein des plaques séniles par diminution du transport du cerveau vers le compartiment sanguin (6,7).

Des mutations dans les gènes du précurseur de la protéine amyloïde (APP), et des présénilines ont été reconnues responsables des formes familiales précoces de la maladie d'Alzheimer (8,9). En revanche aucune mutation n'a été décrite dans la forme sporadique de la maladie d'Alzheimer (10). De même, des mutations du gène de la protéine Tau ont été retrouvées dans les démences fronto-temporales (11), mais elles n'ont pas été décrites dans la MA (4).

D'autres facteurs de risque potentiel de la MA ont été décrits dans la littérature comme le sexe féminin. Il semblerait que les femmes aient un risque plus élevé par rapport aux hommes surtout après 80 ans. Ces données sont à relativiser étant donné la différence d'espérance de vie. Ainsi aux Etats-Unis, où l'écart d'espérance de vie est moindre, la différence entre homme et femme pour le risque de MA n'est pas retrouvé (3,12). Les facteurs de risques cardiovasculaires (hypertension artérielle et athérosclérose) et l'anesthésie générale seraient aussi associés à un risque accru de MA (13–15)

- Facteurs protecteurs

Nous pouvons citer comme facteurs protecteurs les allèles $\epsilon 2$ et $\epsilon 3$ de l'APOE qui diminueraient la probabilité de survenue de la MA et retarderaient l'âge de début de la maladie (5). Des études prospectives ont montré que le niveau d'éducation et la stimulation des fonctions cognitives à l'âge adulte, dont la mémoire, seraient deux facteurs augmentant la réserve cognitive. Une réserve cognitive élevée allongerait la phase préclinique de la MA en retardant le déclin de la mémoire(16).

De même une bonne hygiène de vie (guides nutritionnels, activité physique) préviendrait aussi le déclin cognitif (17). Il a été démontré, sur un modèle de souris Alzheimer (THY - Tau 22), qu'une activité physique quotidienne préviendrait les altérations de la mémoire et diminuerait les lésions associées à la protéine Tau au niveau de l'hippocampe (18).

B. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est caractérisée du point de vue histologique par la présence concomitante de deux lésions cérébrales spécifiques, la dégénérescence neurofibrillaire et les plaques séniles. Ces lésions, associées à des réactions inflammatoires et oxydatives, entraînent un dysfonctionnement synaptique et une perte neuronale (4).

1. La protéine Tau

▪ Structure

La protéine Tau (Tubulin Associated Unit) est traduite à partir du gène *MAPT* situé sur le chromosome 17 et comporte 16 exons (19). Dans le système nerveux central (SNC), l'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 est responsable de la production de six isoformes qui sont exprimées différemment durant le développement du cerveau (20). Leur taille varie de 352 à 441 acides aminés (AA), correspondant à une masse moléculaire comprise entre 45 et 65 kDa (10). L'isoforme la plus courte, ne possédant aucun des trois exons, est exprimée au stade fœtal. En revanche, on retrouve les six isoformes chez l'adulte dont l'isoforme la plus longue possédant les exons 2, 3 et 10 (21). (Fig 2)

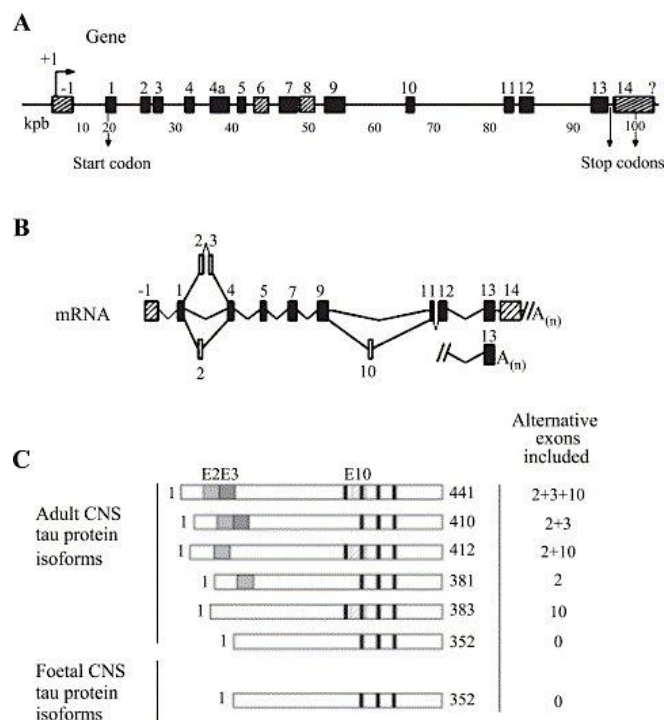


Figure 2 : le gène de la protéine Tau.

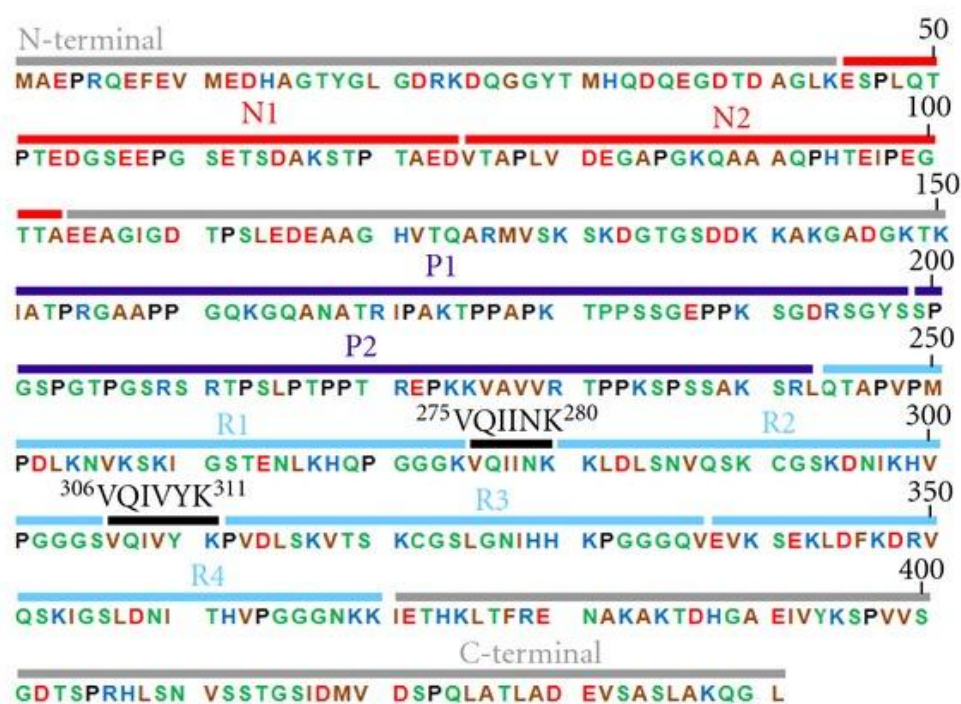
A : structure du gène Tau, B : épissage alternatif du pré-ARNm C : 6 isoformes de protéine Tau. D'après *Sergeant N et al, 2005*.

La protéine Tau est composée d'une partie acide, la partie N-terminale et d'une partie basique, la partie C-terminale. (Fig 3)

La partie N-terminale contient les domaines N1 et N2 composés 29 AA chacun, ces domaines sont codés respectivement par les exons 2 et 3, ce sont les domaines de projection de la protéine Tau (10,22).

La partie C-terminale renferme quant à elle les domaines de liaison aux microtubules, il s'agit des domaines R1, R2, R3 et R4 de 18 AA chacun, imparfaitement répétés et codés respectivement par les exons 9, 10, 11, et 12 (23).

Les régions ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ et ³⁰⁶VQIVYK³¹¹ sont des régions cruciales, elles sont capables d'initier l'agrégation de la protéine Tau en paire de filament en hélice (24).



- X = Basic AA (+)
- X = Polar uncharged AA (hydrophilic)
- X = Nonpolar AA (hydrophobic)
- X = Acidic AA (-)

Figure 3 : séquence d'AA de la protéine Tau isoforme la plus longue, 441 AA.
 D'après Kolarova M et al, 2012.

- Fonction

La protéine Tau appartient à la famille des Protéines Associées aux Microtubules (MAPs). Les microtubules (MT) sont les composants majoritaires du cytosquelette du neurone, ils sont composés de monomères de tubuline et forment l'axone. Ils ont un rôle important dans le maintien de la structure du neurone et dans le trafic intracellulaire, notamment en permettant le transport rétrograde et antérograde de vésicules.

Grâce à ses domaines R, la protéine Tau se lie aux MT et favorise la polymérisation de la tubuline en présence de GTP ; elle inhiberait aussi la dépolymérisation in vitro (25). Il a été montré que l'isoforme adulte de Tau (4R) est plus efficace que l'isoforme fœtale (3R) pour promouvoir la formation de MT (26). La protéine Tau est aussi impliquée dans le transport axonal des vésicules contenant les neurotransmetteurs libérés dans l'espace synaptique. Cette communication est indispensable pour la survie du neurone (27). (Fig 4)

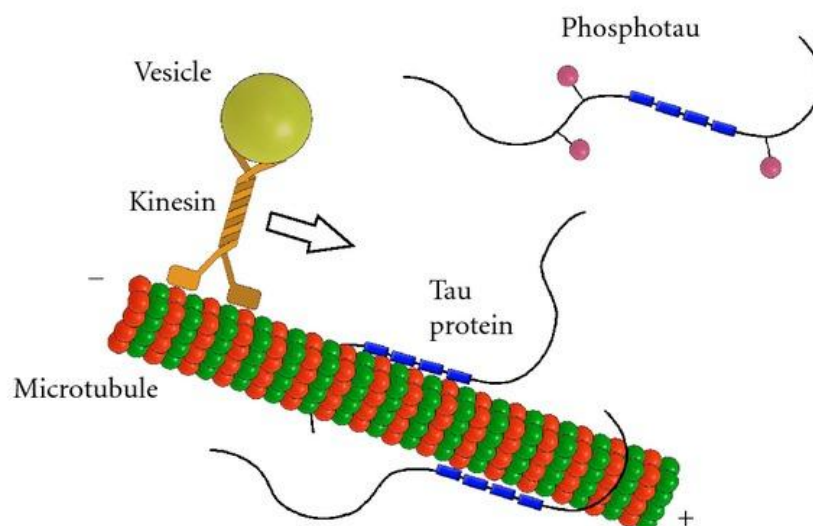


Figure 4 : interaction entre la protéine Tau et les microtubules.

Rectangles bleus : domaines de liaison au MT (domaines R).
Ronds roses : sites phosphorylés.
D'après Kolarova M et al, 2012.

Les domaines de projection de la protéine Tau permettent de maintenir l'organisation des MT entre eux au sein de l'axone et assurent leur stabilité par liaison avec d'autres constituants cellulaires tels que les filaments d'actine ou la membrane cytoplasmique (10). Ils déterminent aussi l'espace entre les MT de l'axone et peuvent donc augmenter son diamètre (28).

La liaison de la protéine Tau aux MT dépend entre autre de son état de phosphorylation. Il existe 80 sites possibles de phosphorylation sur la protéine Tau (isoforme la plus longue, 441 AA) dont au moins 30 ont été caractérisés à l'aide d'anticorps monoclonaux et des techniques de spectrométrie de masse et de séquençage (10). La liaison de la forme phosphorylée semble moins efficace que celle de la forme non phosphorylée, de plus la phosphorylation du résidu sérine 262, situé dans le domaine R1, réduit de manière importante l'affinité de la protéine Tau pour le MT *in vitro* (10,29). Lorsqu'elle est phosphorylée, Tau se détache et les MT se dépolymérisent. La formation des MT est un processus dynamique régulé par un système de phosphorylation/déphosphorylation de la protéine Tau, lui même contrôlé par l'action coordonnée de kinases et de phosphatases (10,30,31).

- Dégénérescences neurofibrillaires

La protéine Tau étant un dipôle, les monomères de Tau se repoussent à l'état physiologique par des charges positives et négatives respectivement au niveau C-ter et N-terminale. Au cours de la MA, on assiste à une phosphorylation qualitativement anormale de ces régions (32). Les monomères de Tau interagissent alors entre eux et s'assemblent d'abord sous forme de dimères de Tau par les domaines de liaison aux MT, R2 et R3 (régions ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ et ³⁰⁶VQIVYK³¹¹) (24,33), puis en oligomères, en filaments (PHF) pour enfin former les lésions de DNF. (Fig 5)

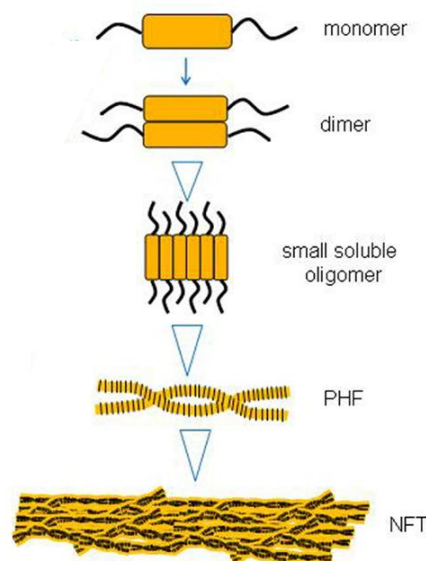


Figure 5 : dégénérescence neurofibrillaire

PHF : paire de filaments en hélice. NFT : dégénérescence neurofibrillaire.
D'après Cowan *et al*, 2013.

On assiste aussi à une hyperphosphorylation de la protéine Tau qui conduit à une diminution de sa capacité de liaison aux MT. La protéine Tau se détache des MT qui se dépolymérisent : arrêt du trafic rétrograde et antérograde compromettant le fonctionnement neuronal (34). Les concentrations en protéine Tau normale (Tau) et hyperphosphorylée (P-Tau) augmentent dans le cytoplasme, les paires de filaments en hélices se polymérisent pour former la dégénérescence neurofibrillaire (DNF) intra-neuronale (33). Ces anomalies conduisent à la mort du neurone. (Fig 6) Les protéines Tau et P-Tau sont alors libérées dans l'espace extracellulaire cérébral puis passent dans le liquide cérébro-spinal (LCS) où elles peuvent être dosées. La DNF débute au niveau de l'hippocampe et de l'amygdale (contrôle de la mémoire et la navigation spatiale) puis elle s'étend aux aires associatives temporo-pariéto-occipitales (contrôle de la gestuelle, du langage et de la reconnaissance) avant de se généraliser. La propagation de ces lésions dans le cerveau suit toujours cette même topologie et est corrélée à la chronologie d'apparition des signes cliniques et à l'atrophie cérébrale (35).

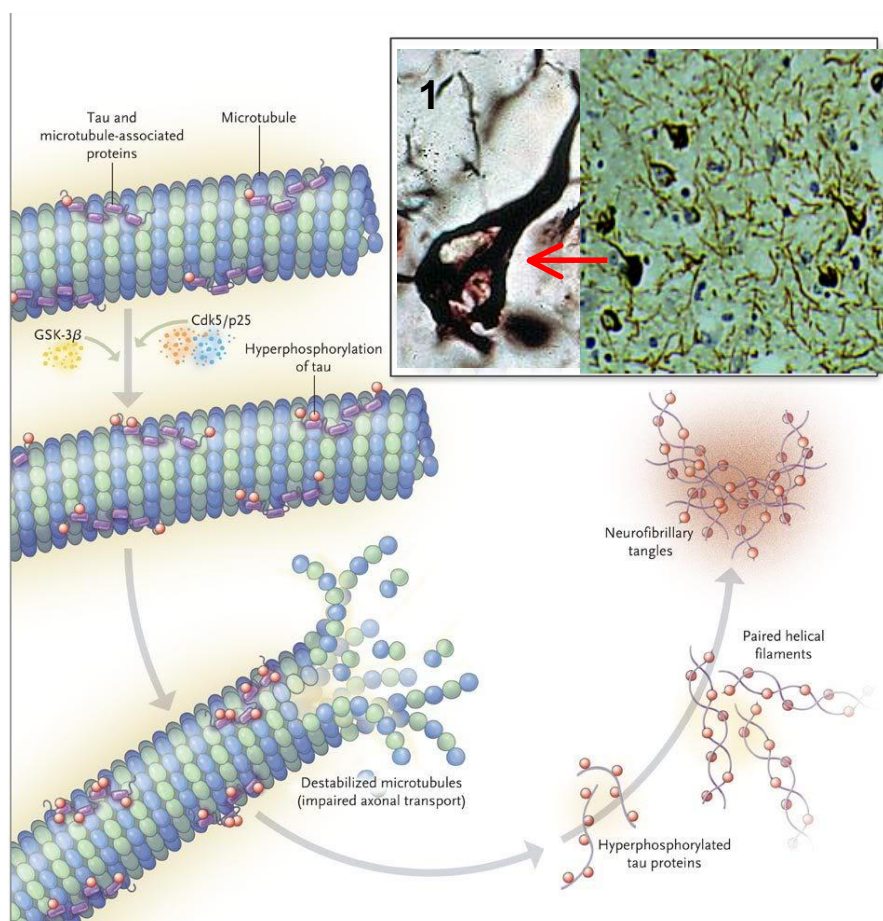


Figure 6 : résumé du processus physiopathologique conduisant à la dégénérescence neurofibrillaire.

1 : dégénérescence neurofibrillaire. D'après Querfurth HW et al, 2010.

2. Le peptide amyloïde

Le peptide amyloïde est naturellement produit dans le SNC, il provient du clivage séquentiel d'une protéine transmembranaire : le précurseur de la protéine amyloïde (APP). Contrairement à la protéine Tau dont l'expression est essentiellement neuronale, l'APP a une expression ubiquitaire. Dans le cerveau, elle est non seulement présente dans les neurones mais également dans les astrocytes et les cellules gliales (36). L'APP peut être dégradée selon deux voies : la voie amyloïdogène ou la voie non amyloïdogène (4). (Fig 7)

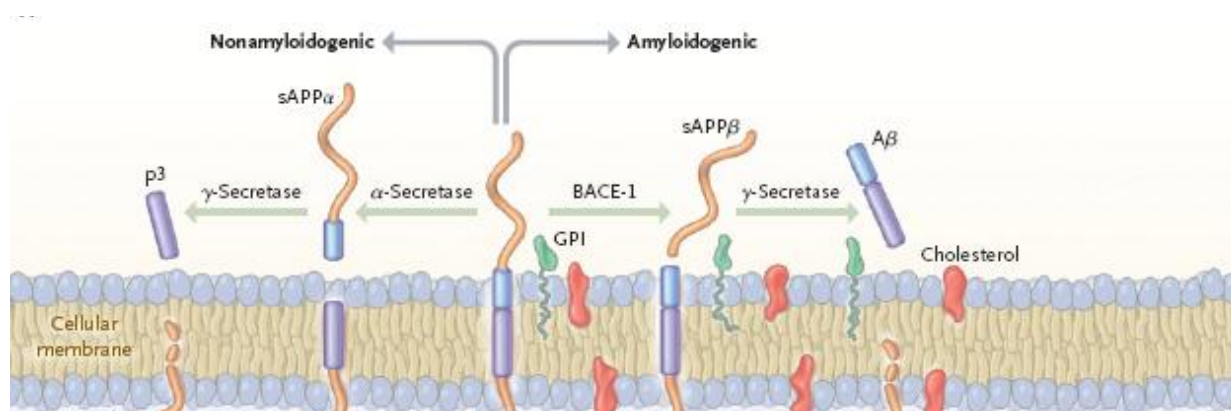


Figure 7 : métabolisme de l'APP.

La voie amyloïdogène et non amyloïdogène
D'après Querfurth HW et al, 2010.

Chez le sujet normal, c'est la voie non amyloïdogène qui prédomine. Elle conduit, après l'action d'une α -sécrétase puis d'une γ -sécrétase, à la libération du côté extracellulaire, de fragments solubles sAPP α et p3, qui sont éliminés dans le LCS. La voie amyloïdogène, minoritaire, conduit à la libération successivement d'un fragment soluble sAPP β après action d'une β -sécrétase (BACE-1) ainsi qu'à la libération de peptides amyloïdes A β 1-40 et A β 1-42 après clivage secondaire par la γ -sécrétase. Ces fragments sont aussi libérés dans l'espace extracellulaire. Le peptide A β 1-40, plus soluble et non pathogène, est majoritaire (90%) (4). Le peptide A β 1-42 plus hydrophobe que le peptide A β 1-40 a tendance à s'agréger (37). Chez le sujet sain, la faible quantité d'A β 1-42 produite est dégradée en A β 1-38 ou éliminée à travers la BHE, il ne s'agrège donc pas.

