

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

**Soutenu publiquement le 05 juin 2019  
Par Lucie VAUDRAN**

**conformément aux dispositions réglementaires en vigueur  
tient lieu de**

**THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

---

**Dosage des biomarqueurs Tau et A $\beta$  dans le liquide cébrospinal sur  
l'automate Lumipulse® G600II : comparaison de méthodes, validation  
analytique et détermination de valeurs seuils en faveur du diagnostic de  
maladie d'Alzheimer**

---

**Membres du jury :**

**Président :** M. le Professeur Thierry BROUSSEAU, PU-PH, CHRU Lille

**Assesseur(s) :** M<sup>me</sup> le Docteur Susanna SCHRAEN, MCU-PH, CHRU Lille  
M. le Professeur Vincent DERAMECOURT, PU-PH, CHRU Lille  
M<sup>me</sup> le Docteur Stéphanie BOMBOIS, PH, Pitié Salpêtrière, APHP  
M<sup>me</sup> le Docteur Malika HAMDANE, MCU, UMR – S1172





## Faculté de Pharmacie 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 de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Damien CUNY
Vice-présidente Formation :	Lynne FRANJIÉ
Vice-président Recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président Relations Internationales :	François-Olivier SEYS
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

### Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-Doyen et Assesseur à la Recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux Relations Internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur à la Vie de la Faculté et aux Relations avec le Monde Professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la Pédagogie :	Benjamin BERTIN
Assesseur à la Scolarité :	Christophe BOCHU
Responsable des Services :	Cyrille PORTA

### Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	ICPAL
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire

### Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	EI Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Onco et Neurochimie
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	ICPAL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	DEPREZ	Rebecca	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNE	Benoît	Bactériologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Onco et Neurochimie
M.	MILLET	Régis	ICPAL
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY	Anne Catherine	Législation
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHÉRAERT	Eric	Législation
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Lab. de Médicaments et Molécules

### 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	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
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.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mme	CHARTON	Julie	Lab. de Médicaments et Molécules
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
Mme	DUTOUT-AGOURIDAS	Laurence	Onco et Neurochimie
M.	EL BAKALI	Jamal	Onco et Neurochimie
M.	FARCE	Amaury	ICPAL
Mme	FLIPO	Marion	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	FURMAN	Christophe	ICPAL
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	ICPAL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Onco et Neurochimie

Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation
Mme	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RAVEZ	Séverine	Onco et Neurochimie
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Onco et Neurochimie
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

### 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.	DAO PHAN	Hai Pascal	Lab. Médicaments et Molécules
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie Pharmaceutique

### Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques

## AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie

## ***Faculté de Pharmacie 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, Centre de  
Biologie Pathologie Pierre-Marie Degand, CHRU Lille.

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 mon internat et pour votre disponibilité. Soyez assuré de ma sincère gratitude et de mon profond respect.

A mes juges,

**Monsieur le Professeur Vincent Deramecourt**

Médecin Neurologue au CMRR du CHRU de Lille. (Centre Mémoire de Ressources  
et de Recherche, Hôpital Roger Salengro)

Praticien Hospitalo-Universitaire en Histologie

Je vous suis reconnaissante d'avoir accepté de juger ce travail. Veuillez accepter  
mes sincères remerciements et soyez assuré de mon profond respect.

**Madame le Docteur Stéphanie Bombois**

Médecin neurologue à l'Institut de la Mémoire et de la Maladie d'Alzheimer, CHU  
Pitié Salpêtrière, APHP.

Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Veuillez accepter mes sincères  
remerciements pour le temps et l'aide précieuse que vous m'avez accordés dans la  
rédaction de cette thèse. Soyez assurée de mon profond respect.

**Madame le Docteur Malika HAMDANE**

Maître de Conférence des Universités, Université de Lille.

Equipe « Alzheimer et Tauopathies » UMR – S1172

Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert, Lille.

Vous me faites l'honneur d'accepter de faire partie du jury de cette thèse. Veuillez  
accepter mes sincères remerciements et soyez assurée de ma profonde  
considération.

A ma directrice de thèse,

**Madame le Docteur Susanna SCHRAEN**

Maître de Conférence des Universités - Praticien Hospitalier

Institut de Biochimie et Biologie moléculaire

Responsable de l'UF Pathologie des protéines

Centre de Biologie – Pathologie Pierre-Marie Degand, CHRU de Lille

Equipe « Alzheimer et Tauopathies » UMR – S1172, Centre de Recherche Jean-  
Pierre Aubert, Lille.

Je vous remercie pour ce travail que vous m'avez confié et tous les conseils que vous m'avez donnés tout au long de la rédaction de cette thèse mais aussi pendant l'année que j'ai passée au sein de l'UF Pathologie des protéines. Soyez assurée de ma reconnaissance et de mon profond respect.

# LISTE DES ABREVIATIONS

ADNI	Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative
ADRDA	Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
APP	Amyloid Precursor Protein
AUC	Area Under the Curve (Aire sous la courbe)
CLEIA	Chemi-Luminescent Enzyme Immuno-Assay
COFRAC	Comité français d'accréditation
CRM	Certified Reference Material
CV	Coefficient de variation
DNF	Dégénérescences neurofibrillaires
DSM-IV-TR	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – Fourth Edition – Text Revision
ECLIA	Electro-Chimi-Luminescence Immuno-Assay
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ET	Ecart-type
FDG	Fluoro-Désoxy-Glucose
HAS	Haute Autorité de Santé
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
IT	INNOTEST®
LCS	Liquide Cérébro-Spinal
LP	Lumipulse®
MA	Maladie d'Alzheimer
MCI	Mild Cognitive Impairment
NIA-AA	National Institute on Aging - Alzheimer's Association
NINCDS	National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke
P-Tau	Protéine Tau hyperphosphorylée

P-Tau <sub>181</sub>	Protéine Tau phosphorylée sur la thréonine 181
RMP	Reference Measurement Procedure
SNAP – 25	Synaptosomal - Associated Protein 25
Tau	Tubulin Associated Unit
TEMP	Tomographie d'Emission MonoPhotonique
TEP	Tomographie à Emission de Positons
t-Tau	Protéine Tau totale
VPP	Valeur Prédictive Positive
WG-CSF	Working Group for CSF proteins

# TABLE DES MATIERES

I.	Introduction.....	18
A.	La maladie d'Alzheimer.....	18
1.	Clinique .....	19
2.	Physiopathologie.....	20
B.	Les biomarqueurs Tau et A $\beta$ : intérêt et place de leur dosage pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer dans le LCS .....	26
1.	Les biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer : les marqueurs actuels les plus directs du processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer .....	27
2.	Place des biomarqueurs du LCS en routine clinique.....	30
3.	Place des biomarqueurs du LCS en recherche : évolution des critères, classification ATN, critères biologiques du NIA-AA .....	31
C.	Les techniques de dosage et leurs limites .....	34
1.	Technique manuelle INNOTEST® .....	34
2.	L'automate Lumipulse® G600II de Fujirebio® .....	36
3.	La technologie Elecsys®.....	38
4.	EUROIMMUN®.....	39
5.	Luminex <sup>100</sup> microsphere system®.....	39
6.	Les limites actuelles de ces dosages .....	40
D.	Objectif de l'étude .....	42
II.	Matériels et méthodes .....	43
A.	Patients et modalités de recueil du LCS .....	43
1.	Patients .....	43
2.	Recueil et aliquotage du LCS.....	43
B.	Matériels .....	44
C.	Etudes de corrélation, analyses ROC, tests de répétabilité, de fidélité intermédiaire et de stabilité .....	44
D.	Statistiques .....	45

1.	Etudes de corrélation .....	45
2.	Analyses ROC.....	46
3.	Tests de répétabilité, de fidélité intermédiaire et de stabilité .....	46
III.	Résultats.....	47
A.	Etudes de corrélation .....	47
1.	Comparaison INNOTEST® (IT) / Lumipulse® (LP).....	47
a)	$A\beta_{1-42}$ .....	47
b)	t-Tau .....	48
c)	P-Tau .....	49
d)	$A\beta_{1-40}$ .....	50
e)	$A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ .....	51
2.	Comparaison des tubes d'aliquotage .....	52
B.	Analyses ROC .....	56
a)	$A\beta_{1-42}$ .....	56
b)	t-Tau .....	57
c)	P-Tau .....	58
d)	$A\beta_{1-40}$ .....	58
e)	$A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ .....	59
f)	Standardisation du dosage d' $A\beta_{1-42}$ .....	60
C.	Tests de répétabilité, de fidélité intermédiaire et de stabilité.....	60
1.	Tests de répétabilité .....	60
2.	Tests de fidélité intermédiaire .....	62
3.	Tests de stabilité .....	63
IV.	Discussion .....	65
V.	Conclusion.....	74
VI.	Références bibliographiques .....	75
VII.	Annexes.....	83

# INDEX DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Biomarqueurs de la classification ATN. ....	32
<b>Tableau 2</b> : Caractéristiques des kits INNOTEST®. ....	34
<b>Tableau 3</b> : Caractéristiques des kits Lumipulse®. ....	37
<b>Tableau 4</b> : Comparaison des anticorps de détection et de capture utilisés dans les techniques INNOTEST® et Lumipulse®. ....	37
<b>Tableau 5</b> : Caractéristiques des kits Elecsys®. ....	38
<b>Tableau 6</b> : Récapitulatif des équations de corrélation Lumipulse® = f(INNOTEST®). .....	52
<b>Tableau 7</b> : Récapitulatif des équations de corrélation tube Sarstedt® = f(tube Eppendorf®). ....	55
<b>Tableau 8</b> : Récapitulatif des valeurs seuils utilisées avec l'INNOTEST® et le Lumipulse®. ....	60
<b>Tableau 9</b> : Test détaillé de répétabilité pour A $\beta$ <sub>1-42</sub> . ....	61
<b>Tableau 10</b> : Récapitulatif des ET et CV des tests de répétabilité. ....	61
<b>Tableau 11</b> : Test de fidélité intermédiaire pour A $\beta$ <sub>1-42</sub> . ....	62
<b>Tableau 12</b> : Récapitulatif des CV des tests de fidélité intermédiaire. ....	62
<b>Tableau 13</b> : Résultats des tests de stabilité. ....	64
<b>Tableau 14</b> : Résumé des études de corrélation entre les différentes techniques... ..	66
<b>Tableau 15</b> : Exemple de CV inter laboratoires rendu par l'Alzheimer's Association QC Program. ....	68
<b>Tableau 16</b> : Valeurs seuils des biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer avant standardisation. ....	69

# INDEX DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Les différents stades de la maladie d'Alzheimer.....	20
<b>Figure 2</b> : Photographie d'une DNF.....	21
<b>Figure 3</b> : Représentation schématique de la formation des DNF et des différentes voies de propagation des agrégats de la protéine Tau.....	21
<b>Figure 4</b> : Photographie de plaques amyloïdes.....	22
<b>Figure 5</b> : Représentation schématique des mécanismes de dégradation enzymatique de l'APP.....	23
<b>Figure 6</b> : Plaques amyloïdes et DNF dans le cortex cérébral d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer.....	23
<b>Figure 7</b> : L'hypothèse de la cascade amyloïde.....	24
<b>Figure 8</b> : Hypothèses modifiées de la cascade amyloïde.....	25
<b>Figure 9</b> : Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer pour les formes génétiques.....	26
<b>Figure 10</b> : Schéma explicatif des variations des dosages des biomarqueurs du LCS dans la maladie d'Alzheimer.....	28
<b>Figure 11</b> : Cinétique d'évolution des biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer.....	29
<b>Figure 12</b> : Classification ATN.....	33
<b>Figure 13</b> : Critères diagnostiques selon la classification ATN.....	33
<b>Figure 14</b> : Séquence des acides aminés du peptide $A\beta_{1-42}$ et anticorps utilisés dans le kit INNOTEST® $\beta$ -AMYLOID <sub>(1-42)</sub> .....	35
<b>Figure 15</b> : Séquence des acides aminés du peptide $A\beta_{1-40}$ et anticorps utilisés dans le kit INNOTEST® $\beta$ -AMYLOID <sub>(1-40)</sub> .....	35
<b>Figure 16</b> : Séquence des acides aminés de Tau et anticorps utilisés dans le kit INNOTEST® hTAU Ag.....	36
<b>Figure 17</b> : Séquence des acides aminés de P-Tau et anticorps utilisés dans le kit INNOTEST® PHOSPHO-TAU <sub>(181P)</sub> .....	36
<b>Figure 18</b> : Technique de dosage du peptide $A\beta_{1-42}$ par le test Elecsys® $\beta$ -Amyloid (1-42).....	38
<b>Figure 19</b> : Anticorps de détection et de capture utilisés pour les dosages de t-Tau, P-Tau et $A\beta_{1-42}$ par l'INNOTEST® et le Luminex®.....	39
<b>Figure 20</b> : Résultats du programme de qualité externe de Alzheimer's Association QC Program pour l'INNOTEST®.....	42

<b>Figure 21</b> : Représentation graphique de la régression linéaire : $A\beta_{1-42}(LP) = f(A\beta_{1-42}(IT))$ .....	47
<b>Figure 22</b> : Représentation graphique de la régression linéaire : $t\text{-Tau}(LP) = f(t\text{-Tau}(IT))$ .....	48
<b>Figure 23</b> : Représentation graphique de la régression linéaire : $P\text{-Tau}(LP) = f(P\text{-Tau}(IT))$ .....	49
<b>Figure 24</b> : Représentation graphique de la régression linéaire : $A\beta_{1-40}(LP) = f(A\beta_{1-40}(IT))$ .....	50
<b>Figure 25</b> : Représentation graphique de la régression linéaire : $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}(LP) = f(A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}(IT))$ . ....	51
<b>Figure 26</b> : Représentation graphique de la régression linéaire : $A\beta_{1-42}(S) = f(A\beta_{1-42}(E))$ .....	53
<b>Figure 27</b> : Représentation graphique de la régression linéaire : $t\text{-Tau}(S) = f(t\text{-Tau}(E))$ . ....	53
<b>Figure 28</b> : Représentation graphique de la régression linéaire : $P\text{-Tau}(S) = f(P\text{-Tau}(E))$ . ....	54
<b>Figure 29</b> : Représentation graphique de la régression linéaire : $A\beta_{1-40}(S)=f(A\beta_{1-40}(E))$ . ....	54
<b>Figure 30</b> : Représentation graphique de la régression linéaire : $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}(S) = f(A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}(E))$ .....	55
<b>Figure 31</b> : Courbe ROC du dosage d' $A\beta_{1-42}$ par le Lumipulse® .....	57
<b>Figure 32</b> : Courbe ROC du dosage de $t\text{-Tau}$ par le Lumipulse® .....	57
<b>Figure 33</b> : Courbe ROC du dosage de $P\text{-Tau}$ par le Lumipulse® .....	58
<b>Figure 34</b> : Courbe ROC du dosage d' $A\beta_{1-40}$ par le Lumipulse® .....	59
<b>Figure 35</b> : Courbe ROC du ratio $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ par le Lumipulse® .....	59

## I. Introduction

Avec l'augmentation de l'espérance de vie, la maladie d'Alzheimer touche de plus en plus de personnes. De ce fait, il est important de pouvoir faire un diagnostic, le meilleur et le plus précoce possible. Ce diagnostic reste difficile ; néanmoins, les marqueurs biologiques, reflets de la pathologie cérébrale, prennent une place de plus en plus importante dans les critères diagnostiques de cette maladie. Parmi ces biomarqueurs, les marqueurs protéiques du liquide cérébro-spinal (LCS) sont les plus accessibles en routine clinique. Ils sont de plus en plus prescrits, et l'automatisation de leur dosage devient nécessaire.

Dans l'introduction, nous aborderons tout d'abord, brièvement, les caractéristiques cliniques et physiopathologiques de la maladie. Ceci nous permettra de présenter les biomarqueurs actuellement validés ainsi que leur place dans les nouveaux critères diagnostiques. Nous finirons par présenter les techniques actuellement disponibles pour leur dosage en routine clinique et leurs limites.

### A. La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative caractérisée par une perte progressive de la mémoire et des autres fonctions cognitives conduisant à des répercussions importantes dans les activités de la vie quotidienne avec une perte d'autonomie conséquente (1).

Il s'agit de la démence la plus fréquente du sujet âgé et elle serait à l'origine de 60 à 70 % des cas (2,3). La démence est un syndrome chronique caractérisé par une altération croissante des fonctions cognitives plus importante que celle du vieillissement normal (2). Elle est l'une des principales causes de handicap et de dépendance chez les personnes âgées dans le monde. Cette maladie reste aujourd'hui un processus irréversible pour lequel il n'existe aucun traitement curatif.

La maladie d'Alzheimer est un enjeu majeur de santé publique. En 2017, 900 000 personnes sont atteintes de la maladie d'Alzheimer en France. Près de 225 000 nouveaux cas sont diagnostiqués par an. Avec l'augmentation de l'espérance de vie, c'est près de 1 300 000 malades qui sont attendus en France en 2020, et près de 1 800 000 en 2050 (1,4).

La forme sporadique, qui constitue la majorité des cas, survient la plupart du temps après 65 ans. Dans moins de 2 % des cas, la maladie débute avant 65 ans. Il s'agit de sujets porteurs de gènes de susceptibilité et essentiellement de l'allèle  $\epsilon 4$  du gène codant pour l'apolipoprotéine E. Rarement, il s'agit de personnes atteintes de formes familiales héréditaires à transmission autosomique dominante pour lesquelles la maladie se déclare souvent autour de 45 ans (1,5).

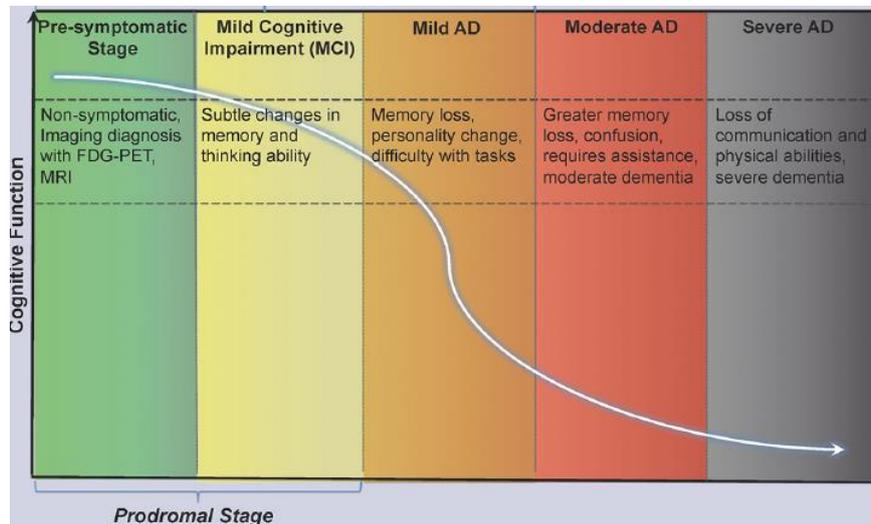
## 1. Clinique

La forme sporadique est caractérisée par une évolution lente et progressive avec une altération principale de la mémoire et des fonctions exécutives. La forme à début précoce, familiale, peut évoluer plus rapidement et prédominer sur l'altération des autres fonctions cognitives (3).

Il existe tout d'abord une phase préclinique, silencieuse, pendant laquelle les lésions cérébrales apparaissent. Cette phase peut durer plusieurs années. Le processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer pourrait en effet débiter 10 ans ou plus avant l'apparition des symptômes (6,7).

Au fur et à mesure de la propagation des lésions neuronales, les signes cliniques commencent à apparaître : on parle alors de troubles cognitifs légers ou Mild Cognitive Impairment (MCI). Il s'agit de la phase pré-démentielle de la maladie d'Alzheimer, ou maladie d'Alzheimer prodromale (Figure 1). Durant cette phase, il existe une plainte cognitive et un déficit concernant un ou plusieurs domaines cognitifs et ce plus importants que ne le voudraient l'âge et le niveau socio-éducatif. La mémoire est le plus souvent touchée. Les activités de la vie quotidienne et l'indépendance sont conservées (8,9).

La dernière phase de la maladie d'Alzheimer est la phase de démence. Elle apparaît lorsque les troubles cognitifs entraînent des perturbations significatives dans les activités de la vie quotidienne jusqu'à la dépendance (10).



**Figure 1 :** Les différents stades de la maladie d'Alzheimer. D'après Caldwell C. et al. 2014 (8).

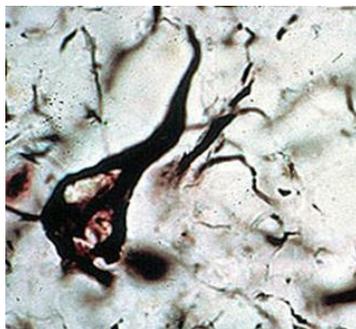
Une étude a montré qu'environ 35 % des patients au stade MCI évoluent vers une phase démentielle de la maladie d'Alzheimer pendant un suivi de 3 ans, et que le taux annuel de conversion est compris entre 5 et 10 % (11).

## 2. Physiopathologie

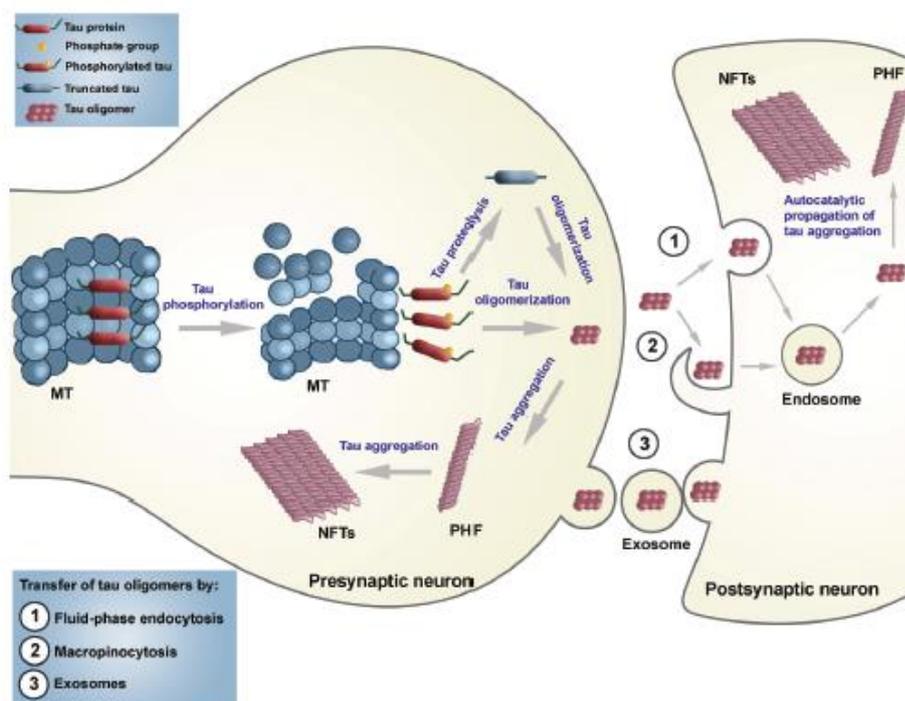
Comme décrit précédemment, les processus physiopathologiques à l'origine des lésions cérébrales observées chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer débutent des années avant l'apparition des premiers symptômes. Ces lésions neuropathologiques sont de deux types : les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) et les plaques amyloïdes.

Les DNF sont des lésions intra-neuronales constituées principalement de l'accumulation de la protéine Tau (Tubulin Associated Unit) sous sa forme hyperphosphorylée (P-Tau) (Figure 3). Cette protéine Tau est essentiellement exprimée au niveau du système nerveux central. En favorisant la polymérisation de la tubuline, elle joue un rôle dans la stabilisation et la dynamique des microtubules et donc dans le transport intracellulaire et la croissance axonale. Sa phosphorylation modifie son association avec les microtubules. Une hyperphosphorylation diminue ainsi son affinité pour les microtubules et entraîne donc une perturbation du cytosquelette (Figure 3). L'hyperphosphorylation de la protéine Tau favorise

également son agrégation et donc l'apparition de DNF. La perte de l'intégrité du neurone et la toxicité de ces formes hyperphosphorylées contribuent à la mort neuronale (12,13). La propagation des lésions de DNF dans le cerveau se fait par transfert des formes pathologiques de la protéine Tau via des vésicules (Figure 3) (13,14).

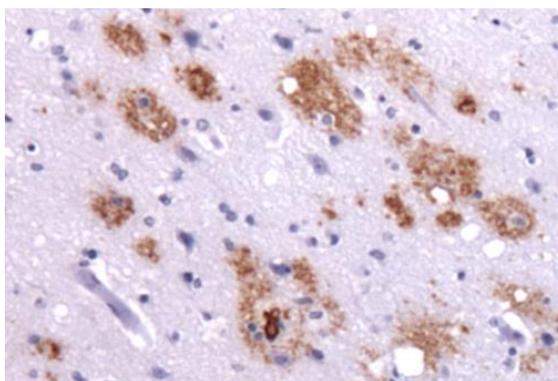


**Figure 2 :** Photographie d'une DNF.  
Pr V. Deramecourt.



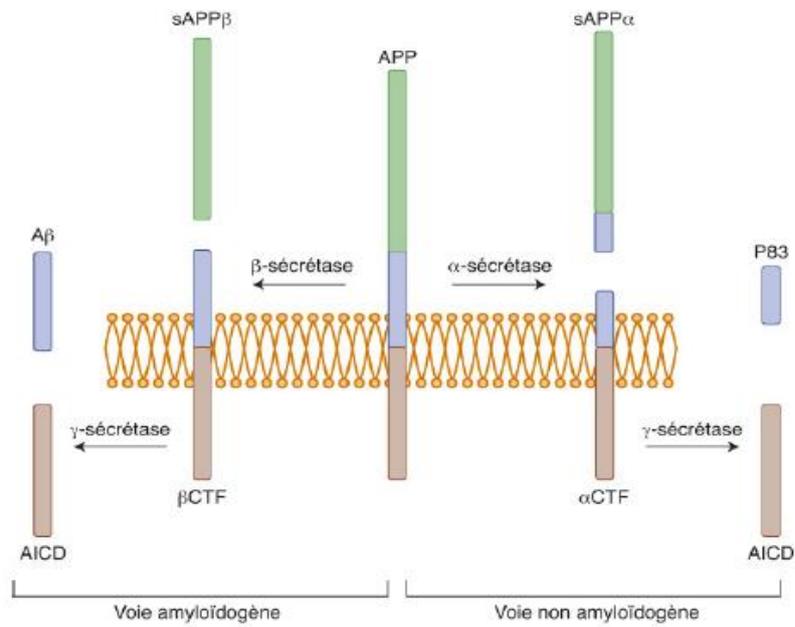
**Figure 3 :** Représentation schématique de la formation des DNF et des différentes voies de propagation des agrégats de la protéine Tau. D'après Šimić G et al. 2016. (13).

Les plaques amyloïdes sont constituées d'agrégats extracellulaires de peptides amyloïdes ou peptides A $\beta$  (Figure 4). Ces peptides résultent du métabolisme de l'Amyloid Precursor Protein (APP). Cette protéine va subir des clivages successifs par la  $\beta$ -sécrétase puis la  $\gamma$ -sécrétase, conduisant à la production de monomères de peptides amyloïdes. Il s'agit de la voie amyloïdogène de la maturation de l'APP (Figure 5). Selon le site de clivage, plusieurs isoformes du peptide amyloïde sont formées, les peptides A $\beta_{1-42}$  et A $\beta_{1-40}$  sont les plus abondants. Cependant, la synthèse d'A $\beta_{1-40}$  est largement supérieure à celle d'A $\beta_{1-42}$ . La concentration d'A $\beta_{1-40}$  dans le LCS est ainsi un reflet de la production globale de peptides amyloïdes. Le peptide A $\beta_{1-42}$ , du fait de sa nature hautement hydrophobe, s'agrège plus facilement pour former les plaques amyloïdes neurotoxiques (12). La voie non amyloïdogène est assurée par l' $\alpha$ -sécrétase puis la  $\gamma$ -sécrétase, et conduit à la production de deux fragments, l'AICD (APP IntraCellular Domain) et P83 (Figure 5).

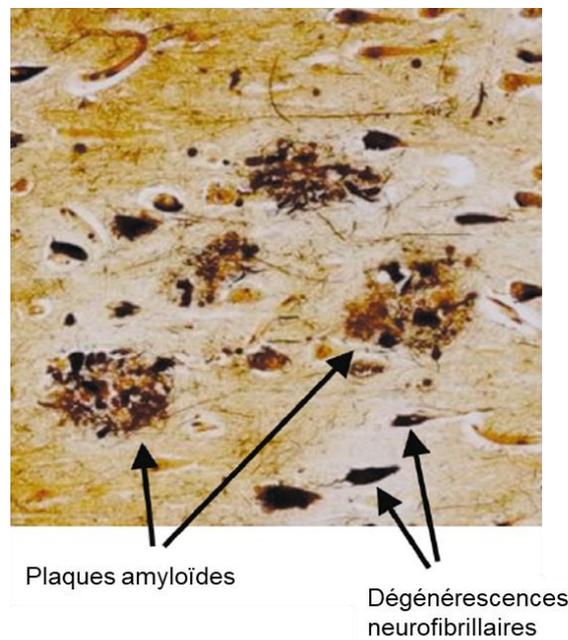


**Figure 4 :** Photographie de plaques amyloïdes.

Pr V. Deramecourt.

