



Journée biologie praticienne 7 dec 2018

Du prélèvement au diagnostic biologique, dans les neurodégénérescences, et en particulier dans la maladie d'Alzheimer

Sylvain LEHMANN (Montpellier) / Modérateur : Jean-Marc LESSINGER (Strasbourg)



Maladies neurodégénératives

- Neurodégénérescence : atteinte irréversible du SNC
- Evolution très lente sur plusieurs années
- Pas de traitement étiologique, rares traitements symptomatiques
- Un des principaux facteur de risque : âge
- En augmentation (vieillesse de la population)
- Sous diagnostiquées
- Diagnostiquées tardivement (au stade de démence)

Maladies neurodégénératives

DLFT

Local° : frontotemporale
Macro : atrophie cérébrale
Micro : dépôts Tau (corps de Pick...)

DCL

Local° : corticale
Macro : atrophie cérébrale
Micro : corps de Lewy

Huntington

Local° : ganglions basaux
Macro : atrophie néostriatale
Micro : perte neuronale, astrocytose

Maladie à prions

Local° : selon maladie à prion
Macro : atrophie cérébrale
Micro : spongiose, dépôts de PrP^{Sc}

Maladie d'Alzheimer

Local° : hippocampe, temporopariétal
Macro : atrophie cérébrale
Micro : plaques séniles, DNF

Démence parkinsonienne

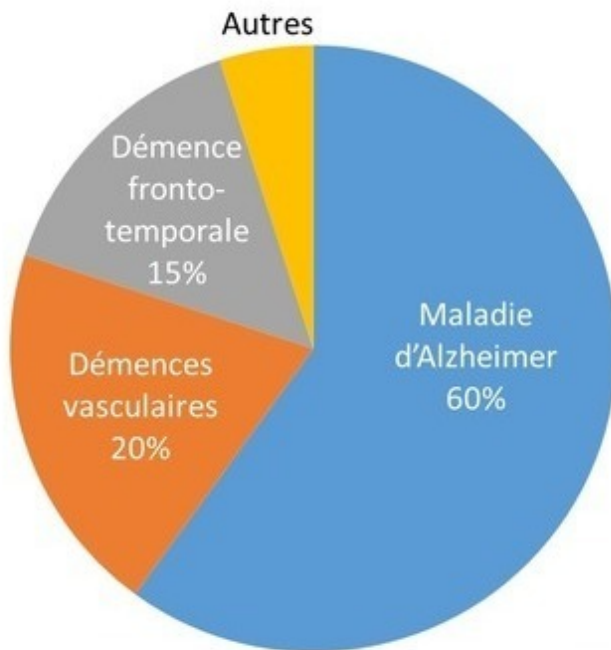
Local° : mésencéphale
Macro : dépigmentation subst noire
Micro : corps de Lewy

SLA

Local° : cortex moteur, tronc cérébral, moelle épinière
Macro : atrophie des motoneurones et muscles
Micro : corps de Lewy

Author's
copyright ©

Principales étiologies des démences



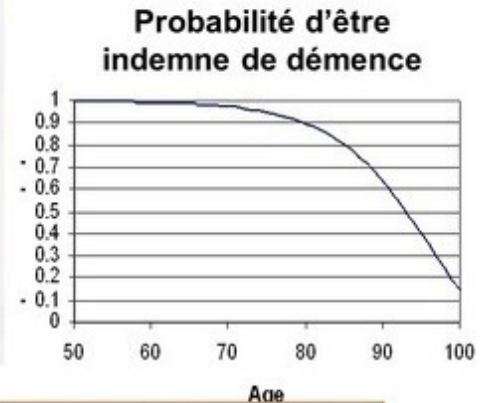
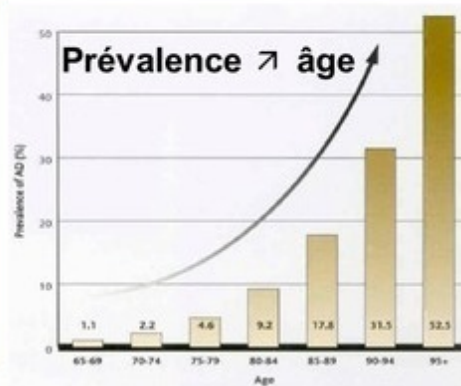
Autres :

- Démence à corps de Lewy
- Démences Parkinsoniennes
- Hydrocéphalie à pression normale
- Infectieuses (VIH, Syphilis, ...)
- Maladie de Creutzfeldt-Jakob
- Huntington
- ...

Centre Mémoire Lille - Bailleul (1992-2001) (n=4212)

Généralités sur la maladie d'Alzheimer

- Démence d'évolution lente, décrite pour la première fois en 1906 par Alois Alzheimer.
- Environ 15% des personnes de plus de 75 ans sont atteintes de démence
- Incidence : 130 000 nouveaux cas / an
- Prévalence : 850 000 cas en France
- → MA et démences = Problème majeur de santé publique



- Diagnostic précis de MA est non fait dans 50% des cas, et seulement 30 % ont un traitement adéquat.

- Existe des formes mixtes (vasculaires..) et de nombreux dg différentiels :
 - Démences fronto-temporales
 - Démence à corps de Lewy
 - Dégénérescence cortico-basal
 - Maladie de Creutzfeldt-Jakob...