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par un déséquilibre entre la production et l'élimination des peptides amyloïdes. On observe une activation de la voie amyloïdogène induite par un dysfonctionnement de l'activité γ -sécrétase (préséniline 1) en faveur de la production de peptides amyloïdes $A\beta$ 1-42. D'autre part, les processus de dégradation et d'élimination d' $A\beta$ 1-42 dans le LCS et à travers la BHE sont altérés, conduisant à son accumulation dans l'espace extracellulaire cérébral. (Fig 8)

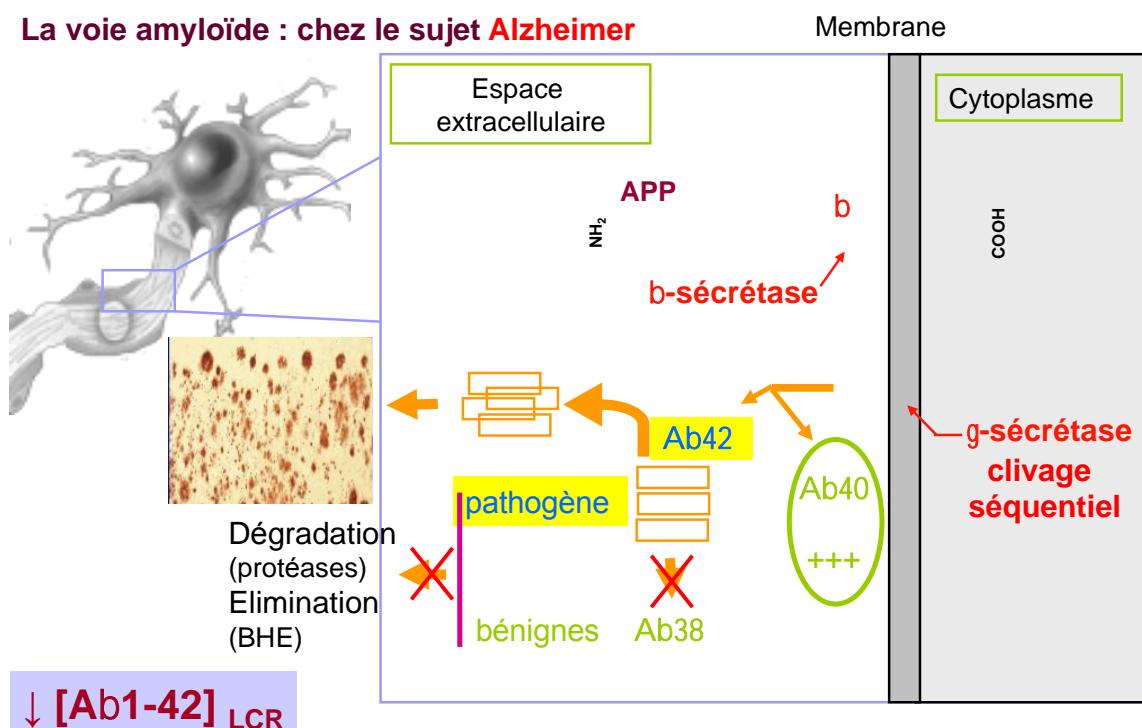


Figure 8 : métabolisme de l'APP chez le sujet MA.

La voie amyloïde est prédominante

D'après *Susanna Schraen-Maschke*, BIOCLINORD Lille, 17 février 2015.

Les peptides $A\beta$ 1-42 en excès forment rapidement des oligomères dans le milieu extracellulaire, ces oligomères sont neurotoxiques pour les synapses entraînant leur dysfonctionnement (38). Ils se déposent ensuite sous la forme de fibrilles amyloïdes, constituants majoritaires des plaques séniles ou plaques amyloïde. (4).

La distribution des plaques amyloïdes ne semble pas corrélée à la chronologie d'apparition des signes cliniques contrairement à la DNF (35). Les plaques séniles se forment au niveau de la plupart des aires du cortex cérébral.

C. Diagnostic

La MA est une maladie dont le diagnostic du vivant du patient, le plus souvent au stade de démence, ne peut être que probable. Le diagnostic de certitude repose sur la mise en évidence dans le cerveau post-mortem des deux lésions caractéristiques : la présence de plaques séniles et de la DNF. Il est donc indispensable avant de poser un diagnostic de MA d'avoir éliminé les autres causes possibles de démence (DSM-IV).

Il existe plusieurs recommandations pour le diagnostic de la MA.

- ✓ Les critères du NINCDS-ADRDA : The National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS) et the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (ADRDA) ont réuni un groupe de travail en 1983 afin d'établir des critères de diagnostic clinique de la MA. Les critères du NINCDS-ADRDA ont été publiés en 1984 (39). Suite aux avancées sur la connaissance de la maladie, notamment sur la caractérisation des lésions, ainsi que la publication des critères de recherche de *Dubois et al* en 2007 (40) et 2010 (1), les critères du NINCDS-ADRDA ont été révisés en 2011. Les nouvelles recommandations intègrent donc l'analyse des biomarqueurs de l'imagerie et de la biologie (2).
- ✓ Les critères cliniques du DSM-IV : Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders publié en 1994 par l'association américaine de psychiatrie (APA) regroupent 6 critères de diagnostic de la démence de type Alzheimer (Annexe).
- ✓ Les recommandations de la Haute Autorité de Santé (HAS) de 2011.

A des fins de recherche uniquement, des recommandations ont été publiées en 2011 par The National Institute on Aging-Alzheimer's Association pour le diagnostic du stade MCI et de la phase préclinique de la MA (41,42).

1. Critères cliniques cardinaux : MA probable

Le diagnostic de la MA repose principalement sur un faisceau d'arguments :

- ✓ Examen clinique du patient avec interrogatoire de celui-ci et de son entourage.
- ✓ Histoire médicale détaillée du patient.

- ✓ Evaluation de la fonction cognitive globale à l'aide de tests neuropsychométriques comme l'échelle « Mini Mental State Examination » (MMSE).
- ✓ Les examens paracliniques : la biologie (hypothyroïdie, vitamines B9, B12) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Ils sont surtout utilisés pour exclure une autre cause de démence, due à une maladie systémique ou à une autre affection du système nerveux central.

2. Critères de recherche : les biomarqueurs

Les critères cliniques restent l'élément fondamental du diagnostic de la MA mais l'apport des biomarqueurs (imagerie et biologie) contribuent à préciser le diagnostic. Les biomarqueurs sont aussi utilisés en recherche où ils permettent de réaliser un diagnostic plus précoce, au stade MCI. Ils pourront aussi permettre d'évaluer l'efficacité des traitements à venir de la MA (43). Les recommandations du NINCDS-ADRDA ne préconisent cependant pas l'utilisation des biomarqueurs en diagnostic de routine. Ils sont surtout utilisés comme outil diagnostique optionnel pour le clinicien en cas de symptomatologie atypique.

▪ L'imagerie

L'IRM structurale est un outil diagnostique et pronostique, il permet aussi d'éliminer une cause curable. Au cours de la MA et au stade MCI, on observe une atrophie cérébrale corrélée à la perte neuronale. Cette atrophie débute dans la région hippocampique puis s'étend aux régions temporo-pariétales et enfin à l'ensemble du cortex (44).

L'imagerie fonctionnelle est principalement utilisée en recherche. Elle permet de mettre en évidence, grâce au 18-fluorodeoxyglucose (TEP-FDG), une diminution du métabolisme du glucose dans la région temporo-pariétale due à la perte neuronale mais cet outil n'est pas spécifique de la MA (45). Le développement de traceurs spécifiques vise à cibler précocement le processus physiopathologique et l'évolution de la maladie. Un premier traceur permettant de localiser les plaques amyloïdes a été mis au point aux États-Unis, le C11-PIB (Carbone 11 Pittsburgh Compound-B) mais la demi-vie réduite de ce traceur n'a pas permis sa commercialisation (46). D'autres traceurs des plaques amyloïdes combinés au Fluor 18 sont en cours de développement, ainsi que des traceurs permettant de mettre en évidence la DNF (47).

- Les biomarqueurs biologiques

Les critères d'un bon biomarqueur de la MA ont été définis en 1998 par un groupe consensus (48). Un bon biomarqueur doit :

- 1) pouvoir être recueilli par un geste non ou peu invasif
- 2) être dosé avec une technique à faible coût, reproductible, fiable, et précise.
- 3) refléter les modifications biochimiques en rapport avec les lésions caractéristiques de la MA
- 4) avoir une sensibilité et une spécificité > 80%

En 2011, les nouvelles recommandations du NINCDS-ADRDA intègrent dans le diagnostic de la MA les biomarqueurs biologiques. On observe au cours de la MA un profil caractéristique des biomarqueurs dans le LCS : une baisse des concentrations en peptide amyloïde A β 1-42 associée à une augmentation des concentrations en protéine Tau totale (Tau) et hyperphosphorylée (P-Tau) (2). Les trois biomarqueurs Tau, P-Tau et A β 1-42 actuellement validés dans le LCS répondent aux critères d'un bon biomarqueur de la MA.

- 1) Le dosage des biomarqueurs s'effectue dans le liquide cérébro-spinal. Le LCS est en contact direct avec le milieu extracellulaire cérébral, c'est une fenêtre ouverte sur le cerveau. Par conséquent, il est susceptible de refléter les modifications biologiques du cerveau et donc de contenir les marqueurs issus des lésions spécifiques de la MA (43). Le LCS est recueilli par ponction lombaire (PL), il s'agit d'un geste modérément invasif dont les effets indésirables sont rares (moins de 2 % des cas). On retrouve principalement des céphalées et des lombalgies plus ou moins sévères qui peuvent être accompagnées de nausées et vomissements (syndrome post-PL). Les infections (méningites) et paralysies restent extrêmement rares (49). La composition du LCS est très différente de celle du plasma, en effet, la concentration en protéines est 100 fois plus faible dans le LCS, de l'ordre de 0,2 à 0,4 g/l. Le LCS provient à la fois d'une filtration à partir du sang, on retrouve donc les protéines du sérum (albumine/préalbumine, immunoglobulines et transferrine), mais aussi d'une sécrétion du liquide interstitiel cérébral où l'on peut retrouver des protéines issues du SNC (50).

- 2) Les biomarqueurs de la MA sont dosés dans le LCS par technique ELISA sandwich (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). (Cf partie E) Cette technique est la méthode de référence actuelle pour le dosage des biomarqueurs dans le LCS en France et plus largement en Europe (51). Elle est moins coûteuse que l'imagerie et est automatisable et reproductible. Le dosage des 3 biomarqueurs dans le LCS est coté BHN 600.
- 3) Les 3 biomarqueurs de la MA Tau, P-Tau et A β 1-42 doivent refléter les modifications biochimiques en rapport avec les lésions caractéristiques de la MA, les plaques amyloïdes et la DNF. (Fig 9)

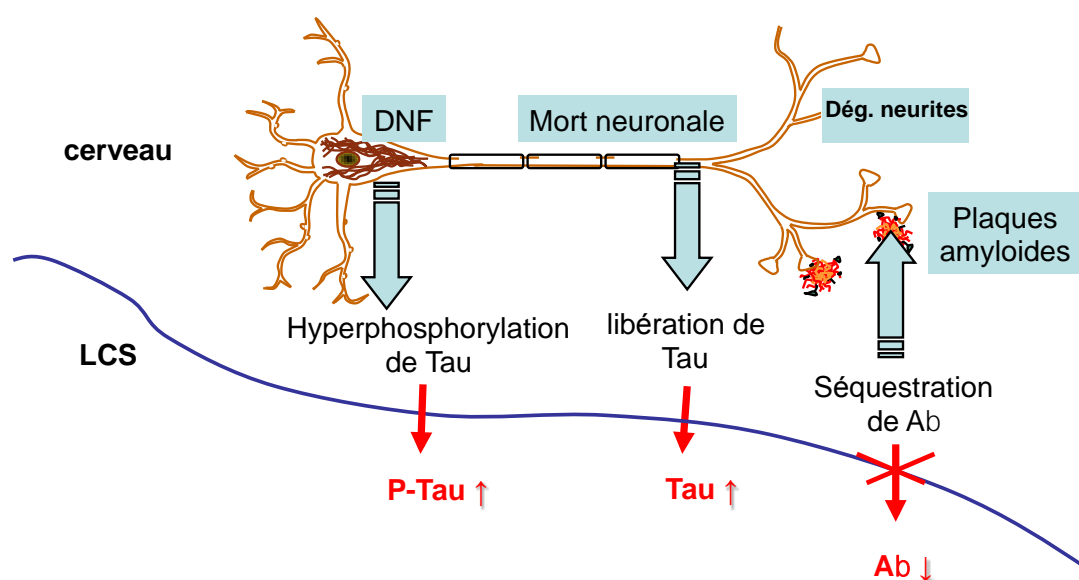


Figure 9 : interprétation des variations des 3 biomarqueurs dans le LCS au cours de la MA.

Dég neurite : dégénérescence des neurites.

D'après *Susanna Schraen-Maschke*, BIOCLINORD Lille, 17 février 2015.

La DNF conduit à la mort du neurone qui libère dans le milieu extracellulaire cérébral les protéines Tau totales (Tau) et hyperphosphorylées (P-Tau) qui passent ensuite dans le LCS où leur concentration augmente. Il a été démontré que les concentrations de Tau et P-Tau étaient corrélées à la distribution des DNF mise en évidence sur des biopsies cérébrales (52,53).

Le peptide amyloïde (A β) libéré dans l'espace extracellulaire est séquestré au sein de la plaque amyloïde, d'autre part son passage dans le LCS est diminué, conduisant à une baisse de sa concentration dans le LCS. Le peptide A β 1-42 est le

principal constituant des plaques amyloïdes. De nombreuses études ont montré que de faibles concentrations en peptide A β 1-42 dans le LCS étaient corrélées à la présence de plaques amyloïdes sur biopsies cérébrales et mise en évidence par l'imagerie fonctionnelle (C11 PIB) (52,54,55)

Une diminution des concentrations en A β 1-42 associée à une augmentation de Tau ou P-Tau permet de différencier les patients MA des patients contrôles (43). Ces modifications peuvent aussi être retrouvées chez les sujets MCI qui évolueront plus tard vers une MA (56,57).

4) La combinaison des dosages des 3 marqueurs biologiques dans le LCS permet de différencier les sujets MA des sujets sains avec une sensibilité de 87 % et une spécificité de 84 % (58), et les sujets MA des sujets ayant un autre type de démence avec une sensibilité de 86 % et une spécificité de 78 %. Cette combinaison permet aussi de prédire le développement d'une démence de type MA chez le sujet MCI avec une sensibilité de 84 % et une spécificité de 63 % (58).

✓ Précautions pré-analytiques

Afin d'avoir de bonnes performances analytiques (sensibilité et spécificité), le dosage des biomarqueurs dans le LCS est soumis à un protocole pré-analytique strict. Les tubes de recueil du LCS sont critiques pour ce dosage (59). Le recueil du LCS, par ponction lombaire, doit se faire impérativement dans des tubes en polypropylène. Une étude (*Perret-Liaudet et al, 2012*) comparant plusieurs tubes a conduit à la préconisation du tube SARSTEDT de référence 62.610.201 PP (10ml), qui a les propriétés adhésives les plus faibles vis-à-vis des biomarqueurs Tau et A β (60). Les valeurs seuils ont été calculées pour cette référence de tube en particulier. Les prélèvements sont ensuite centrifugés à 1000-1500g pendant 10 minutes et décantés dans un nouveau tube en polypropylène. Les échantillons peuvent être conservés 48 heures à 4°C, au delà une congélation à – 80°C est nécessaire, la congélation à – 20°C est proscrite (61).

✓ interprétation

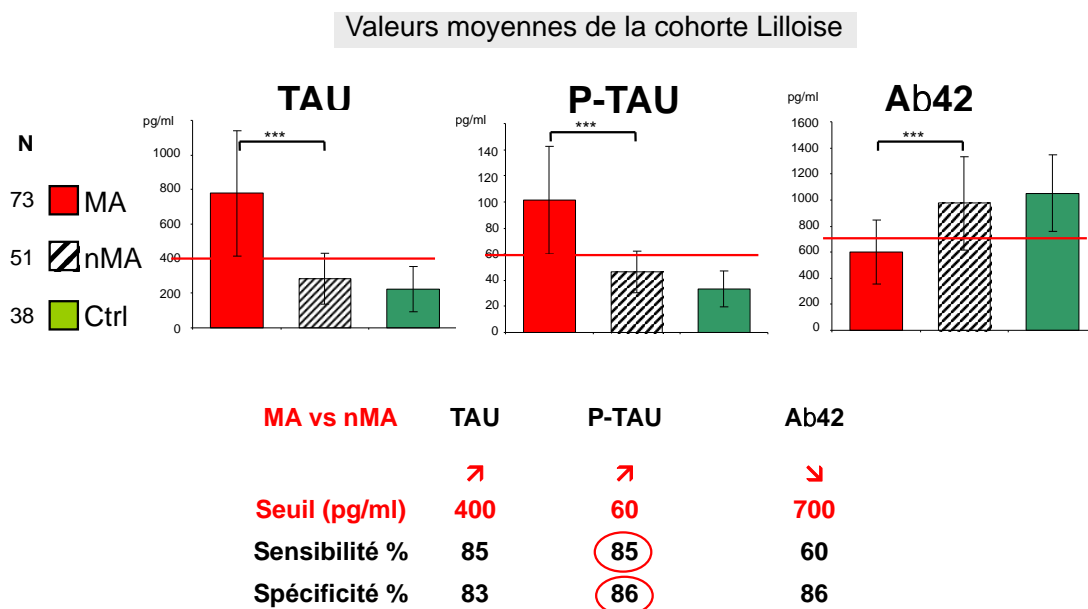


Figure 10 : dosages des biomarqueurs Tau, P-Tau et Aβ1-42 dans le LCS.

N : nombre de sujets

MA : démence de type Maladie d'Alzheimer

nMA : autres types de démences (vasculaire, à corps de Lewy)

Ctrl : sujets du service de neurologie sans démence

Valeurs moyennes de la cohorte lilloise. D'après *Susanna Schraen-Maschke*, BIOCLINORD Lille, 17 février 2015.

Dosages ELISA manuels avec les kits commerciaux INNOTEST hTAU Ag, INNOTEST PHOSPHO-TAU (181P), INNOTEST β-AMYLOID (1-42) de la société Fujirebio Europe.

Tableau 1 : Seuils normaux des biomarqueurs Aβ1-42, Tau et P-Tau dans le LCS

Seuils normaux des biomarqueurs dans le LCS*		
Aβ1-42	>	700 pg/ml
Tau	<	400 pg/ml
P-Tau	<	60 pg/ml

*Seuils valables uniquement pour les tubes SARSTEDT, réf : 62.610.201 PP (59).

L'interprétation du dosage des biomarqueurs, A β 1-42, Tau et P-Tau dans le LCS se fait de la manière suivante :

- **Aucun biomarqueur altéré, 3 biomarqueurs normaux** : profil biochimique du LCS normal, non évocateur d'une MA. (Valeurs prédictive de MA : 9,6 %*).
- **3 biomarqueurs altérés** : profil biochimique du LCS évocateur d'une MA. (Valeurs prédictive de MA : 94,2 %*)
- **2 biomarqueurs altérés** : profil biochimique du LCS n'excluant pas le diagnostic d'une MA. (Valeurs prédictive de MA : 77,2 %*)
- **1 biomarqueur altéré** : profil biochimique du LCS non évocateur d'une MA. (Valeurs prédictive de MA : 24,7 %*)

* Valeurs prédictives d'une MA calculées d'après *Lehmann et al*, 2014 (62).

Le dosage des biomarqueurs dans le LCS est validé et standardisé depuis 2007. Selon les recommandations de la Haute Autorité de Santé (HAS) de décembre 2011, la prescription est réservée aux formes atypiques de MA et à celles d'évolution rapide.

D. Tau : un biomarqueur de la MA

1. Tau dans le LCS

Les formes moléculaires de Tau présentes dans le LCS sont encore mal connues. En effet, la caractérisation moléculaire de Tau avec les techniques actuelles (immunoanalyse, spectrométrie de masse et imagerie par résonance magnétique) reste difficile sachant que dans 3 ml de LCS on trouve moins de 3 nanogrammes de Tau soit moins de 65 femtomoles (63).

Le dosage de Tau total par ELISA, augmenté chez les patients MA par rapport à des patients contrôles, est plutôt un marqueur général de mort neuronale. Cette interprétation provient des études portant sur d'autres pathologies avec mort neuronale : dans la maladie de Creutzfeldt-Jakob, caractérisée par une mort neuronale intense, on observe les concentrations les plus élevées de Tau, pouvant atteindre dans le LCS plus de 10000 pg/ml (64,65). Dans le LCS de patients ayant subi un AVC, on observe uniquement des augmentations transitoires de Tau et non de P-Tau (66).

Le dosage de P-Tau quant à lui, serait le reflet de l'hyperphosphorylation observé dans la MA. Différents épitopes ont été étudiés, en particulier P-Tau181, P-Tau231 et P-Tau199 (67). Ces épitopes apparaissent dans le cerveau à des moments différents de la progressions de la MA : la phosphorylation sur la thréonine 231 est un événement précoce (68), tandis que la phosphorylation sur la thréonine 181 et sur la sérine 199 est plus tardive. Cependant, les concentrations de ces 3 épitopes phosphorylés augmentent dans le LCS de manière équivalente chez les sujets MA comparés aux sujets atteints d'autres démences (67).

La protéine Tau est présente dans le LCS sous forme fragmentée (63). Le métabolisme de Tau et son turn-over restent cependant mal connus. Selon les anticorps utilisés dans les tests ELISA et les épitopes correspondants reconnus, les concentrations mesurées devraient correspondre à celle de la protéine Tau entière ainsi qu'à celle de ses fragments portant ces épitopes. Une étude récente conforte cela en montrant que selon les anticorps (Ac) utilisés dans les tests ELISA, les concentrations de Tau dans le LCS sont différentes et ont un pouvoir discriminant différent pour séparer les sujets MA des contrôles (69). Cette étude a cependant été

réalisée sur un nombre limité de sujets et il est nécessaire dans l'avenir d'évaluer l'intérêt du dosage de tel ou tel fragment pour le diagnostic de la MA.

Il existe d'autres formes de protéine Tau potentiellement intéressante pour le diagnostic : des isoformes particulières de Tau, des formes oligomères et des formes associées à des vésicules. Le développement de techniques de dosages plus sensibles est nécessaire pour mesurer leur concentration.

Le dosage des biomarqueurs dans le LCS est utilisé pour l'aide au diagnostic précoce de la maladie d'Alzheimer, toutefois la réalisation d'une ponction lombaire, un geste invasif, est difficilement généralisable en consultation mémoire. Le dosage plasmatique des marqueurs biologiques de la maladie d'Alzheimer est donc à développer.

2. Tau dans le plasma

Les concentrations en biomarqueurs dans le plasma sont 20 à 50 fois plus faibles que dans le LCS, soit moins de 1 picomol/L (63,70). Le dosage de la protéine Tau dans le sang a été freiné par le manque de sensibilité des techniques d'immunoanalyse. Les premières études ayant évaluées la concentration de Tau plasmatique ont donc portées sur des patients ayant une mort neuronale intense, conduisant à des concentrations élevées de Tau dans le LCS (arrêt cardiaque ou maladie de Creutzfeldt-Jakob). Dans ces conditions, la protéine Tau a pu être détectée et dosée par technique ELISA dans le plasma (71). Les concentrations de Tau plasmatique des sujets atteints de MA sont beaucoup plus faibles et seules deux études ont été publiées actuellement.