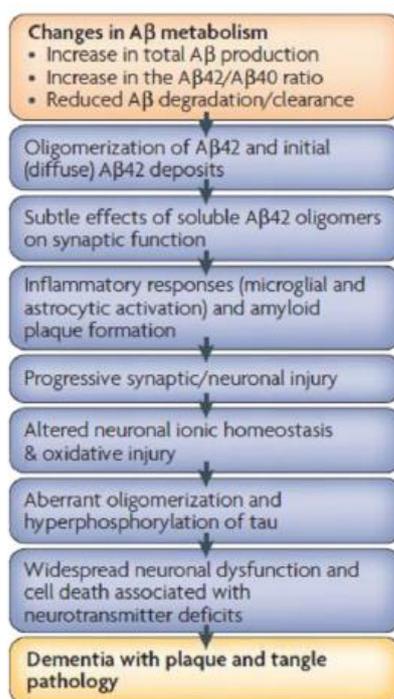


**Figure 5 :** Représentation schématique des mécanismes de dégradation enzymatique de l'APP. D'après Lehmann S. et al. 2014 (12).



**Figure 6 :** Plaques amyloïdes et DNF dans le cortex cérébral d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. D'après Blennow K. et al. (5).

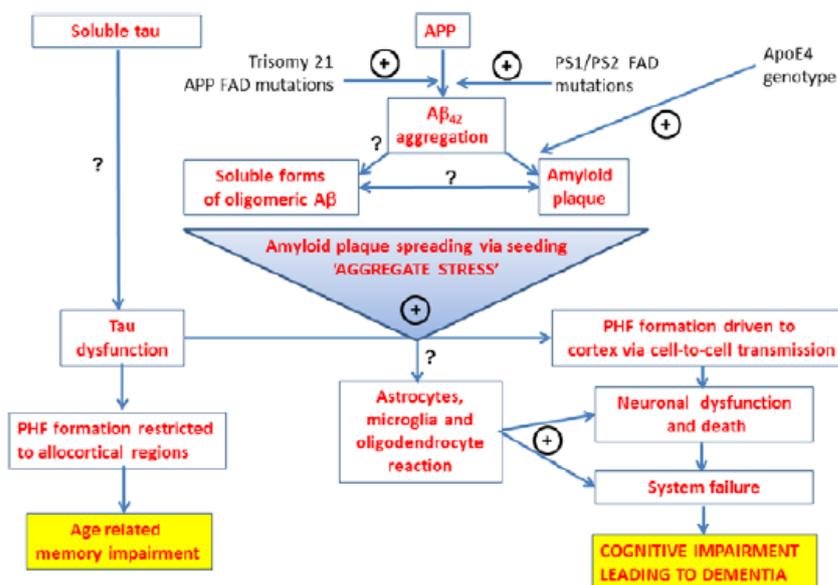
Le lien entre les deux lésions, DNF et plaques amyloïdes, reste encore mal connu. En effet, pour les formes sporadiques, des incertitudes demeurent quant aux mécanismes intervenant dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. Des études ont montré que l'accumulation de peptides  $A\beta_{1-42}$  et donc la formation de plaques amyloïdes seraient les premiers processus physiopathologiques à se développer, et ont conduit à proposer le modèle de « cascade amyloïde » (Figure 7). Cette accumulation contribuerait au développement d'une réponse inflammatoire qui entrainerait une altération de l'activité des phosphatases de la protéine Tau et donc favoriserait la formation des DNF. L'accumulation de ces lésions conduisent à la mort neuronale et donc à la perte progressive des fonctions cognitives puis à la démence (12,15–19).



**Figure 7:** L'hypothèse de la cascade amyloïde. D'après Barrage SH. et al. 2015 (15).

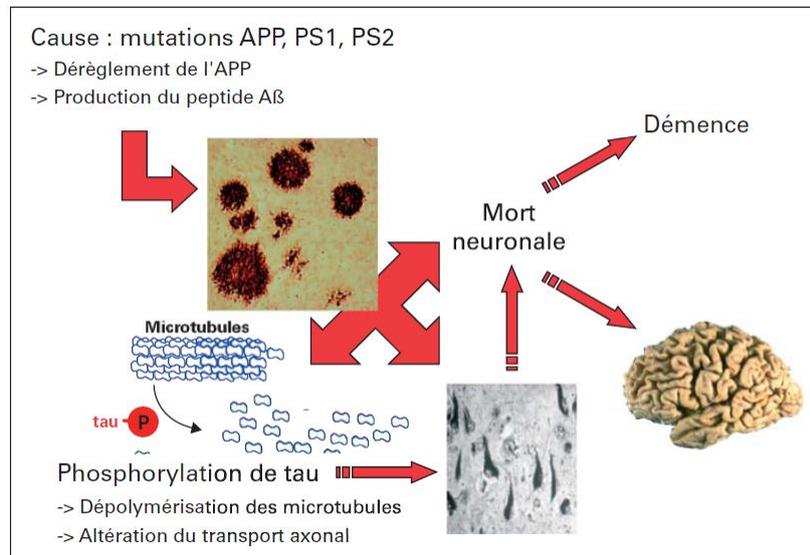
Plus récemment, ce modèle s'est complexifié avec les résultats de la recherche. En effet, les essais thérapeutiques, basés sur l'hypothèse de la cascade amyloïde avec le développement de molécules anti-amyloïdes, ont jusqu'à présent échoué (16,20–22). On considère aujourd'hui, qu'une fois déclenchée, la DNF se propage à l'ensemble du cerveau indépendamment du peptide amyloïde. Cette propagation se ferait selon un mécanisme analogue à celui du prion (14). De nombreux autres mécanismes ont été proposés comme intervenant tôt dans le

processus physiopathologique (Figure 8). Parmi eux, on peut citer la neuroinflammation (20,23) ou une insulino-résistance centrale (24).



**Figure 8 :** Hypothèses modifiées de la cascade amyloïde. D'après Karran E. et al. 2016 (20).

Pour les formes génétiques, des mutations dans le gène codant pour l'APP (gène *APP*) ou dans ceux codant pour des protéines qui composent le complexe de la  $\gamma$ -sécrétase, la préséniline 1 et la préséniline 2 (gènes *PSEN-1* et *PSEN-2* respectivement), conduisent d'abord à la surproduction et à l'agrégation de peptides A $\beta$ , puis à l'hyperphosphorylation de Tau, et à la toxicité neuronale (Figure 9) (16).



**Figure 9 :** Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer pour les formes génétiques.

D'après Buée L. et al. 2006 (16).

La connaissance de la physiopathologie a permis le développement de marqueurs biologiques directs des lésions histologiques de cette maladie.

## **B. Les biomarqueurs Tau et A $\beta$ : intérêt et place de leur dosage pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer dans le LCS**

Selon les premiers critères diagnostiques du National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke et de l'Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) publiés en 1984 (25), le diagnostic de maladie d'Alzheimer était uniquement clinique. Il s'agissait d'un diagnostic d'élimination conduisant, du vivant du patient, à un diagnostic de maladie d'Alzheimer probable ou possible. Le diagnostic de certitude de la maladie d'Alzheimer ne peut être posé que par la mise en évidence des lésions caractéristiques lors de l'étude histologique du cerveau après la mort du patient.

L'avancée des connaissances a permis la mise au point d'exams paracliniques d'imagerie et de dosages biologiques dans le LCS qui permettent la mise en évidence des altérations de la protéine Tau et du peptide amyloïde dans le système nerveux central. Nous présenterons tout d'abord ces biomarqueurs et leurs variations observées dans la maladie d'Alzheimer. Nous verrons ensuite comment ceci a conduit, depuis quelques années, au développement d'une approche

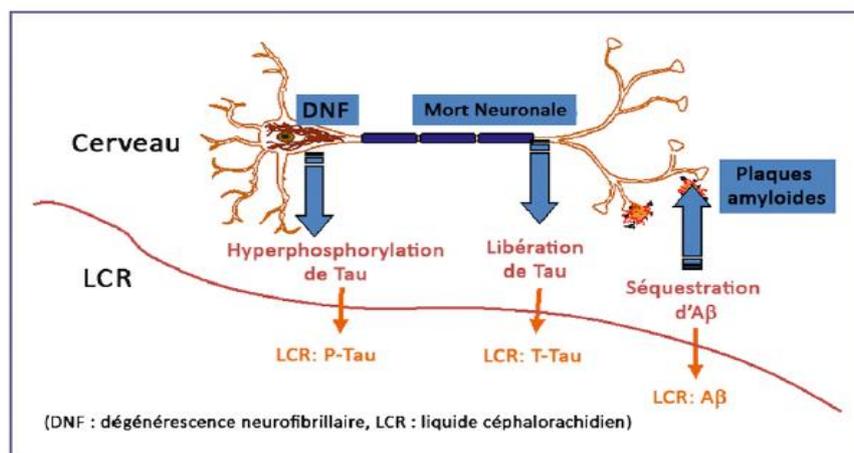
clinico-biologique afin d'améliorer la qualité du diagnostic et de proposer un diagnostic plus précoce, avant le stade de démence. Cette approche par biomarqueurs permet en effet de préciser le degré de preuve de la présence d'un processus physiopathologique de maladie d'Alzheimer sous-jacent chez le patient, et donc de renforcer ou non la probabilité du diagnostic clinique. Enfin, nous verrons leur place dans les nouveaux critères diagnostiques pour la maladie d'Alzheimer, destinés à l'heure actuelle à la recherche (9,10,18,26–31).

### 1. Les biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer : les marqueurs actuels les plus directs du processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer

Deux types de biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer ont pu être développés. D'une part, l'utilisation de radioligands spécifiques permet de mettre en évidence les lésions de DNF et les lésions amyloïdes par imagerie cérébrale : il s'agit de la Tomographie à Emission de Positons (TEP) Tau et de la TEP amyloïde (31,32). Cependant, ces deux examens sont très coûteux et n'ont pas d'autorisation d'utilisation en France. Seuls les biomarqueurs protéiques dosés dans le LCS sont accessibles en routine clinique : les peptides  $A\beta_{1-42}$ ,  $A\beta_{1-40}$ , les protéines Tau totale (t-Tau) et Tau phosphorylée sur la thréonine 181 (P-Tau<sub>181</sub>). Les variations de leur concentration reflètent le processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer. En effet, des études ont montré la corrélation entre l'augmentation des concentrations de t-Tau et P-Tau<sub>181</sub> dans le LCS et le nombre de lésions de DNF mises en évidence en post mortem (33,34), ou avec la TEP Tau du vivant du patient (35,36). D'autres études ont mis en évidence la corrélation entre la diminution des concentrations d' $A\beta_{1-42}$  dans le LCS et le nombre de plaques amyloïdes observées en post mortem (34,37) ou avec la TEP amyloïde (38,39). Le profil biochimique en faveur d'une maladie d'Alzheimer est ainsi caractérisé par des concentrations de t-Tau et P-Tau<sub>181</sub> augmentées, associées à une concentration d' $A\beta_{1-42}$  diminuée par rapport aux sujets sains (40–43).

Comment expliquer ces variations biologiques observées chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer ? Le modèle actuel est représenté sur la figure 10.

Au cours de la mort neuronale, les protéines Tau, normalement intraneuronales, sont libérées dans l'espace extracellulaire du parenchyme cérébral et passent dans le LCS où leur concentration augmente, permettant ainsi leur dosage. Quant aux peptides  $A\beta_{1-42}$ , ils sont d'une part, séquestrés en plaques amyloïdes dans l'espace extracellulaire, d'autre part, leur passage dans le LCS est altéré ; ainsi, leur concentration dans le LCS diminue (Figure 10) (40).

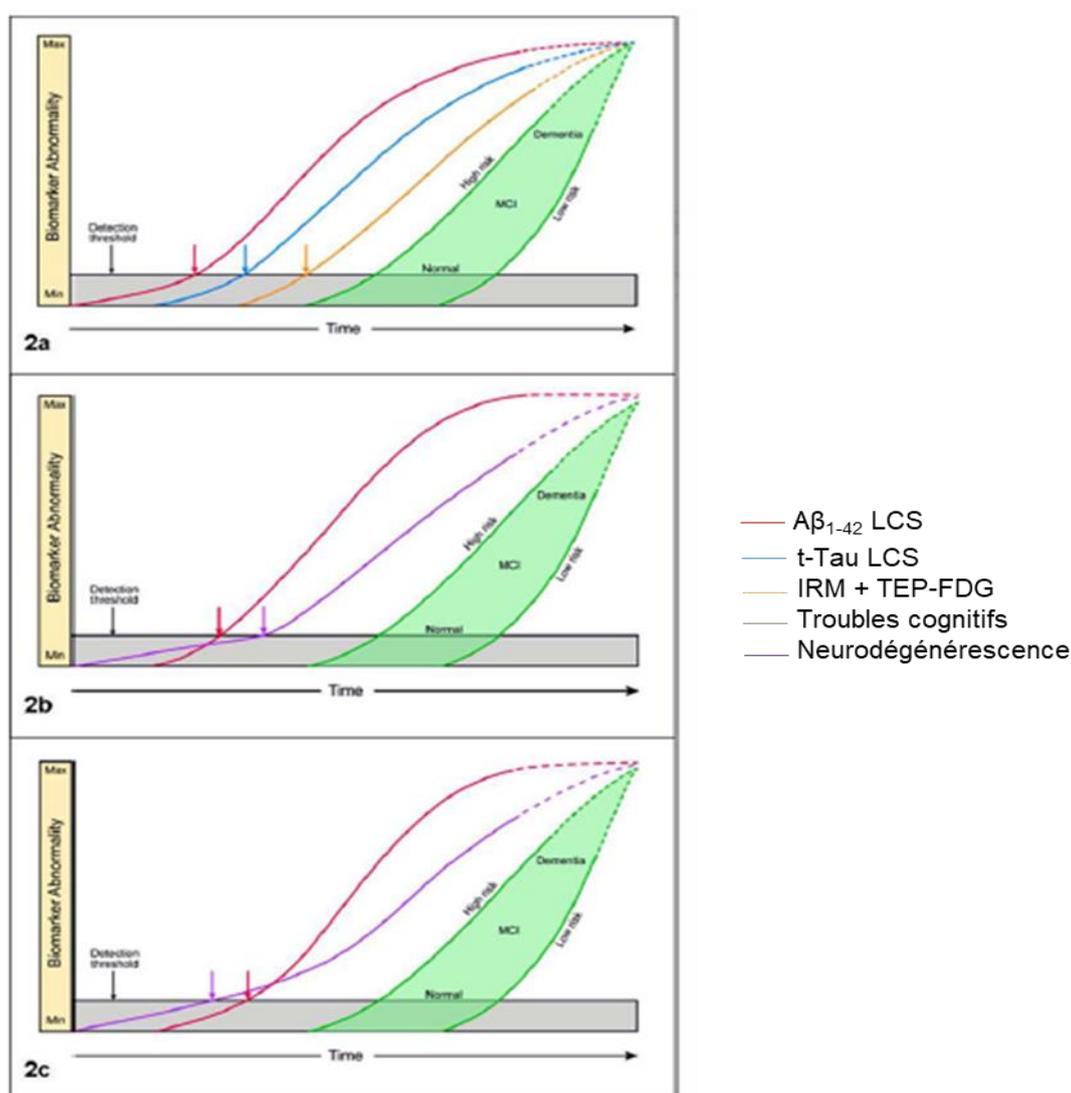


**Figure 10 :** Schéma explicatif des variations des dosages des biomarqueurs du LCS dans la maladie d'Alzheimer. D'après Bombois S. et al. 2011 (40).

De nombreuses études se sont attachées à préciser l'interprétation des variations de ces biomarqueurs. Ainsi, une échelle biologique de probabilité pour la maladie d'Alzheimer a pu être définie selon la positivité des trois biomarqueurs du LCS :  $A\beta_{1-42}$ , t-Tau et P-Tau. Quatre classes ont été distinguées : valeur prédictive positive (VPP) pour la maladie d'Alzheimer très faible (< 10 %) lorsque tous les marqueurs sont négatifs, VPP faible (< 25 %) si un marqueur est pathologique, VPP élevée (> 75 %) si deux marqueurs sur trois sont positifs et VPP très élevée (> 90 %) lorsque tous les marqueurs sont pathologiques (41). Des études ont montré que le dosage d' $A\beta_{1-40}$  pouvait améliorer l'interprétation du dosage de ces biomarqueurs dans le LCS. En effet, la diminution d' $A\beta_{1-42}$  s'interprète par rapport à la production globale de peptide amyloïde évaluée par la concentration d' $A\beta_{1-40}$ . Ainsi, le ratio  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$  est une aide au diagnostic des sujets qui présentent un profil biochimique discordant, c'est-à-dire les patients dont la concentration d' $A\beta_{1-42}$  est discordante avec les concentrations de t-Tau et P-Tau<sub>181</sub> (43). Alors, si la concentration d' $A\beta_{1-42}$  dans le LCS est normale, et que le ratio  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$  est diminué, cela est en faveur d'une séquestration d' $A\beta_{1-42}$  dans le cerveau et donc de la présence de plaques amyloïdes. Inversement, si la concentration d' $A\beta_{1-42}$  est

diminuée et que le ratio est normal, cela est en faveur de l'absence de plaques amyloïdes. De même, dans l'échelle biologique citée précédemment, le remplacement d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> par le ratio A $\beta$ <sub>1-42</sub>/A $\beta$ <sub>1-40</sub> a montré une amélioration de l'interprétation des biomarqueurs du LCS (44).

D'autres études ont essayé de déterminer une cinétique d'évolution des biomarqueurs dans la maladie d'Alzheimer. Elles ont montré que les premiers biomarqueurs à devenir pathologiques sont les marqueurs de la lésion amyloïde, suivis de ceux de la lésion de DNF (17,45–47). Cependant, la présence de pathologies associées rend plusieurs situations possibles quant à la cinétique des biomarqueurs (Figure 11) (17,45). Dans tous les cas, les biomarqueurs deviennent pathologiques des années avant l'apparition des symptômes (6,7,17).



**Figure 11 :** Cinétique d'évolution des biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer.

D'après Jack CR. et al. 2013 (17). 2a : formes génétiques ; 2b et 2c : formes sporadiques.

## 2. Place des biomarqueurs du LCS en routine clinique

Les dernières recommandations de la HAS pour le diagnostic et la prise en charge de la maladie d'Alzheimer datent de 2011. Elles sont basées sur les critères cliniques selon le DSM-IV-TR (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – Fourth Edition – Text Revision) ou le NINCDS-ADRDA (annexes 1 et 2). La HAS recommande l'utilisation des biomarqueurs du LCS, A $\beta$ <sub>1-42</sub>, t-Tau et P-Tau, uniquement dans les cas difficiles ou atypiques (48). Cependant, tout patient souhaitant accéder à un diagnostic fiable de ses troubles cognitifs devrait se voir proposer un dosage des biomarqueurs du LCS pour une médecine personnalisée et de précision.

En 2017, un groupe de travail multidisciplinaire composé de 28 membres européens regroupant des neurologues, psychiatres, biologistes et épidémiologistes, a proposé des recommandations pour l'utilisation et l'interprétation des biomarqueurs du LCS pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer, d'une part chez les patients au stade MCI, d'autre part chez les patients au stade de démence.

Dans le cas des patients MCI, le groupe de travail recommande d'utiliser les biomarqueurs du LCS décrits précédemment comme une aide à l'examen clinique, pour prédire le déclin fonctionnel ou le risque de conversion vers le stade de démence de la maladie d'Alzheimer, et de guider la prise en charge des patients (49).

Pour les patients au stade de démence, le groupe de travail recommande le recours aux biomarqueurs du LCS pour les cas atypiques, soit pour augmenter la probabilité du diagnostic de maladie d'Alzheimer, soit pour « exclure » la maladie d'Alzheimer comme étant la cause de la démence (50).

Il existe cependant quelques limites à l'utilisation des biomarqueurs en routine clinique. Tout d'abord, les contre-indications à la réalisation d'une ponction lombaire comme par exemple des anomalies de l'hémostase, des signes cliniques d'engagement cérébral ou des crises convulsives récentes ou en cours, empêchent le recours au dosage des biomarqueurs du LCS. Il existe aussi des limites techniques que nous aborderons plus loin. D'autre part, l'interprétation des dosages des biomarqueurs du LCS a aussi ses limites. Par exemple, elle est plus difficile chez les sujets plus âgés car les biomarqueurs du LCS sont moins discriminants pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer que chez les sujets plus jeunes (51).

Par ailleurs, une étude a mis en évidence que des profils normaux permettent le plus souvent de revoir un diagnostic clinique initial de maladie d'Alzheimer probable ou possible (52) ; cependant, dans quelques cas, il existe toujours un risque de progression vers une maladie d'Alzheimer (49,50). Enfin, les biomarqueurs du LCS restent insuffisants pour les diagnostics différentiels de la maladie d'Alzheimer, et d'autres biomarqueurs doivent être développés pour ces pathologies (53–55). Ainsi, par exemple, la spécificité de ces biomarqueurs du LCS n'étant pas de 100 %, on peut tous les retrouver pathologiques dans le cadre d'un diagnostic différentiel de la maladie d'Alzheimer comme certaines démences frontotemporales (56).

Ainsi, l'utilisation de ces marqueurs biologiques seuls, reste insuffisante. Ils constituent un élément d'un faisceau d'arguments qui doivent être confrontés lors de réunions multidisciplinaires réunissant des cliniciens, biologistes, neuropsychologues, et des spécialistes de l'imagerie.

En 2018, de nouveaux critères diagnostiques destinés uniquement à la recherche ont été proposés.

### 3. Place des biomarqueurs du LCS en recherche : évolution des critères, classification ATN, critères biologiques du NIA-AA

En 2018, le National Institute on Aging et l'Alzheimer's Association (NIA-AA) ont publié de nouveaux critères diagnostiques réservés à la recherche, basés uniquement sur l'imagerie et les biomarqueurs du LCS et non plus uniquement sur la clinique. Il s'agit de la classification ATN (29–31). Selon cette classification, sept biomarqueurs sont répartis dans trois catégories :

- « A » pour les marqueurs de la lésion amyloïde : TEP amyloïde et concentration de peptide  $A\beta_{1-42}$  ou ratio  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$  dans le LCS
- « T » pour les marqueurs la lésion de DNF : TEP-Tau et concentration de P-Tau dans le LCS
- « N » pour les marqueurs de neurodégénérescence :  $^{18}\text{F}$ -fluoro-désoxyglucose-TEP (TEP-FDG), IRM et concentration de t-Tau dans le LCS.

**Tableau 1** : Biomarqueurs de la classification ATN. D'après Jack CR. et al. 2018 (31).

	« A » : amyloïde	« T » : Tau	« N » : Neurodégénérescence
Marqueurs du LCS	A $\beta$ <sub>1-42</sub> Ratio A $\beta$ <sub>1-42</sub> /A $\beta$ <sub>1-40</sub>	P-Tau	t-Tau
Imagerie	TEP amyloïde	TEP-Tau	IRM, TEP-FDG

La TEP-FDG permet la mise en évidence de l'hypométabolisme cérébral observé au cours des démences. En effet, l'accumulation de 18[F]-fluoro-désoxy-glucose dans une aire cérébrale est proportionnelle au niveau du métabolisme du glucose dans cette aire (31,32).

Dans les précédentes recommandations, les catégories « T » et « N » étaient regroupées dans une seule classe en tant que marqueurs de la lésion de DNF. Or, la neurodégénérescence n'est pas spécifique de la maladie d'Alzheimer. La NIAA-AA prend ici en compte que la concentration de t-Tau dans le LCS est un marqueur de l'intensité de la mort neuronale dans la maladie d'Alzheimer. Elle est donc associée à l'intensité du déclin cognitif, alors que la concentration de P-Tau dans le LCS est plus spécifique de la lésion de DNF présente dans la maladie d'Alzheimer. Séparer ces marqueurs permet de déterminer si la neurodégénérescence est attribuable ou non à la maladie d'Alzheimer (29).

La NIA-AA n'admet non plus trois phases cliniques de la maladie d'Alzheimer mais définit cette maladie selon son continuum physiopathologique. Selon ces recommandations, les patients qui présentent uniquement des marqueurs positifs de la voie amyloïde sont classés dans la catégorie « changement physiopathologique de la maladie d'Alzheimer ». Le terme « maladie d'Alzheimer » peut être utilisé seulement si les marqueurs des catégories « A » et « T » sont pathologiques. Ces deux catégories ne sont pas ici des entités séparées mais font plutôt référence aux phases précoces et tardives du continuum de la maladie d'Alzheimer. Les patients qui ont des marqueurs de DNF pathologiques mais des marqueurs de la voie amyloïde normaux sont considérés comme ayant un processus physiopathologique autre que celui de la maladie d'Alzheimer (Figure 12).

### Biomarker profiles and categories

AT(N) profiles	Biomarker category	
A-T-(N)-	Normal AD biomarkers	
A+T-(N)-	Alzheimer's pathologic change	Alzheimer's continuum
A+T+(N>)	Alzheimer's disease	
A+T+(N)+	Alzheimer's disease	
A+T-(N)+	Alzheimer's and concomitant suspected non Alzheimer's pathologic change	
A-T+(N)-	Non-AD pathologic change	
A-T-(N)+	Non-AD pathologic change	
A-T+(N)+	Non-AD pathologic change	

Abbreviation: AD, Alzheimer's disease.

**Figure 12 :** Classification ATN. D'après Jack CR. et al. 2018 (31).

La NIA-AA a aussi réalisé une classification en regroupant les biomarqueurs et la clinique. Les biomarqueurs des catégories « A » et « T » servent à déterminer si un patient est dans le continuum de la maladie d'Alzheimer. Les biomarqueurs de la neurodégénérescence et les signes cliniques sont utilisés pour déterminer un degré de gravité (Figure 13).

Descriptive nomenclature: Syndromal cognitive staging combined with biomarkers

		Cognitive stage		
		Cognitively Unimpaired	Mild Cognitive Impairment	Dementia
Biomarker Profile	A <sup>-</sup> T <sup>-</sup> (N) <sup>-</sup>	normal AD biomarkers, cognitively unimpaired	normal AD biomarkers with MCI	normal AD biomarkers with dementia
	A <sup>+</sup> T (N)	Preclinical Alzheimer's pathologic change	Alzheimer's pathologic change with MCI	Alzheimer's pathologic change with dementia
	A <sup>+</sup> T <sup>+</sup> (N) <sup>-</sup>	Preclinical Alzheimer's disease	Alzheimer's disease with MCI(Prodromal AD)	Alzheimer's disease with dementia
	A <sup>+</sup> T <sup>+</sup> (N) <sup>+</sup>			
	A <sup>+</sup> T (N) <sup>+</sup>	Alzheimer's and concomitant suspected non Alzheimer's pathologic change, cognitively unimpaired	Alzheimer's and concomitant suspected non Alzheimer's pathologic change with MCI	Alzheimer's and concomitant suspected non Alzheimer's pathologic change with dementia
	A <sup>-</sup> T <sup>+</sup> (N) <sup>-</sup>	non-Alzheimer's pathologic change, cognitively unimpaired	non-Alzheimer's pathologic change with MCI	non-Alzheimer's pathologic change with dementia
	A <sup>-</sup> T <sup>-</sup> (N) <sup>+</sup>			
A <sup>-</sup> T <sup>+</sup> (W) <sup>+</sup>				

Abbreviations: AD, Alzheimer disease; MCI, mild cognitive impairment.

NOTE. Formatting denotes three general biomarker "categories" based on biomarker profiles: those with normal AD biomarkers (no color), those with non-AD pathologic change (dark grey), and those who are in the Alzheimer's continuum (light grey).

**Figure 13 :** Critères diagnostiques selon la classification ATN. D'après Jack CR. et al. 2018 (31).

Avec la place de plus en plus importante de ces biomarqueurs du LCS dans le diagnostic ainsi que dans les protocoles de recherche, le nombre de demandes d'analyses ne cesse d'augmenter et les techniques manuelles ne sont plus suffisantes. Dans ce contexte, plusieurs fournisseurs ont adapté les kits existant sur des automates ou ont développé de nouvelles techniques automatisées de type random access adaptables sur les grands automates de routine. Nous allons tout d'abord présenter les techniques actuellement disponibles, puis nous aborderons leurs limites.

### C. Les techniques de dosage et leurs limites

Dans les paragraphes qui suivent, nous ne présenterons que les techniques utilisées actuellement dans le cadre de la routine clinique ou des grandes cohortes des programmes de recherche clinique.

#### 1. Technique manuelle INNOTEST®

Jusqu'à la fin de l'année 2018, la technique utilisée au laboratoire du CHU de Lille, très majoritairement adoptée en France pour le dosage des biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer dans le LCS, et disponible depuis 1995, est une technique d'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) « sandwich ». La lecture de l'intensité de la coloration se fait par spectrophotométrie. Cette technique peut être automatisée sur des automates de type ELISA.

Les dosages des quatre biomarqueurs A $\beta$ <sub>1-42</sub>, t-Tau, P-Tau<sub>181</sub> et A $\beta$ <sub>1-40</sub> sont commercialisés par Fujirebio®. Le tableau 2 résume les caractéristiques de ces différents kits (57–60).