L'étude de *Sparks et al* de 2012, a dosé la protéine Tau total dans le plasma et le sérum en utilisant une méthode ELISA validée par western blot. Le dosage ELISA a été réalisé à l'aide du kit KHB0042 de la société Invitrogen® utilisant comme Ac de capture un Ac dirigé contre la protéine Tau totale. Le western blot, quant à lui, utilise deux Ac *Tau7* et *tau12* qui reconnaissent respectivement les parties N-ter et C-terminales de la protéine Tau. Le dosage a été évalué chez 49 sujets MA, 47 sujets MCI et 110 sujets contrôles. Les résultats de cette étude montrent que la protéine Tau a pu être détectée dans le plasma mais pas dans le sérum. Les concentrations en protéine Tau sont significativement plus faibles chez les sujets MA comparés aux

sujets MCI et aux contrôles. Enfin, une corrélation positive a été retrouvée entre les concentrations plasmatiques de Tau et les performances cognitives de l'ensemble des sujets, évaluées lors de l'étude longitudinale (72).

L'étude de *Zetterberg et al* de 2013 a dosé, pour la première fois, la protéine Tau totale dans le plasma en utilisant la technique Simoa (Single Molecule Arrays) (70). (Cf partie E) Dans cette technique, *Tau5* est utilisé comme anticorps monoclonal de capture et *HT7/BT2* comme anticorps monoclonaux de détection. Ces anticorps reconnaissent la partie centrale de la protéine Tau (*Tau5*: AA 218 à 225, *HT7*: AA 159 à 163 et *BT2*: AA 193 à 198), ce dosage permet donc de détecter toutes les isoformes de Tau (73). La limite de détection (LDD) pour cet essai a été calculée à 0,02 pg/ml, la technique Simoa est donc 1000 fois plus sensible que l'ELISA conventionnel. L'étude de *Zetterberg et al* a étudié les concentrations plasmatiques de Tau chez 54 sujets MA, 75 sujets MCI et 25 sujets dits contrôles, ayant une cognition normale. Parmi les 75 sujets MCI, 36 sont restés stables durant les 101 mois de suivi, 35 ont développé une MA (MCI-MA) et 4 ont développé un autre type de démence. Les résultats de cette étude montrent que les concentrations plasmatiques de Tau sont significativement plus élevées chez les sujets MA comparés aux sujets MCI et aux contrôles. Il n'y a pas de différence significative entre les concentrations plasmatiques de Tau des sujets MCI-MA et ceux des MCI restés stables durant le suivi. Enfin, aucune corrélation n'a été retrouvée entre les concentrations de protéine Tau dans le plasma et dans le LCS dans chacun des groupes diagnostiques (70).

E. Différentes techniques commerciales d'immunoanalyse disponibles pour le dosage de Tau

L'immunoanalyse utilise la haute spécificité des anticorps (Ac) et leur diversité pour cibler les molécules d'intérêt et mesurer leur concentration.

Les techniques d'immunoanalyse sont plus sensibles que les techniques de néphélométrie ou de turbidimétrie qui détectent des concentrations minimales de l'ordre de 10 mg/l (74).

Les techniques d'immunoanalyse de type ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) ont été développées dans les années 1970 par Peter Perlmann et Eva Engvall pour remplacer les techniques radiométriques trop contraignantes (75,76). Dans les premières méthodes de dosage ELISA, direct (Fig 11A) et indirect (Fig 11B), la molécule d'intérêt est adsorbée au support solide. Ces techniques ont une mauvaise sensibilité car l'adsorption sur le support n'est pas spécifique de la molécule à doser, d'autres protéines se fixent entraînant une augmentation du bruit de fond. L'ELISA compétitif s'affranchit de cet inconvénient, c'est l'anticorps qui est adsorbé sur le support solide augmentant la sensibilité du dosage (77). (Fig 11D) Cette technique reste cependant très sensible aux interférences du milieu car il s'agit d'une méthode compétitive qui utilise une quantité limitante d'Ac. Enfin, la technique ELISA sandwich (Fig 11C), basée sur le principe de double capture de l'antigène (Ag), permet d'augmenter la spécificité de la réaction et est nettement moins sensible aux interférences du milieu car la technique se déroule en excès d'Ac. Cette technique est souvent utilisée en première intention lorsque l'on développe de nouveaux dosages d'Ag en recherche.

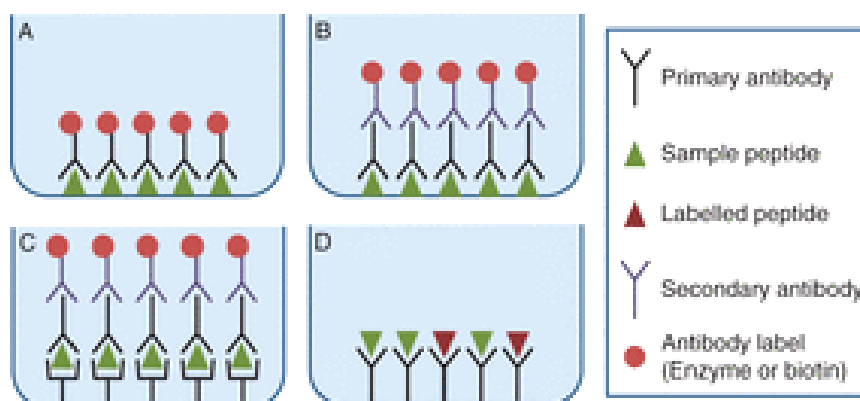


Figure 11 : représentation des différences entre les dosages ELISA

ELISA direct (A), indirect (B), sandwich (C), compétitif (D).

D'après Grange RD et al, 2014.

Les premiers kits de dosage de Tau ont été développés pour son dosage dans le LCS où les concentrations usuelles se situent entre 100 et 900 pg/ml.

1. ELISA sandwich

L'obtention d'Ac dirigés contre la protéine Tau a permis de développer les premiers dosages de type ELISA sandwich. Cette méthode est la méthode de référence actuelle pour le dosage de Tau dans le LCS en France et plus largement en Europe (51).

La 1^{ère} étape du dosage ELISA sandwich est la fixation sur un support solide de l'Ac de capture complémentaire de l'Ag à doser, un agent saturant (caséine) est ensuite ajouté pour réduire la fixation non spécifique. On ajoute ensuite l'échantillon biologique contenant l'Ag, celui-ci est capturé par le premier Ac. La 2^{ème} étape consiste à détecter l'immun complexe grâce à un second Ac, l'Ac de détection, qui est biotinylé, on a alors formation du sandwich. Lors de la 3^{ème} étape, la streptavidine, qui a une forte affinité pour la biotine, se fixe au sandwich. Elle est couplée à une enzyme (péroxydase) qui après addition du substrat va produire une coloration proportionnelle à la concentration en Ag dans l'échantillon (77). (Fig 12)

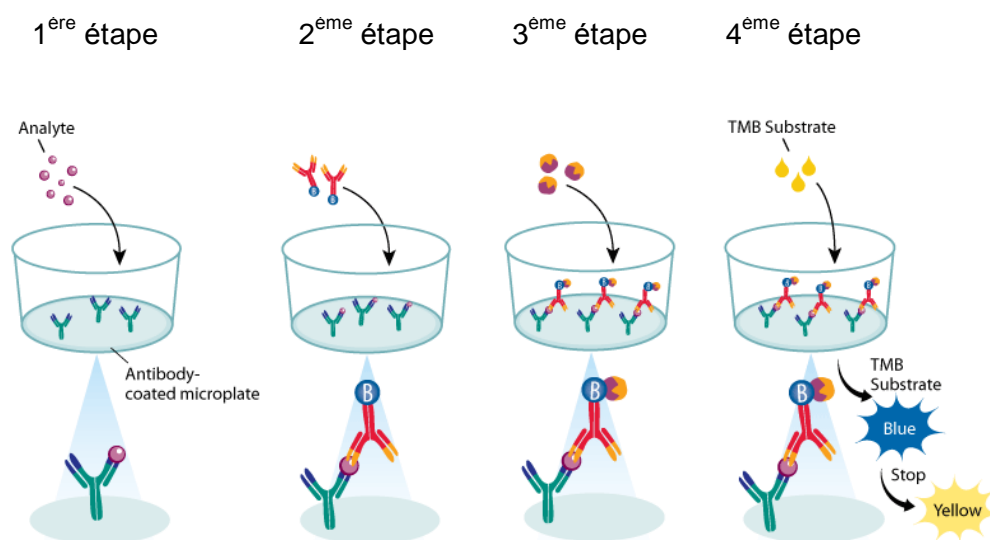






Figure 12 : principe général de formation du sandwich par technique ELISA.

D'après le site internet www.rndsystems.com (page consultée le 29 avril 2015)

-  Ag : analyte à doser
-  Anticorps de capture
-  Anticorps de détection biotinylé
-  Streptavidine-péroxydase

Le support utilisé est une microplaque de 96 puits.

C'est cette technique ELISA sandwich qui a été utilisée dans ce travail pour mettre au point le dosage de la protéine Tau dans le plasma.

Avantages :

- ✓ Très bonne sensibilité et spécificité : reconnaissance de 2 épitopes différents
- ✓ Simple
- ✓ Moins d'interférences que les méthodes compétitives, on travaille en excès d'Ac
- ✓ Cinétique de réaction beaucoup plus rapide que pour les méthodes compétitives : excès de réactif
- ✓ Gamme de concentration mesurée supérieure à celle de l'ELISA compétition et à celle de la néphélométrie, turbidimétrie
- ✓ Limite de détection plus faible que celle de l'ELISA compétition

Inconvénients :

- ✓ Non utilisable pour les petites molécules (haptène) : nécessite au moins deux épitopes distincts
- ✓ Grand volume de réaction par puits (100 µL) : diminution du signal par diffusion
- ✓ Grand volume d'échantillon : 25 à 100 µL (51)
- ✓ Réaction monoplexe (51)
- ✓ Gamme de concentrations plus limitées que celles des nouvelles méthodes d'immunoanalyse avec détection fluo ou électrochimiluminescence

Il n'existait jusque très récemment que deux types de trousse de dosage de Tau par ELISA dans le LCS validé par la Communauté européenne (CE) pour le diagnostic in vitro de la MA. Il s'agit des kits commerciaux INNOTEST® hTAU Ag (dosage de la protéine Tau totale) et INNOTEST® PHOSPHO-TAU (181P) (dosage de la protéine Tau phosphorylée sur la tyrosine en position 181), fabriqué par la société Fujirebio Europe®, autrefois Innogenetics®. Ce sont donc celles utilisées actuellement en France pour l'aide au diagnostic médical. Cependant très récemment un nouveau kit commercial ELISA de la Société Euroimmun® a obtenu le label CE pour le dosage de Tau total. Dans l'avenir proche d'autres Sociétés vont également labelliser des kits de dosage de Tau. Il y aura alors probablement une diversification des méthodes de dosage utilisées en France dans les laboratoires pour la pratique clinique.

L'inconvénient de l'ELISA sandwich est que le site Ac peut être masqué partiellement par le support ce qui conduit à une baisse significative de la réaction et donc de la

sensibilité du dosage. Pour pallier à cela, des traitements de l'Ac capture ont été développés pour mieux exposer le site de reconnaissance. Ces traitements consistent à l'addition d'un ancrage permettant d'éloigner l'Ac de la surface solide en ajoutant par exemple la partie Fc d'un Ac.

Ainsi, de nouvelles techniques basées sur le même principe de formation d'un sandwich Ac-Ag-Ac ont été développées. Elles utilisent de nouveaux supports pour la fixation de l'Ac de capture ainsi que de nouveaux systèmes de détection de l'Ac de révélation, permettant d'une part de couvrir des gammes de concentration plus importantes et d'autre part le multiplexage. Pour le dosage de Tau dans le LCS, 2 dosages ont été développés, un dosage par technologie MSD et un autre par technologie Luminex.

2. MSD

La Technologie MSD (Meso Scale Discovery) est un système multianalytique qui utilise comme méthode de détection l'électrochimiluminescence. (Fig 13) Au fond du puits réactionnel, on trouve une électrode de carbone sur laquelle sont fixés plusieurs Ac de capture différents permettant de détecter plusieurs molécules simultanément. Le principe de dosage de l'ELISA sandwich reste le même. Après formation du sandwich, une différence de potentiel au niveau de l'électrode permet l'oxydation et l'excitation de l'ion Ruthénium conjugué à l'Ac de détection, conduisant à l'émission d'un signal lumineux (photons). (Fig 14)

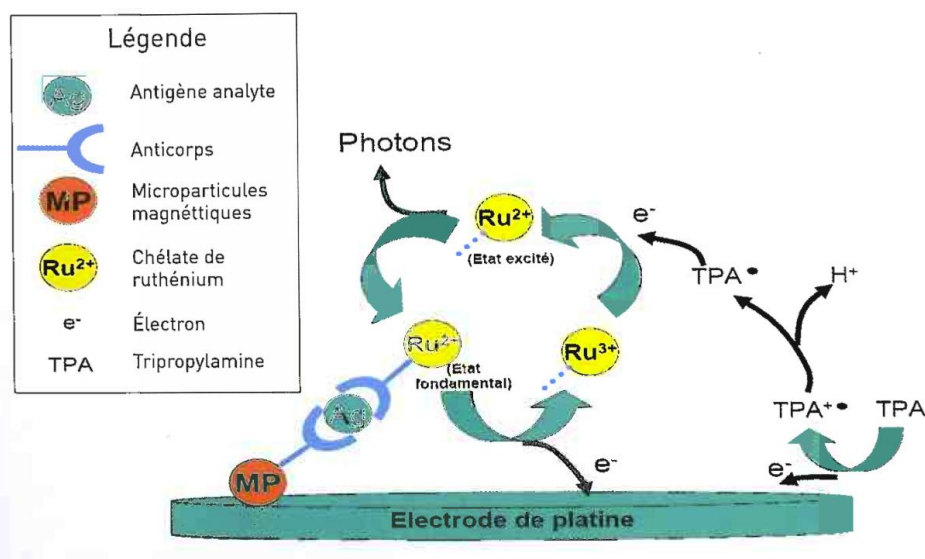


Figure 13 : principe de l'électrochimiluminescence.

D'après le livre Immunoanalyse de Catherine Massart, 2009, EDP Sciences.

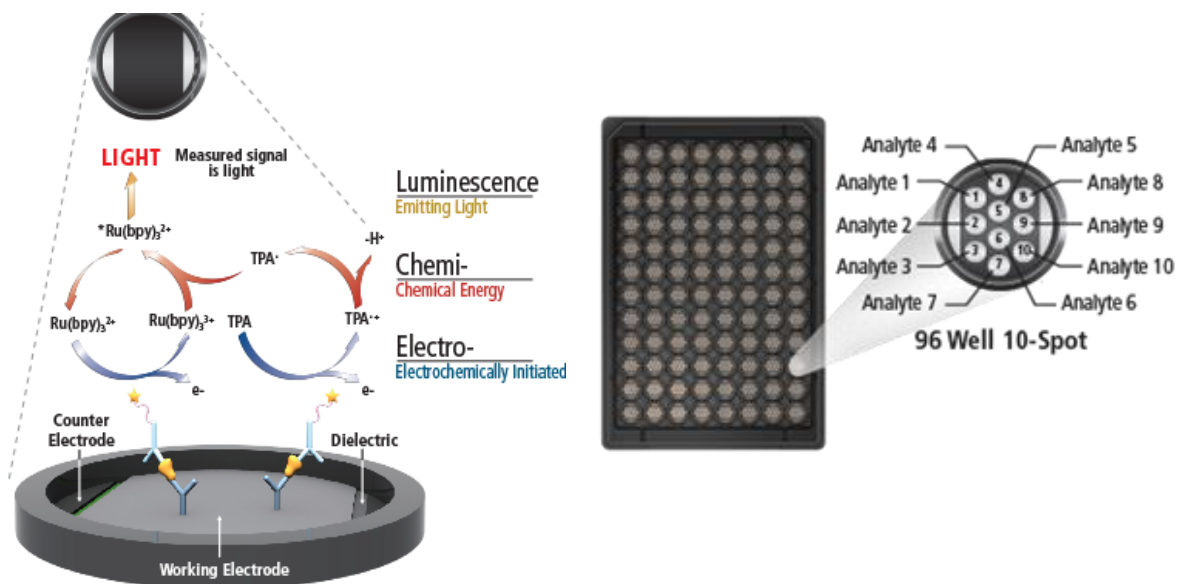


Figure 14 : principe de la technologie MSD.

D'après le site internet www.mesoscale.com (page consultée le 30 avril 2015)

Avantages :

- ✓ Multiplexage, utile dans le diagnostic de la MA car plusieurs paramètres peuvent être dosés en même temps.
- ✓ Rapide
- ✓ Faible bruit de fond
- ✓ Economie d'échantillon
- ✓ Système robuste
- ✓ Gamme dynamique supérieure à l'Elisa (permet de détecter, sans dilution supplémentaire, les concentrations importantes de Tau détectées dans le LCS lors des pathologies avec mort neuronale importante comme par exemple la maladie de Creutzfeld Jakob)

Inconvénients :

- ✓ Coût élevé
- ✓ Système fermé

Pour le dosage de Tau, un kit est commercialisé permettant le dosage simultané de la protéine Tau totale, phosphorylée sur la tyrosine en 231 et du peptide Aβ1-42 (V- PLEX human Tau, P-Tau (231) et Aβ1-42 kit).

3. Luminex

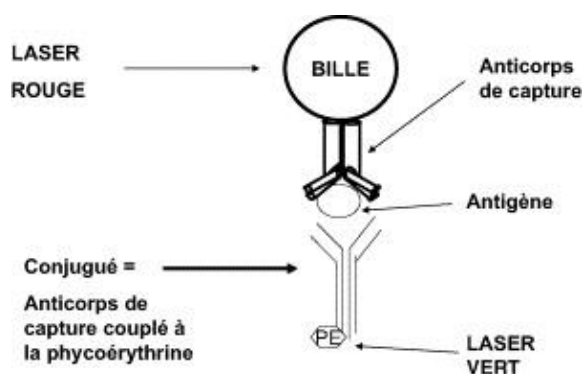


Figure 15 : principe de la technologie Luminex.

D'après *Moalic et al*, 2004.

La technologie Luminex¹⁰⁰ Microsphere System® est une technologie qui allie les compétences de la cytométrie en flux à deux lasers (rouge et vert) et l'utilisation de microbilles en polystyrène (78).

La technologie Luminex reprend le principe de dosage de l'ELISA sandwich mais l'Ac de capture est fixé sur une microbille de 5,6 µm de diamètre. Lors de la fabrication de ces microbilles, deux fluorochromes sont incorporés à l'intérieur avec pour chaque microbille, un rapport précis de la quantité des deux fluorochromes incorporés, cela permet de les identifier (79). La technologie Luminex est donc un système multianalytique puissant puisque jusqu'à 100 microbilles différentes peuvent être incluses dans un même puits de réaction. Après ajout de l'échantillon contenant l'Ag à doser, le sandwich se forme à la surface des microbilles contenues dans le puits de réaction. (Fig 15) La suspension de microbilles est aspirée, puis elle passe dans une veine liquide, à la sortie les billes sont excitées par un jeu de deux lasers, le laser rouge qui permet d'identifier la bille et le laser vert qui excite le fluorochrome couplé à l'Ac de détection et témoigne de la présence de l'Ag (78).

Avantages :

- ✓ Multiplexage, utile dans le diagnostic de la MA car plusieurs paramètres peuvent être dosés en même temps.
- ✓ Economie d'échantillon
- ✓ Rapide

Inconvénients :

- ✓ Les billes sont très sensibles à la lumière (80)

- ✓ Coût
- ✓ Système très sensible aux vibrations extérieures qui entraînent un décalage des lasers
- ✓ Nécessité d'une utilisation régulière car sinon dépôt de tampon dans les circuits et altération du système de flux.

Pour le dosage de Tau, un kit AlzBio3® est commercialisé par la société Fujirebio® permettant le dosage simultané des biomarqueurs A β 1-42, Tau et P-Tau (phosphorylée sur la tyrosine 181) dans le LCS.

C'est ce kit qui est utilisé dans les programmes de recherche américains sur la maladie d'Alzheimer ADNI®.

Ces techniques restent insuffisantes pour doser la protéine Tau dans la majorité des plasmas. En effet, les concentrations plasmatiques de Tau sont beaucoup plus faibles que dans le LCS (<1 picoM). Le dosage de Tau dans le plasma nécessite une optimisation des méthodes de dosage.

La composition du plasma, beaucoup plus riche en protéines par rapport au LCS, est responsable d'une augmentation de l'effet matrice et donc d'une augmentation du bruit de fond. L'effet matrice perturbe la réaction Ag/Ac par fixation de protéines sur l'Ag ou l'Ac de capture. Très récemment un dosage de Tau dans le plasma par une nouvelle technologie combinant le principe ELISA et celui de la microfluidique a été proposé.

4. Simoa

SiMoA (Single Molecule Arrays) est une technique ultrasensible, capable de détecter un signal provenant d'une seule molécule, commercialisée par Quanterix®.

La Technique Simoa reprend le principe de dosage de l'ELISA sandwich mais l'Ac de capture est fixé sur une bille paramagnétique de 2,7 μ m de diamètre, il recouvre toute la surface de la bille. Le reste du dosage est identique, les réactifs utilisés sont les mêmes que dans un ELISA standard.

L'échantillon biologique contenant l'Ag à doser est ajouté, sa concentration doit être de l'ordre du pg/ml afin qu'un seul sandwich se forme par bille. Les 10000 billes sont mélangées avec la solution de substrat et sont réparties dans les micropuits, ces puits ne pouvant contenir qu'une seule bille.