**Tableau 2 :** Caractéristiques des kits INNOTEST®.

<b>INNOTEST®</b>	A $\beta$ <sub>1-42</sub>	t-Tau	P-Tau <sub>181</sub>	A $\beta$ <sub>1-40</sub>
<b>Limite de détection (pg/mL)</b>	65	34	13	2,8
<b>Limite de quantification (pg/mL)</b>	225	57	20	3,4



Pour le dosage de t-Tau, l'anticorps de capture (AT120) reconnaît les acides aminés situés dans la partie C-terminale entre les positions 215 et 221 de Tau. Deux anticorps de détection biotinylés sont utilisés : l'anticorps HT7 qui reconnaît des acides aminés situés entre les positions 159 et 163, et l'anticorps BT2 qui reconnaît ceux situés entre les positions 193 et 198 (Figure 16).

HT7		BT2
NH <sub>2</sub> ...151IATPRGAA <b>PPGQK</b> GQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPKSG <b>DRSGYSS</b>		
PGSPGTPGSRSLPT <b>PPTREPK</b> KVAVVRTPP230...-COOH		
AT120		

**Figure 16 :** Séquence des acides aminés de Tau et anticorps utilisés dans le kit INNOTEST® hTAU Ag. D'après Fujirebio® (59).

L'anticorps de capture de la protéine P-Tau<sub>181</sub> est HT7. L'anticorps de détection biotinylé (AT270) reconnaît la séquence d'acides aminés situés entre les positions 176 et 182, incluant la Thréonine 181 sous forme phosphorylée (Figure 17).

HT7		AT270
NH <sub>2</sub> ...151IATPRGAA <b>PPGQK</b> GQANATRIPAKT <b>PPAPKT</b> <sub>181</sub> <b>P</b> SSGE...-COOH		

**Figure 17 :** Séquence des acides aminés de P-Tau et anticorps utilisés dans le kit INNOTEST® PHOSPHO-TAU<sub>(181P)</sub>. D'après Fujirebio® (60).

## 2. L'automate Lumipulse® G600II de Fujirebio®

Le dosage des biomarqueurs par le Lumipulse® est un test sandwich basé sur la chimiluminescence ou CLEIA (Chemi-Luminescent Enzyme Immuno-Assay). La détection se fait par chimiluminescence, c'est-à-dire par mesure de l'émission de lumière émise après ajout de l'AMPDD, substrat de la phosphatase alcaline, enzyme fixée à l'anticorps de révélation. Les dosages des quatre biomarqueurs sont disponibles depuis 2018 et sont commercialisés par Fujirebio®. Pour Aβ<sub>1-42</sub> et t-Tau, les anticorps de capture et de détection sont les mêmes que ceux utilisés pour la technique manuelle INNOTEST®. Pour P-Tau, l'anticorps de capture est l'AT270 et deux anticorps de détection sont utilisés : BT2 et HT7. Pour Aβ<sub>1-40</sub>, la seule différence

avec la technique INNOTEST® est que l'anticorps de détection 3D6 est directement marqué par l'enzyme (61–64).

**Tableau 3 :** Caractéristiques des kits Lumipulse® (61–64).

<b>Lumipulse®</b>	A $\beta$ <sub>1-42</sub>	t-Tau	P-Tau <sub>181</sub>	A $\beta$ <sub>1-40</sub>
<b>Limite de détection (pg/mL)</b>	7,17	141	0,282	2,78
<b>Limite de quantification (pg/mL)</b>	14,02	141	1,058	4,08

**Tableau 4 :** Comparaison des anticorps de détection et de capture utilisés dans les techniques INNOTEST® et Lumipulse®. Les différences entre les deux techniques sont indiquées en rouge.

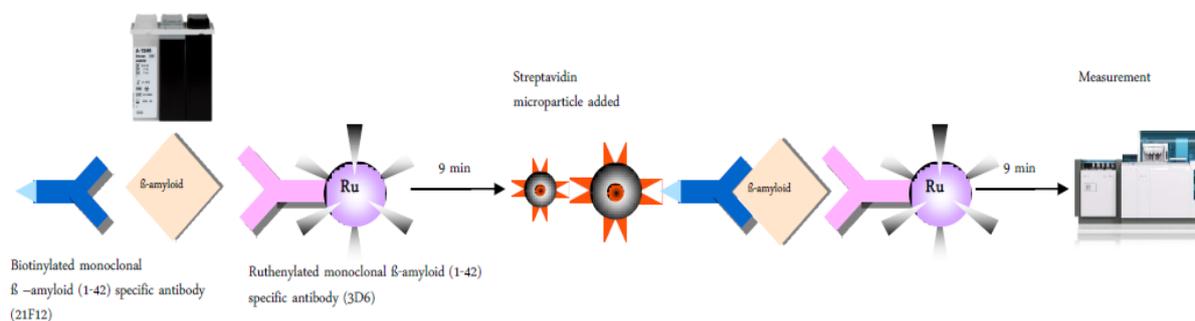
	<b>INNOTEST®</b>		<b>Lumipulse®</b>	
	Anticorps de capture	Anticorps de détection	Anticorps de capture	Anticorps de détection
A $\beta$ <sub>1-42</sub>	21F12	3D6 (biotinylé)	21F12	3D6 (biotinylé)
t-Tau	AT120	BT2 (biotinylé) + HT7 (biotinylé)	AT120	BT2 (biotinylé) + HT7 (biotinylé)
P-Tau <sub>181</sub>	HT7	AT270 (biotinylé)	AT270	BT2 + HT7
A $\beta$ <sub>1-40</sub>	2G3	3D6 (biotinylé)	2G3	3D6

C'est une technique de type random access. Elle a donc l'avantage de pouvoir conserver les courbes de calibration et donc de ne pas réaliser une calibration à chaque série effectuée. De plus, la qualité du dosage peut être vérifiée en début de série, ce qui permet de limiter le nombre de séries non conformes à repasser.

De nombreux laboratoires d'analyses médicales en France basculent de l'INNOTEST® vers cette technique.

### 3. La technologie Elecsys®

Le dosage des biomarqueurs par les tests Elecsys® de la société Roche® est basé sur l'électro-chimiluminescence ou ECLIA (Electro-Chimi-Luminescence Immuno-Assay) et est disponible depuis 2018. L'automate utilisé est le Cobas®. Seuls les dosages de trois biomarqueurs sont disponibles : A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Elecsys®  $\beta$ -Amyloid (1-42) CSF), t-Tau (Elecsys® Total-Tau CSF) et P-Tau<sub>181</sub> (Elecsys® Phospho-Tau (181P) CSF) (65–67). Les anticorps de capture sont biotinylés et les anticorps de détection sont marqués au complexe de ruthénium (Figure 18). Leurs épitopes ne sont pas décrits.



**Figure 18 :** Technique de dosage du peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub> par le test Elecsys®  $\beta$ -Amyloid (1-42). D'après Roche® (67).

**Tableau 5 :** Caractéristiques des kits Elecsys® (65-67) .

<b>Elecsys®</b>	A $\beta$ <sub>1-42</sub>	t-Tau	P-Tau <sub>181</sub>	A $\beta$ <sub>1-40</sub> non disponible
<b>Limite de détection (pg/mL)</b>	120	60	8	-
<b>Limite de quantification (pg/mL)</b>	200	80	8	-

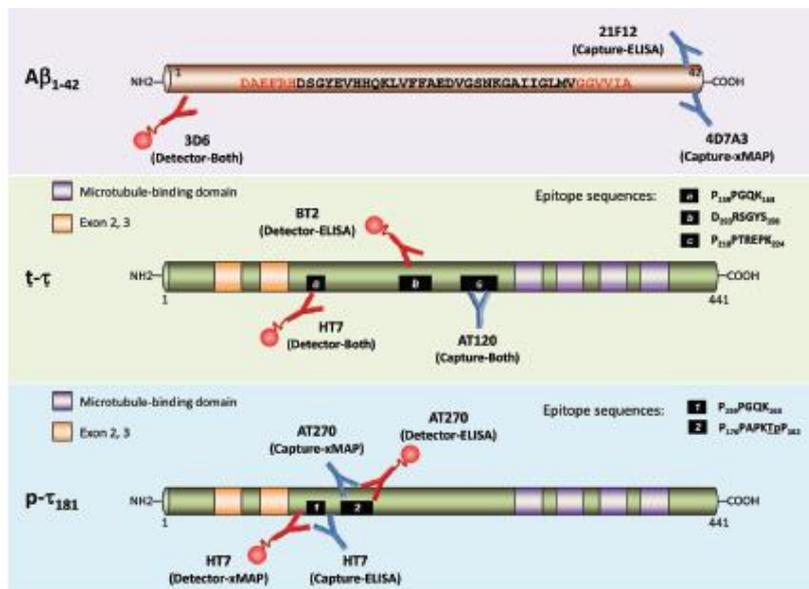
Il s'agit également d'une technique de type random access. Cependant, cette technologie a l'inconvénient, à l'heure actuelle, de ne pas proposer le dosage d'A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Elle commence à être adoptée par des laboratoires d'analyses médicales en routine qui utilisent alors un autre fournisseur pour ce dosage.

#### 4. EUROIMMUN®

La méthode de dosage utilisée par EUROIMMUN® est, comme pour la technique INNOTEST®, l'ELISA. Elle peut être utilisée en technique manuelle (kits Beta-Amyloid (1-42) ELISA, Total Tau ELISA, pTau(181) ELISA et Beta-Amyloid (1-40) ELISA) mais l'automatisation des dosages est possible grâce aux automates Analysers I et I-2P. Cette technique est actuellement peu utilisée en routine en France.

#### 5. Luminex<sup>100</sup> microsphere system®

La technologie Luminex<sup>100</sup> microsphere system® est basée sur l'utilisation de microsphères fluorescentes. Elle est disponible depuis 2005. Il s'agit d'un système multi-analytique, le kit commercialisé par Fujirebio® (INNO-BIA AlzBio3) permet en effet le dosage simultané du peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub>, de t-Tau et de P-Tau<sub>181</sub> dans le LCS (68). Les anticorps utilisés sont représentés sur la figure 19.



**Figure 19 :** Anticorps de détection et de capture utilisés pour les dosages de t-Tau, P-Tau et A $\beta$ <sub>1-42</sub> par l'INNOTEST® et le Luminex®. D'après Kang JH. et al. 2013 (69).

Cette technique n'est pas utilisée dans les laboratoires d'analyses médicales français, mais est très utilisée aux USA, en particulier dans les protocoles de recherche ADNI (Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative).

## 6. Les limites actuelles de ces dosages

On observe une grande variabilité dans les dosages des biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer (70,71). Ces variabilités peuvent être soit d'ordre pré-analytique, soit analytique. Nous verrons comment le laboratoire peut, en partie, les maîtriser. Enfin, nous verrons qu'il est possible de connaître la part de variabilité restante grâce à des programmes de contrôles de qualité externes.

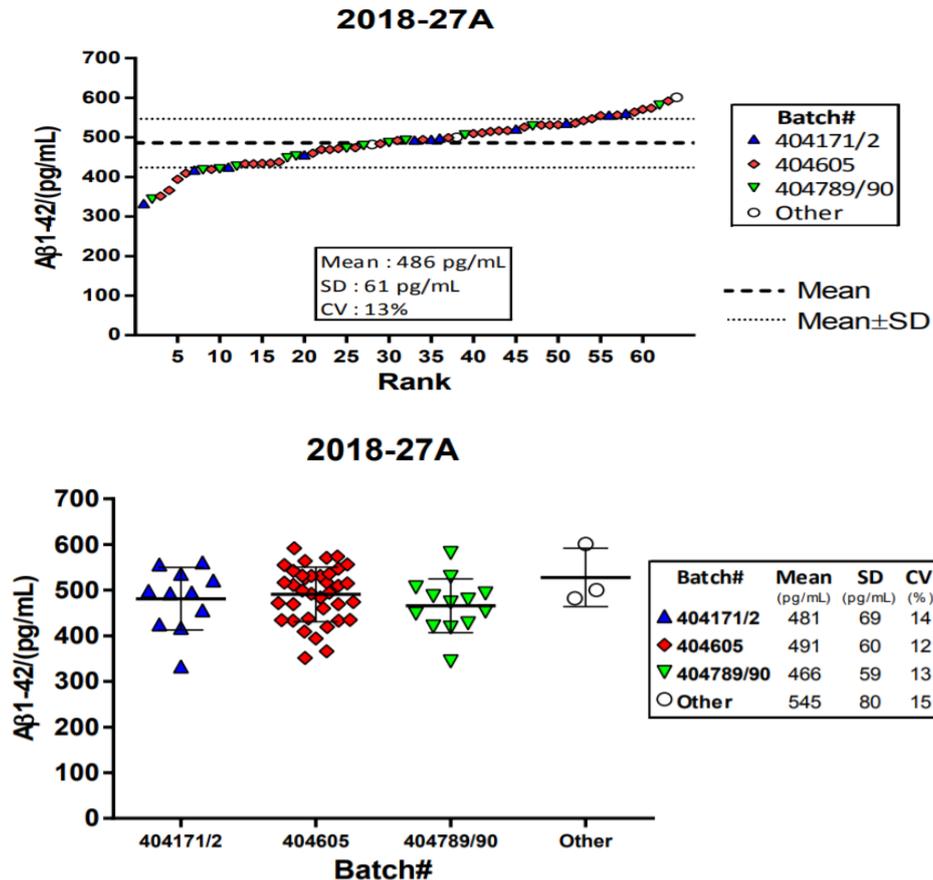
La variabilité observée entre les laboratoires peut être due à des différences dans les procédures pré-analytiques (tubes de prélèvement et conditions d'acheminement et de conservation au laboratoire). En effet, les biomarqueurs, et plus particulièrement le peptide  $A\beta_{1-42}$ , peuvent s'adsorber à la surface des tubes. Les concentrations mesurées sont donc sensibles à la nature des parois des tubes (72). Les effets des conditions pré-analytiques sur la variabilité des résultats peuvent être réduits par une harmonisation des procédures (70,73–75). Au niveau international, des recommandations ont été proposées : l'Alzheimer's Association QC Program est un programme de contrôle de qualité qui a décrit une procédure à respecter pour la phase pré-analytique. En France, une étude publiée en 2013, a montré l'importance de la standardisation des tubes pour le recueil du LCS lors de la ponction lombaire et a pu définir une procédure commune utilisée par les laboratoires hospitaliers français (70). Les tubes de prélèvement utilisés au CHU de Lille et basés sur l'étude de 2013 sont des tubes Sarstedt® en polypropylène.

Une part importante de la variabilité des résultats des dosages des biomarqueurs du LCS de la maladie d'Alzheimer est due à la phase analytique. En France, avant le développement de l'automatisation, la technique majoritairement utilisée était la technique manuelle INNOTEST® de Fujirebio®. Récemment, l'automatisation de ces dosages a été développée par des fournisseurs différents. L'automatisation a de nombreux avantages : rapidité de rendu des résultats, diminution des coefficients de variation (CV), meilleure répétabilité et fidélité intermédiaire. Cependant, cette nouvelle diversité des offres conduit actuellement à une variabilité encore plus importante dans le rendu des résultats car chaque technique possède des limites de détection et de quantification ainsi que des seuils d'interprétation différents. Une standardisation est nécessaire pour pouvoir comparer les résultats des différents laboratoires et envisager l'utilisation de valeurs seuils universelles (74,76). L'IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) a mis en place un groupe de travail pour faciliter la

standardisation des biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer, le Working group for CSF proteins (WG-CSF). Le développement d'une méthode de mesure de référence (RMP : Reference Measurement Procedure) et de matériaux de référence certifiés (CRM : Certified Reference Material) est en cours d'étude. Ce développement par l'IFCC a abouti actuellement uniquement pour le peptide  $A\beta_{1-42}$  (77).

La part de variabilité restante de la phase analytique doit être connue. Ceci est rendu possible par la mise en place de contrôles de qualité externes, par exemple par l'Alzheimer's Association QC Program. Ces contrôles permettent de comparer les résultats rendus par les différents laboratoires utilisant des techniques de dosages différentes. Le but est de bien connaître les variations analytiques pour chaque marqueur selon les techniques et kits utilisés (78). Chaque laboratoire peut ainsi se situer par rapport aux autres laboratoires utilisant la même technique, et aux autres techniques. La figure 20 est un exemple de résultat rendu par l'Alzheimer's Association QC Program concernant le dosage du peptide  $A\beta_{1-42}$  par les laboratoires utilisant l'INNOTEST®. On observe que pour 64 données de laboratoires différents utilisant des lots différents, le CV est de 13 %. C'est un CV qui est habituellement rencontré pour des techniques de type immuno-analyses mais dont on peut espérer que l'automatisation le réduira encore.

**Summary 2018-27 A $\beta$ 1-42  
(INNOTEST)**



**Figure 20** : Résultats du programme de qualité externe de Alzheimer's Association QC Program pour l'INNOTEST®.

**D. Objectif de l'étude**

L'objectif de cette étude est la mise en place du dosage des biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer A $\beta$ 1-42, t-Tau, P-Tau et A $\beta$ 1-40 dans le LCS, au CHRU de Lille, sur l'automate Lumipulse® G600II. Pour cela, nous avons réalisé une validation de méthode : comparaison de l'ancienne technique manuelle INNOTEST® avec la nouvelle technique automatisée Lumipulse® par des analyses de corrélation, tests de répétabilité, de fidélité intermédiaire ou encore de stabilité. Nous avons également déterminé de nouvelles valeurs seuils permettant de différencier les sujets atteints de la maladie d'Alzheimer des sujets atteints de troubles cognitifs autres que la maladie d'Alzheimer.

## II. Matériels et méthodes

### A. Patients et modalités de recueil du LCS

#### 1. Patients

95 patients, vus en consultation de neurologie au CHU de Lille entre janvier 2015 et septembre 2016, ont été sélectionnés pour l'étude. Pour ces 95 patients, nous disposons d'un diagnostic qui a été posé après avis de plusieurs neurologues, à l'aveugle des résultats des biomarqueurs du LCS. Nous disposons de deux groupes de patients. Dans le groupe « maladie d'Alzheimer ou MA », on compte 47 patients avec un diagnostic de maladie d'Alzheimer, soit au stade prodromal, soit au stade de démence. Les 48 autres patients présentent des troubles cognitifs liés à des causes autres que la maladie d'Alzheimer, il s'agit du groupe « nonMA ». Les diagnostics retenus sont des démences vasculaires, des dégénérescences lobaires fronto-temporales, des maladies bipolaires, des démences sémantiques, des paralysies supranucléaires progressives, des scléroses latérales amyotrophiques, des syndromes parkinsoniens, des exogénoses, des atrophies multisystématisées ou encore des hydrocéphalies à pression normale. Les résultats de ces dosages seront donc utilisés pour la réalisation des analyses ROC. Le consentement éclairé des patients a été recueilli.

60 patients dont nous ne disposons pas de diagnostic ont été ajoutés dans l'étude. Les résultats des dosages des biomarqueurs de ces patients ne seront utilisés que pour les études de corrélation.

#### 2. Recueil et aliquotage du LCS

Pour chaque patient, une ponction lombaire a été réalisée en respectant les conditions pré-analytiques nécessaires au dosage des biomarqueurs. Le LCS doit être recueilli dans des tubes Sarstedt® ayant pour référence 62.610.201.

Deux tubes d'aliquotage ont été comparés : d'une part les tubes d'aliquotage utilisés jusqu'à présent qui étaient des microtubes Eppendorf® en polypropylène de 1.5 mL, d'autre part les nouveaux tubes adaptés à l'automate Lumipulse®, c'est-à-dire des microtubes Sarstedt® en polypropylène de 1.5 mL ayant pour référence

72.703.406. Les échantillons de LCS utilisés pour la comparaison de ces deux tubes ont donc été aliquotés et conservés pendant au minimum 15 jours à -80°C dans chacun de ces deux types de tubes.

## **B. Matériels**

Les kits de dosage utilisés et commercialisés par Fujirebio® pour la technique manuelle INNOTEST® sont : INNOTEST®  $\beta$ -AMYLOID<sub>(1-42)</sub> pour le peptide  $A\beta_{1-42}$ , INNOTEST® hTAU Ag pour t-Tau, INNOTEST® PHOSPHO-TAU<sub>(181P)</sub> pour P-Tau<sub>181</sub> et INNOTEST®  $\beta$ -AMYLOID<sub>(1-40)</sub> pour le peptide  $A\beta_{1-40}$ . Les dosages ont été réalisés en suivant exactement le protocole des kits.

L'automate utilisé est le Lumipulse® G600II, commercialisé par Fujirebio®. Les kits de dosages de chaque biomarqueur sont : Lumipulse® G  $\beta$ -Amyloid 1-42 pour le peptide  $A\beta_{1-42}$ , Lumipulse® G Total Tau pour t-Tau, Lumipulse® G pTau181 pour P-Tau<sub>181</sub> et Lumipulse® G  $\beta$ -Amyloid 1-40 pour le peptide  $A\beta_{1-40}$ .

## **C. Etudes de corrélation, analyses ROC, tests de répétabilité, de fidélité intermédiaire et de stabilité**

Pour l'étude de corrélation entre la technique manuelle INNOTEST® et l'automate Lumipulse® G600II, les échantillons ont été dosés en parallèle par les deux techniques. Pour l'étude de corrélation des tubes d'aliquotage, deux aliquots conservés à -80°C dans chacun des deux types de microtubes ont été analysés le même jour à l'aide du Lumipulse® G600II.

Pour les analyses ROC, les biomarqueurs  $A\beta_{1-42}$ , t-Tau, P-Tau et  $A\beta_{1-40}$  ont été dosés à l'aide du Lumipulse® G600II dans le LCS des 95 patients pour lesquels nous disposons d'un diagnostic.

L'essai de répétabilité consiste à analyser un même échantillon plusieurs fois dans les mêmes conditions (même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage) et dans un délai le plus court possible (79). Trois pools de LCS à des niveaux de concentration différents (concentrations élevées, basses et proches du seuil) ont été constitués pour chacun des biomarqueurs. Pour le ratio  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ , les contrôles de qualité fournis par Fujirebio® ont été utilisés.

Le test de fidélité intermédiaire, dont un synonyme est la reproductibilité, consiste à analyser plusieurs fois un même échantillon dans des conditions différentes, c'est-à-dire en faisant varier au moins un des paramètres précédemment cités (79). Pour ce test, les contrôles de qualité fournis par Fujirebio® ont été utilisés. Là encore, trois niveaux de concentration différents ont été étudiés.

Le nombre de détermination minimum demandé par le COFRAC (Comité français d'accréditation) est de 30 pour les tests de répétabilité et de fidélité intermédiaire. Un nombre d'essais inférieur est accepté mais doit être argumenté (79). Le volume mort étant de 100 µL, le LCS étant un prélèvement précieux et les réactifs étant coûteux, nous avons décidé de réaliser entre 6 et 10 essais pour chaque test.

Pour l'essai de stabilité, des pools de LCS de trois niveaux de concentration différents pour chacun des biomarqueurs ont été constitués. Deux pools ont été effectués pour chaque niveau de concentration et ont été conservés soit à 4°C soit à température ambiante. Des dosages ont été réalisés tous les jours pendant 5 jours (J0 à J+4).

## **D. Statistiques**

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide des logiciels xlstat et SAS (version 9.4).

### **1. Etudes de corrélation**

Pour l'étude de corrélation des dosages, les équations de régression linéaire « Lumipulse® = f(INNOTEST®) » ont été déterminées pour chaque biomarqueur et les paramètres de la régression sont donnés avec leur intervalle de confiance à 95 %.

Pour la comparaison des tubes d'aliquotage, les équations de régression linéaire « tube Sarstedt® = f(tube Eppendorf®) » ont été calculées pour chaque paramètre et les paramètres de la régression sont donnés avec leur intervalle de confiance à 95 %.

## 2. Analyses ROC

La capacité discriminante de chaque paramètre a été évaluée par une courbe ROC. L'aire sous la courbe (AUC) et le seuil optimal, c'est-à-dire le seuil réalisant le meilleur compromis entre sensibilité (Se) et spécificité (Spe), ont été calculés.

## 3. Tests de répétabilité, de fidélité intermédiaire et de stabilité

Pour ces tests, les CV, exprimés en %, sont déterminés à l'aide du logiciel Excel et sont comparés aux CV fournis par le fournisseur ou par des sociétés savantes.

### III. Résultats

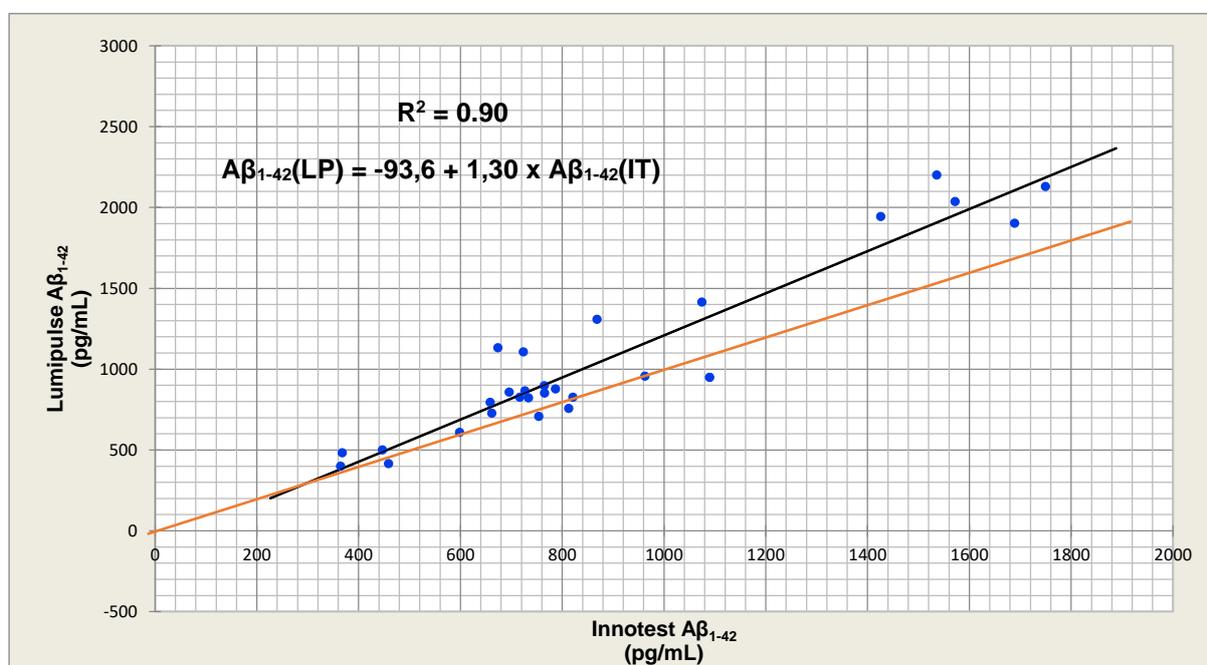
#### A. Etudes de corrélation

##### 1. Comparaison INNOTEST® (IT) / Lumipulse® (LP)

Une étude de régression linéaire a été effectuée pour chaque marqueur. Les données sont récapitulées et exprimées avec leurs intervalles de confiance à 95 % dans le tableau 6 à la fin de ce chapitre.

##### a) $A\beta_{1-42}$

Deux données atypiques n'ont pas été prises en compte dans les calculs. 28 données ont donc été utilisées. L'équation de la régression linéaire obtenue est :  $A\beta_{1-42}(LP) = -93,6 + 1,30 \times A\beta_{1-42}(IT)$ . Le coefficient de détermination est de 0,90. Il existe donc une forte corrélation entre les deux techniques.

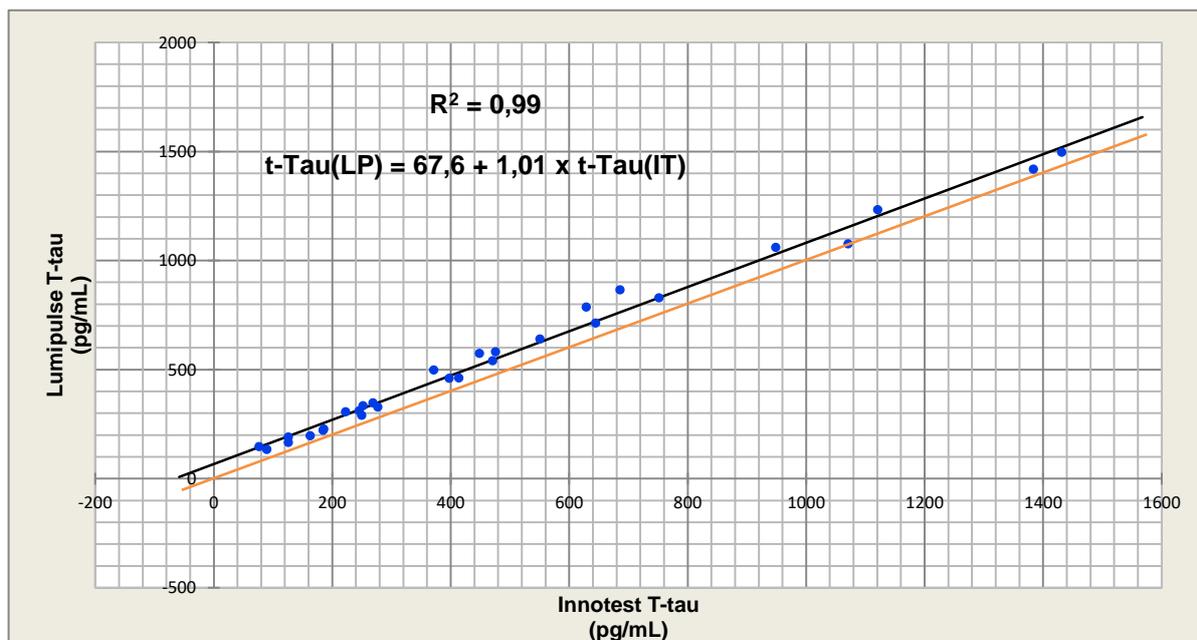


**Figure 21 :** Représentation graphique de la régression linéaire :  $A\beta_{1-42}(LP) = f(A\beta_{1-42}(IT))$ . La droite noire correspond à l'équation du modèle. La droite orange représente le cas où  $A\beta_{1-42}(LP) = A\beta_{1-42}(IT)$ .

On observe que le Lumipulse® a tendance à surestimer les valeurs obtenues en INNOTEST® strictement supérieures à 315 pg/mL, phénomène surtout observé pour des concentrations d'Aβ<sub>1-42</sub> supérieures à 600 pg/mL, déterminées par l'INNOTEST®.

b) t-Tau

Une donnée atypique a été exclue pour déterminer la droite de régression linéaire. 29 données ont donc été prises en compte. L'équation de la droite de régression linéaire est :  $t\text{-Tau(LP)} = 67,6 + 1,01 \times t\text{-Tau(IT)}$ . Le coefficient de détermination est proche de 1 et est égal à 0,99. Il montre donc une très bonne corrélation entre les deux techniques.

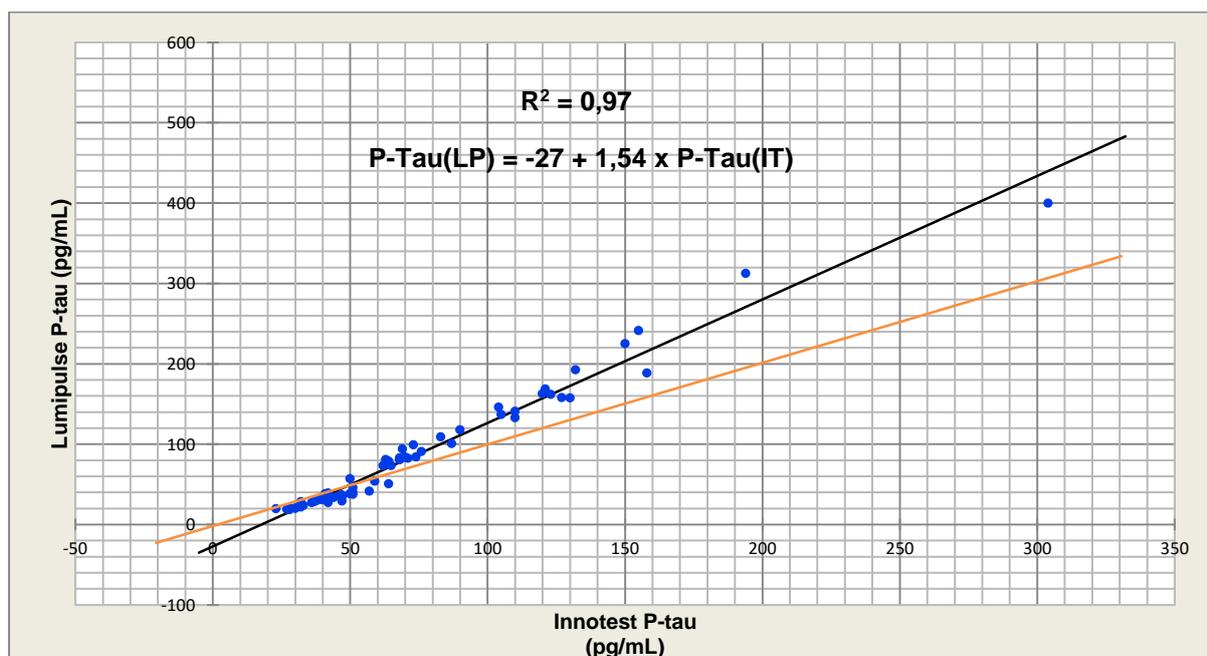


**Figure 22** : Représentation graphique de la régression linéaire :  $t\text{-Tau(LP)} = f(t\text{-Tau(IT)})$ . La droite noire correspond à l'équation du modèle. La droite orange représente le cas où  $t\text{-Tau(LP)} = t\text{-Tau(IT)}$ .

On observe une surestimation des concentrations de t-Tau déterminées par le Lumipulse® par rapport à l'INNOTEST®.

c) P-Tau

64 données ont été utilisées pour déterminer l'équation de la régression linéaire. Cette équation est :  $P\text{-Tau(LP)} = -27 + 1,54 \times P\text{-Tau(IT)}$ . Le coefficient de détermination est de 0,97 et révèle encore une importante corrélation entre les deux techniques.

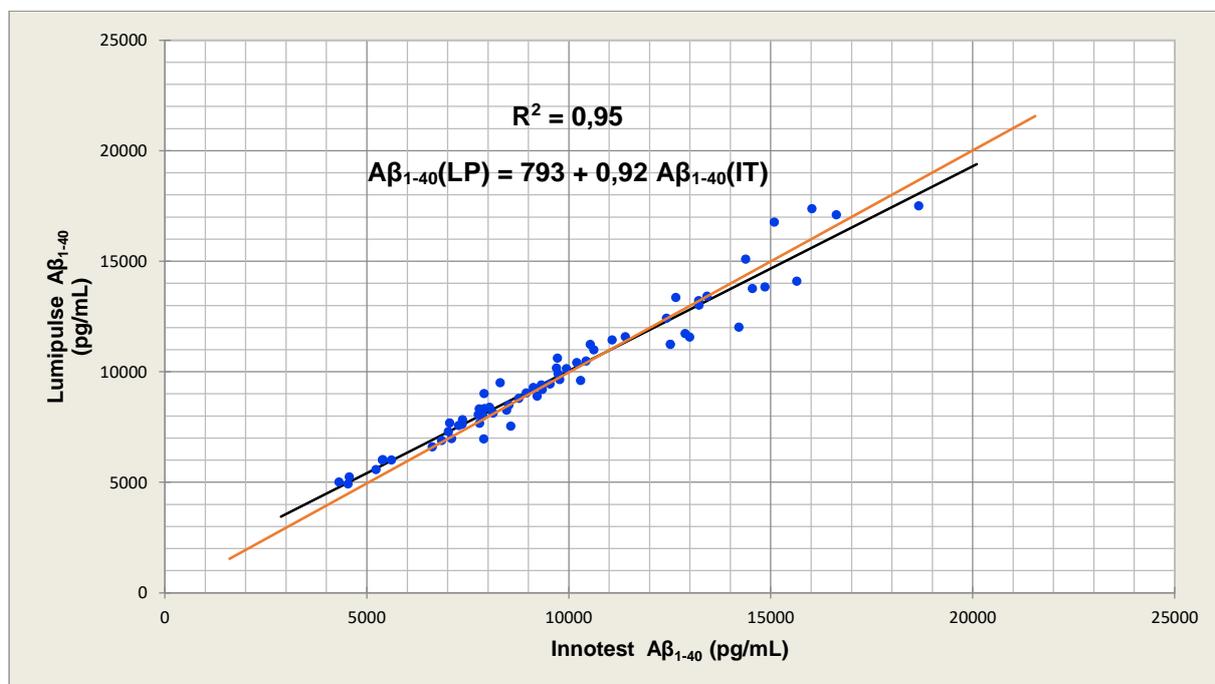


**Figure 23 :** Représentation graphique de la régression linéaire :  $P\text{-Tau(LP)} = f(P\text{-Tau(IT)})$ . La droite noire correspond à l'équation du modèle. La droite orange représente le cas où  $P\text{-Tau(LP)} = P\text{-Tau(IT)}$ .

L'équation et le graphique révèlent une surestimation par le Lumipulse® des concentrations de P-Tau obtenues en INNOTEST® supérieures à environ 60 pg/mL.

d) A $\beta$ <sub>1-40</sub>

64 données ont été utilisées dans cette étude de corrélation. L'équation de la régression linéaire est :  $A\beta_{1-40}(LP) = 793 + 0,92 A\beta_{1-40}(IT)$ . Le coefficient de détermination est de 0,95. La corrélation entre les deux techniques est élevée.

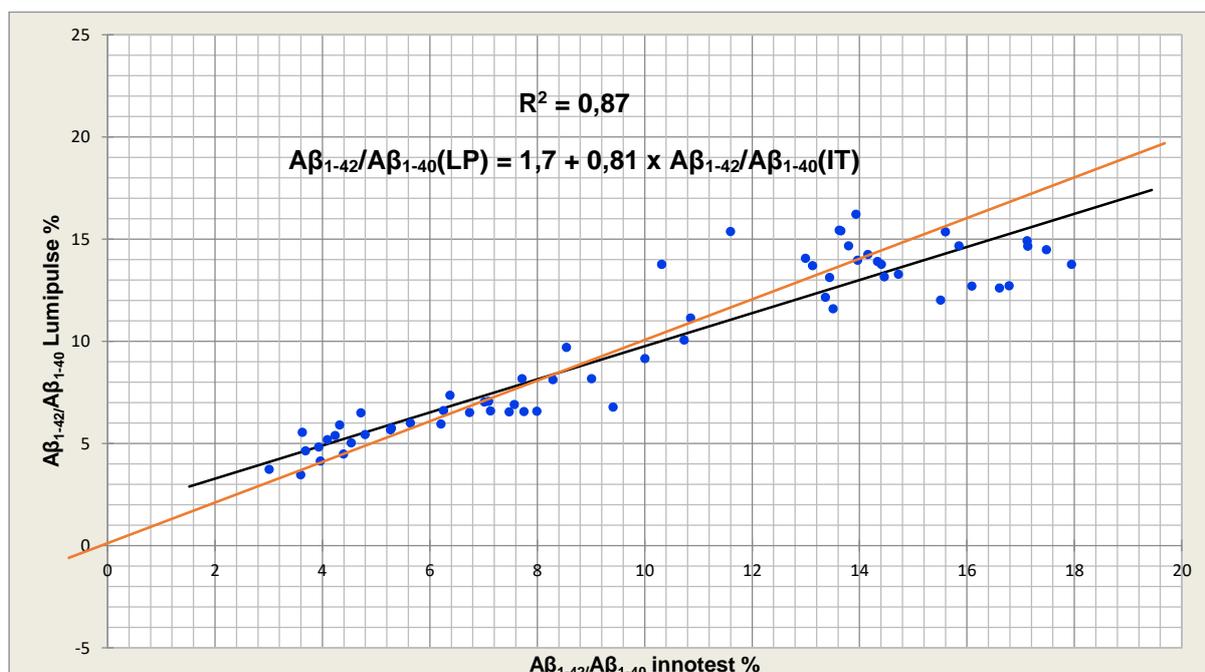


**Figure 24 :** Représentation graphique de la régression linéaire :  $A\beta_{1-40}(LP) = f(A\beta_{1-40}(IT))$ . La droite noire correspond à l'équation du modèle. La droite orange représente le cas où  $A\beta_{1-40}(LP) = A\beta_{1-40}(IT)$ .

On observe une dispersion plus importante des valeurs pour des concentrations en INNOTEST® supérieures à 12 000 pg/mL.

e)  $\frac{A\beta_{1-42}}{A\beta_{1-40}}$

62 données ont pu être utilisées pour l'étude de corrélation. Une valeur atypique a été rejetée. L'équation de la régression linéaire est  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}(LP) = 1,7 + 0,81 \times A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}(IT)$ . Le coefficient de détermination est de 0,87. Il existe une bonne corrélation entre les deux techniques.



**Figure 25** : Représentation graphique de la régression linéaire :  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}(LP) = f(A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}(IT))$ . La droite noire correspond à l'équation du modèle. La droite orange représente le cas où  $A\beta_{1-40}(LP) = A\beta_{1-40}(IT)$ .

On observe une légère surestimation des ratios obtenus en Lumipulse® par rapport à l'INNOTEST® jusqu'à des valeurs environ égales à 6.5 %. De plus, la dispersion des valeurs est plus importante pour des ratios supérieurs à 12 % en INNOTEST®.

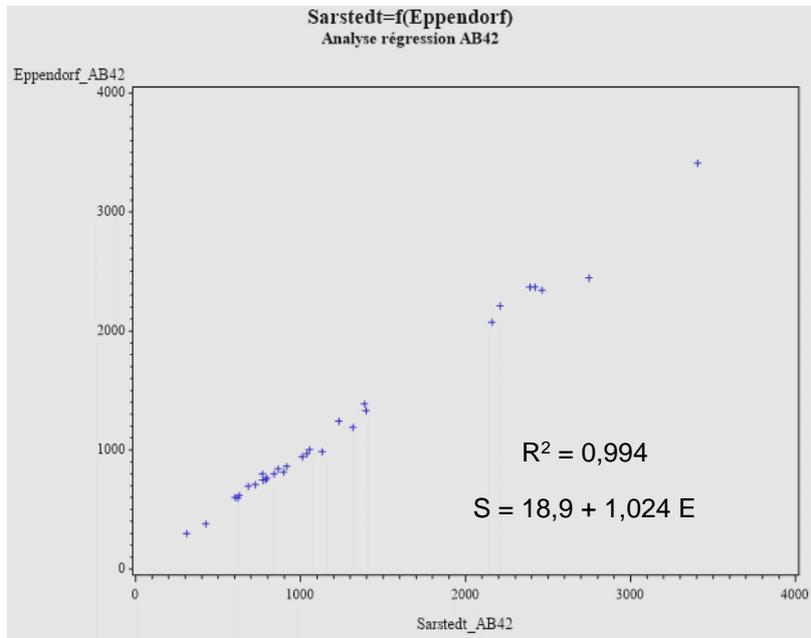
**Tableau 6** : Récapitulatif des équations de corrélation Lumipulse® = f(INNOTEST®).

Marqueurs	$R^2$	Paramètres	Valeurs	IC 95 %
$A\beta_{1-42}$	<b>0,90</b>	Constante	-93,6	[-261,1 – 73,9]
		Pente	1,30	[1,13 – 1,48]
t-Tau	<b>0,99</b>	Constante	67,6	[42,8 – 92,5]
		Pente	1,01	[0,97 – 1,06]
P-Tau	<b>0,97</b>	Constante	-27	[-33 – -21]
		Pente	1,54	[1,47 – 1,60]
$A\beta_{1-40}$	<b>0,95</b>	Constante	793	[253 – 1332]
		Pente	0,92	[0,87 – 0,98]
$A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$	<b>0,87</b>	Constante	1,7	[0,78 – 2,54]
		Pente	0,81	[0,73 – 0,89]

## 2. Comparaison des tubes d'aliquotage

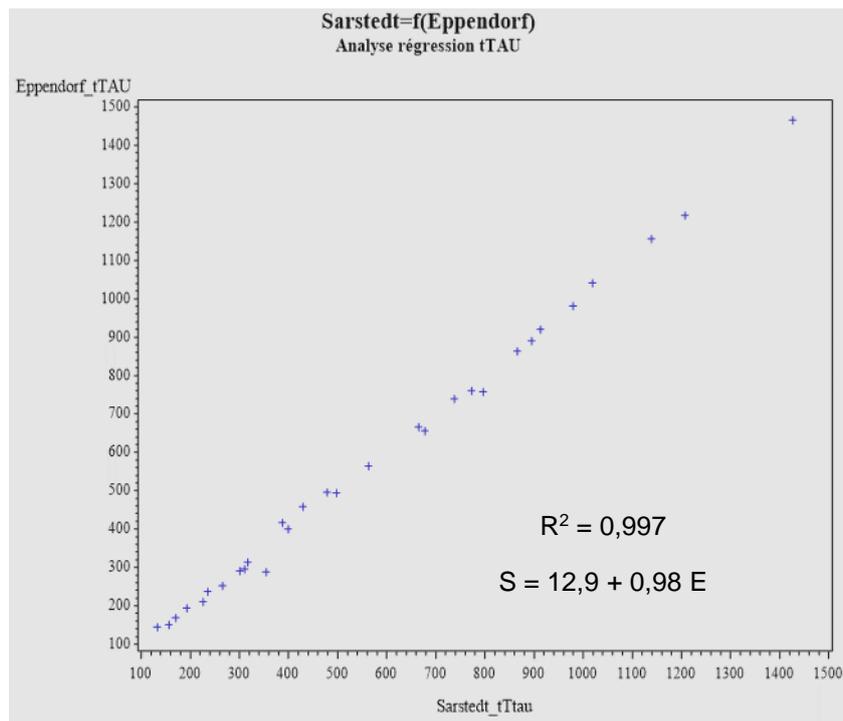
Comme nous l'avons vu, les quatre biomarqueurs étudiés sont sensibles à la nature de la paroi des tubes de prélèvement et d'aliquotage. En effet, ils peuvent plus ou moins s'adsorber à la paroi des tubes. L'automatisation nous oblige à changer nos tubes d'aliquotage pour qu'ils soient adaptés à l'automate. Nous devons donc comparer les dosages des biomarqueurs après aliquotage et conservation au minimum pendant 15 jours d'une part dans les anciens microtubes d'aliquotage Eppendorf® polypropylène de 1,5 mL, d'autre part dans les nouveaux microtubes d'aliquotage Sarstedt® en polypropylène de 1,5 mL.

30 données ont été prises en compte, sauf pour le ratio  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$  pour lequel une valeur aberrante a été rejetée. Une étude de corrélation a ainsi été réalisée. Les équations de régression linéaires « Sarstedt (S) = f(Eppendorf (E)) » ont été déterminées. Les coefficients de détermination sont tous proches de 1, les corrélations entre les deux types de tubes sont très bonnes (Figures 26 à 30).



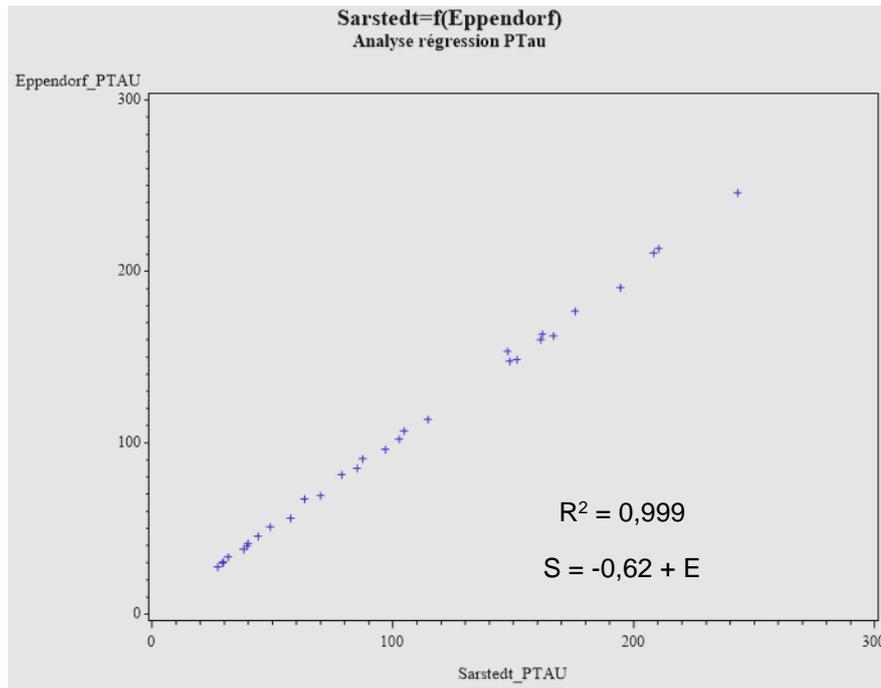
**Figure 26 :** Représentation graphique de la régression linéaire :

$$A\beta_{1-42}(S) = f(A\beta_{1-42}(E)).$$

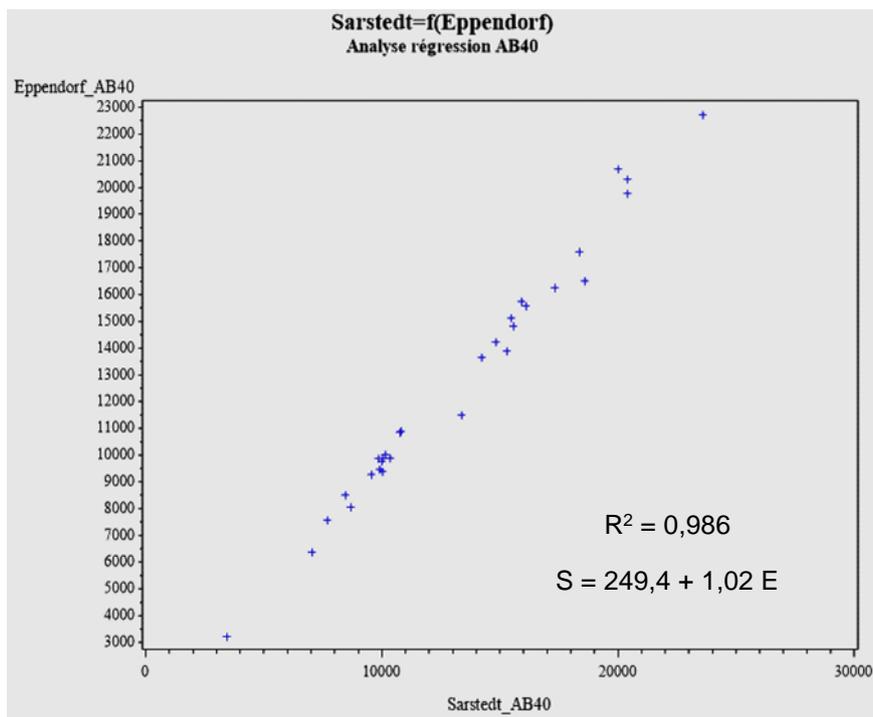


**Figure 27 :** Représentation graphique de la régression linéaire :

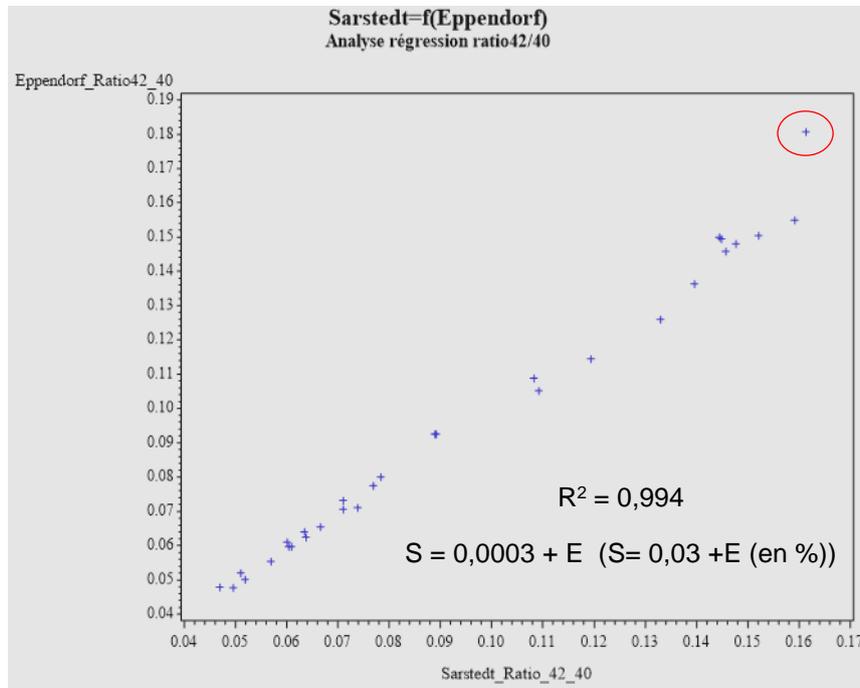
$$t\text{-Tau}(S) = f(t\text{-Tau}(E)).$$



**Figure 28 :** Représentation graphique de la régression linéaire :  
 $P\text{-Tau}(S) = f(P\text{-Tau}(E))$ .



**Figure 29 :** Représentation graphique de la régression linéaire :  
 $A\beta_{1-40}(S) = f(A\beta_{1-40}(E))$ .



**Figure 30 :** Représentation graphique de la régression linéaire :

$$A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40} (S) = f(A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40} (E)).$$

**Tableau 7 :** Récapitulatif des équations de corrélation tube Sarstedt® = f(tube Eppendorf®)

Marqueurs	$R^2$	Paramètres	Valeurs	IC 95 %
$A\beta_{1-42}$	<b>0,994</b>	Constante	18,9	[-25,6 – 63,5]
		Pente	1,024	[0,993 – 1,055]
t-Tau	<b>0,997</b>	Constante	12,9	[-1,1 – 26,9]
		Pente	0,98	[0,96 – 1,00]
P-Tau	<b>0,999</b>	Constante	-0,62	[-2,30 – 1,05]
		Pente	1,00	[0,99 – 1,01]
$A\beta_{1-40}$	<b>0,986</b>	Constante	249,4	[-384,9 – 883,7]
		Pente	1,02	[0,97 – 1,07]
$A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$	<b>0,994</b>	Constante	0,03	[-0,27 – 0,33]
		Pente	1,00	[0,972 – 1,03]

On observe que le changement de tube a très peu d'impact sur le dosage de t-Tau et P-Tau. Cependant, même s'il reste faible, l'impact du type de tube est plus important sur les dosages d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> et A $\beta$ <sub>1-40</sub>. En effet, les valeurs sont plus élevées avec les tubes Sarstedt<sup>®</sup> qu'avec les anciens tubes Eppendorf<sup>®</sup>. A $\beta$ <sub>1-42</sub> et A $\beta$ <sub>1-40</sub> s'adsorbent moins à la surface des tubes Sarstedt<sup>®</sup>. Le ratio A $\beta$ <sub>1-42</sub>/A $\beta$ <sub>1-40</sub> reste lui inchangé.

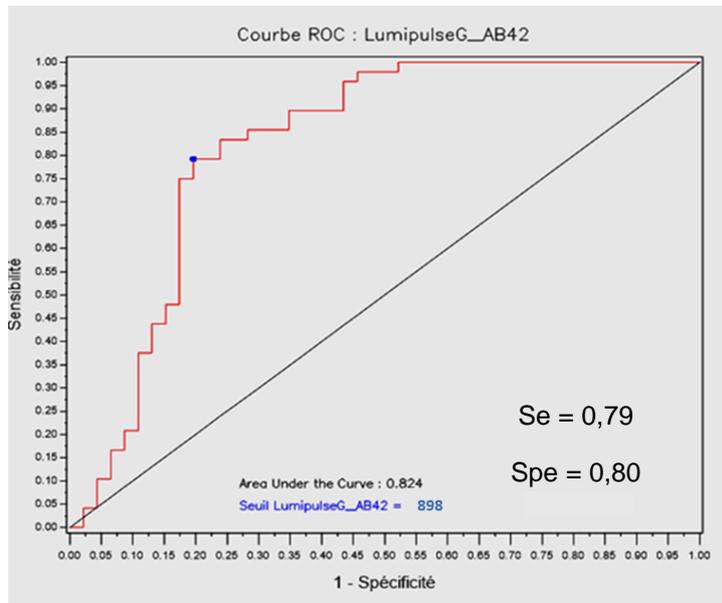
## **B. Analyses ROC**

95 patients ont été sélectionnés pour la réalisation des courbes ROC car un diagnostic a pu être déterminé à l'aveugle des biomarqueurs, afin d'éviter un biais de sélection. Pour 47 patients, le diagnostic de maladie d'Alzheimer probable a été posé. Les diagnostics retenus pour les 48 autres patients sont des démences vasculaires, des dégénérescences lobaires fronto-temporales, des maladies bipolaires, des démences sémantiques, des paralysies supranucléaires progressives, des scléroses latérales amyotrophiques, des syndromes parkinsoniens, des exogénoses, des atrophies multisystématisées ou encore des hydrocéphalies à pression normale.

Les valeurs seuils déterminées par la réalisation des courbes ROC sont celles qui maximisent la sensibilité et la spécificité des biomarqueurs.

### a) A $\beta$ <sub>1-42</sub>

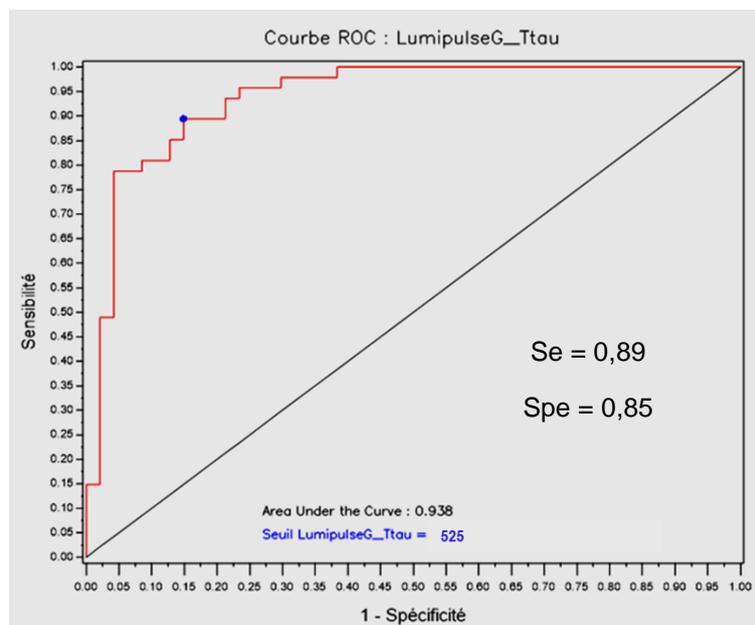
94 données ont été utilisées. L'aire sous la courbe (AUC) est de 0,82. La **valeur seuil** déterminée par l'analyse de la courbe ROC est de **898 pg/mL**. Pour cette valeur seuil, on observe une sensibilité de 0,79 et une spécificité de 0,80.