Le capteur réalise alors une mesure digitale de chaque puits, donc de chaque bille, afin de déterminer si l'Ag est présent ou non (81). (Fig 16)

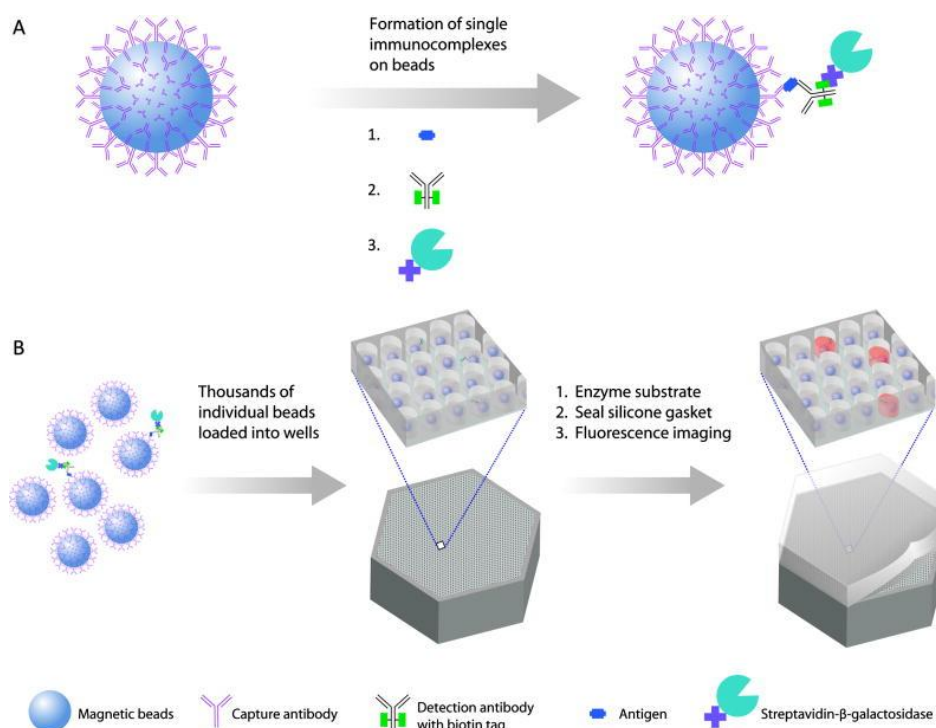


Figure 16 : principe de la technique d'immunoanalyse Simoa.

D'après *Tanen et al*, 2014.

Avantages :

✓ Le volume réactionnel est très faible (50 fl), il correspond à un micropuits dans lequel vient se loger une bille paramagnétique. La coloration produite par un sandwich ne diffuse pas à travers le milieu réactionnel mais est directement mesurée par le capteur d'où une sensibilité beaucoup plus élevée qu'avec la technique ELISA sandwich (81).

✓ Automatisable

✓ Rapide

Inconvénients :

✓ Coût

✓ monoplexe

Quanterix® : Aβ1-40 (sur commande), Aβ1-42 et Tau (recherche).

Les concentrations des biomarqueurs diffèrent entre les différentes techniques d'immunoanalyse ELISA, Luminex et MSD (82). Ceci provient du fait qu'il n'existe pas de matériel de référence certifié (MRC) pour réaliser les calibrateurs de la protéine Tau (83). Il est assez facile de reproduire un MRC pour de petites molécules comme le glucose, en revanche il est beaucoup plus compliqué de le faire pour des protéines dont il est difficile d'établir la pureté du à des problèmes de contaminations ou à des problèmes d'hétérogénéité causés par les modifications post traductionnelles (83). Le développement d'un tel standard est une tâche complexe qui nécessite la collaboration des chercheurs, des industriels et des laboratoires de métrologie. Toutefois, les techniques de dosage ont pu être comparées et les concentrations sont hautement corrélées entre les techniques ELISA, MSD et Luminex (82). Cependant l'absence de MRC rend difficile la comparaison des différentes études portant sur le dosage de Tau.

F. ADx215 : objectifs de l'étude

1. ADx215

L'anticorps ADx215 a été généré à partir de souris immunisées par une protéine Tau produite chez la levure. Le gène de la protéine Tau humaine a été implanté dans le génome de la levure. Des mutations dans les gènes codant les kinases ont été réalisées conduisant à la synthèse, par la levure, d'une protéine Tau ayant les caractéristiques de celle retrouvée dans la MA (hyperphosphorylation, changement de conformation et auto-agrégation). Cette protéine Tau a été purifiée et injectée à des souris afin qu'elles s'immunisent.

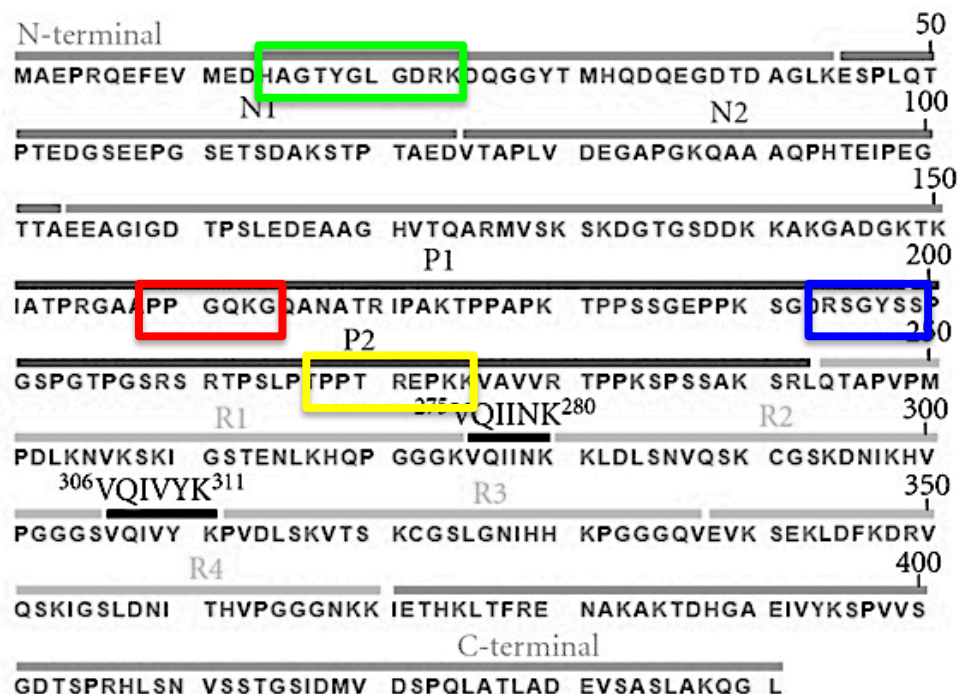
L'anticorps ADx215 ainsi produit, a été caractérisé et validé sur différents modèles tels que des protéines Tau recombinantes, des homogénats de cerveaux de patients MA ou des souris mutées THY-Tau 22 (73).

Tout d'abord, l'épitope reconnu par ADx215 a été déterminé. L'Ac ADx215 reconnaît la partie N terminale de la protéine Tau au niveau de la séquence d'AA ¹⁶GTYGLGDRK²⁴, quand celle-ci n'est pas phosphorylée sur la tyrosine 18. (Fig 17) Cet épitope est spécifique des primates (pas de détection de la protéine Tau de souris) (73).

Ensuite, des expériences de western blots avec des protéines Tau recombinantes ont montré que ADx215 reconnaît la protéine Tau sous forme phosphorylée (65 à 75 kDa), non phosphorylée (60 à 62 kDa) et des oligomères de protéine Tau (100 à 130 kDa) qui semblent correspondre à des dimères de Tau (73).

Enfin, ADx215 reconnaît la protéine Tau in vivo. Sur des homogénats du cortex fronto-temporale obtenus à partir de patients MA (niveaux de Braak 4, 5 et 6), ADx215 marque systématiquement la DNF et les dimères de protéine Tau, en plus des différentes formes de monomères. Ces dimères seraient impliqués dans la propagation de la MA (84).

L'affinité de l'Ac ADx215 pour l'isoforme la plus longue (441 AA, 2N/4R) est très grande : sa constante d'équilibre de dissociation est : $K_d = 14 \text{ pmol/L}$ (73). Utilisé comme Ac de détection biotinylé, ADX215 permet le dosage des la protéine Tau totale dans le LCS.



X = Basic AA (+)
 X = Polar uncharged AA (hydrophilic)
 X = Nonpolar AA (hydrophobic)
 X = Acidic AA (-)

Figure 17 : épitopes reconnus par les différents Ac dirigés contre Tau.

Séquence d'AA de la protéine TAU, *ADx215, HT7, BT2 et AT120
 Adapté d'après Kolarova M et al, 2012.

A noter que les Ac AT120, HT7 et BT2, utilisés pour le dosage dans le LCS de la protéine Tau totale avec le kit commercial INNOTEST hTAU Ag, ciblent la partie centrale de la protéine Tau. AT120 se lie au niveau des AA 218 à 224, BT2 au niveau des AA 193 à 198 et HT7 au niveau des AA 159 à 163 (73), (FUJIREBIO, FRI94931). (Fig 17)

2. Objectifs de l'étude

L'objectif principal de notre travail est d'optimiser le dosage de la protéine Tau dans le plasma par technique ELISA sandwich avec l'Ac ADx215 et d'appliquer ce dosage aux plasmas des patients de la cohorte BLATAZAR.

Les objectifs secondaires de notre travail ont été :

- de sélectionner les patients de la cohorte BALTAZAR ayant les concentrations plasmatiques de protéine Tau les plus élevées.
- de comparer chez ces patients, les résultats du dosage plasmatique de Tau avec l'Ac ADx215 :

- ✓ Entre les différents groupes diagnostiques de l'étude BALTAZAR
- ✓ Aux résultats du dosage plasmatique avec le kit INNOTEST hTAU
- ✓ Aux résultats du dosage des biomarqueurs (Tau, P-Tau et A β 1-42) dans le LCS

3. Conduite de l'étude

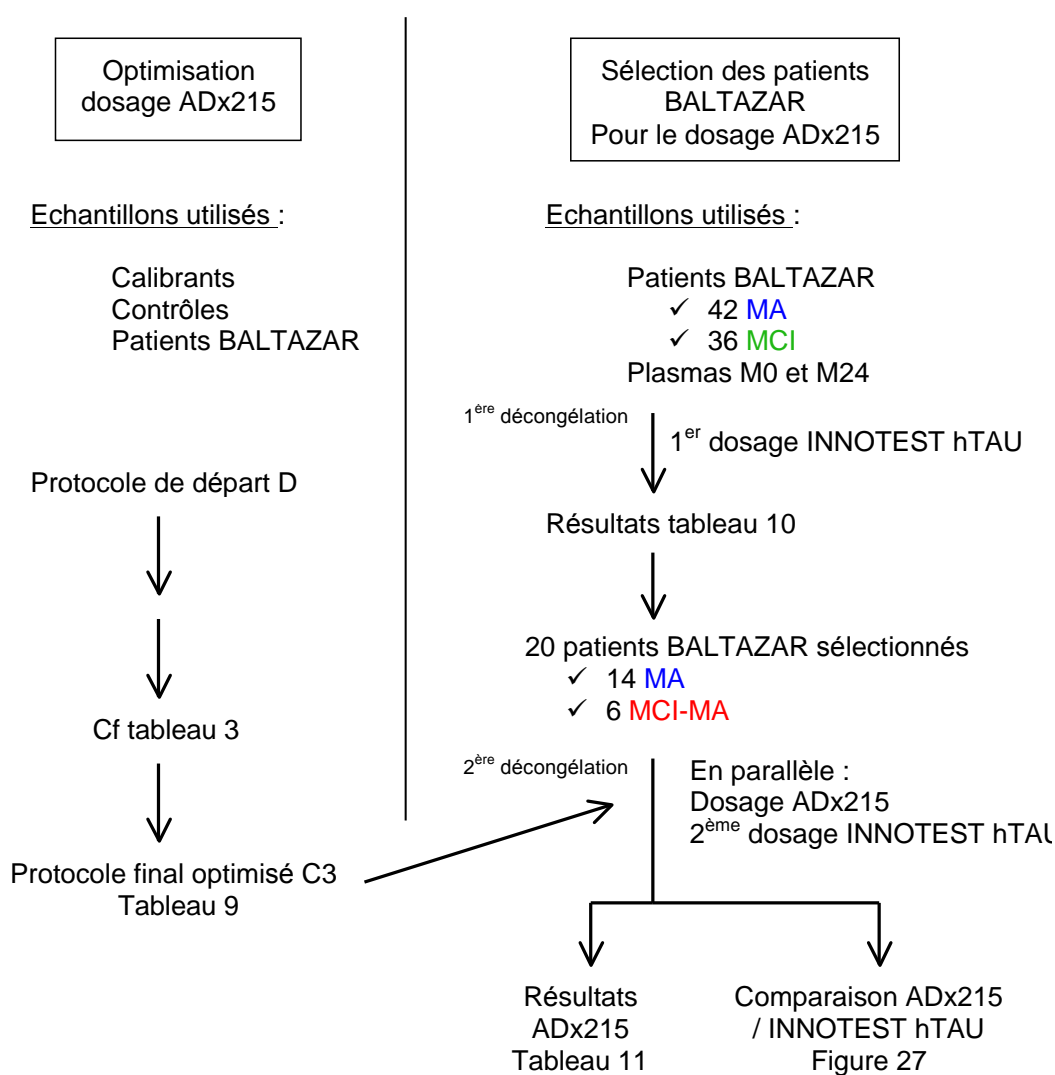


Figure 18 : conduite de l'étude

Notre travail s'est déroulé en 3 parties.

Nous avons tout d'abord optimisé le dosage ELISA sandwich avec l'Ac ADx215 afin d'avoir un bruit de fond le plus faible et des densités optiques (DO) optimales. Un protocole final optimisé a été établi.

Parallèlement, nous avons sélectionné à l'aide du kit commercial INNOTEST hTAU (Ac de capture AT120) 78 patients BALTAZAR, 42 MA et 36 MCI. Les patients ayant plasmas avec les plus fortes concentrations en protéine Tau ont été sélectionnés, soit 40 plasmas (M0 et M24) au total, correspondant à 20 patients, 14 MA et 6 MCI-MA.

Ces plasmas ont été ensuite dosés avec l'ADx215 selon le protocole final optimisé.

Un second dosage INNOTEST hTAU a été réalisé en parallèle afin de les comparer et de s'affranchir de la variabilité due à la décongélation.

II. Matériel et méthode

A. Les patients : étude BALTAZAR-Pla-Tau

1. Présentation

L'étude BALTAZAR-Pla-Tau est une étude secondaire du PHRC National BALTAZAR (Biomarker of AmyLoid pepTide and AlZheimer's diseAse Risk, ClinicalTrials.gov n°NCT01315639), à l'initiative des trois Centres Mémoire de Ressources et de Recherche de Lille, Paris et Montpellier.

Il s'agit d'une étude prospective en cours, multicentrique regroupant 30 centres en France. Elle a débuté en septembre 2010 et est sous la responsabilité de l'Assistance Publique / Hôpitaux de Paris.

L'étude princeps BALTAZAR a pour objectif principal d'étudier l'intérêt du dosage plasmatique des peptides amyloïdes A β 1-40, A β 1-42 pour évaluer le pronostic de la MA. L'étude BALTAZAR-Pla-Tau s'intéresse quant à elle à l'intérêt du dosage de la protéine Tau totale dans le plasma pour évaluer ce même risque.

2. Procédure

Tableau 2 : principaux examens réalisés aux différentes visites

Examens Visites	Clinique	Neuropsychométrique	IRM	Plasma	LCS*
Inclusion M0	oui	oui	oui	oui	oui Si accord
Tous les 6 mois M6 - M12 - M18	oui	oui	-	-	-
2 ans M24	oui	oui	oui	oui	oui Si accord
30 mois M30	oui	oui	-	-	-
3 ans M36	oui	oui	-	-	-
Conversion MCI en MA	oui	oui	oui	oui	-

* Le dosage des biomarqueurs dans le LCS nécessite l'accord du patient pour la ponction lombaire.

Les sujets sélectionnés au sein de l'étude BALTAZAR sont suivis durant 3 ans, avec 7 visites d'évaluation.

Les biomarqueurs dosés sont :

- ✓ dans le LCS : A β 1-42, Tau, P-Tau
- ✓ dans le plasma : A β 1-42, A β 1-40, Tau total.

BALTAZAR est l'une des cohortes les plus importantes dans la recherche de nouveaux biomarqueurs, elle centralise des données cliniques et para cliniques provenant de tests neuropsychométriques, de l'imagerie et de la biologie.

3. Objectifs

Les études BALTAZAR et BALTAZAR-Pla-Tau visent à déterminer s'il existe une corrélation entre les taux de biomarqueurs plasmatiques (A β 1-40, A β 1-42, Tau totale) et le risque de conversion des sujets MCI en MA ou de dégradation des sujets MA, évaluée par le test neuropsychométrique MMSE.

4. Critères d'inclusion

L'étude BALTAZAR a inclus 1052 sujets :

- ✓ 502 avec une maladie d'Alzheimer diagnostiquée : MA
- ✓ 514 avec des troubles cognitifs légers : MCI
- ✓ 36 sont en cours de diagnostic.

- MA

Le groupe MA est composé de sujets âgés de 45 ans et plus, qui répondent aux critères diagnostiques internationaux de la maladie d'Alzheimer du DSM IV-TR et du NINCDS-ADRDA (2).

Seuls les sujets atteints de MA légère à modérée ont été inclus dans le groupe MA, ils ont été définis par un score MMSE supérieur à 15.

- MCI

Le groupe MCI est composé de sujets âgés de 70 ans et plus, qui ne répondent ni à des critères de démence, ni à une fonction cognitive normale.

Les sujets MCI répondent aux critères internationaux de Petersen (85).

- MCI-MA

Les sujets MCI-MA sont des patients qui ont été inclus dans l'étude au sein du groupe MCI et qui se sont convertis en MA au cours des trois années de suivi.

5. Critères d'exclusion

Fonction cognitive normale.

Forme génétique de MA.

Dépression majeure.

Autres maladies pouvant interférer avec l'évaluation des fonctions cognitives :

- ✓ Epilepsie
- ✓ Maladie de Parkinson
- ✓ Schizophrénie
- ✓ Autres démences : vasculaire, à corps de Lewy, fronto-temporale.

Contre indication à l'IRM, à la ponction lombaire.

Sujet ayant déjà été inclus dans l'étude BALTAZAR.

B. Le kit commercial INNOTEST hTAU Ag

Le kit commercial INNOTEST® hTAU Ag est un test ELISA sandwich en phase solide qui permet la détermination quantitative de la protéine Tau totale c'est à dire phosphorylée et non phosphorylée, dans le liquide cébrospinal (LCS). (FUJIREBIO, FRI94931)

1. Principe du test

Méthode ELISA immunoenzymatique de type sandwich.

L'anticorps de capture **AT120** est greffé au fond d'un puits, le LCS est ajouté, la protéine Tau ou ses fragments présents dans l'échantillon sont capturés par ce premier anticorps. (Fig 19)

Une incubation avec deux anticorps de détection, HT7 et BT2, permet la formation de sandwich. Ces deux anticorps étant biotinylés, la détection du sandwich se fait grâce à la streptavidine-peroxydase, la streptavidine se liant à la biotine des anticorps de détection.

Après addition de la solution de substrat, les échantillons vont développer une coloration, son intensité est proportionnelle à la quantité de protéine Tau totale humaine présente dans l'échantillon.

résultats du dosage ADx215 avec ceux du dosage INNOTEST hTAU après un cycle de décongélation des échantillons.

C. Optimisation du dosage ADx215

La quantité réduite d'anticorps ADx215 disponible pour mener la comparaison avec l'anticorps AT120 nous a conduits à améliorer ce dosage mais nous a limités dans le nombre de tests réalisés.

Nous avons choisi de comparer les DO brutes pour sélectionner les meilleures conditions de dosage, en effet cela nous a permis de comparer de faibles DO, en dessous du seuil de quantification.

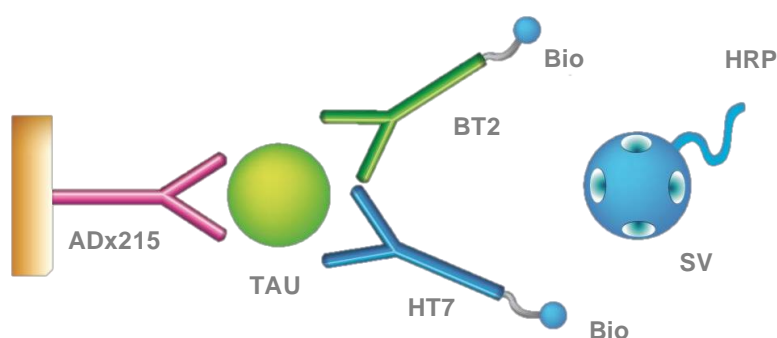


Figure 20 : principe du dosage ADx215.

Adapté d'après la notice FRI94931 de FUJIREBIO, 2014.

1. Test ELISA de départ (protocole D)

- Préparation des réactifs

Tampon carbonate :

Préparer une solution de bicarbonate de sodium NaHCO_3 à 0,1 mol/L (4,2 g pour 500 ml) ainsi qu'une solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 à 0,1 mol/L (2,645 g pour 250 ml).

Ajouter progressivement le Na_2CO_3 dans le NaHCO_3 jusqu'à obtenir une solution de pH égale à 9,6.

Solution de caséine 0,1 % :

La solution de caséine est à réaliser la veille pour permettre sa dissolution complète. Amener la solution de lavage 25X du kit INNOTEST hTAU à température ambiante 60 min avant utilisation.

Diluer la solution de lavage au 25^{ème} avec de l'eau stérile.