**Figure 31 :** Courbe ROC du dosage d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> par le Lumipulse®

b) t-Tau

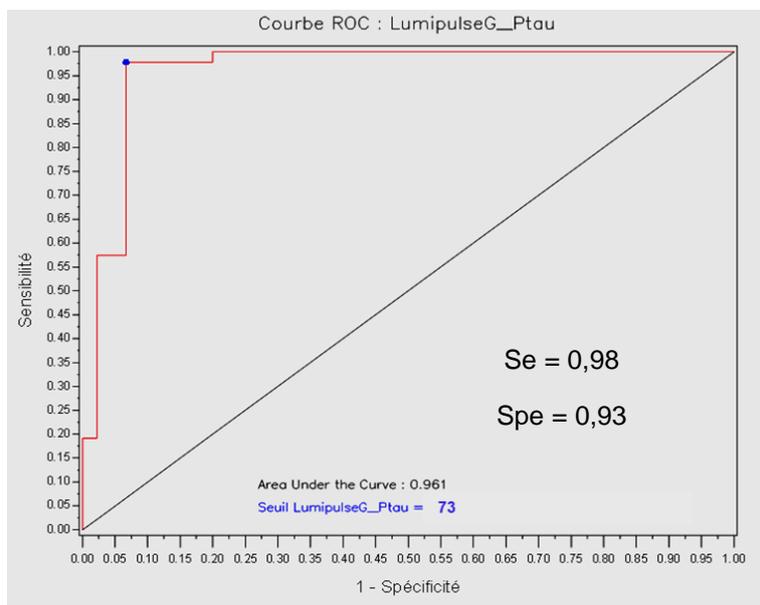
94 données ont pu être exploitées. L'AUC est de 0,94. La **valeur seuil** déterminée par l'analyse de la courbe ROC est de **525 pg/mL**. Pour cette valeur seuil, on observe une sensibilité de 0,89 et une spécificité de 0,85.



**Figure 32 :** Courbe ROC du dosage de t-Tau par le Lumipulse®

c) P-Tau

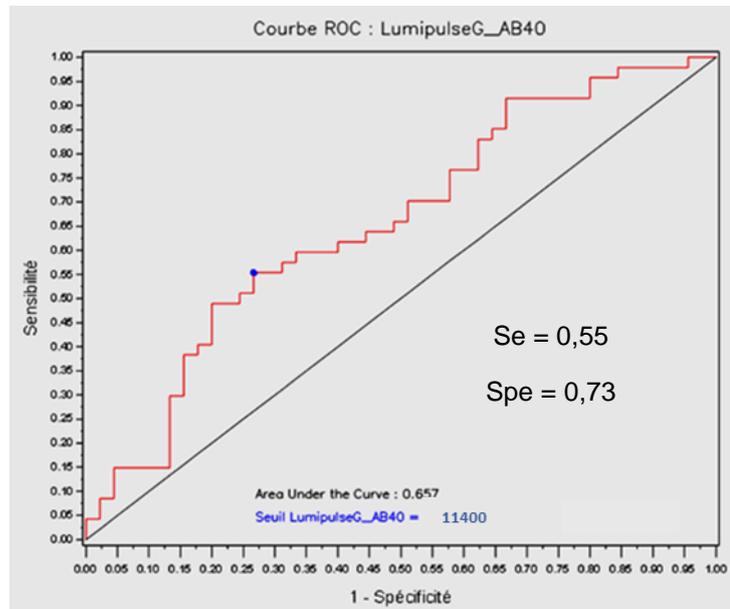
92 données étaient disponibles pour l'étude. L'AUC est de 0,96. La **valeur seuil** déterminée par l'analyse de la courbe ROC est de **73 pg/mL**. Pour cette valeur seuil, on observe une sensibilité de 0,98 et une spécificité de 0,93.



**Figure 33 :** Courbe ROC du dosage de P-Tau par le Lumipulse®

d) A $\beta$ <sub>1-40</sub>

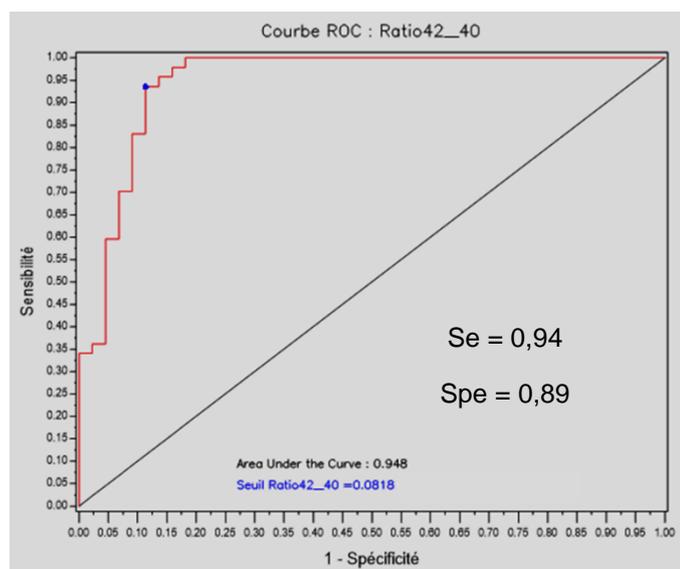
92 données ont été analysées. L'AUC est seulement de 0,66. La **valeur seuil** déterminée par l'analyse de la courbe ROC est de **11 400 pg/mL**. Pour cette valeur seuil, on observe une sensibilité de 0,55 et une spécificité de 0,73. Ces résultats montrent bien que le peptide A $\beta$ <sub>1-40</sub> seul est un mauvais biomarqueur et ne peut pas être utilisé pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer.



**Figure 34 :** Courbe ROC du dosage d'A $\beta$ <sub>1-40</sub> par le Lumipulse®

e) A $\beta$ <sub>1-42</sub>/A $\beta$ <sub>1-40</sub>

92 données ont été analysées. L'AUC est de 0,95. La **valeur seuil** déterminée par l'analyse de la courbe ROC est de **8,2 %**. Pour cette valeur seuil, on observe une sensibilité de 0,94 et une spécificité de 0,89.



**Figure 35 :** Courbe ROC du ratio A $\beta$ <sub>1-42</sub>/A $\beta$ <sub>1-40</sub> par le Lumipulse®

f) Standardisation du dosage d'A $\beta$ <sub>1-42</sub>

Le 1<sup>er</sup> décembre 2017, l'IFCC a libéré trois CRM pour A $\beta$ <sub>1-42</sub> : ERMR-DA480/IFCC<sup>®</sup>, ERMR-DA481/IFCC<sup>®</sup> et ERMR-DA482/IFCC<sup>®</sup> avec une valeur certifiée respectivement de 450, 720, et 1220 pg/mL. Après avoir testé ces CRM, Fujirebio<sup>®</sup> a conclu qu'une adaptation de ses calibrateurs était nécessaire. Un facteur de correction, diviser par 1,46, doit ainsi être appliqué (77). Les valeurs seuils déterminées précédemment pour A $\beta$ <sub>1-42</sub> et A $\beta$ <sub>1-42</sub>/A $\beta$ <sub>1-40</sub> ont donc été recalculées avec ce facteur de correction afin de définir de nouvelles valeurs seuils standardisées IFCC, soit pour A $\beta$ <sub>1-42</sub> : 615 pg/mL et pour A $\beta$ <sub>1-42</sub>/A $\beta$ <sub>1-40</sub> : 5,6 %.

**Tableau 8** : Récapitulatif des valeurs seuils utilisées avec l'INNOTEST<sup>®</sup> et le Lumipulse<sup>®</sup>.

	Valeurs seuils INNOTEST <sup>®</sup>	Valeurs seuils Lumipulse <sup>®</sup> avant standardisation IFCC	<b>Valeurs seuils finales Lumipulse<sup>®</sup> après standardisation IFCC</b>
A $\beta$ <sub>1-42</sub> (pg/mL)	700	898	<b>615</b>
t-Tau (pg/mL)	400	525	<b>525</b>
P-Tau (pg/mL)	60	73	<b>73</b>
A $\beta$ <sub>1-42</sub> /A $\beta$ <sub>1-40</sub> (%)	6.0	8,2	<b>5.6</b>

**C. Tests de répétabilité, de fidélité intermédiaire et de stabilité**

1. Tests de répétabilité

Pour le peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub>, trois pools de LCS ciblant une valeur basse, une valeur proche du seuil et une valeur haute, ont été constitués. Le tableau 9 résume les moyennes, écart-types (ET) et CV obtenus. En comparant ces résultats aux données de Fujirebio<sup>®</sup> et aux données de la littérature (80) on peut conclure que les essais de répétabilité sont conformes.

**Tableau 9** : Test détaillé de répétabilité pour A $\beta$ <sub>1-42</sub>.

REPETABILITE							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne (pg/mL)	Ecart-type (pg/mL)	CV (%)	CV (%) fournisseur (concentration pg/mL)	CV (%) retenu par le laboratoire (80)	Conclusion
POOL de LCS, niveau1	6	540	11	2,0	1,7 (409)	2,1	Conforme
POOL de LCS, niveau 2	10	871*	11	1,3	1,0 (773)	1,4	Conforme
POOL de LCS, niveau 3	6	1040	35	3,4	1,0 (1228)	/	Conforme

\*Concentration proche du seuil

Les résultats détaillés des tests de répétabilité des autres paramètres sont présentés dans les SHFORM dans les annexes 3 à 5. Les ET et CV sont résumés dans le tableau 10. Les CV étant compris entre 0,6 % et 6,7 % les résultats sont tous conformes.

**Tableau 10** : Récapitulatif des ET et CV des tests de répétabilité.

t-Tau			P-Tau			A $\beta$ <sub>1-40</sub>			A $\beta$ <sub>1-42</sub> /A $\beta$ <sub>1-40</sub>		
Moy (pg/mL)	ET (pg/mL)	CV (%)	Moy (pg/mL)	ET (pg/mL)	CV (%)	Moy (pg/mL)	ET (pg/mL)	CV (%)	Moy (%)	ET (%)	CV (%)
221	15	6,7	27	0,2	0,8	8335,9	134,9	1,6	10,4	0,1	1,0
578	8,9	1,5	61,5	0,5	0,8	11698,8	104,7	0,9	8,0	0,1	1,3
764	31	4,1	184,8	1,2	1,2	18621,4	174,1	0,9	6,9	0,04	0,6

## 2. Tests de fidélité intermédiaire

Pour les tests de fidélité intermédiaire, ce sont les trois niveaux de contrôles fournis par Fujirebio® qui ont été utilisés pour chaque paramètre.

Le tableau 11 présente les résultats obtenus pour A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Les résultats détaillés des tests de fidélité intermédiaire des autres paramètres sont présentés dans les SHFORM des annexes 3 à 5. Les CV sont récapitulés dans le tableau 12. Par comparaison, les CV des tests de fidélité intermédiaire obtenus précédemment pour l'INNOTEST® sont également représentés. Selon la société INSTAND, impliquée dans les contrôles de qualité externes inter-laboratoires, les CV acceptables pour les dosages des biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer sont de 25 %. Les CV obtenus ici étant inférieurs à 25 %, on peut en conclure que les résultats sont conformes aux exigences attendues.

**Tableau 11 :** Test de fidélité intermédiaire pour A $\beta$ <sub>1-42</sub>.

FIDELITE INTERMEDIAIRE							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	N	Moyenne (pg/mL)	Ecart-type (pg/mL)	CV % (CV IT)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (INSTAND)	Conclusion
Niveau L1	7	382	9	2,4 (12,9)	2,3	25	Conforme
Niveau L2	7	734	18	2,5 (8,0)	1,9	25	Conforme
Niveau L3	7	1060	27	2,3 (13,3)	2,3	25	Conforme

**Tableau 12 :** Récapitulatif des CV des tests de fidélité intermédiaire.

t-Tau			P-Tau			A $\beta$ <sub>1-40</sub>			A $\beta$ <sub>1-42</sub> /A $\beta$ <sub>1-40</sub>		
Moy LP (pg/mL)	CV LP %	CV IT%	Moy LP (pg/mL)	CV LP %	CV IT%	Moy LP (pg/mL)	CV LP %	CV IT %	Moy LP %	CV LP %	CV IT %
294	5,0	7,9	29,7	3,3	5,2	3773,8	4,8	8,5	10,0	1,8	-
497	2,3	6,3	60,3	3,0	3,1	9601,6	2,8	8,3	7,8	1,0	-
809	3,1	5,9	100,2	4,0	9,1	21421	3,7	13,4	6,8	0,6	24

### 3. Tests de stabilité

Pour chaque marqueur, nous avons comparé, chaque jour, le CV calculé par rapport au dosage initial, aux CV obtenus dans les études de fidélité intermédiaire. Les CV à J+3 et J+4 sont présentés dans le tableau 13.

Pour  $A\beta_{1-42}$ , seul le niveau 3 présente des CV supérieurs aux CV des études de fidélité intermédiaire : 13,3 % et 7,6 % à J+4, à température ambiante et à 4°C respectivement. Ces CV sont plus importants que pour les autres marqueurs mais restent dans les limites acceptables. De plus, il s'agit du niveau élevé (moyenne = 2280 pg/mL), l'interprétation ne change donc pas.

Pour t-Tau, dans les conditions de conservation des aliquots à 4°C, le CV maximum obtenu pour les trois niveaux confondus est de 3.9 %, CV à J+4. Tous les CV sont inférieurs aux CV de nos études de fidélité intermédiaire, ou aux CV du fournisseur. Dans les conditions de conservation des échantillons à température ambiante, trois CV sont supérieurs aux CV des études de fidélité intermédiaire : 4.4 %, 5.2 % et 6.3 %. Ces CV restent cependant acceptables.

Pour P-Tau, seul un CV est supérieur à nos CV de fidélité intermédiaire ou aux CV du fournisseur. Ce CV est égal à 5.2 % et est acceptable.

Pour  $A\beta_{1-40}$ , le CV maximum atteint est de 8,2 % et est obtenu pour le niveau intermédiaire dans les conditions de conservation des aliquots à température ambiante, à J+4. Ce CV est aussi acceptable.

Pour le ratio  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ , seuls deux niveaux ont pu être testés, les CV obtenus sont plus faibles que pour les autres marqueurs, allant de 0,9 à 5,0 %. Le problème de CV plus élevé pour  $A\beta_{1-42}$  peut être compensé par le dosage d' $A\beta_{1-40}$  et donc par l'interprétation du ratio  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ .

Ces tests de stabilité nous permettent de valider le délai de réception de 48 heures (72 heures acceptables) défini par le laboratoire.

**Tableau 13** : Résultats des tests de stabilité.

Paramètres	Jour	Niveau 1			Niveau 2			Niveau 3		
		CV %	CVr %	CVf %	CV %	CVr %	CVf %	CV %	CVr %	CVf %
A $\beta$ <sub>1-42</sub> Tambiante	J+3	0,4	2,4	2,3	2,1	2,3	2,3	1,4	2,3	2,3
	J+4	0,2	2,4	2,3	1,9	2,3	2,3	13,3	2,3	2,3
A $\beta$ <sub>1-42</sub> 4°C	J+3	1,1	2,4	2,3	-	2,3	2,3	-	2,3	2,3
	J+4	0,9	2,4	2,3	2,4	2,3	2,3	7,6	2,3	2,3
t-Tau Tambiante	J+3	4,4	2,3	4,0	4,0	2,3	4,0	1,9	3,1	2,2
	J+4	6,3	2,3	4,0	1,2	2,3	4,0	5,2	3,1	2,2
t-Tau 4°C	J+3	1,3	2,3	4,0	2,4	2,3	4,0	0,7	3,1	2,2
	J+4	3,9	2,3	4,0	3,1	2,3	4,0	2,1	3,1	2,2
P-Tau Tambiante	J+3	0,8	3,0	4,4	2,6	3,0	4,4	2,1	4,0	4,4
	J+4	3,2	3,0	4,4	5,2	3,0	4,4	2,3	4,0	4,4
P-Tau 4°C	J+3	1,7	3,0	4,4	0,3	3,0	4,4	0,2	4,0	4,4
	J+4	0,8	3,0	4,4	0,8	3,0	4,4	0,1	4,0	4,4
A $\beta$ <sub>1-40</sub> Tambiante	J+1	0,4	4,8	3,4	1,8	2,8	2,6	0,7	2,8	2,6
	J+2	1,1	4,8	3,4	8,2	2,8	2,6	1,0	2,8	2,6
A $\beta$ <sub>1-40</sub> 4°C	J+3	1,6	4,8	3,4	8,1	2,8	2,6	1,3	2,8	2,6
	J+4	0,8	4,8	3,4	5,6	2,8	2,6	1,9	2,8	2,6
A $\beta$ <sub>1-42</sub> / A $\beta$ <sub>1-40</sub> Tambiante	J+1	1,0	1,0	-	1,7	1,0	-	-	-	-
	J+2	1,0	1,0	-	0,9	1,0	-	-	-	-
A $\beta$ <sub>1-42</sub> / A $\beta$ <sub>1-40</sub> 4°C	J+3	5,0	1,0	-	-	1,0	-	-	-	-
	J+4	1,9	1,0	-	0,9	1,0	-	-	-	-

CVr : CV obtenus lors des tests de reproductibilité (SHFORM), CVf : CV fournisseur, Tambiante : température ambiante.

#### IV. Discussion

L'évolution des critères diagnostiques de la maladie d'Alzheimer dans le sens d'une place de plus en plus grande donnée aux dosages des biomarqueurs A $\beta$ <sub>1-42</sub>, t-Tau, P-Tau et A $\beta$ <sub>1-40</sub> dans le LCS, et donc l'augmentation de leur prescription, a conduit à l'arrivée sur le marché de plusieurs automates permettant ces dosages. Ainsi, l'objectif de notre étude était la validation du dosage automatisé des biomarqueurs du LCS de la maladie d'Alzheimer, sur le Lumipulse® G600II.

Les résultats obtenus ouvrent la discussion autour de deux points majeurs. D'une part, nous aborderons l'évaluation technique de cette nouvelle méthode : corrélations avec les techniques actuellement disponibles, amélioration des performances avec l'automatisation, problème de la variabilité entre les techniques qu'il faut pouvoir évaluer. D'autre part, la possibilité du dosage en random access ouvre la discussion autour de la stratégie de dosage des quatre biomarqueurs et donc de la stratégie de leur interprétation.

Concernant les corrélations entre les techniques, nos résultats montrent que, pour les quatre biomarqueurs et le ratio, le Lumipulse® est très bien corrélé avec l'INNOTEST®,  $R^2 \geq 0,85$ . Une autre étude a comparé l'INNOTEST® avec le Lumipulse® mais uniquement pour le dosage d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> (81). L'équation de la régression linéaire obtenue est :  $A\beta_{1-42}(LP) = -103,04 + 1,52 \times A\beta_{1-42}(IT)$ . Le coefficient de détermination est de 0,68. Les résultats de cette étude sont proches de ceux que nous avons obtenus. Même si le coefficient de détermination est inférieur à celui de notre travail, il montre tout de même une bonne corrélation entre les deux techniques. De plus, les auteurs de cette étude observent une surestimation des dosages réalisés avec le Lumipulse® par rapport à l'INNOTEST® pour des concentrations supérieures à 200 pg/mL, ce qui est comparable à nos données qui montrent une surestimation à partir de 315 pg/mL. Ce biais peut être expliqué par le fait que même si les anticorps de capture et de révélation utilisés sont les mêmes, la méthode de détection par luminescence crée un biais positif pour les concentrations plus élevées par rapport à la méthode de détection dans le visible.

Comme nous l'avons vu, différentes techniques et automates sont disponibles sur le marché pour les dosages des biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer dans le LCS. Ces techniques ont été comparées avec l'INNOTEST® dans différentes études

et les résultats sont présentés dans le tableau 14. Toutes les études mettent en évidence une bonne corrélation entre les techniques pour les dosages d'Aβ<sub>1-42</sub>, t-Tau et P-Tau. Les meilleures corrélations avec la technique INNOTEST® sont cependant obtenues pour le Lumipulse®, notre travail, et la technologie Elecsys® : R<sup>2</sup> ≥ 0,85. Cependant, la société Roche® n'a pas encore développé le dosage d'Aβ<sub>1-40</sub>, et l'évaluation de la corrélation du ratio Aβ<sub>1-42</sub>/Aβ<sub>1-40</sub> est un élément important à prendre en compte.

**Tableau 14 :** Résumé des études de corrélation entre les différentes techniques.

	N	Paramètres	R <sup>2</sup>	Droites de corrélation
INNOTEST® vs Lumindex® (82)	161	Aβ <sub>1-42</sub>	0,69	Aβ <sub>1-42</sub> (IT) = 13,36 + 3,11 Aβ <sub>1-42</sub> (Lumindex®)
		t-Tau	0,69	t-Tau(IT) = -12,94 + 4,07 t-Tau(Lumindex®)
		P-Tau	0,80	P-Tau(IT) = 17,17 + 0,74 P-Tau(Lumindex®)
INNOTEST® vs EUROIMMUN® (automate analyzer I-2P) (83)	150	Aβ <sub>1-42</sub>	0,69	-
		t-Tau	0,69	-
		P-Tau	-	-
INNOTEST® vs Elecsys® (84)	137	Aβ <sub>1-42</sub>	0,88	Aβ <sub>1-42</sub> (Elecsys®) = -365 + 1,87 Aβ <sub>1-42</sub> (IT)
		t-Tau	0,97	t-Tau(Elecsys®) = 52 + 0,42 t-Tau(IT)
		P-Tau	0,96	P-Tau(Elecsys®) = -3,9 + 0,44 P-Tau(IT)
INNOTEST® vs Lumipulse® (81)	49	Aβ <sub>1-42</sub>	0,68	Aβ <sub>1-42</sub> (LP) = -103,04 + 1,52 x Aβ <sub>1-42</sub> (IT)
Notre laboratoire				
INNOTEST® vs Lumipulse®	28	Aβ <sub>1-42</sub>	0,90	Aβ <sub>1-42</sub> (LP) = -93,6 + 1,30 x Aβ <sub>1-42</sub> (IT)
	29	t-Tau	0,99	t-Tau(LP) = 67,6 + 1,01 x T-Tau(IT)
	64	P-Tau	0,97	P-Tau(LP) = -27 + 1,54 x P-Tau(IT)
	65	Aβ <sub>1-40</sub>	0,95	Aβ <sub>1-40</sub> (LP) = 793 + 0,92 Aβ <sub>1-40</sub> (IT)
	62	Aβ <sub>1-42</sub> /Aβ <sub>1-40</sub>	0,87	Aβ <sub>1-42</sub> /Aβ <sub>1-40</sub> (LP) = 1,7 + 0,81 x Aβ <sub>1-42</sub> /Aβ <sub>1-40</sub> (IT)

Concernant l'évaluation des performances, les résultats au sein de notre laboratoire montrent une amélioration de la fidélité intermédiaire avec le Lumipulse® par rapport à l'INNOTEST® ce qui confirme l'intérêt de l'automatisation pour réduire la variabilité analytique, les erreurs et la variabilité dues aux manipulations humaines. En effet, les CV des tests de fidélité intermédiaire sont plus faibles pour le Lumipulse® par rapport à l'INNOTEST® (Tableaux 11 et 12). Pour  $A\beta_{1-42}$  et  $A\beta_{1-40}$ , on passe de CV en INNOTEST® d'environ 8-13 %, à des CV en Lumipulse® inférieurs à 5 %. Pour t-Tau et P-Tau, de CV en INNOTEST® d'environ 5-9 %, on obtient des CV en Lumipulse® inférieurs à 5 %. Pour le ratio  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ , le test de fidélité intermédiaire n'a pu être réalisé que pour un seul niveau en INNOTEST®, et le CV est de 24,1 %. Ce résultat, bien qu'élevé, est toutefois cohérent avec les résultats des contrôles de qualité externes qui montrent, pour ce rapport, un CV de 32 % avec la technique INNOTEST® (Tableau 15). Avec le Lumipulse®, les CV de fidélité intermédiaire du ratio  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$  sont très faibles dans notre étude : inférieurs à 1,5 %.

Les contrôles de qualité externes permettent de comparer, pour chaque technique, les variabilités inter-laboratoires et sont donc un élément informatif important pour évaluer la technique choisie dans un laboratoire. Un exemple de résultats obtenus pour les contrôles de qualité externes de l'Alzheimer Association QC Program est présenté dans le tableau 15. Il s'agit de résultats datant de 2018 et, à ce moment-là, il y avait beaucoup plus de laboratoires utilisant l'INNOTEST® que les autres techniques. A l'avenir, on devrait obtenir de plus en plus de données pour les nouvelles techniques automatisées, ceci permettra une meilleure comparaison des CV entre les techniques. On peut tout de même noter que, en comparaison à notre étude où une diminution des CV de fidélité intermédiaire avec le Lumipulse® par rapport à l'INNOTEST® est mise en évidence pour tous les marqueurs, dans les données issues des contrôles de qualité externes, on observe une amélioration des CV avec le Lumipulse® pour tous les marqueurs sauf P-Tau. A noter qu'une très nette amélioration est mise en évidence pour le ratio  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$  : on passe d'un CV de 32 % avec l'INNOTEST® à 4 % pour le Lumipulse®, ce qui est comparable à nos données. D'autre part, on observe que les CV, tous marqueurs et toutes techniques confondus, sont très variables, allant de 2,3 % pour P-Tau dosée par l'Elecsys®, à 32 % pour le ratio  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$  dosé en INNOTEST®. Ces valeurs sont supérieures à nos CV de fidélité intermédiaire obtenus avec le Lumipulse®, ceci est le reflet de la diversité des laboratoires et des techniques disponibles. La variabilité inter-

laboratoire est aussi mise en évidence lorsque nous comparons nos CV de fidélité intermédiaire obtenus avec le Lumipulse® (Tableaux 11 et 12) qui sont bien inférieurs aux CV inter-laboratoires des contrôles de qualité externes des laboratoires utilisant le Lumipulse® (Tableau 15), c'est-à-dire nos pairs. En effet, pour A $\beta$ <sub>1-42</sub>, t-Tau, P-Tau et A $\beta$ <sub>1-40</sub>, nos CV de fidélité intermédiaire sont tous inférieurs ou égaux à 5 %, alors que les CV des pairs sont supérieurs ou égaux à 8,0 %. Pour le ratio A $\beta$ <sub>1-42</sub>/A $\beta$ <sub>1-40</sub>, le CV des pairs est de 4,2 % alors que nos CV de fidélité intermédiaire sont inférieurs à 2 %.

On remarque aussi que la technologie Elecsys® semble se distinguer, les CV obtenus dans le contrôle de qualité externe sont plus faibles que pour les autres techniques. Ceci est cohérent avec l'étude de Tobias Bittner, où les CV de fidélité intermédiaire décrits pour la technologie Elecsys® sont inférieurs aux CV des autres techniques (85). Cette technique semble donc très prometteuse et, lorsque Roche® aura développé le dosage d'A $\beta$ <sub>1-40</sub>, il sera également intéressant d'évaluer cette nouvelle méthode.

**Tableau 15 :** Exemple de CV inter laboratoires rendu par l'Alzheimer's Association QC Program.

	A $\beta$ <sub>1-42</sub> CV % (N)	t-Tau CV % (N)	P-Tau CV % (N)	A $\beta$ <sub>1-40</sub> CV % (N)	A $\beta$ <sub>1-42</sub> /A $\beta$ <sub>1-40</sub> CV % (N)
INNOTEST®	13 (60)	16 (65)	12 (70)	24 (22)	32 (20)
Lumipulse®	8,0 (19)	9,8 (19)	12 (8)	8,3 (7)	4,2 (7)
Elecsys®	7,6 (8)	4,3 (8)	2,3 (8)	-	-
Euroimmun®	9,4 (3)	33 (3)	4,8 (3)	11 (4)	9,0 (3.8)

Le changement de technique nous a amenés à déterminer de nouvelles valeurs seuils pour les dosages des biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer. Pour comparaison avec nos résultats, le tableau 16 résume les résultats obtenus dans la littérature.

**Tableau 16 :** Valeurs seuils des biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer avant standardisation.

	A $\beta$ <sub>1-42</sub> (pg/mL)	t-Tau (pg/mL)	P-Tau <sub>181</sub> (pg/mL)	A $\beta$ <sub>1-42</sub> /A $\beta$ <sub>1-40</sub>
INNOTEST® (70)	700	400	60	0,06
EUROIMMUN® (83)	531	412	-	0,076
COBAS® (86) / (67)	1098 / 1000	242 / 300	19,2 / 27	-
Luminex® (82) / (87)	156 / 192	70 / 93	41 / 23	-
Lumipulse (notre étude)	898	525	73	0,082

On observe que les valeurs seuils varient beaucoup entre les techniques, ce qui met bien en évidence le manque de standardisation et la nécessité du développement d'un standard international. Dans notre laboratoire, le dosage standardisé a été mis en place depuis janvier 2019, uniquement pour A $\beta$ <sub>1-42</sub>. A l'avenir, la standardisation devrait permettre de comparer les résultats obtenus dans les cohortes de Lille à celles des autres centres pour lesquels les dosages seront également standardisés. Elle devrait ainsi permettre de mettre en place des études multicentriques plus fiables pour la maladie d'Alzheimer mais aussi pour des démences plus rares.