Préparer une solution de caséine à 0,1 % à dissoudre dans la solution de lavage diluée (0,020 g de caséine dans 20 ml de solution de lavage diluée).

Le reste de la solution de lavage diluée sera utilisée pour les étapes de lavage du protocole.

- Greffe de l'anticorps de capture ADx215

À partir d'une microplaque ELISA vierge (NUNC F8 Maxisorp, réf. 469949) on dépose dans chaque puits 100 µL d'anticorps de capture, **ADx215** à 2 µg/ml dilués dans du tampon carbonate. Recouvrir la plaque d'un film plastique et la laisser une nuit à 4°C. Enlever le surnageant de la solution de coating sans rincer.

Saturer les puits avec 200 µL de solution de caséine à 0,1% et laisser incuber une heure à 37°C. Rincer les puits avec 200 µL de solution de lavage diluée. Répéter 3 fois cette étape.

- Protocole de lavages et de révélation

Nous avons repris les réactifs (anticorps secondaires, diluants, solution de lavage, substrat) du kit commercial INNOTEST hTAU.

Amener l'ensemble des réactifs à température ambiante 60 min avant utilisation.

Diluer les 2 anticorps de révélation biotinylés, HT7 et BT2 (conjugué 1) au 100^{ème} avec le diluant conjugué 1, vortexer et déposer 75 µL dans chaque puits.

Déposer ensuite les échantillons : 100 µL de tampon SD utilisé comme blanc (diluant échantillon du kit), 25 µL de calibrant, 25 µL de contrôles (RVC1, RVC2) et 100 µL de plasma. Mélanger en tapotant le coté de la plaque, couvrir d'un film puis laisser incuber une nuit (14 à 18 heures) à 25°C.

Le lendemain, rincer 4 fois les puits avec 200 µL de solution de lavage diluée.

Diluer le conjugué 2 100X (streptavidine-peroxydase) au 100^{ème} avec le diluant conjugué 2, vortexer et déposer 100 µL dans chaque puits. Laisser incuber 30 min à 25°C.

Rincer 4 fois les puits avec 200 µL de solution de lavage diluée.

Diluer le substrat TMB 100X (tétraméthylbenzidine) au 100^{ème} avec le tampon substrat, vortexer, déposer 100 µL dans chaque puits, la solution doit être incolore avant le dépôt.

Laisser la plaque à l'abri de la lumière à 25°C pendant 30 min.

Ajouter ensuite 50 µL de solution d'arrêt prêt à l'emploi dans chaque puits.

Les puits positifs de couleur bleu deviennent jaunes, la réaction est arrêtée.

Lecture de la plaque à une longueur d'onde de 450 nm afin d'obtenir les absorbances.

2. Echantillons utilisés pour l'optimisation

Au cours de l'optimisation, nous avons utilisé la gamme de calibration (cal 1 à cal 6) et les contrôles (RVC1 et RVC2) du kit commercial INNOTEST hTAU dans le LCS (LOT : 400062) dont les concentrations sont les suivantes :

Cal 6	= 40,8 pg/ml
Cal 5	= 122,4 pg/ml
Cal 4	= 271,5 pg/ml
Cal 3	= 599,8 pg/ml
Cal 2	= 879,7 pg/ml
Cal 1	= 2324,9 pg/ml
RVC1	= 618,6 – 1030,9 pg/ml
RVC2	= 139,1 – 231,8 pg/ml

Nous avons aussi testé avec le protocole ELISA de départ, le plasma de 10 patients pris au hasard dans l'étude BALTAZAR, 5 patients M0 et 5 patients M24.

Les patients avec les DO supérieures au blanc ont été sélectionnés pour l'optimisation du dosage ADx215, il s'agit des patients 010123VD, 010234SC, 010540GJ.

3. Optimisation des tampons de dilution des conjugués

Tableau 3 : protocoles T1 à T3.

Dans le protocole ELISA de départ (T1), le conjugué 1 contenant les anticorps de révélation HT7 et BT2 et le conjugué 2 contenant la streptavidine-péroxydase sont dilués respectivement dans le diluant conjugué 1 et 2 du kit INNOTEST hTAU.

Afin d'optimiser les conditions d'hybridation Ag/Ac secondaires, nous avons comparé le protocole T1 à deux autres, T2 et T3. Ces protocoles utilisent un seul tampon de dilution pour les deux conjugués : pour le protocole T2 un tampon PBS/BSA 0,2 % et pour le protocole T3 un tampon PBS/Tween 0,05 %.

Nous avons testé pour ces 3 conditions un blanc (100 µL de tampon SD), 25 µL de calibrant 6 et 25 µL des deux contrôles de qualité du kit, RVC1 et RVC2.

Les résultats obtenus (DO brutes) ont été comparés au protocole initial T1.

4. Optimisation du volume de plasma

Tableau 3 : protocoles Vp1 à Vp3.

Afin d'économiser la quantité de plasma utilisé dans le dosage, nous avons testé 3 volumes de plasma : 100 μL (Vp1), 50 μL (Vp2) et 25 μL (Vp3) avec une concentration en ADx215 de 2 $\mu\text{g/ml}$.

Pour chaque condition, deux échantillons de plasma 010123VD et 010234SC ont été testés.

Les résultats obtenus (DO brutes) ont été comparés au protocole initial Vp1.

5. Optimisation de la concentration en ADx215

Tableau 3 : protocoles C1 à C8.

La concentration du protocole de départ C1 est de 2 $\mu\text{g/ml}$.

Dans le but d'optimiser la quantité d'anticorps ADx215 utilisée dans le test, nous avons comparé différentes concentrations décroissantes en partant de 2 $\mu\text{g/ml}$.

Les concentrations testées sont en $\mu\text{g/ml}$: 1,5 – 1 – 0,5 – 0,25 – 0,125 – 0,05 – 0,02.

Pour chaque condition, deux échantillons de plasma : 010123VD et 010234SC ainsi qu'un blanc et la gamme complète de calibration ont été testés.

Les résultats obtenus (DO brutes) ont été comparés à la concentration de départ 2 $\mu\text{g/ml}$.

6. Optimisation du volume de coating ADx215

Tableau 3 : protocoles Vadx1 et Vadx2.

Dans un même but d'optimiser la quantité d'anticorps ADx215 utilisés dans le dosage, nous avons cherché à diminuer le volume d'anticorps déposé.

100 μL et 50 μL ont été testés avec le blanc et la gamme complète de calibration.

Les résultats obtenus (DO brutes) ont été comparés au protocole initial Vadx1.

7. Bilan des étapes d'optimisation

Tableau 3 : bilan des étapes d'optimisation

Condition testée	Protocoles		
Tampons de dilution des conjugués	T	T1	Kit INNOTEST hTAU
		T2	PBS/BSA 0,2 %
		T3	PBS/Tween 0,05 %
Volume de plasma	Vp	Vp1	100 µL
		Vp2	50 µL
		Vp3	25 µL
Concentration en ADx215	C	C1	2 µg/ml
		C2	1,5 µg/ml
		C3	1 µg/ml
		C4	0,5 µg/ml
		C5	0,25 µg/ml
		C6	0,125 µg/ml
		C7	0,05 µg/ml
		C8	0,02 µg/ml
Volume de coating ADx215	Vadx	Vadx1	100 µL
		Vadx2	50 µL

8. Test ELISA final optimisé (protocole C3)

- Préparation des réactifs

Tampon carbonate :

Préparer une solution de bicarbonate de sodium NaHCO_3 à 0,1 mol/L (4,2 g pour 500 ml) ainsi qu'une solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 à 0,1 mol/L (2,645 g pour 250 ml).

Ajouter progressivement le Na_2CO_3 dans le NaHCO_3 jusqu'à obtenir une solution de pH égale à 9,6.

Solution de caséine 0,1 % :

La solution de caséine est à réaliser la veille pour permettre sa dissolution complète. Amener la solution de lavage 25X du kit INNOTEST hTAU à température ambiante 60 min avant utilisation.

Diluer la solution de lavage au 25^{ème} avec de l'eau stérile.

Préparer une solution de caséine à 0,1 % à dissoudre dans la solution de lavage diluée (0,020 g de caséine dans 20 ml de solution de lavage diluée).

Le reste de la solution de lavage diluée sera utilisée pour les étapes de lavage du protocole.

- Greffe de l'anticorps de capture ADx215

À partir d'une microplaque ELISA vierge (NUNC F8 Maxisorp, réf. 469949) on dépose dans chaque puits **100 µL** d'anticorps ADx215 à **1 µg/ml** dilués dans du tampon carbonate. Recouvrir la plaque d'un film plastique et la laisser une nuit à 4°C. Enlever le surnageant de la solution de coating sans rincer.

Saturer les puits avec 200 µL de solution de caséine à 0,1% et laisser incuber une heure à 37°C. Rincer les puits avec 200 µL de solution de lavage diluée. Répéter 3 fois cette étape.

- Protocole de lavages et de révélation

Diluer le conjugué 1 100X (2 anticorps monoclonaux anti-TAU, HT7 et BT2) au 100^{ème} avec le **diluant conjugué 1**, vortexer et déposer 75 µL dans chaque puits.

Déposer ensuite les échantillons : 25 µL de tampon SD utilisé comme blanc (diluant échantillon du kit), 25 µL de calibrant, 25 µL de contrôles (RVC1, RVC2) et **50 µL** de plasma. Mélanger en tapotant le coté de la plaque, couvrir d'un film puis laisser incuber une nuit (14 à 18 heures) à 25°C.

Le lendemain, rincer 4 fois les puits avec 200 µL de solution de lavage diluée.

Diluer le conjugué 2 100X (streptavidine-peroxydase) au 100^{ème} avec le **diluant conjugué 2**, vortexer et déposer 100 µL dans chaque puit.

Laisser incuber 30 min à 25°C.

Rincer 4 fois les puits avec 200 µL de solution de lavage diluée.

Diluer le substrat TMB 100X (tétraméthylbenzidine) au 100^{ème} avec le tampon substrat, vortexer, déposer 100 µL dans chaque puits, la solution doit être incolore avant le dépôt.

Laisser la plaque à l'abri de la lumière à 25°C pendant 30 min.

Ajouter ensuite 50 µL de solution d'arrêt prêt à l'emploi dans chaque puits.

Les puits positifs de couleur bleu deviennent jaunes, la réaction est arrêtée.

Lecture de la plaque à une longueur d'onde de 450 nm afin d'obtenir les absorbances.

D. Statistiques

Nous avons utilisé le logiciel Prism6 pour Windows, version 6.05 (GraphPad Software Inc. CA, USA).

Le seuil de signification retenu est de 5 % soit une valeur du $p < 0,05$.

Les variables quantitatives analysées sont :

- ✓ La concentration en protéine Tau dans le plasma, en pg/ml.
- ✓ La concentration des biomarqueurs dans le LCS (Tau, P-Tau et A β 1-42), en pg/ml.
- ✓ L'âge : en années

Etant donné le faible effectif ($n < 30$), nous avons choisi d'utiliser des tests non paramétriques. Les résultats sont exprimés en médiane.

Les variables qualitatives analysées sont :

- ✓ Le sexe : codé 1 pour les hommes et 2 pour les femmes.
- ✓ Génotype d'APOE : codé 4 pour E3/E3, 5 pour E3/E4 et 6 pour E4/E4

1. Analyse des dosages de Tau dans le plasma

Nous avons réalisé les analyses statistiques avec 2 séries de valeurs de concentrations en protéine Tau. Une première analyse a été effectuée avec l'ensemble des valeurs obtenues, sans tenir compte des seuils de détection recommandés et calculés. Les valeurs négatives ont toutefois été ramenées à 0 (série de valeurs sans seuil). Nous avons ensuite réalisé une seconde analyse en tenant compte cette fois des seuils de détection, ainsi les valeurs inférieures à ces seuils (seuil recommandé de 34 pg/ml pour le dosage INNOTEST hTAU et seuil calculé à 39 pg/ml pour le dosage ADx215), ont été ramenées à zéro (série de valeurs avec seuils).

À l'aide du test de Wilcoxon pour séries appariées, nous avons comparé les concentrations en protéine Tau avec les deux dosages ADx215 et INNOTEST hTAU chez les mêmes patients aux temps M0 et M24.

De même, nous avons comparé les moyennes des deux groupes indépendants MA et MCI-MA aux temps M0 et M24 à l'aide du test de Mann & Whitney.

Enfin, les corrélations entre les deux anticorps ADx215 et AT120 ont été réalisées à l'aide du test de corrélation de Spearman et la droite de régression a été calculée à l'aide de l'équation classique de la régression linéaire :

- ✓ Avec et sans prise en compte des seuils de détection.
- ✓ Avec et sans les valeurs discordantes.

Les deux dosages de protéines Tau avec le kit INNOTEST hTAU ont été comparés avant et après décongélation à l'aide du test de Wilcoxon pour séries appariées.

2. Tests de corrélations des dosages de Tau dans le plasma avec les données cliniques et biologiques du LCS

À l'aide du test de corrélation de Spearman nous avons étudié la corrélation entre les dosages plasmatiques de Tau (ADx215 et INNOTEST hTAU) et :

- ✓ Tau dans le LCS, dosage INNOTEST® hTAU Ag
- ✓ P-Tau dans le LCS, dosage INNOTEST® PHOSPHO-TAU (181P)
- ✓ A β 1-42 dans le LCS, dosage INNOTEST® B-AMYLOID (1-42)

Ces analyses statistiques ont été réalisées avec et sans prise en compte des seuils de détection

Nous avons aussi étudié, grâce au test de Mann & Whitney la corrélation entre les dosages plasmatiques de protéine Tau (ADx215 et INNOTEST hTAU) et :

- ✓ L'âge
- ✓ L'APOE
- ✓ Le sexe

III. Résultats

A. Optimisation du dosage ADx215

Notre objectif est d'améliorer le dosage ADx215 de façon à avoir le bruit de fond le plus faible (blanc) et d'avoir des DO optimales pour les concentrations les plus faibles.

Au cours de l'optimisation, nous avons utilisé les calibrants (cal 1 à cal 6) et les contrôles (RVC1 et RVC2) du kit commercial INNOTEST hTAU Ag dans le LCS dont les concentrations sont les suivantes :

Cal 6	= 40,8 pg/ml
Cal 5	= 122,4 pg/ml
Cal 4	= 271,5 pg/ml
Cal 3	= 599,8 pg/ml
Cal 2	= 879,7 pg/ml
Cal 1	= 2324,9 pg/ml
RVC1	= 618,6 – 1030,9 pg/ml
RVC2	= 139,1 – 231,8 pg/ml

Nous avons aussi utilisés 3 patients de l'étude BALTAZAR : 010123VD, 010234SC et 010540GJ.

Les résultats de l'optimisation du dosage ADx215 sont exprimés en DO, la quantité réduite d'anticorps ADx215 ne nous ayant pas permis de réaliser une gamme de calibration complète pour chaque protocole.

1. 1^{ère} condition testée : tampons de dilution des conjugués

Tableau 4 : résultats (DO 450 nm) obtenus selon les différents tampons

Protocoles Echantillons	T1 = D	T2	T3
	Tampons du kit commercial	Tampon PBS/BSA 0,2 %	Tampon PBS/Tween 0,05 %
Blanc	0,045	0,057	0,050
Cal 6	0,045	0,05	0,046
RVC 1	1,272	0,927	1,204
RVC 2	0,133	0,123	0,173

On observe un bruit de fond plus élevé avec le protocole T2 comparé aux deux autres protocoles T1 et T3 qui ont un bruit de fond comparable. Les DO des

contrôles RVC1 et RVC2 sont plus faibles pour le protocole T2 comparé aux protocoles T1 et T3.

Conclusion : Le protocole T2 semble être le moins performant. Les protocoles T1 et T3 sont comparables mais le protocole T1 présente l'avantage d'utiliser un tampon commercial, bien standardisé. Nous avons donc décidé de rester sur le protocole T1.

2. 2^{ème} condition testée : volume de plasma

Tableau 5 : résultats (DO 450 nm) obtenus selon les différents volumes de plasma

Protocoles Echantillons	Vp1 = D	Vp2	Vp3
	100 µL	50 µL	25 µL
010123VD	0,449	0,400	0,212
010234SC	0,111	0,093	0,074
010540GJ	0,048	0,056	0,048

On observe une baisse significative des DO avec le protocole Vp3. Pour l'échantillon le plus concentré en protéine Tau, 010123VD, on a une valeur de DO approximativement 2 fois plus faible avec le protocole Vp3 par rapport à Vp1. Pour 010234SC, on observe une baisse de DO de 28 % entre les protocoles Vp1 et Vp3. En revanche, on n'observe pas de différence notable entre les protocoles Vp1 et Vp2, le coefficient de variation (CV) moyen pour 010123VD étant de 8,2% et de 12,5 % pour 010234CS.

Pour l'échantillon 010540GJ, la protéine Tau est non quantifiable avec les 3 protocoles.

Conclusion : 25 µL de plasma semble être un volume de plasma trop faible pour assurer une bonne quantification. Les protocoles Vp1 et Vp2 sont comparables, nous avons donc sélectionné le protocole Vp2 qui permet de réaliser une économie de plasma par rapport à Vp1.

3. 3^{ème} condition testée : concentration en ADx215

Tableau 6 : résultats (DO 450 nm) obtenus selon les différentes concentrations en ADX215 (µg/ml).

Protocoles	C1 = Vp2	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Echantillons	2	1,5	1	0,5	0,25	0,125	0,05	0,02
Blanc	0,044	0,044	0,042	0,042	0,043	0,043	0,036	0,042
Cal 6	0,060	0,047	0,051	0,051	0,043	0,043	0,045	0,041
Cal 5	0,121	0,109	0,111	0,047	0,043	0,050	0,046	0,041
Cal 4	0,318	0,290	0,306	0,094	0,049	0,093	0,099	0,045
Cal 3	0,982	0,907	0,932	0,288	0,158	0,282	0,185	0,128
Cal 2	1,471	1,425	1,428	0,623	0,299	0,487	0,593	0,312
Cal 1	2,362	2,379	2,241	1,151	0,762	1,102	1,499	0,938
010123VD	0,400	0,357	0,389	0,139	0,137	0,151	0,163	0,190
010234SC	0,093	0,098	0,075	0,043	0,042	0,046	0,042	0,045

La ligne bleue sépare les protocoles pour lesquels les DO restent stables de ceux pour lesquels on observe une baisse des DO.

On observe une stabilité des DO de la gamme de calibration et des patients jusqu'au protocole C3, en effet, le CV moyen des protocoles C1 et C3 est de 5,5 %. Avec le protocole C4 on observe une baisse de moitié des DO entre les protocoles C1 et C4.

Conclusion : La concentration la plus faible permettant de garder des DO stables par rapport au protocole C1 est 1 µg/ml. Le protocole C3 a donc été sélectionné, la diminution de la concentration en ADx215 nous a permis de réaliser le double de dosages.

Un problème technique a du survenir lors de la réalisation de la gamme de calibration du protocole C5, les DO étant inférieurs à celles du protocole C6. Ceci n'a cependant pas eu d'impact pour le choix du protocole.

4. 4^{ème} condition testée : volume de coating ADx215

Tableau 7 : résultats (DO 450nm) obtenus selon les différents volumes de coating d'ADx215

Echantillons \ Protocoles	Vadx1 = C3	Vadx2
	100 µL	50 µL
Blanc	0,044	0,047
Cal 6	0,044	0,044
Cal 5	0,084	0,046
Cal 4	0,318	0,080
Cal 3	0,560	0,297
Cal 2	1,015	0,501
Cal 1	2,252	0,895

On note une diminution importante des DO à partir du cal 5 avec le protocole Vadx2, en effet, les DO sont plus faibles de 45 % pour le calibrant 5 et jusqu'à 75 % pour le calibrant 4 par rapport au protocole Vadx1.

Conclusion : La diminution du volume de coating entraine une baisse significative des DO, nous avons donc gardé 100 µL comme volume de coating d'ADx215.

5. Le blanc et la gamme de calibration

L'absorbance du blanc et de la gamme de calibration ont été mesurées pour une concentration en ADx215 égale à 1 µg/ml à trois reprises lors des tests d'optimisation de la concentration en ADx215 ainsi que lors du dosage des patients BALTAZAR sélectionnés.

Tableau 8 : fidélité intermédiaire (DO 450 nm) du protocole final C3 déterminée à partir de 4 séries

	Série 1	Série 2	Série 3	BALTAZAR Série 4	CV (%)
Blanc	0,042	0,041	0,043	0,048	7,15
Cal 6	0,051	0,044	0,047	0,053	8,27
Cal 5	0,111		0,121	0,149	15,51
Cal 4	0,306	0,417	0,273	0,443	26,46
Cal 3	0,932	1,061	0,742	1,176	19,03
Cal 2	1,428	1,512	1,374	1,684	9,03
Cal 1	2,241	2,371	2,26	2,596	6,89

On observe une bonne reproductibilité des valeurs de DO du blanc et de la gamme de calibration (CV moyen = 12,71 %, inférieur à 20 %). À noter que le calibrant 4 montre le CV le plus important.

Conclusion : La fidélité intermédiaire de cette méthode ELISA sandwich manuelle semble satisfaisante. Ces données nous ont permis de déterminer l'écart type du blanc (ET = 0,0031) nous permettant de déterminer la limite de détection et de quantification du dosage ADx215.

Exclusion de la valeur cal 5 du test 2 car aberrante.

6. Conclusion : meilleure condition pour chaque étape

Tableau 9 : conditions testées pour chaque étape d'optimisation

Protocoles	Tampons de dilution des conjugués	Volume de plasma	Concentration en ADx215	Volume de coating d'ADx215
Départ = D	Kit INNOTEST hTAU	100 µL	2 µg/ml	100 µL
T1 = D	Kit INNOTEST hTAU	100 µL	2 µg/ml	100 µL
T2	PBS/BSA 0,2 %	100 µL	2 µg/ml	100 µL
T3	PBS/Tween 0,05 %	100 µL	2 µg/ml	100 µL
Vp1 = D	Kit INNOTEST hTAU	100 µL	2 µg/ml	100 µL
Vp2	Kit INNOTEST hTAU	50 µL	2 µg/ml	100 µL
Vp3	Kit INNOTEST hTAU	25 µL	2 µg/ml	100 µL
C1 = Vp2	Kit INNOTEST hTAU	50 µL	2 µg/ml	100 µL
C2	Kit INNOTEST hTAU	50 µL	1,5 µg/ml	100 µL
C3	Kit INNOTEST hTAU	50 µL	1 µg/ml	100 µL
C4	Kit INNOTEST hTAU	50 µL	0,5µg/ml	100 µL
C5	Kit INNOTEST hTAU	50 µL	0,25 µg/ml	100 µL
C6	Kit INNOTEST hTAU	50 µL	0,125 µg/ml	100 µL
C7	Kit INNOTEST hTAU	50 µL	0,05 µg/ml	100 µL
C8	Kit INNOTEST hTAU	50 µL	0,02 µg/ml	100 µL
Vadx1 = C3	Kit INNOTEST hTAU	50 µL	1 µg/ml	100 µL
Vadx2	Kit INNOTEST hTAU	50 µL	1 µg/ml	50 µL
Final = C3	Kit INNOTEST hTAU	50 µL	1 µg/ml	100 µL

Surligné en bleu la condition sélectionnée pour chaque étape, ainsi que le protocole final.

- Limite de détection (LDD)

La LDD a été calculée à partir des quatre mesures du blanc selon la formule :

$$\text{LDD} = \text{moyenne} + 2 * \text{écart-type}$$

$$\text{LDD} = 0,0435 + 2 * 0,0031$$

$$\text{LDD} = \mathbf{0,0497 \text{ soit } 39,6 \text{ pg/ml}}$$

- Limite de quantification (LDQ)

La LDQ a été calculée à partir des quatre mesures du blanc selon la formule :

$$\text{LDQ} = \text{moyenne} + 10 * \text{écart-type}$$

$$\text{LDQ} = 0,0435 + 10 * 0,0031$$

$$\text{LDQ} = \mathbf{0,074 \text{ soit } 64,8 \text{ pg/ml}}$$

B. Sélection des patients BALTAZAR pour le dosage ADX215

156 plasmas BALTAZAR (M0 et M24) ont été pris au hasard avec une répartition égale entre les MA et les MCI (dont les MCI-MA). (Fig 21)

La quantité réduite d'Ac ADx215 nous a contraint à sélectionner les 40 plasmas BALTAZAR avec les concentrations les plus élevées en protéine Tau.

Cette sélection a été réalisée grâce au dosage du kit commercial INNOTEST hTAU pour lequel nous n'étions pas limités par le nombre de test.

Les résultats obtenus ont été classés en trois catégories (Cf. tableau 10) :

- ✓ Les non détectables : signal inférieur à la limite de détection.
- ✓ Les détectables : signal détectables mais inférieur à la limite de quantification.
- ✓ Les quantifiables : signal supérieur à la limite de quantification.

Les limites de détection et de quantification choisies sont celles données dans le LCS par le kit commercial, soit respectivement, 34 pg/ml et 57 pg/ml.

n = nombre d'échantillon de plasma (total, M0 ou M24)

Parmi les quantifiables, on trouve des MA, des MCI et des MCI-MA. Le pourcentage de plasmas quantifiables est plus élevé chez les sujets MCI-MA : 4/13 soit 31 % que chez les sujets MA : 8/42 soit 19 % et chez les MCI : 4/23 soit 17 %.

Conclusion : Pour la sélection, nous avons choisi de nous focaliser sur les patients MA et MCI-MA. Cela va nous permettre de comparer des stades précoces versus des stades tardifs de MA.

Nous avons éliminé les sujets MCI car il s'agit d'un groupe hétérogène d'un point de vue diagnostique, en effet à ce stade de l'étude le suivi reste insuffisant et tous n'évolueront pas vers une MA. De plus, chez les MCI le pourcentage de plasmas quantifiables est plus faible que chez les MA et MCI-MA.

Afin d'avoir les échantillons avec les valeurs de Tau les plus élevées, nous avons donc sélectionné 14 sujets MA (8 quantifiables, 3 détectables et 3 non détectables) et 6 MCI-MA (4 quantifiables et 2 non détectables) pour le dosage ADx215 ; nous étions limités à 40 plasmas. (Cf. tableau 10)

C. Résultats du dosage plasmatique avec ADx215

Un second dosage des plasmas avec l'Ac AT120 a été réalisé en parallèle de celui avec ADx215 afin de pouvoir comparer les deux dosages sans biais supplémentaire dû au cycle de congélation/décongélation. (Cf. tableau 11)

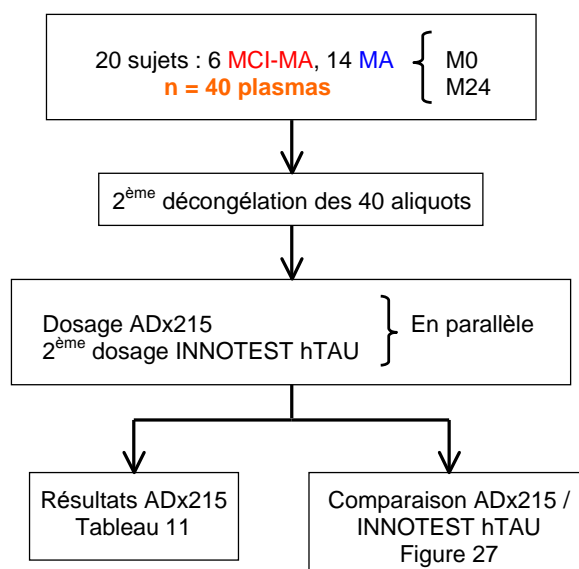


Figure 22 : dosage des plasmas sélectionnés avec ADx215

Tableau 11 : résultats des dosages plasmatiques ADx215 et 2^{ème} dosage INNOTEST hTAU

Patients	Diagnostic	Dosage ADx215	2 ^{ème} dosage INNOTEST hTAU
030127SM M0	1	152,61	102,33
030127SM M24	1	270,74	186,66
030073PL M0	1	29,52	0
030073PL M24	1	186,68	126,99
030018 CM M0	1	388,52	16,07
030018 CM M24	1	439,85	11,12
110224FT M0	1	53,82	92,32
110224FT M24	1	40,77	47,72
070290CB M0	1	270,26	38,47
070290CB M24	1	280,26	24,20
070102TP M0	1	261,41	196,52
070102TP M24	1	251,56	180,82
070148RM M0	1	48,56	0
070148RM M24	1	105,46	29,81
010162FJ M0	1	484,19	406,66
010162FJ M24	1	324,08	303,12
010015CP M0	1	59,83	48,49
010015CP M24	1	132,57	6,95
010341KA M0	1	30,78	1,90
010341KA M24	1	56,63	24,20
010177PS M0	1	49,78	362,90
010177PS M24	1	42,83	355,29
020169LH M0	1	29,52	9,46
020169LH M24	1	31,20	9,46
140137AM M0	1	31,20	7,79
140137AM M24	1	33,29	5,27
010496CS M0	1	30,36	6,95
010496CS M24	1	29,52	0
020789KM M0	2	45,70	16,07
020789KM M24	2	50,59	20,15
160086JM M0	2	263,10	333,10
160086JM M24	2	357,37	358,00
010001PR M0	2	179,73	207,65
010001PR M24	2	126,73	220,19
010855GM M0	2	60,22	211,93
010855GM M24	2	39,53	122,09
290431BE M0	2	389,20	290,97
290431BE M24	2	291,07	290,74
010566FL M0	2	39,12	25,01
010566FL M24	2	39,00	16,89

Diagnostic : 1 = MA, 2 = MCI-MA. **Dosage** : protéine Tau en pg/ml.

Valeurs en marron : sous le seuil de détection (34 pg/ml pour le dosage INNOTEST hTAU et à 39 pg/ml pour le dosage ADx215) ramenées à 0 pour les tests statistiques avec seuils.

Chaque dosage ADx215 a été réalisé en double avec un CV moyen de 4,68 %.

Les valeurs vont de 29,52 à 484,19 pg/ml. La moyenne est à 150,7 pg/ml et la médiane à 60 pg/ml.

Pour le dosage ADx215, la LDD est de 39,6 pg/ml et la LDQ de 64,8 pg/ml, nous avons:

- ✓ 11 plasmas non détectables
- ✓ 10 plasmas détectables
- ✓ 19 plasmas quantifiables

1. Corrélation des dosages INNOTEST hTAU avant et après décongélation

Les dosages de Tau plasmatique avec le kit INNOTEST hTAU avant et après un cycle de décongélation ont été comparés à l'aide du test de Wilcoxon pour séries appariées. Les analyses statistiques ne montrent pas de différence significative ($p = 0,3209 > 0,05$) due au cycle de décongélation entre ces 2 dosages. De plus on observe une corrélation significative ($p < 0,0001$) et forte, le R^2 est égal à 0,8494 entre les 2 dosages INNOTEST hTAU. Nous avons donc utilisé le 2^{ème} dosage (après décongélation) dans toutes les analyses.

2. Comparaison des dosages M0 et M24

- Avec le dosage ADx215

Les dosages à M0 et M24 ont été comparés à l'aide du test de Wilcoxon pour séries appariées, avec la série de valeurs sans seuil. (Fig 23)

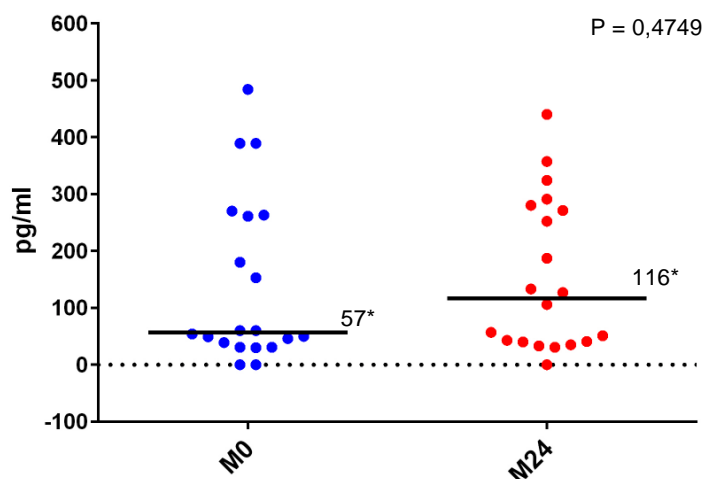


Figure 23 : concentrations de Tau plasmatique déterminées avec le dosage ADx215 à M0 et M24 chez les 40 sujets BALTAZAR sélectionnés

_____ * : médiane

M0 : échantillon de plasma à l'inclusion dans l'étude

M24 : échantillon de plasma à 2 ans de suivi

Ces résultats ne montrent pas de différence significative ($p = 0,4749 > 0,05$) entre les concentrations de Tau plasmatique dosées à M0 et M24 avec ADx215.

▪ Avec le dosage INNOTEST hTAU

Les dosages à M0 et M24 ont été comparés à l'aide du test de Wilcoxon pour séries appariées, avec la série de valeurs sans seuil. (Fig 24)

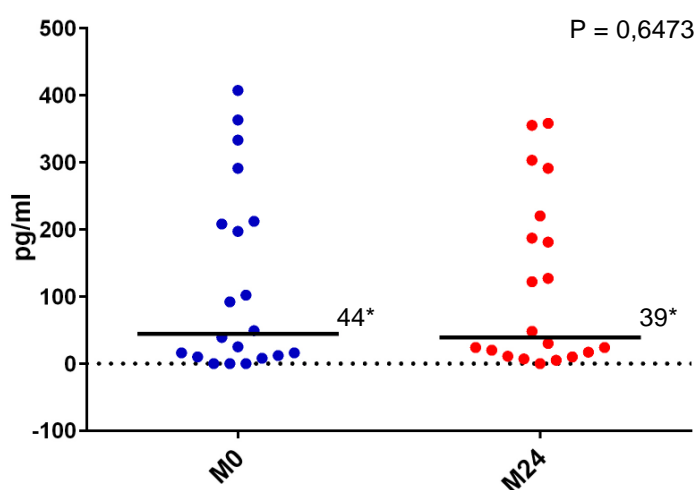


Figure 24 : concentrations de Tau plasmatique déterminées avec le dosage INNOTEST hTAU à M0 et M24 chez les 40 sujets BALTAZAR sélectionnés

_____ * : médiane

M0 : échantillon de plasma à l'inclusion dans l'étude

M24 : échantillon de plasma à 2 ans de suivi

Ces résultats ne montrent pas de différence significative ($p = 0,6473 > 0,05$) entre les concentrations de Tau plasmatique dosées à M0 et M24 avec INNOTEST hTAU.

3. Comparaison des patients MA et MCI-MA

- Avec le dosage ADx215

Nous avons comparé les moyennes des deux groupes indépendants MA et MCI-MA à l'aide du test de Mann & Whitney, avec la série de valeurs sans seuil. (Fig 25)

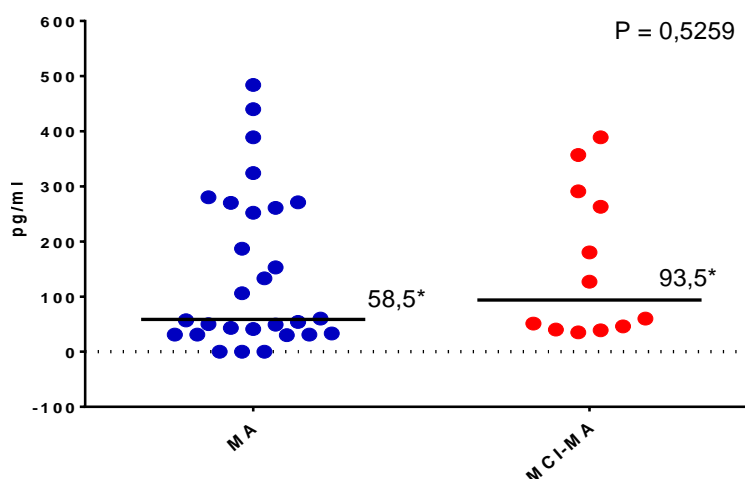


Figure 25 : concentrations de Tau plasmatique déterminées avec le dosage ADx215 chez les sujets MA et MCI-MA sélectionnés

___* : médiane

MA : 28 plasmas M0 et M24. MCI-MA : 12 plasmas M0 et M24

L'analyse statistique des données ne montre pas de différence significative ($p = 0,5259 > 0,05$) entre les concentrations de Tau plasmatique chez les patients MA et MCI-MA avec le dosage ADx215.

- Avec le dosage INNOTEST hTAU

Nous avons comparé les moyennes des deux groupes indépendants MA et MCI-MA à l'aide du test de Mann & Whitney, avec la série de valeurs sans seuil. (Fig 26)

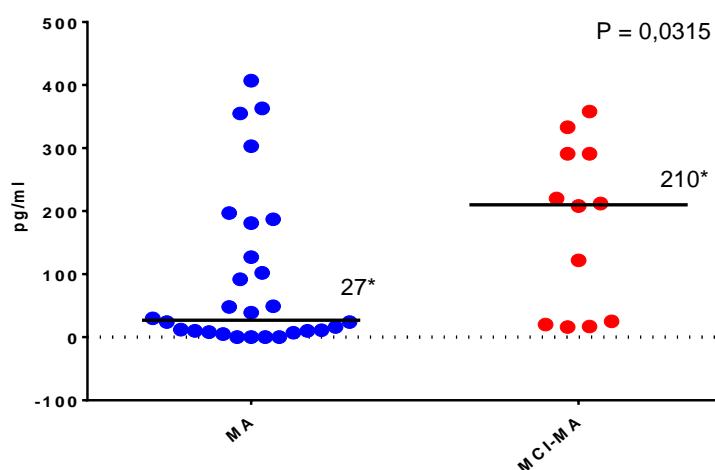


Figure 26 : concentrations de Tau plasmatique déterminées avec le dosage INNOTEST hTAU chez les sujets MA et MCI-MA sélectionnés

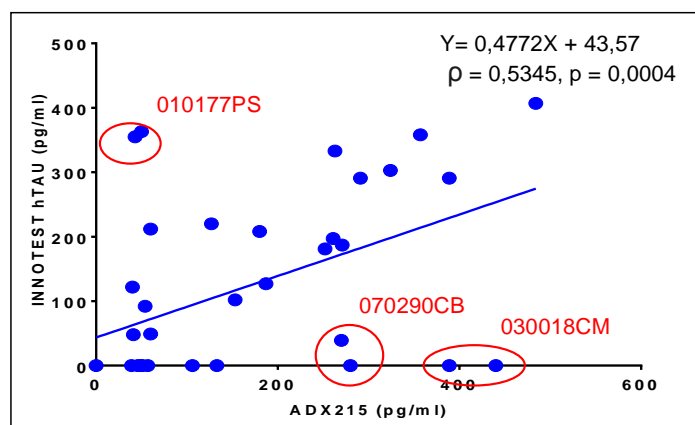
_____ * : médiane

MA : 28 plasmas M0 et M24. MCI-MA : 12 plasmas M0 et M24

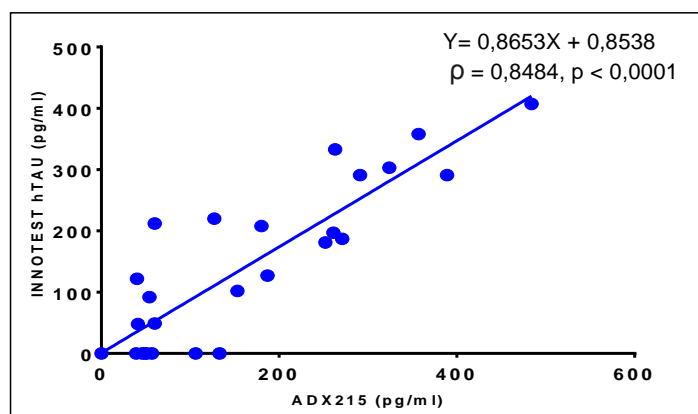
Les médianes sont égales à 27 pg/ml pour les MA et à 210 pg/ml pour les MCI-MA. L'analyse statistique des données montre une différence significative ($p = 0,0315 < 0,05$) entre les concentrations de Tau plasmatique des sujets MA versus MCI-MA avec le dosage INNOTEST hTAU. Ces concentrations sont plus élevées chez les patients MCI-MA que chez les MA.

4. Corrélation entre les dosages ADx215 et INNOTEST hTAU

À l'aide du test de corrélation de Spearman nous avons testé la corrélation entre les deux dosages ELISA (ADx215 et INNOTEST hTAU) avec la série de valeurs avec seuils. La droite de régression a été calculée à l'aide de l'équation classique de la régression linéaire. (Fig 27)



A : Corrélation entre ADx215 et AT120, 40 plasmas.
○ : valeurs discordantes.



B : Corrélation entre ADx215 et AT120 sans les 6 valeurs discordantes, 34 plasmas.

Figure 27 : résultats de la corrélation entre les dosages ADX215 et INNOTEST hTAU

Les valeurs de Tau utilisées sont celles du 2^{ème} dosage INNOTEST hTAU.

On observe une dispersion des données autour de la droite de régression pour le graphique 27.A. Il existe une corrélation significative entre les dosages ADx215 et INNOTEST hTAU ($p = 0,0004 < 0,05$). Le ρ est égal à 0,5345 et montre que cette corrélation est faible. On note 6 valeurs discordantes qui correspondent aux échantillons M0 et M24 des 3 patients 010177PS, 070290CB et 030018CM. Pour ces échantillons, la protéine Tau n'est détectée que par un seul dosage, INNOTEST hTAU pour 010177PS et ADx215 pour 070290CB et 030018CM. En supprimant ces 6 valeurs on obtient une corrélation significative ($p < 0,0001$) et beaucoup plus forte ($\rho = 0,8484$). (Fig 27.B)

Nous avons obtenu des résultats analogues en comparant la série de valeurs sans seuil.

D. Comparaison des dosages de Tau dans le plasma et le LCS

Nous avons pu obtenir pour 18 de nos 20 patients BALTAZAR les résultats du dosage des biomarqueurs dans le LCS (Tau, P-Tau et A β 1-42) à l'inclusion dans l'étude (M0). Les résultats étaient manquants pour les patients 070290CB et 020789KM. Le dosage de la protéine Tau dans le LCS a été réalisé avec le même kit INNOTEST hTAU Ag que celui utilisé dans le plasma. P-Tau a été dosé avec le kit INNOTEST PHOSPHO-TAU (181P) et A β 1-42 avec INNOTEST B-AMYLOID (1-42). Nous avons également pu obtenir leur âge, leur sexe et le génotype de l'APOE. Ces données sont résumées dans le tableau 12.

Concernant la corrélation entre les marqueurs du LCS, on retrouve bien dans nos échantillons les données de la littérature, à savoir une corrélation entre Tau et P-Tau dans le LCS ($p < 0,0001$). Ceci permet de valider notre cohorte.

Aucune corrélation n'a été retrouvée entre les dosages de Tau plasmatique (ADx215 et INNOTEST hTAU) et le sexe, le génotype de l'APOE ou la concentration en A β 1-42 dans le LCS.

Tableau 12 : résultats du dosage des biomarqueurs (Tau, P-Tau et A β 1-42) dans le LCS, du dosage de Tau plasmatique avec ADx215 et INNOTEST hTAU, âge, sexe et génotype de l'APOE.