Nous avons vu que le Lumipulse® est un automate qui fonctionne en random access ce qui permet donc de limiter le nombre de calibrations et de séries non conformes à repasser. De plus, on peut réaliser simultanément le dosage de plusieurs biomarqueurs en une seule série, tandis qu'avec les techniques qui ne sont pas en random access, il faut procéder à une série pour chaque biomarqueur. En effet, avec l'INNOTEST®, il fallait deux jours pour réaliser les trois séries de dosages d'A $\beta$ <sub>1-42</sub>, t-Tau et P-Tau. Un délai supplémentaire était encore nécessaire pour réaliser une série de dosage d'A $\beta$ <sub>1-40</sub> pour les cas discordants. Les dosages d'A $\beta$ <sub>1-42</sub>,

t-Tau, P-Tau et  $A\beta_{1-40}$  peuvent maintenant être effectués le même jour. De plus, l'automatisation nous permet de créer une connexion informatique entre le Lumipulse® et le logiciel de validation biologique. Cela permet aussi de diminuer les délais de rendu de résultats et d'éliminer le risque d'erreur de rendu de résultats.

L'automatisation du dosage des biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer par un automate de type random access ouvre la possibilité de revoir notre stratégie de dosages ainsi que les commentaires d'interprétation des bilans en routine.

Concernant la stratégie du dosage des biomarqueurs, nous avons vu qu'un groupe de travail multidisciplinaire a publié, en 2017, des recommandations pour l'utilisation et l'interprétation des biomarqueurs du LCS, d'une part pour le diagnostic des patients au stade MCI (49), d'autre part pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer des patients au stade de démence (50). Les experts proposent un arbre décisionnel basé sur l'examen clinique, les examens de neuroimagerie et le dosage des trois biomarqueurs,  $A\beta_{1-42}$ , t-Tau, P-Tau, dans le LCS. L'arbre décisionnel indique que si les trois biomarqueurs sont pathologiques, le statut MCI ou la démence sont probablement dus à la maladie d'Alzheimer, les biomarqueurs renforçant dans ces cas le diagnostic clinique. Si les trois biomarqueurs sont normaux, il est peu probable que la maladie d'Alzheimer soit la cause du statut MCI ou de la démence, il faut considérer d'autres diagnostics. Pour les dosages discordants des patients au stade de démence, il est conseillé de faire le dosage d' $A\beta_{1-40}$  uniquement pour les patients pour lesquels la concentration d' $A\beta_{1-42}$  dans le LCS est normale alors que les concentrations de t-Tau et P-Tau sont augmentées. La place du dosage d' $A\beta_{1-40}$  dans ces recommandations reste mal définie et vient encore en deuxième intention. Or, la littérature récente semble indiquer que le ratio  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$  est supérieur au dosage d' $A\beta_{1-42}$  seul, et ce, pas uniquement pour les cas discordants. En effet, plusieurs études récentes ont conclu à une meilleure performance diagnostique du ratio  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$  par rapport au dosage d' $A\beta_{1-42}$  seul (44,87–90). L'étude de Piotr Lewczuk portant sur la validation de l'algorithme du score de Erlangen chez les patients au stade MCI, montre que les résultats basés sur l'utilisation de quatre biomarqueurs sont davantage corrélés avec le pourcentage de sujets évoluant vers la démence que les scores calculés avec trois biomarqueurs uniquement (87). De plus, les études qui évaluent la corrélation entre le dosage d' $A\beta_{1-42}$  dans le LCS ou du ratio  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$  avec les données des analyses par TEP amyloïde montrent une meilleure corrélation de la TEP avec le ratio  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$  qu'avec le dosage d' $A\beta_{1-42}$  seul (91–93). Les analyses ROC réalisées dans notre

étude vont aussi dans le sens d'une supériorité diagnostique du ratio  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$  par rapport au dosage d' $A\beta_{1-42}$  seul. En effet, l'AUC du dosage d' $A\beta_{1-42}$  seul est égale à 0,82 avec une Se de 0,79 et une Spe de 0,80, alors que l'AUC du ratio  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$  est supérieure et égale à 0,95, avec une Se de 0,94 et une Spe de 0,89. Ceci confirme l'intérêt du ratio  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$  comme aide au diagnostic de la maladie d'Alzheimer et nous a amenés à mettre en place le dosage systématique d' $A\beta_{1-40}$ .

Ainsi, sur la base de ces recommandations et des publications récentes sur le ratio  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ , en intégrant le dosage systématique d' $A\beta_{1-40}$ , nous avons revu les commentaires d'interprétation comme suit :

- Si les quatre biomarqueurs sont pathologiques : « profil biochimique évocateur d'une maladie d'Alzheimer »
- Si les quatre biomarqueurs sont normaux : « profil biochimique normal, non évocateur d'une maladie d'Alzheimer »
- Si la concentration d' $A\beta_{1-42}$  est normale avec un ratio  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$  pathologique et des concentrations de t-Tau et P-Tau élevées : « profil biochimique évocateur d'une maladie d'Alzheimer »
- Si la concentration d' $A\beta_{1-42}$  est diminuée, le ratio  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$  normal et les concentrations de t-Tau et P-Tau normales : « profil biochimique normal, non évocateur d'une maladie d'Alzheimer »
- Pour les profils intermédiaires, nous décrivons seulement les anomalies. En effet, nous ne disposons pas de tous les éléments cliniques et des résultats des examens d'imagerie.

Nous évaluerons sur une deuxième cohorte l'intérêt du dosage systématique d' $A\beta_{1-40}$  et la concordance obtenue entre les interprétations du dosage des biomarqueurs du LCS et le diagnostic clinique.

Un dernier point important à soulever est le problème de l'interprétation des résultats proches des valeurs seuils. Les deux articles du groupe de travail cités précédemment (49,50) recommandent l'utilisation d'une zone grise de 10 % dans l'interprétation des résultats des dosages de ces biomarqueurs, comme c'est le cas dans d'autres études (87,94). Cette zone grise permet de prendre en compte la variabilité analytique des dosages. Si nous l'appliquons à nos valeurs seuils, nous

obtenons les bornes suivantes : 553 à 676 pg/mL pour  $A\beta_{1-42}$ , 472 à 577 pg/mL pour t-Tau, 66 à 80 pg/mL pour P-Tau et 5,0 à 6,2 % pour  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ . Ainsi, lorsque les résultats sont situés dans cette zone grise, nous rendons en commentaires que les concentrations sont subnormales. Si les concentrations de tous les biomarqueurs sont subnormales alors, le groupe de travail recommande de répéter l'analyse et/ou de réaliser d'autres examens comme l'imagerie (50).

Notre étude présente quelques limites. L'incertitude du dosage n'a pas pu être évaluée car nous n'avons pas assez de données de contrôles de qualité externes. Ce travail devra être complété par la suite. D'autre part, les valeurs seuils, Se et Spe ont été déterminées sur une cohorte rétrospective et seront vérifiées sur une deuxième cohorte prospective en cours actuellement. Cette deuxième cohorte permettra aussi de valider ou d'ajuster les commentaires d'interprétation des bilans biologiques. Il n'existe pas encore de dosage standardisé pour t-Tau, P-Tau et  $A\beta_{1-40}$ , les valeurs seuils devront être de nouveau adaptées lorsque les standards internationaux seront disponibles. La standardisation n'a été mise en place récemment que pour  $A\beta_{1-42}$ , et les futures études et résultats des contrôles de qualité externes devraient montrer la convergence des résultats obtenus pour ce marqueur.

Cependant, notre étude présente l'avantage de posséder des diagnostics posés à l'aveugle des biomarqueurs par au moins deux neurologues. Ceci nous permet d'éviter un biais de classement. Les résultats des dosages des biomarqueurs du LCS n'ont pas influencé les cliniciens. La présence, dans le groupe de patients témoins, de patients présentant des troubles neurologiques autres que la maladie d'Alzheimer et non des sujets sains, pourrait être considérée comme une limite à l'étude. Cependant, ces deux groupes diagnostiques (Alzheimer / non Alzheimer) permettent de déterminer des seuils en adéquation avec la question que se pose le clinicien pour un patient présentant des troubles cognitifs, c'est-à-dire, s'agit-il d'une maladie d'Alzheimer ou non ? L'interprétation des bilans avec ces seuils permet d'aider les cliniciens à répondre à cette question uniquement.

Comme nous l'avons vu, les dosages des biomarqueurs actuellement disponibles présentent quelques limites : la ponction lombaire est un examen invasif et ces biomarqueurs du LCS restent insuffisants pour le diagnostic différentiel avec les autres démences. De nouvelles perspectives s'ouvrent tant sur le plan des techniques de dosages qui sont de plus en plus sensibles, que sur le plan du développement de nouveaux biomarqueurs. En effet, de nouvelles technologies plus

sensibles voient le jour. C'est le cas de l'automate SIMOA® (Single Molecule Array) développé par Quanterix®. Il utilise des nanotechnologies appliquées au principe de l'ELISA. Cette technique permet une détection de protéines jusqu'à 1000 fois plus sensible que les techniques ELISA classiques (95,96). Elle permet ainsi de doser des marqueurs tels qu'Aβ<sub>1-42</sub>, Aβ<sub>1-40</sub> et t-Tau dans le plasma où les concentrations sont beaucoup plus faibles que dans le LCS. Cette technique utilise des nanobilles paramagnétiques sur lesquelles sont fixés des anticorps de capture spécifiques de la molécule à doser, et le signal fluorescent du sandwich sur la nanopuce est mesuré grâce à une caméra haute résolution. Des études sont en cours pour évaluer leur intérêt pour le diagnostic et le suivi de la maladie d'Alzheimer (97,98). Le dosage sanguin a l'avantage d'être moins invasif qu'une ponction lombaire et pourra donc être répété ce qui pourra être intéressant le jour où de nouveaux traitements seront développés. Il pourra aussi être proposé à un plus grand nombre de patients pour une médecine personnalisée et de précision.

D'autre part, le développement de nouveaux biomarqueurs est en cours de recherche : les chaînes légères des neurofilaments dans le plasma ou le LCS comme marqueur de neurodégénérescence (99,100), la synaptosomal - associated protein 25 (SNAP – 25), la syntaxine – 1 et la neurogranine dans le LCS comme marqueurs de dégénérescence synaptique (99). Parmi ces nouveaux biomarqueurs, la neurogranine serait la plus spécifique de la maladie d'Alzheimer (101) .

Ainsi, dans le futur, l'automatisation, la standardisation, le développement de nouvelles techniques de dosage et de nouveaux biomarqueurs vont permettre une amélioration de l'aide au diagnostic de la maladie d'Alzheimer.

## V. Conclusion

Ce travail a permis la validation des dosages des biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer  $A\beta_{1-42}$ , t-Tau, P-Tau et  $A\beta_{1-40}$  dans le LCS par l'automate Lumipulse® G600II. Nous avons pu définir de nouvelles valeurs seuils permettant de différencier la maladie d'Alzheimer des autres causes de troubles cognitifs : 615 pg/mL pour  $A\beta_{1-42}$ , 525 pg/mL pour t-Tau, 73 pg/mL pour P-Tau et 5.6 % pour le ratio  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ . Ce travail a aussi contribué à la révision de l'interprétation des bilans biologiques avec l'intégration du dosage systématique d' $A\beta_{1-40}$  pour le calcul du ratio  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ , et la mise en place d'une zone grise de 10 % autour des valeurs seuils.

Nous avons mis en évidence les avantages de l'automatisation mais aussi la nécessité d'une standardisation des dosages pour faire face à la diversité des automates disponibles sur le marché. Cette standardisation n'a été mise en place récemment que pour  $A\beta_{1-42}$ . Des études doivent encore être réalisées pour permettre la standardisation des quatre biomarqueurs, l'harmonisation de l'interprétation de ces dosages ainsi que l'intégration de nouveaux biomarqueurs comme aide au diagnostic de la maladie d'Alzheimer.

## VI. Références bibliographiques

1. Maladie d'Alzheimer [Internet]. Inserm. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/alzheimer-maladie>
2. La démence [Internet]. World Health Organization. Disponible sur: <http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
3. Scheltens P, Blennow K, Breteler MMB, de Strooper B, Frisoni GB, Salloway S, et al. Alzheimer's disease. Lancet. 30 juill 2016;388(10043):505-17.
4. La maladie d'Alzheimer en chiffres. France Alzheimer [Internet]. Disponible sur: <https://www.francealzheimer.org/maladie-dalzheimer-vos-questions-nos-reponses/maladie-dalzheimer-chiffres/>
5. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. Lancet. 29 juill 2006;368(9533):387-403.
6. Croisile B, Auriacombe S, Etcharry- Bouyx F, Vercelletto M. Les nouvelles recommandations 2011 du National Institute on Aging et de l'Alzheimer's Association sur le diagnostic de la maladie d'Alzheimer. Rev Neurol. Juillet 2012 ; 168(6-7):471-82.
7. Amieva H. Signes prédictifs de la maladie d'Alzheimer. Rev Med Interne. Juin 2011;32 Suppl 1:S12-3.
8. Caldwell CC, Yao J, Brinton RD. Targeting the Prodromal Stage of Alzheimer's Disease: Bioenergetic and Mitochondrial Opportunities. Neurotherapeutics. janv 2015;12(1):66-80.
9. Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. mai 2011;7(3):270-9.
10. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. mai 2011;7(3):263-9.
11. Mitchell AJ, Shiri-Feshki M. Rate of progression of mild cognitive impairment to dementia--meta-analysis of 41 robust inception cohort studies. Acta Psychiatr Scand. avr 2009;119(4):252-65.
12. Lehman S, Gabelle A, Delaby C. Protéine Tau et peptides amyloïdes. EMC - Bio. Médicale. Mars 2019;9(1).

13. Šimić G, Babić Leko M, Wray S, Harrington C, Delalle I, Jovanov-Milošević N, et al. Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies. *Biomolecules*. 6 janv 2016;6(1):6.
14. Mudher A, Colin M, Dujardin S, Medina M, Dewachter I, Alavi Naini SM, et al. What is the evidence that tau pathology spreads through prion-like propagation? *Acta Neuropathol Commun*. 19 déc 2017;5(1):99.
15. Barage SH, Sonawane KD. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*. août 2015;52:1-18.
16. Buée L, Delacourte A. [Tauopathy and Alzheimer disease: a full degenerating process]. *Psychol Neuropsychiatr Vieil*. déc 2006;4(4):261-73.
17. Jack CR, Holtzman DM. Biomarker Modeling of Alzheimer's Disease. *Neuron*. 18 déc 2013;80(6):1347-58.
18. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. mai 2011;7(3):280-92.
19. Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol*. janv 2010;9(1):119-28.
20. Karran E, De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *J Neurochem*. 2016;139 Suppl 2:237-52.
21. Gulisano W, Maugeri D, Baltrons MA, Fà M, Amato A, Palmeri A, et al. Role of Amyloid- $\beta$  and Tau Proteins in Alzheimer's Disease: Confuting the Amyloid Cascade. *J Alzheimers Dis*. 2018;64(s1):S611-31.
22. Ricciarelli R, Fedele E. The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. *Curr Neuropharmacol*. 2017;15(6):926-35.
23. Laurent C, Buée L, Blum D. Tau and neuroinflammation: What impact for Alzheimer's Disease and Tauopathies? *Biomed J*. 2018;41(1):21-33.
24. Joly-Amado A, Gratuze M, Benderradji H, Vieau D, Buée L, Blum D. Relation mutuelle entre Tau et signalisation centrale de l'insuline: Quelles conséquences pour la maladie d'Alzheimer et les tauopathies? *médecine/sciences*. nov 2018;34(11):929-35.
25. 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*. juill 1984;34(7):939-44.

26. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Hampel H, Molinuevo JL, Blennow K, et al. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol.* juin 2014;13(6):614-29.
27. 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.* août 2007;6(8):734-46.
28. 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.* nov 2010;9(11):1118-27.
29. Jack CR, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Feldman HH, Frisoni GB, et al. A/T/N: An unbiased descriptive classification scheme for Alzheimer disease biomarkers. *Neurology.* 2 août 2016;87(5):539-47.
30. Gauthier S, Zhang H, Ng KP, Pascoal TA, Rosa-Neto P. Impact of the biological definition of Alzheimer's disease using amyloid, tau and neurodegeneration (ATN): what about the role of vascular changes, inflammation, Lewy body pathology? *Transl Neurodegener.* 2018;7:12.
31. Jack CR, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* avr 2018;14(4):535-62.
32. Rosa-Neto P, Leuzy A. Imagerie moléculaire en TEP dans la maladie d'Alzheimer. *Rev. Can. Mal. Alzheimer. Autres Démences.* Janv 2008;11(1):18-24
33. Buerger K, Ewers M, Pirttilä T, Zinkowski R, Alafuzoff I, Teipel SJ, et al. CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain.* nov 2006;129(Pt 11):3035-41.
34. Tapiola T, Alafuzoff I, Herukka S-K, Parkkinen L, Hartikainen P, Soininen H, et al. Cerebrospinal fluid {beta}-amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain. *Arch Neurol.* mars 2009;66(3):382-9.
35. Mattsson N, Smith R, Strandberg O, Palmqvist S, Schöll M, Insel PS, et al. Comparing 18F-AV-1451 with CSF t-tau and p-tau for diagnosis of Alzheimer disease. *Neurology.* 30 janv 2018;90(5):e388-95.
36. La Joie R, Bejanin A, Fagan AM, Ayakta N, Baker SL, Bourakova V, et al. Associations between [18F]AV1451 tau PET and CSF measures of tau pathology in a clinical sample. *Neurology.* 23 janv 2018;90(4):e282-90.
37. Strozzyk D, Blennow K, White LR, Launer LJ. CSF Abeta 42 levels correlate with amyloid-neuropathology in a population-based autopsy study. *Neurology.* 25 févr 2003;60(4):652-6.
38. 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.* mars 2004;55(3):306-19.

39. Grimmer T, Riemenschneider M, Förstl H, Henriksen G, Klunk WE, Mathis CA, et al. Beta amyloid in Alzheimer's disease: increased deposition in brain is reflected in reduced concentration in cerebrospinal fluid. *Biol Psychiatry*. 1 juin 2009;65(11):927-34.
40. Bombois S, Schraen S, Sablonniere B, Buée L, Pasquier F. Intérêt du dosage des biomarqueurs du LCR dans les démences dégénératives. *Pratique Neurologique - FMC*. 1 déc 2011;2(4):256-63.
41. 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.
42. Villars H. Place des biomarqueurs du liquide céphalorachidien dans le diagnostic de la maladie d'Alzheimer. *Neurologie.com*. avr 2010;(4):92–95.
43. Blennow K, Zetterberg H. The Past and the Future of Alzheimer's Disease Fluid Biomarkers. *J Alzheimers Dis*. 2018;62(3):1125-40.
44. Dumurgier J, Schraen S, Gabelle A, Vercruysse O, Bombois S, Laplanche J-L, et al. Cerebrospinal fluid amyloid- $\beta$  42/40 ratio in clinical setting of memory centers: a multicentric study. *Alzheimers Res Ther*. 2015;7(1):30.
45. Petrella JR, Hao W, Rao A, Doraiswamy PM. Computational Causal Modeling of the Dynamic Biomarker Cascade in Alzheimer's Disease. *Comput Math Methods Med*. 2019;2019:6216530.
46. Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TLS, Fagan AM, Goate A, Fox NC, et al. Clinical and Biomarker Changes in Dominantly Inherited Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*. 30 août 2012;367(9):795-804.
47. Buchhave P, Minthon L, Zetterberg H, Wallin AK, Blennow K, Hansson O. Cerebrospinal fluid levels of  $\beta$ -amyloid 1-42, but not of tau, are fully changed already 5 to 10 years before the onset of Alzheimer dementia. *Arch Gen Psychiatry*. janv 2012;69(1):98-106.
48. Maladie d'Alzheimer et maladies apparentées : diagnostic et prise en charge. [Internet]. [https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2011-12/recommandation\\_maladie\\_d\\_alzheimer\\_et\\_maladies\\_apparentees\\_diagnostic\\_et\\_prsie\\_en\\_charge.pdf](https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2011-12/recommandation_maladie_d_alzheimer_et_maladies_apparentees_diagnostic_et_prsie_en_charge.pdf)
49. Herukka S-K, Simonsen AH, Andreasen N, Baldeiras I, Bjerke M, Blennow K, et al. Recommendations for cerebrospinal fluid Alzheimer's disease biomarkers in the diagnostic evaluation of mild cognitive impairment. *Alzheimers Dement*. mars 2017;13(3):285-95.
50. Simonsen AH, Herukka S-K, Andreasen N, Baldeiras I, Bjerke M, Blennow K, et al. Recommendations for CSF AD biomarkers in the diagnostic evaluation of dementia. *Alzheimers Dement*. mars 2017;13(3):274-84.
51. Dumurgier J, Gabelle A, Vercruysse O, Bombois S, Laplanche J-L, Peoc'h K, et al. Exacerbated CSF abnormalities in younger patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. juin 2013;54:486-91.

52. Vercruyse O, Paquet C, Gabelle A, Delbeuck X, Blanc F, Wallon D, et al. Relevance of Follow-Up in Patients with Core Clinical Criteria for Alzheimer Disease and Normal CSF Biomarkers. *Curr Alzheimer Res.* 2018;15(7):691-700.
53. Bousiges O, Bombois S, Schraen S, Wallon D, Quillard MM, Gabelle A, et al. Cerebrospinal fluid Alzheimer biomarkers can be useful for discriminating dementia with Lewy bodies from Alzheimer's disease at the prodromal stage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* mai 2018;89(5):467-75.
54. Pouclet-Courtemanche H, Nguyen T-B, Skrobala E, Boutoleau-Bretonnière C, Pasquier F, Bouaziz-Amar E, et al. Frontotemporal dementia is the leading cause of « true » A-/T+ profiles defined with A $\beta$ 42/40 ratio. *Alzheimers Dement (Amst).* déc 2019;11:161-9.
55. Sancesario GM, Bernardini S. How many biomarkers to discriminate neurodegenerative dementia? *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2015;52(6):314-26.
56. Wallon D, Rovelet-Lecrux A, Deramecourt V, Pariente J, Auriacombe S, Le Ber I, et al. Definite behavioral variant of frontotemporal dementia with C9ORF72 expansions despite positive Alzheimer's disease cerebrospinal fluid biomarkers. *J Alzheimers Dis.* 2012;32(1):19-22.
57. INNOTEST®  $\beta$ -AMYLOID<sub>(1-42)</sub> version de notice du 05/04/2016 (v4).
58. INNOTEST®  $\beta$ -AMYLOID<sub>(1-40)</sub> version de notice du 20/11/15 (v1).
59. INNOTEST® hTAU Ag version de notice du 17/03/16 (v3).
60. INNOTEST® PHOSPHO-TAU<sub>(181P)</sub> version de notice du 13/10/16 (v4).
61. Lumipulse® G Total Tau, version de notice de juillet 2017 (v1).
62. Lumipulse® G  $\beta$ -Amyloid 1-42, version de notice de janvier 2019 (v3).
63. Lumipulse® G P-Tau, version de notice de novembre 2018 (v1).
64. Lumipulse® G  $\beta$ -Amyloid 1-40, version de notice de novembre 2018 (v1).
65. FR\_Elecsys\_pTau\_description\_du\_test.pdf [Internet]. Disponible sur: [http://www.roche-diagnostics.ch/content/dam/corporate/roche-dia\\_ch/documents/broschueren/professional\\_diagnostics/serumarbeitsplatz/immunologie/Alzheimer/FR\\_Elecsys\\_pTau\\_description\\_du\\_test.pdf](http://www.roche-diagnostics.ch/content/dam/corporate/roche-dia_ch/documents/broschueren/professional_diagnostics/serumarbeitsplatz/immunologie/Alzheimer/FR_Elecsys_pTau_description_du_test.pdf)
66. FR\_Elecsys\_tTau\_description\_du\_test.pdf [Internet]. Disponible sur: [http://www.roche-diagnostics.ch/content/dam/corporate/roche-dia\\_ch/documents/broschueren/professional\\_diagnostics/serumarbeitsplatz/immunologie/Alzheimer/FR\\_Elecsys\\_tTau\\_description\\_du\\_test.pdf](http://www.roche-diagnostics.ch/content/dam/corporate/roche-dia_ch/documents/broschueren/professional_diagnostics/serumarbeitsplatz/immunologie/Alzheimer/FR_Elecsys_tTau_description_du_test.pdf)
67. Simon M. Diagnostic biomarkers of Alzheimer disease. [Internet]. Disponible sur: [https://www.labqualitydays.fi/wpcontent/uploads/sites/2/2018/01/LQD18\\_Abstrac t\\_Simon\\_Maryline.pdf](https://www.labqualitydays.fi/wpcontent/uploads/sites/2/2018/01/LQD18_Abstrac t_Simon_Maryline.pdf).
68. Moalic V, Mercier B, Ferec C. Technologie Luminex™: principe, applications, et perspectives. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée.* août 2004;19(4):181-7.

69. Kang J-H, Korecka M, Toledo JB, Trojanowski JQ, Shaw LM. Clinical Utility and Analytical Challenges in Measurement of Cerebrospinal Fluid Amyloid- $\beta$ 1–42 and  $\tau$  Proteins as Alzheimer Disease Biomarkers. *Clinical Chemistry*. 1 juin 2013;59(6):903-16.
70. Lehmann S, Schraen S, Quadrio I, Paquet C, Bombois S, Delaby C, et al. Impact of harmonization of collection tubes on Alzheimer's disease diagnosis. *Alzheimers Dement*. oct 2014;10(5 Suppl):S390-S394.e2.
71. 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*. juill 2011;7(4):386-395.e6.
72. Perret-Liaudet A, Pelpel M, Tholance Y, Dumont B, Vanderstichele H, Zorzi W, et al. Risk of Alzheimer's disease biological misdiagnosis linked to cerebrospinal collection tubes. *J Alzheimers Dis*. 2012;31(1):13-20.
73. Dumurgier J, Vercruysse O, Paquet C, Bombois S, Chaulet C, Laplanche J-L, et al. Intersite variability of CSF Alzheimer's disease biomarkers in clinical setting. *Alzheimers Dement*. juill 2013;9(4):406-13.
74. Bjerke M, Andreasson U, Kuhlmann J, Portelius E, Pannee J, Lewczuk P, et al. Assessing the commutability of reference material formats for the harmonization of amyloid- $\beta$  measurements. *Clin Chem Lab Med*. 1 juill 2016;54(7):1177-91.
75. Vanderstichele H, Bibl M, Engelborghs S, Le Bastard N, Lewczuk P, Molinuevo JL, et al. Standardization of preanalytical aspects of cerebrospinal fluid biomarker testing for Alzheimer's disease diagnosis: a consensus paper from the Alzheimer's Biomarkers Standardization Initiative. *Alzheimers Dement*. janv 2012;8(1):65-73.
76. Andreasson U, Kuhlmann J, Pannee J, Umek RM, Stoops E, Vanderstichele H, et al. Commutability of the certified reference materials for the standardization of  $\beta$ -amyloid 1-42 assay in human cerebrospinal fluid: lessons for tau and  $\beta$ -amyloid 1-40 measurements. *Clin Chem Lab Med*. 27 juin 2018;
77. Fujirebio. Re standardisation du Lumipulse G  $\beta$ -Amyloid 1-42, référence 00003, source ERM-DA480-481-482\_IFCC\_report.pdf.
78. The Alzheimer's Association QC Program - Psychiatry and Neurochemistry, University of Gothenburg, Sweden [Internet]. Göteborgs universitet. Disponible sur:[http://neurophys.gu.se/english/departments/psychiatry\\_and\\_neurochemistry/Neurochemical\\_pathophysiology\\_and\\_diagnostics/TheAlzAssQCProgram/](http://neurophys.gu.se/english/departments/psychiatry_and_neurochemistry/Neurochemical_pathophysiology_and_diagnostics/TheAlzAssQCProgram/)
79. SH-GTA-04.pdf[Internet]. Disponible sur: <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>
80. Kollhoff AL, Howell JC, Hu WT. Automation vs. Experience: Measuring Alzheimer's Beta-Amyloid 1-42 Peptide in the CSF. *Front Aging Neurosci*. 2018;10:253.
81. Zecca C, Brescia V, Piccininni M, Capozzo R, Barone R, Barulli MR, et al. Comparative evaluation of two immunoassays for cerebrospinal fluid  $\beta$ -Amyloid1-42 measurement. *Clin Chim Acta*. 4 mars 2019;493:107-11.