Patients	Diagnostic	Age	Sexe	APOE	A β -42 LCS	PTAU LCS	TAU LCS	ADx215 plasma	INNOTEST hTAU plasma
030127SM M0	1	80	2	4	741	122	702	152,61	102,33
030073PL M0	1	85	1	5	679	78	656	29,52	0
030018CM M0	1	63	1	4	931	20	236	388,52	16,07
110224FT M0	1	76	2	5	519	78	696	53,82	92,32
070290CB M0	1	67	2	6	nr	nr	nr	270,26	38,47
070102TP M0	1	74	1	5	542	72	366	261,41	196,52
070148RM M0	1	73	2	5	656	95	562	48,56	0
010162FJ M0	1	77	2	5	918	131	828	484,19	406,66
010015CP M0	1	85	1	4	393	48	423	59,83	48,49
010341KA M0	1	66	1	5	714	88	777	30,78	1,90
010177PS M0	1	86	2	4	767	152	980	49,78	362,90
020169LH M0	1	73	1	5	535	124	697	29,52	9,46
140137AM M0	1	76	2	5	638	158	972	31,20	7,79
010496CS M0	1	60	2	5	742	106	863	30,36	11,50
020789KM M0	2	nr	nr	4	nr	nr	nr	45,70	16,07
160086JM M0	2	79	2	nr	699	42	333	263,10	333,10
010001PR M0	2	78	2	nr	532	52	391	179,73	207,65
010855GM M0	2	86	1	nr	1279	60	440	60,22	211,93
290431BE M0	2	75	2	5	720	80	463	389,20	290,97
010566FL M0	2	75	2	6	419	89	724	39,12	25,01

Diagnostic : 1 = MA, 2 = MCI-MA. **Age :** années. **Sexe :** 1 = homme, 2 = femme. **APOE :** 4 = E3/E3, 5 = E3/E4, 6 = E4/E4. **Concentration en protéine Tau** en pg/ml. nr : non renseigné.

À l'aide du test de corrélation de Spearman avec les séries de données tenant compte des seuils, nous avons pu mettre en évidence une corrélation significative ($p = 0,0167 < 0,05$) entre les concentrations de Tau plasmatique déterminées avec le dosage INNOTEST hTAU et l'âge des patients. On observe une augmentation des concentrations de Tau dès l'âge de 70 ans. (Fig 28)

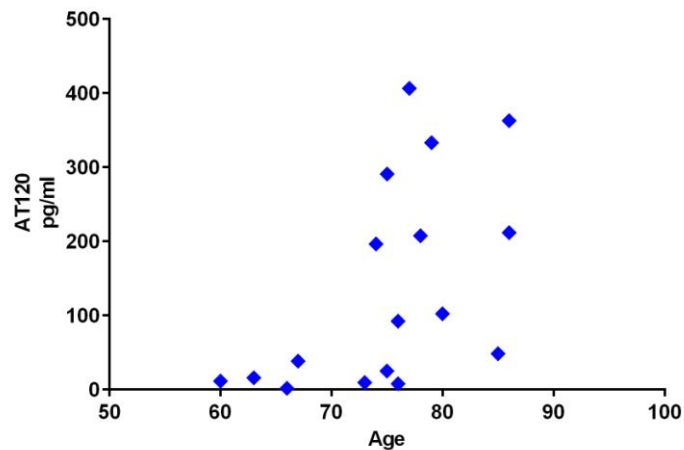


Figure 28 : concentrations de Tau plasmatique déterminées avec le dosage INNOTEST hTAU en fonction de l'âge des 20 patients BALTAZAR

En revanche cette corrélation n'a pu être mise en évidence avec le dosage ADx215 ($p = 0,7398 > 0,05$). (Fig 29)

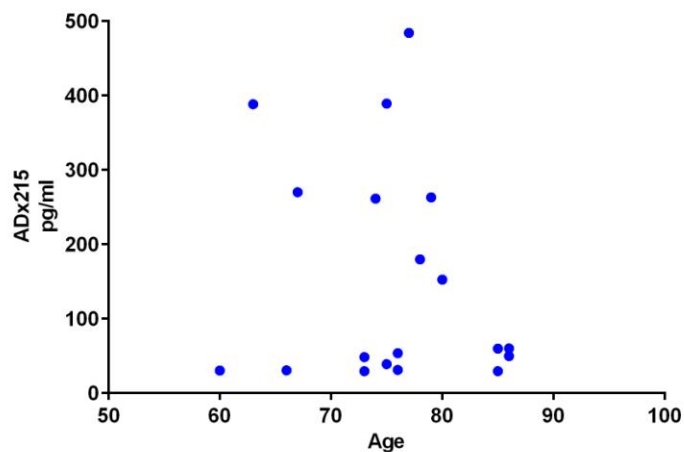


Figure 29 : concentrations de Tau plasmatique déterminées avec le dosage ADx215 en fonction de l'âge des 20 patients BALTAZAR

À l'aide du test de corrélation de Spearman, avec les séries de données tenant compte des seuils, on observe une corrélation significative ($p = 0,0166 < 0,05$) entre les concentrations de Tau plasmatique dosées avec ADx215 et les concentrations de Tau dans le LCS (dosage INNOTEST hTau). (Fig 30)

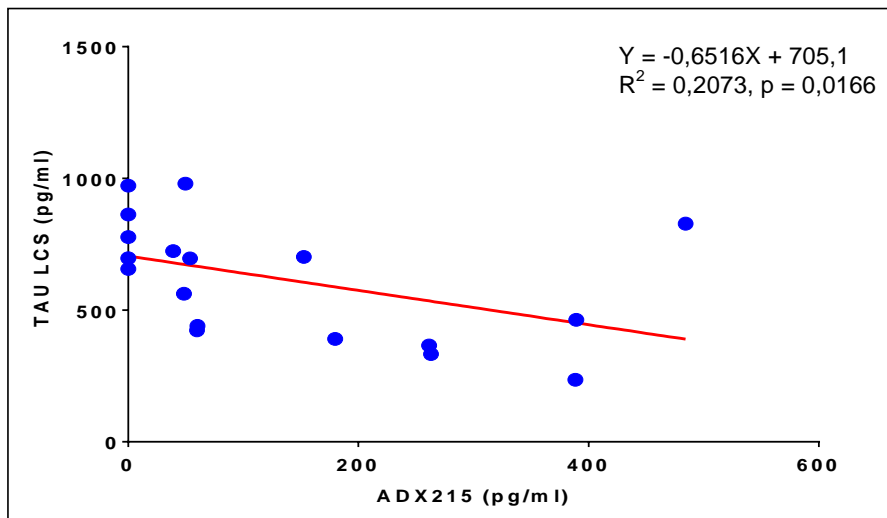


Figure 30 : résultats de la corrélation entre Tau plasmatique dosé avec ADx215 et Tau dans le LCS

Nous retrouvons également une tendance pour une corrélation entre les concentrations de Tau plasmatique avec ADx215 et les concentrations de P-Tau dans le LCS ($p = 0,0773$). (Fig 31)

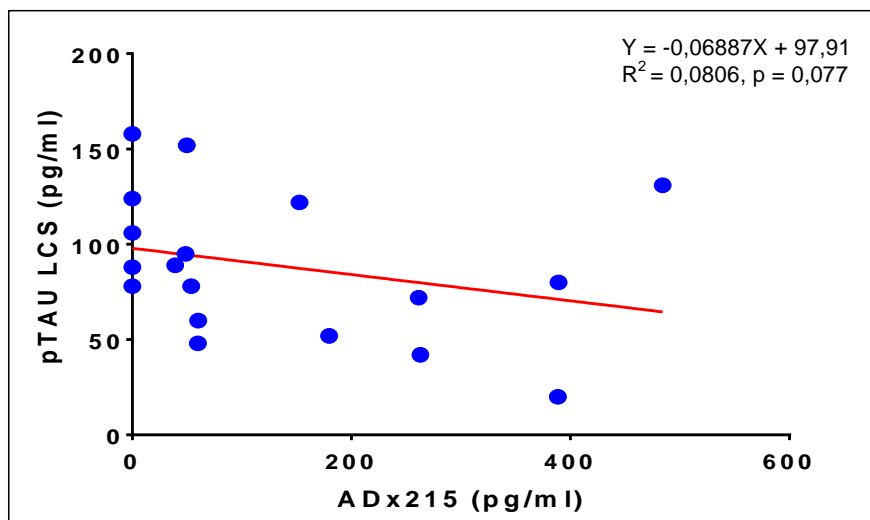


Figure 31 : résultats de la corrélation entre Tau plasmatique dosage ADx215 et P-Tau dans le LCS

Comme l'indique le calcul du coefficient de corrélation de Spearman rho, les corrélations entre Tau LCS et ADx215 ($r = -0,6516$) et entre P-Tau LCS et ADx215 ($r = -0,06887$) sont négatives. Cela signifie que lorsque les concentrations de Tau et de P-Tau augmentent dans le LCS, les concentrations en protéine Tau totale dosées avec ADx215 baissent dans le plasma. Cette conclusion n'est cependant significative que pour Tau dans le LCS.

Ces résultats sont retrouvés lors de l'analyse avec les séries de données sans seuil.

Ces résultats ne sont pas retrouvés avec le dosage plasmatique de Tau avec INNOTEST hTAU.

IV. Discussion

L'objectif principal de notre travail a été d'optimiser et de tester sur les sujets de la cohorte BALTAZAR, le dosage ELISA de la protéine Tau totale dans le plasma avec comme anticorps de capture ADx215.

Nous avons choisi l'Ac ADx215 pour son excellente affinité afin d'obtenir un ELISA sensible, adapté au dosage de la protéine Tau dans le plasma (73). Le dosage ADx215 initial est utilisé au laboratoire pour mesurer des concentrations de protéine Tau dans les modèles de souris THY-Tau 22 surexprimant la protéine Tau humaine. Dans ce modèle de surexpression, les concentrations de Tau à mesurer étaient importantes et n'avaient pas nécessité une optimisation du dosage.

Notre objectif a donc été de diminuer le bruit de fond (absorbance du blanc) et d'obtenir les DO optimales pour de faibles concentrations en protéine Tau. Pour cela, nous avons tenté d'améliorer 4 paramètres du dosage ELISA.

Les tampons de dilution PBS/BSA 0,2 % (T2) et PBS/Tween 0,05 % (T3) testés ne se sont pas montrés plus performant que les tampons commerciaux du kit INNOTEST hTAU, il a donc été décidé de garder les tampons du dosage INNOTEST hTAU (T1) qui présentent l'avantage d'être bien standardisés. La concentration et le volume d'Ac de capture ADx215 ont aussi été optimisés. En effet nous avons pu diminuer la concentration en Ac à 1 $\mu\text{g/ml}$ (C3) tout en gardant des DO stables. De plus, 1 $\mu\text{g/ml}$ est une concentration qui est classiquement retrouvée pour la greffe des Ac de capture dans les dosages ELISA. Cette diminution de moitié de la concentration nous a permis de réaliser le double de dosages avec la quantité d'Ac disponible. En revanche la diminution du volume de coating entraînant une baisse significative des DO, il n'a pas été possible de diminuer le volume de coating d'ADx215 à moins de 100 μL . Enfin, nous avons pu réduire à 50 μL le volume de plasma nécessaire à notre dosage. En effet, cela correspond au plus petit volume permettant d'obtenir des DO équivalentes au protocole de départ.

La faible quantité d'Ac ADx215 nous a contraint à l'économiser dès les étapes d'optimisation jusqu'au dosage plasmatique de la protéine Tau. De ce fait, tous les paramètres du dosage ADx215 n'ont pu être optimisés, en effet nous avons prévu de tester un tampon commercial de coating pour ADx215 afin de diminuer d'avantage le bruit de fond mais cet essai n'a pu être mené.

Avec ce nouveau protocole (C3) nous avons pu caractériser le dosage en déterminant la LDD et la LDQ. Contrairement à nos attentes et malgré le très faible Kd d'ADx215, ces valeurs n'étaient pas plus faibles que celles du dosage INNOTEST hTAU mais équivalentes, ceci pouvant s'expliquer en partie par les limites de l'optimisation liées à la faible quantité d'Ac disponible. D'autre part, l'adhésion de l'Ac de capture sur le support solide peut-être responsable d'un encombrement stérique du site de liaison à la protéine Tau et donc d'une diminution de son affinité. Dans ce contexte, il serait intéressant, de procéder à une technique d'ancrage de l'Ac de capture ou de mettre au point et d'optimiser le dosage ELISA en utilisant l'Ac ADx215 comme Ac de détection biotinylé. Nous avons ensuite montré que ce dosage était reproductible avec un CV moyen de 4,68 %, ce qui permet de valider ce protocole pour le dosage chez l'homme. Cette méthode optimisée pourra être reprise chez le modèle animal car l'intérêt de cet ELISA est qu'il permet de doser spécifiquement la protéine Tau humaine sans croisement avec la protéine Tau de la souris.

Nous avons observé que les concentrations en protéine Tau mesurées avec ADx215 et INNOTEST hTAU sont stables entre les prélèvements M0 et M24 chez les sujets MA et MCI-MA. A ce jour, il n'existe pas de données de la littérature sur l'évolution longitudinale des concentrations plasmatiques de Tau. Cependant ces résultats peuvent être rapprochés des données existantes dans le LCS. Ces études montrent une augmentation de Tau dans le temps entre deux PL mais ces augmentations restent relativement modestes, par exemple, sur 24 mois, on note une augmentation de 156 à 189 pg/ml (soit 21 % environ) chez les sujets MA (86–88). Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser ces dosages à M0 et M24 avec une technique plus sensible et sur un nombre plus grand nombre de sujets. Cette observation nous a conduit à regrouper les données de concentrations aux temps M0 et M24 afin d'en avoir un plus grand nombre pour comparer ces deux groupes.

Si l'on compare alors les deux groupes MA et MCI-MA, nous n'observons pas de différence significative avec le dosage ADx215. En revanche, avec le dosage INNOTEST hTAU, on observe une différence significative, les concentrations en protéine Tau sont plus élevées chez les patients MCI-MA par rapport aux patients MA. Ce résultat est retrouvé à une plus large échelle dans nos résultats de screening des plasmas avec le kit INNOTEST hTAU, le pourcentage de plasmas quantifiables est plus élevé chez les sujets MCI-MA : 4/13 soit 31 % que chez les sujets MA : 8/42 soit 19 % et chez les MCI : 4/23 soit 17 %.

Ces premiers résultats semblent montrer que les deux dosages ADx215 et INNOTEST hTAU ne sont pas équivalents. Ceci est également suggéré par l'étude de corrélation entre les concentrations de ces deux dosages qui montre une corrélation significative mais faible. Les formes de Tau reconnues par les dosages ADx215 et INNOTEST hTAU sont issues de la même protéine Tau, ce qui explique la corrélation significative. Cependant ces dosages ne sont pas identiques ce qui explique les différences entre les concentrations mesurées. Les deux Ac reconnaissent des épitopes différents, ADx215 reconnaît la partie N terminale de Tau quand celle-ci n'est pas phosphorylée sur la tyrosine 18 (73) alors qu'AT120 reconnaît la partie centrale de la protéine. (Fig 32)

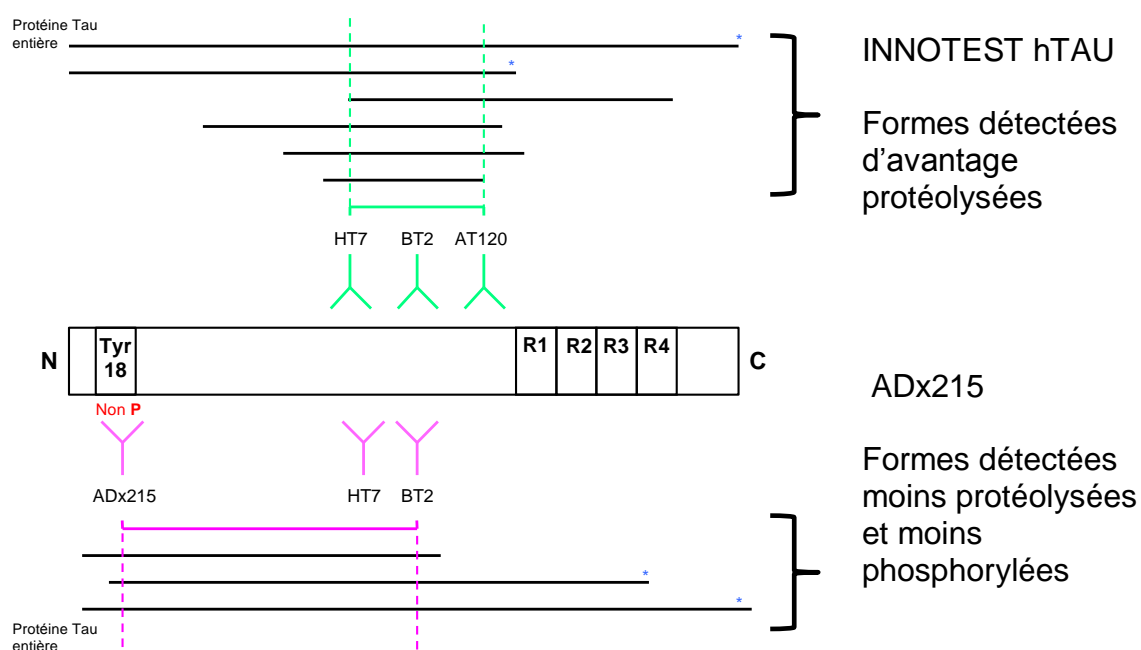


Figure 32 : représentation théorique des formes de Tau détectables avec les dosages ADx215 et INNOTEST hTAU (AT120)

* : formes de Tau détectées à la fois avec les dosages ADx215 et INNOTEST hTAU

— : séquence minimale reconnue par le test ADx215

— : séquence minimale reconnue par le test INNOTEST hTAU

non P : l'Ac ADx215 reconnaît le résidu tyrosine 18 non phosphorylé.

Ce modèle permettrait d'expliquer les six valeurs discordantes où la protéine Tau n'est détectable qu'avec un seul des deux Ac. En effet, le patient 030018CM qui a une concentrations de Tau plasmatique importante avec ADX215 et faible avec INNOTEST hTAU a certainement une phosphorylation de Tau à un niveau physiologique comme l'indique la concentration faible de P-Tau dans le LCS. (Nous ne disposons pas des valeurs dans le LCS pour le deuxième patient, 070290CB).

Au contraire, le patient 010177PS qui a une concentration de Tau plasmatique faible avec ADX215 et importante avec INNOTEST hTAU a certainement une hyperphosphorylation cérébrale de Tau comme en témoigne la valeur élevée de la concentration de P-Tau dans le LCS.

Etant donné que la protéine Tau est exprimée majoritairement dans le SNC, nous pouvons poser l'hypothèse que la protéine Tau dosée dans le plasma provient du cerveau et passe dans le sang soit directement via la BHE, soit indirectement via le LCS. Pour 18 plasmas M0, nous avons pu comparer nos dosages plasmatiques (ADx215 et INNOTEST hTAU) de Tau, avec le dosage des biomarqueurs (Tau, P-Tau et A β 1-42) dans le LCS. Une corrélation négative a pu être mise en évidence entre les concentrations de Tau dans le plasma mesurées avec ADx215 et les concentrations de Tau dans le LCS. Il y a également une tendance pour une corrélation négative entre les concentrations de Tau plasmatique mesurées avec ADx215 et les concentrations de P-Tau dans le LCS. Les Ac utilisés pour ces deux dosages sont différents, ADx215 reconnaît les formes de Tau non phosphorylées sur la tyrosine 18, donc plutôt les formes déphosphorylées. Les sujets MA avec des concentrations élevées de Tau totale ont aussi des concentrations de P-Tau élevées dans le LCS (58). Le test ADx215 reconnaît donc moins de formes de P-Tau que le test INNOTEST hTAU. Cela pourrait expliquer la corrélation négative observée à la fois avec Tau et P-Tau dans le LCS et la protéine Tau dosée avec ADx215 dans le plasma. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait réaliser un dosage de la protéine Tau dans le LCS avec l'Ac ADx215. Aucune corrélation n'a été retrouvée entre les concentrations plasmatiques de Tau avec le dosage INNOTEST hTAU et les biomarqueurs du LCS.

Notre étude comporte un biais de recrutement équivalent à celui de l'étude de *Sparks et al* de 2012 : nous avons en effet sélectionné les sujets ayant des concentrations élevées de protéine Tau dans le plasma. Les concentrations présentées dans l'étude de *Sparks et al* sont également élevées ce qui laisse à penser qu'il y a aussi eu une sélection des patients (72). Avec son dosage ELISA *Sparks et al* observe également des concentrations de Tau plasmatique plus élevées chez les sujets MCI que chez les MA. En revanche, l'étude de *Zetterberg et al* de 2013 a un recrutement plus large, la technique de dosage étant plus sensible les résultats intègrent des patients avec des concentrations plasmatiques plus faibles de Tau (2 log de différence entre les concentrations les plus faibles et les plus fortes contre 1 log pour notre étude) (70). Dans ces conditions, ils observent des concentrations plus élevées chez les sujets MA comparés aux sujets MCI et MCI-MA. Néanmoins, ces études restent difficilement comparables car les dosages utilisent des Ac différents et en l'absence de standard de référence et d'études ayant répliquées ces résultats, il faut rester prudent (83).

Il existe un autre biais lié à la sélection des sujets au sein du protocole de recherche clinique Baltazar. Les sujets Baltazar ne sont pas des patients représentatifs de l'ensemble de la population atteinte de MA. Il s'agit de patients venus consulter un centre Mémoire de Ressources et de Recherche et qui ont accepté de participer à un protocole : en général, il s'agit de patients éduqués, ayant une réserve cognitive élevée.

Notre étude comporte un certain nombre de faiblesses. Il est tout d'abord important d'être prudent lors de l'interprétation de ces résultats car l'ensemble des dosages a été réalisé sur un faible nombre de patients, 20 sujets BALTAZAR sélectionnés, soit 40 plasmas M0/M24. Les hypothèses mises en évidence dans ce travail sont à valider sur de plus grandes cohortes. Le 2^{ème} point faible de cette étude est la quantité réduite d'anticorps ADx215 qui nous a limité dans la mise au point du dosage ADx215. Il faut aussi noter un biais dans l'analyse statistique : les valeurs M0 et M24 ne sont pas réellement indépendantes, mais nous avons choisi de les regrouper de façon à ne pas trop réduire la taille des groupes MA et MCI-MA. Dans le cadre d'une étude plus large, avec un nombre plus important de patients, il faudrait analyser indépendamment les valeurs M0 et M24. Enfin, nous avons réalisé un biais de recrutement des sujets Baltazar avec des concentrations plasmatiques de protéine Tau élevées pour le dosage INNOTEST hTAU. Cette sélection est due au

manque de sensibilité de la technologie ELISA sandwich qui n'est pas adaptée pour des concentrations inférieures à 40 pg/ml.