82. Le Bastard N, Coart E, Vanderstichele H, Vanmechelen E, Martin J-J, Engelborghs S. Comparison of two analytical platforms for the clinical qualification of Alzheimer's disease biomarkers in pathologically-confirmed dementia. *J Alzheimers Dis.* 2013;33(1):117-31.
83. Chiasserini D, Biscetti L, Farotti L, Eusebi P, Salvadori N, Lisetti V, et al. Performance Evaluation of an Automated ELISA System for Alzheimer's Disease Detection in Clinical Routine. *J Alzheimers Dis.* 22 2016;54(1):55-67.
84. Willemse EAJ, van Maurik IS, Tijms BM, Bouwman FH, Franke A, Hubeek I, et al. Diagnostic performance of Elecsys immunoassays for cerebrospinal fluid Alzheimer's disease biomarkers in a nonacademic, multicenter memory clinic cohort: The ABIDE project. *Alzheimers Dement (Amst).* 2018;10:563-72.
85. Bittner T, Zetterberg H, Teunissen CE, Ostlund RE, Militello M, Andreasson U, et al. Technical performance of a novel, fully automated electrochemiluminescence immunoassay for the quantitation of  $\beta$ -amyloid (1-42) in human cerebrospinal fluid. *Alzheimers Dement.* 2016;12(5):517-26.
86. Schindler SE, Gray JD, Gordon BA, Xiong C, Batrla-Utermann R, Quan M, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers measured by Elecsys assays compared to amyloid imaging. *Alzheimers Dement.* nov 2018;14(11):1460-9.
87. Lewczuk P, Kornhuber J, German Dementia Competence Network, Toledo JB, Trojanowski JQ, Knapik-Czajka M, et al. Validation of the Erlangen Score Algorithm for the Prediction of the Development of Dementia due to Alzheimer's Disease in Pre-Dementia Subjects. *J Alzheimers Dis.* 2015;48(2):433-41.
88. Baldeiras I, Santana I, Leitão MJ, Gens H, Pascoal R, Tábuas-Pereira M, et al. Addition of the A $\beta$ 42/40 ratio to the cerebrospinal fluid biomarker profile increases the predictive value for underlying Alzheimer's disease dementia in mild cognitive impairment. *Alzheimers Res Ther.* 20 mars 2018;10(1):33.
89. Lehmann S, Delaby C, Boursier G, Catteau C, Ginestet N, Tiers L, et al. Relevance of A $\beta$ 42/40 Ratio for Detection of Alzheimer Disease Pathology in Clinical Routine: The PLMR Scale. *Front Aging Neurosci.* 2018;10:138.
90. Biscetti L, Salvadori N, Farotti L, Cataldi S, Eusebi P, Paciotti S, et al. The added value of A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 in the CSF signature for routine diagnostics of Alzheimer's disease. *Clin Chim Acta.* 4 mars 2019;494:71-3.
91. Doecke JD, Rembach A, Villemagne VL, Varghese S, Rainey-Smith S, Sarros S, et al. Concordance Between Cerebrospinal Fluid Biomarkers with Alzheimer's Disease Pathology Between Three Independent Assay Platforms. *J Alzheimers Dis.* 2018;61(1):169-83.
92. Janelidze S, Pannee J, Mikulskis A, Chiao P, Zetterberg H, Blennow K, et al. Concordance Between Different Amyloid Immunoassays and Visual Amyloid Positron Emission Tomographic Assessment. *JAMA Neurol.* 01 2017;74(12):1492-501.
93. Bouter C, Vogelgsang J, Wiltfang J. Comparison between amyloid-PET and CSF amyloid- $\beta$  biomarkers in a clinical cohort with memory deficits. *Clin Chim Acta.* mai 2019;492:62-8.

94. Rosén C, Farahmand B, Skillbäck T, Nägga K, Mattsson N, Kilander L, et al. Benchmarking biomarker-based criteria for Alzheimer's disease: Data from the Swedish Dementia Registry, SveDem. *Alzheimers Dement.* déc 2015;11(12):1470-9.
95. 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.* juin 2010;28(6):595-9.
96. Wilson DH, Rissin DM, Kan CW, Fournier DR, Piech T, Campbell TG, et al. The Simoa HD-1 Analyzer: A Novel Fully Automated Digital Immunoassay Analyzer with Single-Molecule Sensitivity and Multiplexing. *J Lab Autom.* août 2016;21(4):533-47.
97. Dage JL, Wennberg AMV, Airey DC, Hagen CE, Knopman DS, Machulda MM, et al. Levels of tau protein in plasma are associated with neurodegeneration and cognitive function in a population-based elderly cohort. *Alzheimers Dement.* déc 2016;12(12):1226-34.
98. 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.
99. Blennow K, Zetterberg H. Biomarkers for Alzheimer's disease: current status and prospects for the future. *J Intern Med.* déc 2018;284(6):643-63.
100. Mattsson N, Andreasson U, Zetterberg H, Blennow K, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Association of Plasma Neurofilament Light With Neurodegeneration in Patients With Alzheimer Disease. *JAMA Neurol.* 01 2017;74(5):557-66.
101. Wellington H, Paterson RW, Portelius E, Törnqvist U, Magdalinou N, Fox NC, et al. Increased CSF neurogranin concentration is specific to Alzheimer disease. *Neurology.* 1 mars 2016;86(9):829-35.

## VII. Annexes

### Annexe 1 : Critères diagnostiques de la maladie d'Alzheimer, NINCDS-ADRDA

#### 1. Critères de maladie d'Alzheimer probable :

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

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

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

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

- période de plateaux au cours de l'évolution

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

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

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

#### 5. Le diagnostic clinique de la maladie d'Alzheimer possible :

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

#### 6. Les critères pour le diagnostic de maladie d'Alzheimer certaine sont :

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

**Annexe 2 : Critères diagnostiques de la démence de type Alzheimer,**  
**DSM-IV-TR**

A. Apparition de déficits cognitifs multiples, comme en témoignent à la fois :

1. une altération de la mémoire (altération de la capacité à apprendre des informations nouvelles ou à se rappeler les informations apprises antérieurement) ;
2. une (ou plusieurs) des perturbations cognitives suivantes :
  - a. aphasie (perturbation du langage)
  - b. apraxie (altération de la capacité à réaliser une activité motrice malgré des fonctions motrices intactes)
  - c. agnosie (impossibilité de reconnaître ou d'identifier des objets malgré des fonctions sensorielles intactes)
  - d. perturbation des fonctions exécutives (faire des projets, organiser, ordonner dans le temps, avoir une pensée abstraite).

B. Les déficits cognitifs des critères A1 et A2 sont tous les deux à l'origine d'une altération significative du fonctionnement social ou professionnel et représentent un déclin significatif par rapport au niveau de fonctionnement antérieur.

C. L'évolution est caractérisée par un début progressif et un déclin cognitif continu.

D. Les déficits cognitifs des critères A1 et A2 ne sont pas dus :

1. à d'autres affections du système nerveux central qui peuvent entraîner des déficits progressifs de la mémoire et du fonctionnement cognitif (par exemple : maladie cérébrovasculaire, maladie de Parkinson, maladie de Huntington, hématome sous-dural, hydrocéphalie à pression normale, tumeur cérébrale) ;
2. à des affections générales pouvant entraîner une démence (par exemple : hypothyroïdie, carence en vitamine B12 ou en folates, pellagre, hypercalcémie, neurosyphilis, infection par le VIH) ;
3. à des affections induites par une substance.

E. Les déficits ne surviennent pas de façon exclusive au cours de l'évolution d'un syndrome confusionnel.

F. La perturbation n'est pas mieux expliquée par un trouble de l'Axe I (par exemple : trouble dépressif majeur, schizophrénie).

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

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

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

Préciser le sous-type :

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

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

## Annexe 3 : SH FORM43 : Peptides amyloïdes dans le LCS

### LUMIPULSE®

	VERIFICATION (PORTEE A) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE	
POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	Peptides amyloïdes dans le LCS LUMIPULSE®	V : 1
		Page 7 sur 21

#### EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, ...) : .....

REPETABILITE Applicable <input checked="" type="checkbox"/> non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne (pg/mL)	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur (concentration pg/ml)	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source <sup>5</sup> )	Conclusion <sup>6</sup>
POOL de LCR	6	540	11	2.0	1.7 (409)	2.1	Conforme
POOL de LCR	10	871	11	1.3	1.0 (773)	1.4	Conforme
POOL de LCR	6	1040	35	3.4	1.0 (1228)	/	Conforme

<sup>4</sup> Kollhoff A. et al. *Frontiers in aging neuroscience* 2018 Aug 22;10:253.  
Argumentaire de la conclusion : Résultats conformes

FIDELITE INTERMEDIAIRE Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne (pg/mL)	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur (concentration pg/mL)	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source <sup>5</sup> )	Conclusion <sup>5</sup>
Niveau L1	7	382	9	2.4	2.3 (409)	25	Conforme
Niveau L2	7	734	18	2.5	1.9 (773)	25	Conforme
Niveau L3	7	1060	27	2.3	2.3 (1228)	25	Conforme

<sup>4</sup> INSTAND  
Argumentaire de la conclusion : Résultats conformes

VARIABILITE INTER-OPERATEURS Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input checked="" type="checkbox"/>	
Opérateur évalué 1	Essai sur site – résultats de la variabilité
Opérateur évalué 2	
....	

Argumentaire de la conclusion : Analyseur automatique, aucune influence de l'opérateur

<sup>5</sup> Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.  
<sup>6</sup> Conforme/non conforme

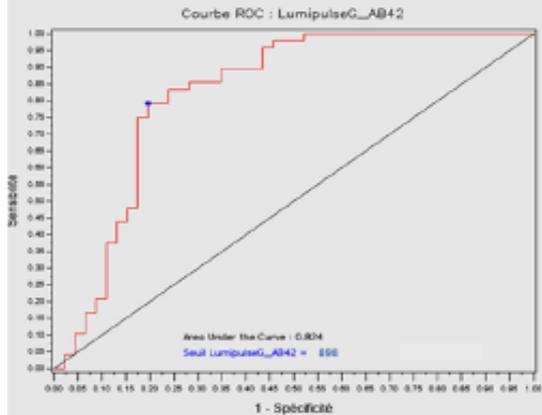
	<b>VERIFICATION (PORTEE A) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE</b>	
<b>POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE</b>	<b>Peptides amyloïdes dans le LCS LUMIPULSE®</b>	<b>V : 1</b>
		<b>Page 8 sur 21</b>

JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>								
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Valeurs Labo	Cible (groupe de pairs)	Biais (%) /groupe de pairs	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) / moyenne générale	Biais (%) Limite <sup>a</sup>	Conclusion <sup>b</sup>
Echantillon CIQ niveau 1								
Echantillon CIQ niveau 2								

Argumentaire de la conclusion : Pas de CIQ externalisés disponibles

EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEO/CNQ) Contrôles quantitatifs <input checked="" type="checkbox"/> ; Contrôles qualitatifs <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Valeur Labo	Cible (groupe de pairs)	Cible (toutes techniques)	Biais (%) / groupe de pairs	Biais (%) / toute technique	Biais (%) limite <sup>a</sup>	Conclusion <sup>b</sup>
				A renseigner pour les contrôles quantitatifs			

Argumentaire de la conclusion : en cours

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Vrais positifs Faux positifs Vrais négatifs Faux négatifs	<div style="text-align: center;">  <p style="text-align: center;">Courbe ROC : LumipulseG_AB42</p> <p style="text-align: center;">Area Under the Curve : 0.804 Seuil LumipulseG_AB42 = 898</p> </div> <p>           Se = 0,79            Spe = 0,80            VPP = 0,81            VPN = 0,79            Cut-off optimal : &gt; 898 pg/mL (kits non standardisés IFCC)         </p>

Argumentaire de la conclusion : Résultats acceptables pour la pratique clinique

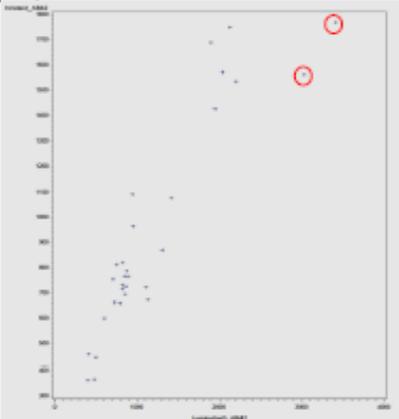
	<b>VERIFICATION (PORTEE A) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE</b>	
<b>POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE</b>	<b>Peptides amyloïdes dans le LCS LUMIPULSE®</b>	<b>V : 1</b>
		Page 9 sur 21

INCERTITUDE DE MESURE (niveau, choix du mode de calcul, interprétation) : Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) <input type="checkbox"/> ; calcul <input checked="" type="checkbox"/>		
	Incertitudes calculées	Exigence de performances
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	Formule utilisée	Référence
Quantification de l'incertitude (niveau 1) :	Niveau 1 en valeur absolue = U ou Niveau 1 en valeur absolue = U%	Exigences en fidélité, justesse et incertitude
Quantification de l'incertitude (niveau 2) :	Niveau 2 en valeur absolue = U ou Niveau 2 en valeur absolue = U%	Exigences en fidélité, justesse et incertitude
Quantification de l'incertitude (niveau xxx) :	Niveau xxx en valeur absolue = U ou Niveau xxx en valeur absolue = U%	Exigences en fidélité, justesse et incertitude

Argumentaire de la conclusion (impact sur la zone décisionnelle ?) : Pas de CIQ externalisés disponibles

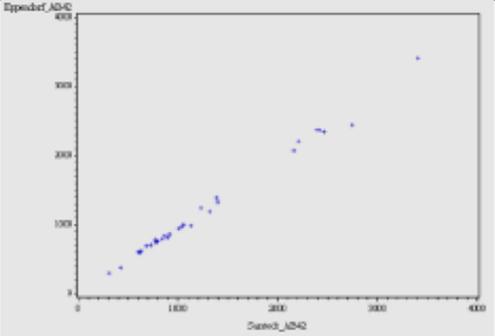
LIMITE DE DETECTION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Limite de détection :	7.17 pg/mL (notice fournisseur FR155951 Octobre 2017 (ver.2))

Argumentaire de la conclusion : Convient aux besoins du laboratoire

COMPARAISON DE METHODES : Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	Références méthodes
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :	INNOTEST® β-AMYLOID <sub>1-42</sub> , Immunoanalyse ELISA (cut-off : N > 700 pg/mL)
Nombre de mesures :	30
Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :	Min = 400 pg/mL Max = 3409 pg/mL
Méthode d'exploitation des résultats :	Droite des moindres carrés (statistiques réalisées par le service de statistique du CHU de Lille)
Equation de la droite de régression :	 $Y (\text{A}\beta_{1-42} \text{ Lumipulse}^*) = -93.6 + 1.3 \times (\text{A}\beta_{1-42} \text{ Innotest}^*), R^2 = 0.90$
Diagramme des différences et/ou des rapports :	2 déviants

Argumentaire de la conclusion : Convient aux besoins du laboratoire

	<b>VERIFICATION (PORTEE A) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE</b>	
<b>POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE</b>	<b>Peptides amyloïdes dans le LCS LUMIPULSE®</b>	<b>V : 1</b>
		<b>Page 10 sur 21</b>

<b>COMPARAISON DE METHODES : (selon tubes d'aliquotage : microtubes sarstedt® en polypropylène de 1.5 mL, référence 72.703.406 à partir du 01/01/2019)</b> Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	Références méthodes
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :	microtubes d'aliquotage eppendorf® polypropylène de 1.5 mL (cut-off : N > 700 pg/mL), jusqu'au 31/12/2018
Nombre de mesures :	30
Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :	Min = 308 pg/mL Max = 3409 pg/mL
Méthode d'exploitation des résultats :	Droite des moindres carrés (statistiques réalisées par le service de statistique du CHU de Lille)
Equation de la droite de régression :	 <p><math>Y(\text{Sarstedt}^*) = 18.9 + 1.024x (\text{Eppendorf}^*), R^2 = 0.994</math></p>
Diagramme des différences et/ou des rapports :	0 déviant
Argumentaire de la conclusion : Convient aux besoins du laboratoire	

<b>COMPARAISON DE METHODES : selon standardisation IFCC</b> Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	Re standardisation du Lumipulse G β-Amyloïd 1-42, ref 00003, Fujirebio®, source : ERM-DA480-481 IFCC report.pdf
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :	
Nombre de mesures :	
Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :	
Méthode d'exploitation des résultats :	
Equation de la droite de régression :	$Y(A\beta_{1-42} \text{ Lumipulse}^* \text{ IFCC}) = (1/1.46) \times (A\beta_{1-42} \text{ Lumipulse}^* \text{ IFCC})$
Diagramme des différences et/ou des rapports :	
Argumentaire de la conclusion : Convient aux besoins du laboratoire	

	<b>VERIFICATION (PORTEE A) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE</b>	
<b>POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE</b>	<b>Peptides amyloïdes dans le LCS LUMIPULSE®</b>	<b>V : 1</b>
		<b>Page 11 sur 21</b>

ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, ...) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/> - kits non IFCC		
Limite de détection :	7.17 pg/mL (notice fournisseur FRI55951 Octobre 2017 (ver.2))	
Limite de quantification :	14.02 pg/mL (notice fournisseur FRI55951 Octobre 2017 (ver.2))	
Limite supérieure de linéarité :	2069 pg/mL (notice fournisseur FRI55951 Octobre 2017 (ver.2))	

Argumentaire de la conclusion : convient aux besoins du laboratoire

INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, ... - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Hémolyse	Aucune interférence jusqu'à une concentration de 50 mg/dL d'Hb (notice fournisseur FRI55951 Octobre 2017 (ver.2))
Turbidité	
Bilirubine, ictère	
Médicaments	
...	

Argumentaire de la conclusion : Acceptable pour utilisation en pratique clinique

CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, pHCC, ...): détermination sur site	0 % de contamination d'un échantillon à 531 pg/mL par un échantillon à 1858 pg/mL
Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, ...):	

Argumentaire de la conclusion : Convient aux besoins du laboratoire.

ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Paramètres sensibles testés (t°, pH, position sur un support, ...)	
Stabilité des réactifs après ouverture, embarques, ...	

Argumentaire de la conclusion : non indispensable en portée A

INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Valeurs de référence	Non standardisé IFCC : N > 898 pg/mL Standardisé IFCC : N > 615 pg/mL (détermination sur site, référence 1)

1 : Re standardisation du Lumipulse G β-Amyloïd 1-42, ref 00003, Fujirebio®, source : ERM-DA480-481\_IFCC\_report.pdf

Argumentaire de la conclusion : Conforme pour l'utilisation clinique

	<b>VERIFICATION (PORTEE A) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE</b>	
<b>POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE</b>	<b>Peptides amyloïdes dans le LCS LUMIPULSE®</b>	<b>V : 1</b>
		<b>Page 13 sur 21</b>

**EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE**

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, ...) : .....

<b>REPETABILITE A<math>\beta_{1-40}</math></b> Applicable <input checked="" type="checkbox"/> non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne (pg/mL)	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur (concentration pg/ml)	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source <sup>8</sup> )	Conclusion <sup>9</sup>
POOL de LCR	9	8335.9	134.9	1.6	2.1 (7256)		Conforme
POOL de LCR	9	11698.8	104.7	0.9	1.9 (10213)		Conforme
POOL de LCR	9	18632.4	174.1	0.9	2.0 (18994)		Conforme

Argumentaire de la conclusion : Résultats conformes (CV inférieurs au CV acceptables pour la répétabilité)

<b>REPETABILITE A<math>\beta_{1-42}</math>/A<math>\beta_{1-40}</math></b> Applicable <input checked="" type="checkbox"/> non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source <sup>10</sup> )	Conclusion <sup>11</sup>
POOL de LCR	9	0.10	0.00	1.0		25	Conforme
POOL de LCR	9	0.08	0.00	1.3		25	Conforme
POOL de LCR	9	0.07	0.00	0.6		25	Conforme

10. INSTAND

Argumentaire de la conclusion : Résultats conformes

<b>FIDELITE INTERMEDIAIRE A<math>\beta_{1-40}</math></b> Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne (pg/mL)	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur (concentration pg/mL)	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source <sup>8</sup> )	Conclusion <sup>12</sup>
Niveau L1	10	3773.8	179.4	4.8	3.4 (4136)	25	Conforme
Niveau L2	10	9601.6	265.8	2.8	2.6 (9363)	25	Conforme
Niveau L3	10	21421	751.1	3.7	3.1 (18994)	25	Conforme

12. INSTAND

Argumentaire de la conclusion : Résultats acceptables

<sup>8</sup> Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.

<sup>9</sup> Conforme/non conforme

<sup>10</sup> Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.

<sup>11</sup> Conforme/non conforme

	VERIFICATION (PORTEE A) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE	
POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	Peptides amyloïdes dans le LCS LUMIPULSE®	V : 1
		Page 14 sur 21

FIDELITE INTERMEDIAIRE $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne (pg/mL)	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source <sup>4</sup> )	Conclusion <sup>13</sup>
Niveau L1	5	0.100	0.00	1.8		25	Conforme
Niveau L2	5	0.078	0.00	1.0		25	Conforme
Niveau L3	5	0.068	0.00	0.6		25	Conforme

14. INSTANT

Argumentaire de la conclusion : Résultats acceptables

VARIABILITE INTER-OPERATEURS Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input checked="" type="checkbox"/>	
Opérateur évalué 1	Essai sur site – résultats de la variabilité
Opérateur évalué 2	
...	

Argumentaire de la conclusion : Analyseur automatique, aucune influence de l'opérateur

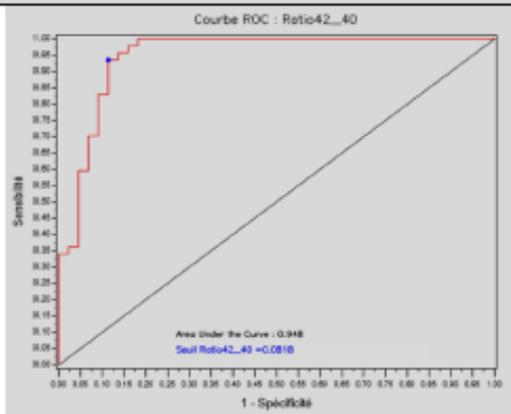
JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>								
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Valeurs Labo	Cible (groupe de paires)	Biais (%) /groupe de paires	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) / moyenne générale	Biais (%) Limite <sup>4</sup>	Conclusion <sup>4</sup>
Echantillon CIQ niveau 1								
Echantillon CIQ niveau 2								

Argumentaire de la conclusion : pas de CIQ externalisés disponibles

EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNO) Contrôles quantitatifs <input checked="" type="checkbox"/> ; Contrôles qualitatifs <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Valeur Labo	Cible (groupe de paires)	Cible (toutes techniques)	Biais (%) / groupe de paires	Biais (%) / toute technique	Biais (%) limite <sup>4</sup>	Conclusion <sup>4</sup>
							A renseigner pour les contrôles quantitatifs

Argumentaire de la conclusion : en cours

	<b>VERIFICATION (PORTEE A) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE</b>	
<b>POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE</b>	<b>Peptides amyloïdes dans le LCS LUMIPULSE®</b>	<b>V : 1</b>
		<b>Page 15 sur 21</b>

<b>SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE ratio A<math>\beta</math><sub>1-42</sub>/A<math>\beta</math><sub>1-40</sub></b> (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>	
Vrais positifs	
Faux positifs	
Vrais négatifs	
Faux négatifs	
	Se = 0,94 Spe = 0,89 VFP = 0,90 VPN = 0,93 Cut-off optimal : A $\beta$ <sub>1-42</sub> /A $\beta$ <sub>1-40</sub> > 8.2% (kits A $\beta$ <sub>1-42</sub> non standardisés IFCC)

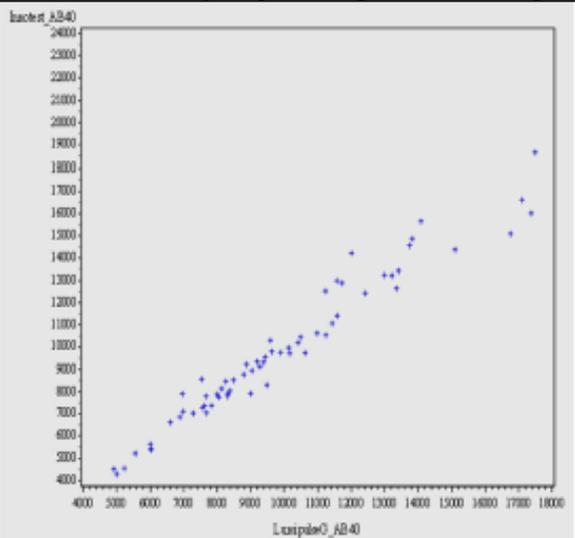
Argumentaire de la conclusion : Résultats acceptables pour la pratique clinique

<b>INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) :</b> Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) <input type="checkbox"/> ; calcul <input checked="" type="checkbox"/>		
	Incertitudes calculées	Exigence de performances
Mode de calcul (cf. SH-GTA 14) :	Formule utilisée	Référence
Quantification de l'incertitude (niveau 1) :	Niveau 1 en valeur absolue = U ou Niveau 1 en valeur absolue = U%	Exigences en fidélité, justesse et incertitude
Quantification de l'incertitude (niveau 2) :	Niveau 2 en valeur absolue = U ou Niveau 2 en valeur absolue = U%	Exigences en fidélité, justesse et incertitude
Quantification de l'incertitude (niveau xxx) :	Niveau xxx en valeur absolue = U ou Niveau xxx en valeur absolue = U%	Exigences en fidélité, justesse et incertitude

Argumentaire de la conclusion (impact sur la zone décisionnelle ?) : Pas de CIQ externalisés disponibles

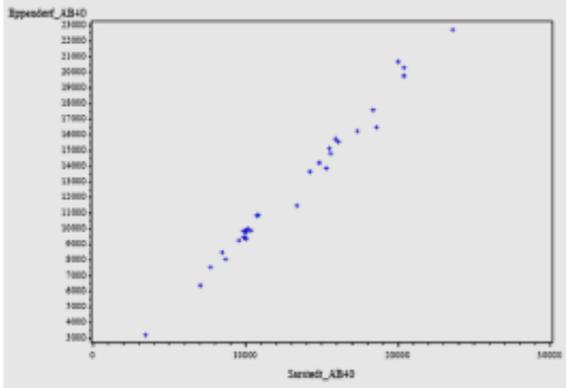
<b>LIMITE DE DETECTION A<math>\beta</math><sub>1-40</sub> (étude expérimentale indispensable en portée B)</b> (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Limite de détection :	2,78 pg/mL (notice fournisseur FRI20903 nov.2018 ver.1)
Argumentaire de la conclusion : Convient aux besoins du laboratoire	

	<b>VERIFICATION (PORTEE A) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE</b>	
<b>POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE</b>	<b>Peptides amyloïdes dans le LCS LUMIPULSE®</b>	<b>V : 1</b>
		<b>Page 16 sur 21</b>

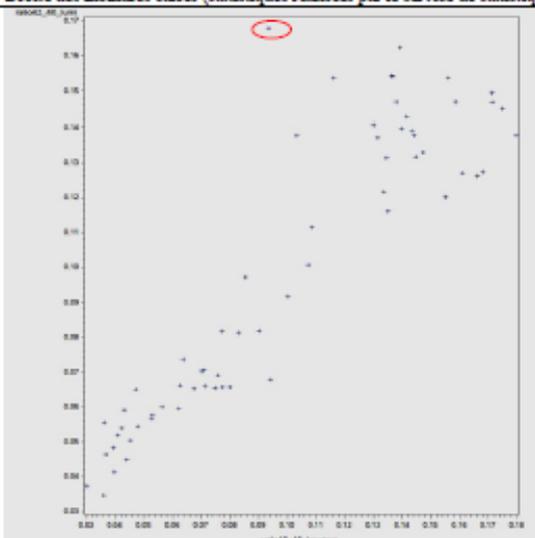
<b>COMPARAISON DE METHODES : Corrélation dosages du peptide A<math>\beta_{1-40}</math></b> Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Données bibliographiques (fournisseurs, publications, ...) :	Références méthodes
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBAD :	INNOTEST® $\beta$ -AMYLOID <sub>1-40</sub>
Nombre de mesures :	30
Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :	Min = 4924 pg/mL Max = 17496 pg/mL
Méthode d'exploitation des résultats :	Droite des moindres carrés (statistiques réalisées par le service de statistique du CHU de Lille)
Equation de la droite de regression :	 <p><math>Y (A\beta_{1-40} \text{ Lumipulse}^*) = 793 + 0.92 \times (A\beta_{1-40} \text{ Innotest}^*), R^2 = 0.95</math></p>
Diagramme des différences et/ou des rapports :	0 déviant

Argumentaire de la conclusion : Convient aux besoins du laboratoire

	<b>VÉRIFICATION (PORTEE A) D'UNE MÉTHODE DE BIOLOGIE MÉDICALE</b>	
<b>POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE</b>	<b>Peptides amyloïdes dans le LCS LUMIPULSE®</b>	<b>V : 1</b>
		<b>Page 17 sur 21</b>

<b>COMPARAISON DE MÉTHODES A<math>\beta_{1-40}</math>: (selon tubes d'aliquotage : microtubes sarstedt® en polypropylène de 1.5 mL, référence 72.703.406)</b>	
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	Références méthodes
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :	INNOTEST® $\beta$ -AMYLOID <sub>1-40</sub> , Immunoanalyse ELISA, microtubes d'aliquotage eppendorf® polypropylène de 1.5 mL
Nombre de mesures :	30
Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :	Min = 3452 pg/mL Max = 23598 pg/mL
Méthode d'exploitation des résultats :	Droite des moindres carrés (statistiques réalisées par le service de statistique du CHU de Lille)
Equation de la droite de régression :	 <p><math>Y(\text{Sarstedt}^*) = 294.4 + 1.02x (\text{Eppendorf}^*), R^2 = 0.986</math></p>
Diagramme des différences et/ou des rapports :	0 deviant
Argumentaire de la conclusion : Convient aux besoins du laboratoire	