Notre travail comporte aussi des points forts. Les patients ont été recrutés selon des critères internationaux de diagnostic au sein de Centres Mémoire de Ressources et de Recherche experts. Pour chaque patient, nous disposons de données cliniques, génétiques, biologiques et d'imagerie, mais aussi d'un suivi longitudinal. Les concentrations des biomarqueurs dans le LCS sont d'ailleurs en accord avec les données de la littérature ce qui confirme la bonne sélection des sujets (58). Un autre point fort de l'étude est lié à la rigueur et à la qualité de la méthodologie mise en place pour les dosages. La prise en charge pré-analytique des échantillons est identique dans tous les centres (kit pré-analytique fourni). Le dosage des biomarqueurs dans le LCS et les dosages de Tau plasmatique ont été réalisés dans un seul centre ce qui réduit les variations de concentrations dues à un biais technique inter-laboratoire. La stabilité des concentrations plasmatiques de protéine Tau chez un même patient à M0 et M24 témoigne de cette qualité. Le 3^{ème} point fort de cette étude est la réalisation simultanée dosages ADx215 et INNOTEST hTAU qui a permis une analyse de corrélation rigoureuse. Le dernier point fort concerne l'aspect novateur de cette étude. En effet, c'est la première fois que l'on compare l'évolution des concentrations plasmatiques de Tau à M0 et M24 et que l'on observe une corrélation négative entre les concentrations plasmatiques de Tau mesurées avec ADX215 et les concentrations de Tau dans le LCS mesurées avec INNOTEST hTAU.

Ce dosage ELISA manuel arrive à ses limites pour le plasma humain mais il sera utilisé au sein de laboratoire pour le dosage de la protéine Tau plasmatique chez les souris mutées THY-Tau22 et le calcul des limites de détection et de quantification sera utile dans le cadre de la recherche.

Le dosage de la protéine Tau dans le plasma nécessite une technique plus sensible. Nous avons obtenu, avec le laboratoire de Biochimie de Montpellier, le financement pour la technologie Quanterix®. Celle-ci semblant plus sensible, les dosages de l'étude Baltazar seront réalisés avec cette technique.

V. Conclusion

Ce travail de thèse a permis de mettre au point un nouveau dosage robuste de la protéine Tau avec l'Ac ADx215. L'affinité importante de cet Ac pour la protéine Tau nous a permis de calculer des valeurs de LDD et de LDQ équivalentes à celles du dosage INNOTEST hTAU alors que l'Ac ADx215 reconnaît des formes moins protéolysées de Tau, moins abondantes. Ce travail montre aussi que la technique ELISA sandwich n'est pas adaptée à la détection de la protéine Tau dans le plasma. Le laboratoire a récemment reçu le financement pour acquérir la technologie Quanterix®, cette technologie sera désormais utilisée pour le dosage plasmatique de Tau pour les prélèvements de la cohorte Baltazar. Un kit commercial de dosage Tau dans le plasma avec cette technologie est en cours de développement, il utilise respectivement comme Ac de capture et de détection Tau5 et HT7/BT2. L'Ac Tau5 reconnaît un épitope proche de celui de l'Ac AT120, ce dosage devrait reconnaître des formes de Tau identiques à celle du dosage INNOTEST hTAU (73). Cependant, nos résultats préliminaires montrent qu'il serait intéressant de développer cette technologie également avec l'Ac ADx215. Cela permettrait de détecter d'autres formes de Tau N terminales pouvant avoir une signification pathologique différente de celle du dosage de la protéine Tau totale.

VI. Références bibliographiques

81572 INNOTEST hTAU Ag / 31105 v0 / KEY-CODE: FRI94931, 2014.

Immunoanalyse. De la théorie aux critères de choix en biologie Clinique. *Catherine Massart*. EDP SCIENCES, 2009.

1. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Cummings JL, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, et al. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol*. 2010 Nov;9(11):1118–27.
2. 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*. 2011 May;7(3):263–9.
3. Letenneur L, Commenges D, Dartigues JF, Barberger-Gateau P. Incidence of dementia and Alzheimer's disease in elderly community residents of south-western France. *Int J Epidemiol*. 1994 Dec;23(6):1256–61.
4. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2010 Jan 28;362(4):329–44.
5. Strittmatter WJ, Roses AD. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci*. 1996;19:53–77.
6. Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, Fagan AM, Parsadanian M, Sartorius LJ, et al. Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 14;97(6):2892–7.
7. Weisgraber KH, Mahley RW. Human apolipoprotein E: the Alzheimer's disease connection. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 1996 Nov;10(13):1485–94.
8. Chartier-Harlin M-C, Araria-Goumidi L, Lambert J-C. Complexité génétique de la maladie d'Alzheimer. *Rev Neurol (Paris)*. 2004 Feb;160(2):251–5.
9. St George-Hyslop PH. Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*. 2000 Feb 1;47(3):183–99.
10. Sergeant N, Delacourte A, Buée L. Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Jan 3;1739(2-3):179–97.
11. Goedert M, Jakes R. Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Jan 3;1739(2-3):240–50.
12. Edland SD, Rocca WA, Petersen RC, Cha RH, Kokmen E. Dementia and Alzheimer disease incidence rates do not vary by sex in Rochester, Minn. *Arch*

Neurol. 2002 Oct;59(10):1589–93.

13. Hofman A, Ott A, Breteler MM, Bots ML, Slooter AJ, van Harskamp F, et al. Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *Lancet*. 1997 Jan 18;349(9046):151–4.

14. Skoog I, Lernfelt B, Landahl S, Palmertz B, Andreasson LA, Nilsson L, et al. 15-year longitudinal study of blood pressure and dementia. *Lancet*. 1996 Apr 27;347(9009):1141–5.

15. Planel E, Bretteville A, Liu L, Virag L, Du AL, Yu WH, et al. Acceleration and persistence of neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy following anesthesia. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2009 Aug;23(8):2595–604.

16. Hall CB, Lipton RB, Sliwinski M, Katz MJ, Derby CA, Verghese J. Cognitive activities delay onset of memory decline in persons who develop dementia. *Neurology*. 2009 Aug 4;73(5):356–61.

17. Ngandu T, Lehtisalo J, Solomon A, Levälähti E, Ahtiluoto S, Antikainen R, et al. A 2 year multidomain intervention of diet, exercise, cognitive training, and vascular risk monitoring versus control to prevent cognitive decline in at-risk elderly people (FINGER): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2015 Mar 11;

18. Belarbi K, Burnouf S, Fernandez-Gomez F-J, Laurent C, Lestavel S, Figeac M, et al. Beneficial effects of exercise in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease-like Tau pathology. *Neurobiol Dis*. 2011 Aug;43(2):486–94.

19. Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA. Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Mol Brain Res*. 1986 Dec;1(3):271–80.

20. Andreadis A, Broderick JA, Kosik KS. Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons. *Nucleic Acids Res*. 1995 Sep 11;23(17):3585–93.

21. Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*. 1989 Oct;3(4):519–26.

22. Hirokawa N, Shiomura Y, Okabe S. Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol*. 1988 Oct 1;107(4):1449–59.

23. Lee G, Neve RL, Kosik KS. The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron*. 1989 Jun;2(6):1615–24.

24. Von Bergen M, Friedhoff P, Biernat J, Heberle J, Mandelkow EM, Mandelkow

- E. Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 May 9;97(10):5129–34.
25. Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW. Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell*. 1992 Oct 1;3(10):1141–54.
26. Goedert M, Jakes R. Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J*. 1990 Dec;9(13):4225–30.
27. Brady ST, Sperry AO. Biochemical and functional diversity of microtubule motors in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol*. 1995 Oct;5(5):551–8.
28. Chen J, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N. Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature*. 1992 Dec 17;360(6405):674–7.
29. Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow E-, Mandelkow E. Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: Distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron*. 1993 Jul;11(1):153–63.
30. Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Rossie S, Gong C-X. Dephosphorylation of tau by protein phosphatase 5: impairment in Alzheimer's disease. *J Biol Chem*. 2005 Jan 21;280(3):1790–6.
31. Mandelkow EM, Biernat J, Drewes G, Gustke N, Trinczek B, Mandelkow E. Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules. *Neurobiol Aging*. 1995 Jun;16(3):355–62; discussion 362–3.
32. Alonso A, Zaidi T, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 5;98(12):6923–8.
33. Kolarova M, García-Sierra F, Bartos A, Ricny J, Ripova D. Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease. *Int J Alzheimers Dis [Internet]*. 2012 [cited 2014 Dec 18];2012. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3368361/>
34. Iqbal K, Alonso A del C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong C-X, et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Jan 3;1739(2-3):198–210.
35. Braak H, Braak E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1991;82(4):239–59.

36. Zheng H, Koo EH. Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Mol Neurodegener.* 2011 Apr 28;6:27.
37. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 2001 Apr;81(2):741–66.
38. Walsh DM, Selkoe DJ. A β Oligomers – a decade of discovery. *J Neurochem.* 2007 Jun 1;101(5):1172–84.
39. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology.* 1984 Jul;34(7):939–44.
40. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, et al. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol.* 2007 Aug;6(8):734–46.
41. 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 J Alzheimers Assoc.* 2011 May;7(3):270–9.
42. 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 J Alzheimers Assoc.* 2011 May;7(3):280–92.
43. Blennow K. Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *NeuroRx J Am Soc Exp Neurother.* 2004 Apr;1(2):213–25.
44. Chetelat G, Baron J-C. Early diagnosis of Alzheimer's disease: contribution of structural neuroimaging. *NeuroImage.* 2003 Feb;18(2):525–41.
45. Edison P, Archer HA, Hinz R, Hammers A, Pavese N, Tai YF, et al. Amyloid, hypometabolism, and cognition in Alzheimer disease: an [11C]PIB and [18F]FDG PET study. *Neurology.* 2007 Feb 13;68(7):501–8.
46. Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, et al. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol.* 2004 Mar;55(3):306–19.
47. Okamura N, Harada R, Furumoto S, Arai H, Yanai K, Kudo Y. Tau PET imaging in Alzheimer's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2014 Nov;14(11):500.

48. 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*. 1998 Apr;19(2):109–16.
49. Peskind E, Nordberg A, Darreh-Shori T, Soininen H. Safety of Lumbar Puncture Procedures in Patients with Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res*. 2009 Jun;6(3):290–2.
50. Roche S, Gabelle A, Lehmann S. Clinical proteomics of the cerebrospinal fluid: Towards the discovery of new biomarkers. *Proteomics Clin Appl*. 2008 Mar;2(3):428–36.
51. Köhler K, Seitz H. Validation Processes of Protein Biomarkers in Serum—A Cross Platform Comparison. *Sensors*. 2012 Sep 18;12(9):12710–28.
52. 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*. 2009 Mar;66(3):382–9.
53. 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*. 2006 Nov 1;129(11):3035–41.
54. Strozyk D, Blennow K, White LR, Launer LJ. CSF Abeta 42 levels correlate with amyloid-neuropathology in a population-based autopsy study. *Neurology*. 2003 Feb 25;60(4):652–6.
55. Fagan AM, Mintun MA, Mach RH, Lee S-Y, Dence CS, Shah AR, et al. Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans. *Ann Neurol*. 2006 Mar;59(3):512–9.
56. Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Londos E, Blennow K, Minthon L. Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *Lancet Neurol*. 2006 Mar;5(3):228–34.
57. Herukka S-K, Hallikainen M, Soininen H, Pirttilä T. CSF Abeta42 and tau or phosphorylated tau and prediction of progressive mild cognitive impairment. *Neurology*. 2005 Apr 12;64(7):1294–7.
58. Ferreira D, Perestelo-Pérez L, Westman E, Wahlund L-O, Sarría A, Serrano-Aguilar P. Meta-Review of CSF Core Biomarkers in Alzheimer's Disease: The State-of-the-Art after the New Revised Diagnostic Criteria. *Front Aging Neurosci*. 2014;6:47.

59. 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 J Alzheimers Assoc.* 2014 Oct;10(5 Suppl):S390–4.e2.
60. Perret-Liaudet A, Pelpel M, Tholance Y, Dumont B, Vanderstichele H, Zorzi W, et al. Cerebrospinal Fluid Collection Tubes: A Critical Issue for Alzheimer Disease Diagnosis. *Clin Chem.* 2012 Apr 1;58(4):787–9.
61. Schoonenboom NSM, Mulder C, Vanderstichele H, Van Elk E-J, Kok A, Van Kamp GJ, 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. *Clin Chem.* 2005 Jan;51(1):189–95.
62. 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.* 2014;6(3):38.
63. Portelius E, Hansson SF, Tran AJ, Zetterberg H, Grognat P, Vanmechelen E, et al. Characterization of tau in cerebrospinal fluid using mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2008 May;7(5):2114–20.
64. Bahl JMC, Heegaard NHH, Falkenhorst G, Laursen H, Høgenhaven H, Mølbak K, et al. The diagnostic efficiency of biomarkers in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease compared to Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2009 Nov;30(11):1834–41.
65. Blennow K, Johansson A, Zetterberg H. Diagnostic value of 14-3-3beta immunoblot and T-tau/P-tau ratio in clinically suspected Creutzfeldt-Jakob disease. *Int J Mol Med.* 2005 Dec;16(6):1147–9.
66. 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.* 2001 Jan 19;297(3):187–90.
67. 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.* 2004 Jan;61(1):95–102.
68. Vincent I, Zheng JH, Dickson DW, Kress Y, Davies P. Mitotic phosphoepitopes precede paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 1998 Aug;19(4):287–96.
69. Meredith Jr. JE, Sankaranarayanan S, Guss V, Lanzetti AJ, Berisha F, Neely RJ, et al. Characterization of Novel CSF Tau and ptau Biomarkers for Alzheimer's

- Disease. PLoS ONE [Internet]. 2013 Oct 7 [cited 2015 Apr 18];8(10). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3792042/>
70. Zetterberg H, Wilson D, Andreasson U, Minthon L, Blennow K, Randall J, et al. Plasma tau levels in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* 2013;5(2):9.
 71. Mörtberg E, Zetterberg H, Nordmark J, Blennow K, Catry C, Decraemer H, et al. Plasma tau protein in comatose patients after cardiac arrest treated with therapeutic hypothermia. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2011 Oct;55(9):1132–8.
 72. Sparks DL, Kryscio RJ, Sabbagh MN, Ziolkowski C, Lin Y, Sparks LM, et al. Tau is reduced in AD plasma and validation of employed ELISA methods. *Am J Neurodegener Dis.* 2012;1(1):99–106.
 73. Rosseels J, Van den Brande J, Violet M, Jacobs D, Grognet P, Lopez J, et al. Tau Monoclonal Antibody Generation based on Humanized Yeast Models: Impact on Tau Oligomerization and Diagnostics. *J Biol Chem.* 2014 Dec 24;
 74. Borderie D. Néphélométrie-turbidimétrie. [Httpwwwem-Premiumcomdoc-Distantuniv-Lille2frdatatraitesbioemb-47670](http://www.em-premium.com/doc-distant.univ-lille2.fr/61483/resultatrecherche/1) [Internet]. 2007 May 16 [cited 2015 Apr 28]; Available from: [http://www.em-premium.com.doc-distant.univ-lille2.fr/article/61483/resultatrecherche/1](http://www.em-premium.com/doc-distant.univ-lille2.fr/article/61483/resultatrecherche/1)
 75. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 1971 Sep;8(9):871–4.
 76. Lequin RM. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clin Chem.* 2005 Dec 1;51(12):2415–8.
 77. Grange RD, Thompson JP, Lambert DG. Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays. *Br J Anaesth.* 2014 Feb 1;112(2):213–6.
 78. Moalic V, Mercier B, Ferec C. Technologie LuminexTM : principe, applications, et perspectives. *Immuno-Anal Biol Spéc.* 2004 Aug;19(4):181–7.
 79. Joos TO, Stoll D, Templin MF. Miniaturised multiplexed immunoassays. *Curr Opin Chem Biol.* 2002 Feb;6(1):76–80.
 80. Fulton RJ, McDade RL, Smith PL, Kienker LJ, Kettman JR. Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system. *Clin Chem.* 1997 Sep;43(9):1749–56.
 81. Rissin DM, Kan CW, Campbell TG, Howes SC, Fournier DR, Song L, et al. Single-Molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nat Biotechnol.* 2010 Jun;28(6):595–9.
 82. Schipke CG, Prokop S, Heppner FL, Heuser I, Peters O. Comparison of immunosorbent assays for the quantification of biomarkers for Alzheimer's disease in

- human cerebrospinal fluid. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2011;31(2):139–45.
83. Mattsson N, Andreasson U, Persson S, Arai H, Batish SD, Bernardini S, et al. The Alzheimer's Association external quality control program for cerebrospinal fluid biomarkers. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc*. 2011 Jul;7(4):386–95.e6.
84. Yanamandra K, Kfoury N, Jiang H, Mahan TE, Ma S, Maloney SE, et al. Anti-tau antibodies that block tau aggregate seeding in vitro markedly decrease pathology and improve cognition in vivo. *Neuron*. 2013 Oct 16;80(2):402–14.
85. Petersen RC, Caracciolo B, Brayne C, Gauthier S, Jelic V, Fratiglioni L. Mild cognitive impairment: a concept in evolution. *J Intern Med*. 2014 Mar;275(3):214–28.
86. Mattsson N, Portelius E, Rolstad S, Gustavsson M, Andreasson U, Stridsberg M, et al. Longitudinal cerebrospinal fluid biomarkers over four years in mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis JAD*. 2012;30(4):767–78.
87. Le Bastard N, Aerts L, Slegers K, Martin J-J, Van Broeckhoven C, De Deyn PP, et al. Longitudinal stability of cerebrospinal fluid biomarker levels: fulfilled requirement for pharmacodynamic markers in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis JAD*. 2013;33(3):807–22.
88. Kester MI, Scheffer PG, Koel-Simmelink MJ, Twaalfhoven H, Verwey NA, Veerhuis R, et al. Serial CSF sampling in Alzheimer's disease: specific versus non-specific markers. *Neurobiol Aging*. 2012 Aug;33(8):1591–8.

VII. Annexe

■ Critères diagnostiques de la Démence de type Alzheimer FOO.xx [294.1x]

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 (p. ex., maladie cérébro-vasculaire, maladie de Parkinson, maladie de Huntington, hématome sous-durai, hydrocéphalie à pression normale, tumeur cérébrale)

(2) à des affections générales pouvant entraîner une démence (p. ex., 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 delirium.

F. La perturbation n'est pas mieux expliquée par un trouble de l'Axe I (p. ex., Trouble dépressif majeur, Schizophrénie).

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

FOO.,c, [294.10] Sans perturbation du comportement : si les troubles cognitifs ne s'accompagnent d'aucune perturbation cliniquement significative du comportement.

FOO.xx [294.11] Avec perturbation du comportement : si les troubles cognitifs s'accompagnent d'une perturbation cliniquement significative (p. ex., 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

Université de Lille 2
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE
MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
(Tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)
Année Universitaire 2014/2015

Nom : BROUTIN
Prénom : Caroline

Titre de la thèse : Optimisation du dosage plasmatique de la protéine Tau par ELISA (anticorps ADx215) : étude pilote de la cohorte Baltazar

Mots-clés : ELISA – Maladie d'Alzheimer – Tau – Plasma – Diagnostic – ADx215 – Cohorte Baltazar – INNOTEST hTAU – Biomarqueur – Démence - MCI

Résumé :

La maladie d'Alzheimer (MA) est la cause la plus fréquente de démence. Cette maladie est caractérisée, d'un point de vue histologique, par la présence de deux lésions cérébrales caractéristiques, la dégénérescence neurofibrillaire et les plaques séniles, correspondant respectivement à l'agrégation de protéines Tau et de peptides amyloïde A β 1-42. Trois biomarqueurs biologiques, le peptide A β 1-42, la protéine Tau totale et hyperphosphorylée ont été validés dans le liquide cérébro-spinal comme aide au diagnostic de la MA. Le dosage des biomarqueurs nécessite néanmoins la réalisation d'une ponction lombaire, un geste invasif. La recherche de nouveaux biomarqueurs sanguins est donc en plein développement. L'objectif de ce travail consistait en la mise au point d'un nouveau dosage plasmatique de Tau utilisant une technique ELISA sandwich sensible avec l'anticorps ADx215 d'une très haute affinité pour la protéine Tau. Une fois l'optimisation terminée, nous avons réalisé une étude pilote en appliquant ce dosage à 20 patients atteints de MA (cohorte Baltazar), 6 au stade MCI (MCI-MA) et 14 au stade de démence (MA). Pour chaque patient, nous disposons de deux plasmas prélevés à 2 ans d'intervalle (M0 et M24). Nos résultats montrent que les concentrations de Tau plasmatique sont stables sur 2 ans. On n'observe pas de différence significative entre les concentrations de Tau plasmatique chez les patients MA et MCI-MA. Des analyses complémentaires de corrélation ont été réalisées avec les concentrations plasmatiques obtenues avec un autre kit commercial, INNOTEST hTAU et les biomarqueurs du LCS.

Membres du jury :

Président : M. le Professeur Thierry BROUSSEAU, PU-PH Université Lille 2

Directeur de Thèse : M^{me} le Docteur Susanna SCHRAEN-MASCHKE, MCU-PH Université Lille 2

Assesseurs : M. le Professeur Bernard SABLONNIERE, PU-PH Université Lille2
: M. le Docteur Luc BUEE, Directeur de Recherches, UMR-S1172
: M. le Docteur Farid ZERIMECH, PH CHRU de Lille