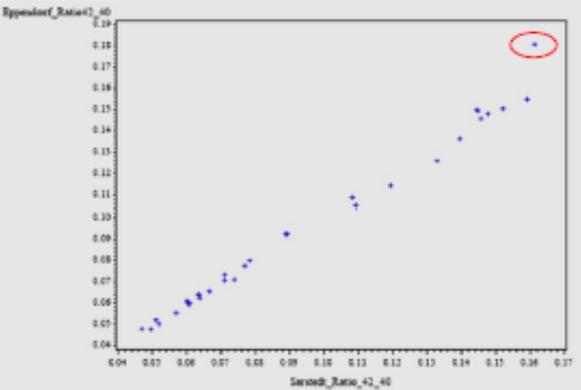
	<b>VERIFICATION (PORTEE A) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE</b>	
<b>POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE</b>	<b>Peptides amyloïdes dans le LCS LUMIPULSE®</b>	<b>V : 1</b>
		<b>Page 18 sur 21</b>

<b>COMPARAISON DE METHODES : corrélation rapport <math>A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}</math></b> Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	Références méthodes
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :	INNOTEST® $\beta$ -AMYLOID <sub>1-40</sub> , INNOTEST® $\beta$ -AMYLOID <sub>1-42</sub> . (cut-off : N > 6.0 %)
Nombre de mesures :	30
Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :	Min = 3.5 % Max = 16.8 %
Méthode d'exploitation des résultats :	Droite des moindres carrés (statistiques réalisées par le service de statistique du CHU de Lille)
Equation de la droite de régression :	 <p style="text-align: center;"><math>Y (A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40} \text{ Lumipulse}^*) = 0.017 + 0.81 \times (A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40} \text{ Innotest}^*)</math>. <math>R^2 = 0.87</math></p>
Diagramme des différences et/ou des rapports :	1 déviant

Argumentaire de la conclusion : Convient aux besoins du laboratoire

	<b>VERIFICATION (PORTEE A) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE</b>	
<b>POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE</b>	<b>Peptides amyloïdes dans le LCS LUMIPULSE®</b>	<b>V : 1</b>
		<b>Page 19 sur 21</b>

**COMPARAISON DE METHODES ratio  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$  : (selon tubes d'aliquotage : tubes microtubes sarstedt® en polypropylène de 1.5 mL, référence 72.703.406, à partir du 01/01/19)**  
 Applicable  ; non applicable (à justifier)

Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	Références méthodes
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :	INNOTESt® $\beta$ -AMYLOID <sub>1-40</sub> , INNOTESt® $\beta$ -AMYLOID <sub>1-42</sub> , Immunanalyse ELISA, microtubes d'aliquotage eppendorf® polypropylène de 1.5 mL (cut-off : N > 6.0 %).
Nombre de mesures :	30
Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :	Min = 4.7 % Max = 15.9 %
Méthode d'exploitation des résultats :	Droite des moindres carrés (statistiques réalisées par le service de statistique du CHU de Lille)
Equation de la droite de régression :	 <p><math>Y(\text{Sarstedt}^*) = 0.0003 + x(\text{Eppendorf}^*)</math>, <math>R^2 = 0.994</math></p>
Diagramme des différences et/ou des rapports :	1 déviant

Argumentaire de la conclusion : Convient aux besoins du laboratoire

**ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B)**  
 (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, ...)  
 Applicable  ; non applicable (à justifier)

Limite de détection :	2.78 pg/mL (notice fournisseur (notice fournisseur FRI20903 nov.2018 ver.1)	
Limite de quantification :	4.08 pg/mL (notice fournisseur (notice fournisseur FRI20903 nov.2018 ver.1)	
Limite supérieure de linéarité :	18644 pg/mL (notice fournisseur (notice fournisseur FRI20903 nov.2018 ver.1)	

Argumentaire de la conclusion : Convient aux besoins du laboratoire

	<b>VERIFICATION (PORTEE A) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE</b>	
<b>POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE</b>	<b>Peptides amyloïdes dans le LCS LUMIPULSE®</b>	<b>V : 1</b>
		<b>Page 20 sur 21</b>

<b>INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B)</b> (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, ... - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
<b>Hémolyse</b>	Aucune interférence jusqu'à une concentration de 12.5 mg/dL d'Hb (notice fournisseur FR20903 Novembre 2018 (ver.1))
<b>Turbidité</b>	Aucune interférence jusqu'à une concentration de 40 mg/dL de triglycérides (notice fournisseur FR20903 Novembre 2018 (ver.1))
<b>Bilirubine, ictère</b>	Aucune interférence jusqu'à une concentration de 0.5 mg/dL de bilirubine (notice fournisseur FR20903 Novembre 2018 (ver.1))
<b>Médicaments</b>	
...	

Argumentaire de la conclusion : Convient aux besoins du laboratoire

<b>CONTAMINATION A<math>\beta_{1-40}</math> (étude expérimentale indispensable en portée B)</b> (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
<b>Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, <math>\beta</math>HCG, ...)</b>	0 % de contamination d'un échantillon à 9086 pg/mL par un échantillon à 16398 pg/mL
<b>Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, ...)</b>	

Argumentaire de la conclusion : Convient aux besoins du laboratoire.

<b>ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS</b> (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
<b>Paramètres sensibles testés (T°, pH, position sur un support, ...)</b>	
<b>Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ...</b>	

Argumentaire de la conclusion : non indispensable en portée A

<b>INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B)</b> Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
<b>Valeurs de référence</b>	Rapport A $\beta_{1-42}$ /A $\beta_{1-40}$ non standardisé IFCC : N > 8.2 % Rapport A $\beta_{1-42}$ /A $\beta_{1-40}$ standardisé IFCC : N > 5.6 % (détermination sur site, référence)

1 : Re standardisation du Lumipulse G  $\beta$ -Amyloïd 1-42, ref 00003, Fujirebio®, source : ERM-DA480-481\_IFCC\_report.pdf

Argumentaire de la conclusion : Conforme pour l'utilisation clinique

## Annexe 4 : SH FORM43 : Protéine TAU dans le LCS

### LUMIPULSE®

	<b>VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION (PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE</b>	
<b>POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE</b>	<b>Protéine TAU dans le LCS LUMIPULSE®</b>	<b>V : 1</b>
		Page 7 sur 11

#### EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, ...) : .....

<b>REPETABILITE</b> Applicable <input checked="" type="checkbox"/> non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne (pg/mL)	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur (concentration pg/mL)	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source <sup>4</sup> )	Conclusion <sup>5</sup>
POOL de LCR.	6	221	15	6.7	7.4 (275)		Conforme
POOL de LCR.	10	578	8.9	1.5	3.6 (500)		Conforme
POOL de LCR.	6	764	31	4.1	2.0 (783)		Conforme

Argumentaire de la conclusion : Résultats conformes (CV inférieurs au CV acceptables pour la répétabilité)

<b>FIDELITE INTERMEDIAIRE</b> Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur (concentration pg/mL)	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source <sup>4</sup> )	Conclusion <sup>5</sup>
Ctrl interne Niveau L1	7	294	15	5.0	8.3 (275)	25	Conforme
Ctrl interne Niveau L2	7	497	12	2.3	4.0 (500)	25	Conforme
Ctrl interne Niveau L3	7	809	25	3.1	2.2 (783)	25	Conforme

<sup>4</sup> INSTAND

Argumentaire de la conclusion : Résultats conformes

<b>VARIABILITE INTER-OPERATEURS</b> Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input checked="" type="checkbox"/>	
Opérateur évalué 1	Essai sur site – résultats de la variabilité
Opérateur évalué 2	
...	

Argumentaire de la conclusion : Analyseur automatique, aucune influence de l'opérateur

<sup>4</sup> Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.

<sup>5</sup> Conforme/non conforme

	<b>VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION (PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE</b>	
<b>POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE</b>	<b>Protéine TAU dans le LCS LUMIPULSE®</b>	<b>V : 1</b>
		Page 8 sur 11

JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>								
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Valeurs Labo	Cible (groupe de pairs)	Biais (%) /groupe de pairs	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) / moyenne générale	Biais (%) Limite <sup>a</sup>	Conclusion <sup>a</sup>
Echantillon CIQ niveau 1								
Echantillon CIQ niveau 2								

Argumentaire de la conclusion : pas de CIQ externalisés disponibles

EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNO) Contrôles quantitatifs <input checked="" type="checkbox"/> ; Contrôles qualitatifs <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Valeur Labo	Cible (groupe de pairs)	Cible (toutes techniques)	Biais (%) / groupe de pairs	Biais (%) / toute technique	Biais (%) limite <sup>a</sup>	Conclusion <sup>a</sup>
							A renseigner pour les contrôles quantitatifs

Argumentaire de la conclusion : en cours

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Vrais positifs Faux positifs Vrais négatifs Faux négatifs	<p>Se = 0,89            Spe = 0,85            VPP = 0,86            VPN = 0,89            Cut-off optimal : &lt; 525 pg/mL</p>

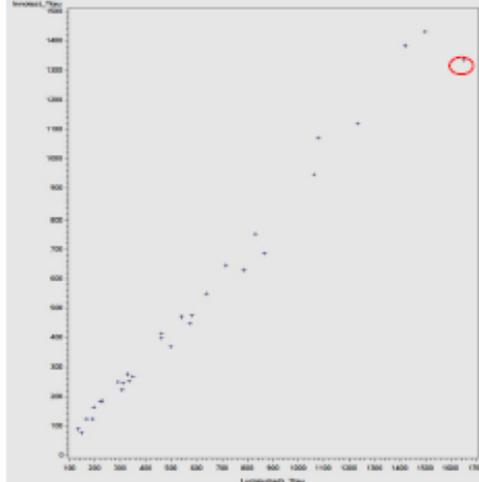
Argumentaire de la conclusion : Résultats acceptables pour la pratique clinique

	<b>VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION (PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE</b>	
<b>POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE</b>	<b>Protéine TAU dans le LCS LUMIPULSE®</b>	<b>V : 1</b>
		Page 9 sur 11

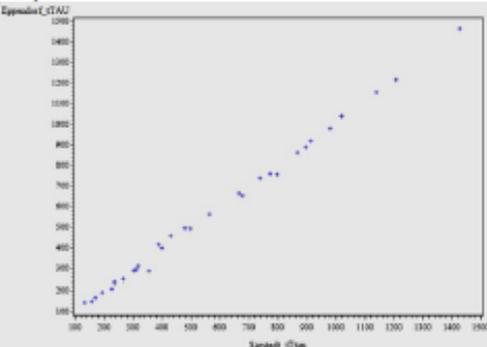
<b>INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) :</b> Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) <input type="checkbox"/> ; calcul <input checked="" type="checkbox"/>		
	Incertitudes calculées	Exigence de performances
<b>Mode de calcul (cf. SH-GTA 14) :</b>	Formule utilisée	Référence
<b>Quantification de l'incertitude (niveau I) :</b>	Niveau 1 en valeur absolue $\pm U$ ou Niveau 1 en valeur absolue $\pm U\%$	Exigences en fidélité, justesse et incertitude
<b>Quantification de l'incertitude (niveau 2) :</b>	Niveau 2 en valeur absolue $\pm U$ ou Niveau 2 en valeur absolue $\pm U\%$	Exigences en fidélité, justesse et incertitude
<b>Quantification de l'incertitude (niveau xxx) :</b>	Niveau xxx en valeur absolue $\pm U$ ou Niveau xxx en valeur absolue $\pm U\%$	Exigences en fidélité, justesse et incertitude

Argumentaire de la conclusion (impact sur la zone décisionnelle ?) : Pas de CIQ externalisés disponibles

<b>LIMITE DE DETECTION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/></b>	
<b>Limite de détection :</b>	141 pg/mL (notice fournisseur FRI32291 Juillet 2017 (ver 1))
Argumentaire de la conclusion : convient aux besoins du laboratoire	

<b>COMPARAISON DE METHODES :</b> Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
<b>Données bibliographiques (fournisseurs, publications, ...) :</b>	Références méthodes
<b>Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :</b>	INNOTEST® hTAU, Immunoanalyse ELISA (cut-off : N < 400 pg/mL)
<b>Nombre de mesures :</b>	30
<b>Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :</b>	Min = 134 pg/mL Max = 1497 pg/mL
<b>Méthode d'exploitation des résultats :</b>	Droite des moindres carrés (statistiques réalisées par le service de statistique du CHU de Lille)
<b>Equation de la droite de régression :</b>	 <p>Y (hTAU Lumipulse*) = 67.6 + 1.01x (hTAU Innotest*) R<sup>2</sup> = 0.99</p>
<b>Diagramme des différences et/ou des rapports :</b>	1 déviant
Argumentaire de la conclusion : Convient aux besoins du laboratoire	

	<b>VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION (PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE</b>	
<b>POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE</b>	<b>Protéine TAU dans le LCS LUMIPULSE®</b>	V : 1
		Page 10 sur 11

COMPARAISON DE METHODES : (Selon tubes d'aliquotage : microtubes sarstedt® en polypropylène de 1.5 mL, référence 72.703.406, à partir du 01/01/19) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	Références méthodes
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :	INNOVATEST® hTAU, Immunoanalyse ELISA, microtubes d'aliquotage eppendorf® polypropylène de 1.5 mL (cut-off : N < 400 pg/mL).
Nombre de mesures :	30
Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :	Min = 134 pg/mL Max = 1650 pg/mL
Méthode d'exploitation des résultats :	Droite des moindres carrés (statistiques réalisées par le service de statistique du CHU de Lille)
Equation de la droite de régression :	 <p>Y (Sarstedt*) = 12.9 + 0.98X(Eppendorf*), R² = 0.997</p>
Diagramme des différences et/ou des rapports :	0 déviant

Argumentaire de la conclusion : Convient aux besoins du laboratoire

<b>ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, ...) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/></b>	
Limite de détection :	141 pg/mL (notice fournisseur FRI32291 Juillet 2017 (ver.1))
Limite de quantification :	141 pg/mL (notice fournisseur FRI32291 Juillet 2017 (ver.1))
Limite supérieure de linéarité :	1919 pg/mL (notice fournisseur FRI32291 Juillet 2017 (ver.1))

Argumentaire de la conclusion : convient aux besoins du laboratoire

	<b>VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION (PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE</b>	
<b>POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE</b>	<b>Protéine TAU dans le LCS LUMIPULSE®</b>	<b>V : 1</b>
		<b>Page 11 sur 11</b>

**INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B)**  
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, ... - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire)  
Applicable  ; non applicable (à justifier)

<b>Hémolyse</b>	Aucune interférence jusqu'à une concentration de 53 mg/dL d'Hb (notice fournisseur FRL32291 Juillet 2017 (ver.1))
<b>Turbidité</b>	
<b>Bilirubine, ictère</b>	
<b>Médicaments</b>	
...	

Argumentaire de la conclusion : Acceptable pour utilisation en pratique clinique

**CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B)**  
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles)  
Applicable  ; non applicable (à justifier)

<b>Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, βHCG, ...):</b>	0 % de contamination d'un échantillon à 240 pg/mL par un échantillon à 1525 pg/mL.
<b>Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, ...):</b>	

Argumentaire de la conclusion : Convient aux besoins du laboratoire.

**ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS**  
(étude expérimentale indispensable en portée B)  
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles)  
Applicable  ; non applicable (à justifier)

<b>Paramètres sensibles testés (t°, pH, position sur un support, ...)</b>	
<b>Stabilité des réactifs après ouverture, embarques, ...</b>	

Argumentaire de la conclusion : non indispensable en portée A

**INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B)**  
Applicable  ; non applicable

<b>Valeurs de référence</b>	N < 525 pg/mL. (détermination sur site)
-----------------------------	---

Argumentaire de la conclusion : Conforme pour l'utilisation clinique

## Annexe 5 : SH FORM43 : Protéine PHOSPHO-TAU dans le LCS

### LUMIPULSE®

	<b>VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION (PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE</b>	
<b>POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE</b>	<b>Protéine PHOSPHO-TAU dans le LCS LUMIPULSE®</b>	<b>V : 1</b>
		Page 7 sur 11

#### EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, ...) : .....

REPETABILITE							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne (pg/mL)	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur (concentration pg/mL)	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source <sup>4</sup> )	Conclusion <sup>5</sup>
POOL de LCR	6	27	0.2	0.8	3.5 (28.5)		Conforme
POOL de LCR	6	61.5	0.5	0.8	2.9 (57.0)		Conforme
POOL de LCR	9	184.8	2.2	1.2	3.1 (95.8)		Conforme

Argumentaire de la conclusion : Résultats conformes (CV inférieurs au CV acceptables pour la répétabilité)

FIDELITE INTERMEDIAIRE							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur (concentration pg/mL)	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source <sup>4</sup> )	Conclusion <sup>5</sup>
Niveau L1	10	29.7	1	3.3	5.0 (28.5)	25	Conforme
Niveau L2	10	60.3	1.8	3.0	4.4 (57.0)	25	Conforme
Niveau L3	10	100.2	4.0	4.0	4.4 (95.8)	25	Conforme

4. INSTAND

Argumentaire de la conclusion : Résultats acceptables

VARIABILITE INTER-OPERATEURS	
Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input checked="" type="checkbox"/>	
Opérateur évalué 1	Essai sur site – résultats de la variabilité
Opérateur évalué 2	
...	

Argumentaire de la conclusion : Analyseur automatique, aucune influence de l'opérateur

JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés)								
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>								
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Valeurs Labo	Cible (groupe de pairs)	Biais (%) /groupe de pairs	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) / moyenne générale	Biais (%) Limite <sup>4</sup>	Conclusion <sup>5</sup>
Echantillon CIQ niveau 1								
Echantillon CIQ niveau 2								

Argumentaire de la conclusion : pas de CIQ externalisés disponibles

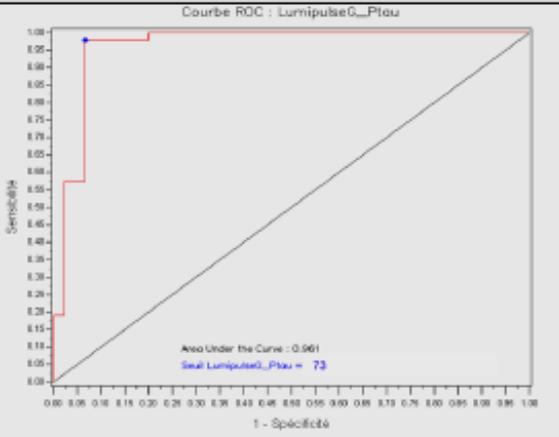
<sup>4</sup> Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.

<sup>5</sup> Conforme/non conforme

	<b>VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION (PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE</b>	
<b>POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE</b>	<b>Protéine PHOSPHO-TAU dans le LCS LUMIPULSE®</b>	<b>V : 1</b>
		<b>Page 8 sur 11</b>

EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEO/CNQ) Contrôles quantitatifs <input checked="" type="checkbox"/> ; Contrôles qualitatifs <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Valeur Labo	Cible (groupe de pairs)	Cible (toutes techniques)	Biais (%) / groupe de pairs	Biais (%) / toute technique	Biais (%) limite <sup>4</sup>	Conclusion <sup>5</sup>
				A renseigner pour les contrôles quantitatifs			

Argumentaire de la conclusion : en cours

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>	
<b>Vrais positifs</b> <b>Faux positifs</b> <b>Vrais négatifs</b> <b>Faux négatifs</b>	<p>Courbe ROC : Lumipulse0_Ptau</p>  <p>Area Under the Curve : 0,961 Seuil Lumipulse0_Ptau = 73</p> <p>Se = 0,98 Spe = 0,94 VPP = 0,94 VPN = 0,98 Cut-off optimal : &lt; 73 pg/mL</p>

Argumentaire de la conclusion : Résultats acceptables pour la pratique clinique

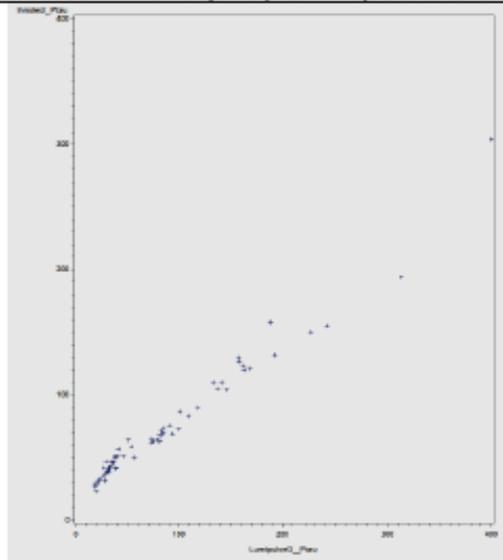
INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) : Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) <input type="checkbox"/> ; calcul <input checked="" type="checkbox"/>		
	Incertitudes calculées	Exigence de performances
<b>Mode de calcul (cf. SH-GTA 14) :</b>	Formule utilisée	Référence
<b>Quantification de l'incertitude (niveau 1) :</b>	Niveau 1 en valeur absolue = U ou Niveau 1 en valeur absolue = U%	Exigences en fidélité, justesse et incertitude
<b>Quantification de l'incertitude (niveau 2) :</b>	Niveau 2 en valeur absolue = U ou Niveau 2 en valeur absolue = U%	Exigences en fidélité, justesse et incertitude
<b>Quantification de l'incertitude (niveau xxx) :</b>	Niveau xxx en valeur absolue = U ou Niveau xxx en valeur absolue = U%	Exigences en fidélité, justesse et incertitude

Argumentaire de la conclusion (impact sur la zone décisionnelle ?) : Pas de CIQ externalisés disponibles

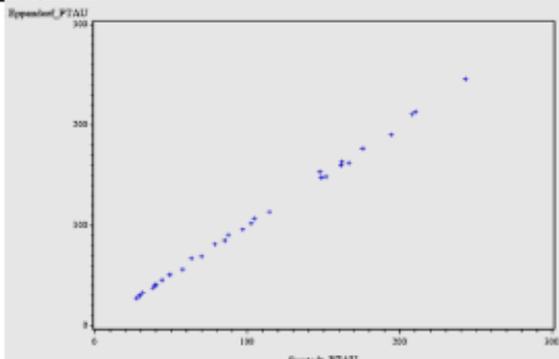
© Document interne, propriété C.H.R.U. de LILLE

	<b>VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION (PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE</b>	
<b>POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE</b>	<b>Protéine PHOSPHO-TAU dans le LCS LUMIPULSE®</b>	<b>V : 1</b>
		<b>Page 9 sur 11</b>

<b>LIMITE DE DETECTION</b> (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Limite de détection :	0.282 pg/mL (notice fournisseur FRI29776 Nov.2018 (ver.1))
Argumentaire de la conclusion : convient aux besoins du laboratoire	

<b>COMPARAISON DE METHODES :</b> Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	Références méthodes
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :	INNOTEST® PHOSPHO-TAU <sub>(181)P</sub>
Nombre de mesures :	30
Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :	Min = 18.6 pg/mL Max = 400 pg/mL
Méthode d'exploitation des résultats :	Droite des moindres carrés (statistiques réalisées par le service de statistique du CHU de Lille)
Equation de la droite de régression :	 <p>Y (P-TAU Lumipulse*) = -27 + 1.54 x (P-TAU Innotest*) R²=0.97</p>
Diagramme des différences et/ou des rapports :	0 déviant
Argumentaire de la conclusion : Convient aux besoins du laboratoire	

	<b>VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION (PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE</b>	
<b>POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE</b>	<b>Protéine PHOSPHO-TAU dans le LCS LUMIPULSE®</b>	<b>V : 1</b>
		Page 10 sur 11

<b>COMPARAISON DE METHODES : (Selon tubes d'aliqotage : microtubes sarstedt® en polypropylène de 1.5 mL, référence 72.703.406, à partir du 01/01/19) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/></b>	
Données bibliographiques (fournisseurs, publications, ...) :	Références méthodes
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :	INNOTEEST® PHOSPHO-TAU <sub>(1811)</sub> , Immunoanalyse ELISA, tubes d'aliqotage microtubes eppendorf® polypropylène de 1.5 mL (cut-off : N < 60 pg/mL).
Nombre de mesures :	30
Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :	Min = 27.3 pg/mL Max = 243.1 pg/mL
Méthode d'exploitation des résultats :	Droite des moindres carrés (statistiques réalisées par le service de statistique du CHU de Lille)
Equation de la droite de régression :	 <p><math>Y(\text{Sarstedt}^*) = -0.62 + x (\text{Eppendorf}^*)</math>, <math>R^2 = 0.999</math></p>
Diagramme des différences et/ou des rapports :	0 déviant
Argumentaire de la conclusion : Convient aux besoins du laboratoire	
<b>ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH ...) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/></b>	
Limite de détection :	0.282 pg/mL (notice fournisseur FRI29776 Nov.2018 (ver.1))
Limite de quantification :	1.058 pg/mL (notice fournisseur FRI29776 Nov.2018 (ver.1))
Limite supérieure de linéarité :	314.7 pg/mL (notice fournisseur FRI29776 Nov.2018 (ver.1))
Argumentaire de la conclusion : convient aux besoins du laboratoire	

	<b>VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION (PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE</b>	
<b>POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE</b>	<b>Protéine PHOSPHO-TAU dans le LCS LUMIPULSE®</b>	<b>V : 1</b>
		<b>Page 11 sur 11</b>

<b>INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, ... - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/></b>	
<b>Hémolyse</b>	Aucune interférence jusqu'à une concentration de 12.5 mg/dL d'Hb (notice fournisseur FRI29776 Novembre 2018 (ver.1))
<b>Turbidité</b>	Aucune interférence jusqu'à une concentration de 40 mg/dL de triglycérides (notice fournisseur FRI29776 Novembre 2018 (ver.1))
<b>Bilirubine, ictère</b>	Aucune interférence jusqu'à une concentration de 0.5 mg/dL de bilirubines (notice fournisseur FRI29776 Novembre 2018 (ver.1))
<b>Médicaments</b>	
...	

Argumentaire de la conclusion : Acceptable pour utilisation en pratique clinique

<b>CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/></b>	
<b>Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, βHCG, ...):</b>	0 % de contamination d'un échantillon à 27 pg/mL par un échantillon à 167 pg/mL
<b>Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, ...):</b>	

Argumentaire de la conclusion : Convient aux besoins du laboratoire.

<b>ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/></b>	
<b>Paramètres sensibles testés (T°, pH, position sur un support, ...)</b>	
<b>Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ...</b>	

Argumentaire de la conclusion : non indispensable en portée A

<b>INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/></b>	
<b>Valeurs de référence</b>	<b>N &lt; 73.0 pg/mL (détermination sur site)</b>

Argumentaire de la conclusion : Conforme pour l'utilisation clinique

Université de Lille  
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE  
**MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)  
Année Universitaire 2018/2019

**Nom : VAUDRAN**  
**Prénom : Lucie**

**Titre du mémoire / thèse : Dosage des biomarqueurs Tau et A $\beta$  dans le liquide cébrospinal sur l'automate Lumipulse® G600II : comparaison de méthodes, validation analytique et détermination de valeurs seuils en faveur du diagnostic de maladie d'Alzheimer.**

**Mots-clés : Biomarqueurs, Liquide cébrospinal, Alzheimer**

---

**Résumé : Introduction et objectifs :** L'augmentation de la prescription des biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer (MA) du liquide cébro-spinal (LCS) nécessite l'automatisation de leur dosage. Ainsi, l'objectif de cette étude est l'évaluation du dosage d'A $\beta$ <sub>1-42</sub>, t-Tau, P-Tau et A $\beta$ <sub>1-40</sub> sur l'automate Lumipulse® G600II.

**Matériels et méthode :** 155 échantillons de LCS dont 95 avec un diagnostic de MA ou d'une autre démence sont issus de la banque de LCS du CHU de Lille. La validation de méthode repose sur des analyses de régression linéaire entre l'ancienne technique manuelle INNOTEST® et le nouvel automate Lumipulse®, des tests de répétabilité, de fidélité intermédiaire et de stabilité. La détermination de nouveaux seuils en faveur d'une MA est réalisée par des analyses de courbes ROC.

**Résultats :** Une très bonne corrélation a été mise en évidence entre l'INNOTEST® et le Lumipulse® ( $R^2 > 0.85$ ) ainsi que de très bonnes performances analytiques pour le Lumipulse (CV de fidélité intermédiaire  $\leq 5$  % pour les quatre biomarqueurs). Les valeurs seuils en faveur d'une MA obtenues avec le Lumipulse® sont les suivantes : A $\beta$ <sub>1-42</sub> < 615 pg/mL, t-Tau > 525 pg/mL, P-Tau > 73 pg/mL, A $\beta$ <sub>1-42</sub>/A $\beta$ <sub>1-40</sub> < 5,6 %.

**Conclusion :** L'automate Lumipulse G600II® montre de bonnes performances analytiques et une bonne corrélation avec la méthode manuelle INNOTEST®. Les valeurs seuils déterminées sur la cohorte rétrospective doivent être validées sur une 2<sup>ème</sup> cohorte prospective en cours actuellement.

---

**Membres du jury :**

**Président :** M. le Professeur Thierry BROUSSEAU, PU-PH, CHRU Lille  
**Assesseur(s) :** M<sup>me</sup> le Docteur Dr Susanna SCHRAEN, MCU-PH, CHRU Lille  
M. le Professeur Pr Vincent DERAMECOURT, PU-PH, CHRU Lille  
M<sup>me</sup> le Docteur Dr Stéphanie BOMBOIS, PH, Pitié Salpêtrière APHP  
M<sup>me</sup> le Docteur Dr Malika HAMDANE, MCU, UMR – S1172