Author's Copyright ©

Diagnostic de la Maladie d'Alzheimer (MA)



Plainte du patient

Tests neuropsychologiques

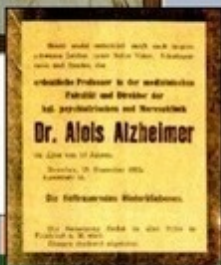
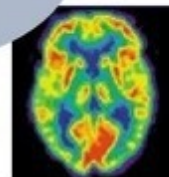
Marqueurs en imagerie

Diagnostic

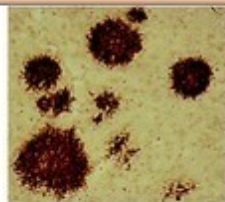
Examen clinique

Marqueurs biologiques

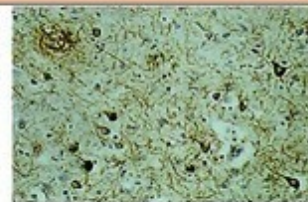
MINI MENTAL SCORE
Examen de Folstein sur l'état mental - Mini Mental State
A - ORIENTATION



Certitude diagnostique apportée par l'analyse anatomo-pathologique



Depôts amyloïdes



Dégénérescence neurofibrillaire



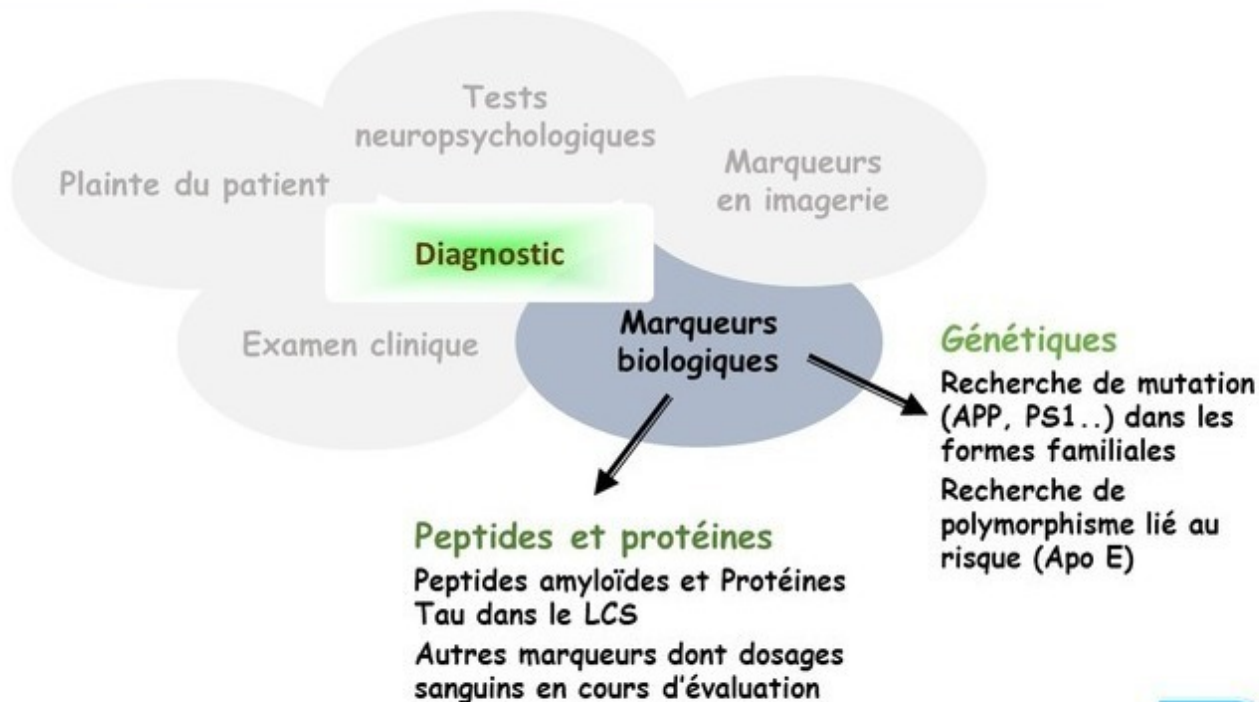
+



52 JBP 2013 S. LEHMANN

Author's
copyright ©

Diagnostic de la Maladie d'Alzheimer (MA)



Place des biomarqueurs du LCS dans le diagnostic de la MA

HAS
HAUTE AUTORITÉ DE SANTÉ

GUIDE MÉDECIN - AFFECTION DE LONGUE DURÉE

Maladie d'Alzheimer et autres démences

Actualisation juillet 2012

• Analyse du LCR

- ▶ Analyse standard du LCR uniquement chez les patients ayant une présentation clinique atypique et/ou rapidement évolutive.
- ▶ Le dosage de marqueurs de la maladie d'Alzheimer dans le LCR (protéines *Tubulin Associated Unit* (TAU) totale, phospho-TAU, A β 42, etc.) peut être réalisé en cas de doute diagnostique et en particulier chez les patients jeunes.

Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria

Bruno Dubois, Howard H Feldman, Claudio Jacova, Harald Hampel, José Luis Molinuevo, Kaj Blennow, Steven T DeKosky, Serge Gauthier, Dennis Selkoe, Randall Bateman, Stefano Cappa, Sebastian Crutch, Sebastian Engelborghs, Giovanni B Frisani, Nick C Fox, Douglas Galasko, Marie-Odile Habert, Gregory A Jicha, Agneta Nordberg, Florence Pasquier, Gil Rabinovici, Philippe Robert, Christopher Rowe, Stephen Salloway, Marie Sarazin, Stéphane Epelbaum, Leonardo C de Souza, Bruno Vellas, Pieter Vlisser, Len Schneider, Yaakov Stern, Philip Scheltens, Jeffrey L Cummings

Lancet Neurol 2014; 13: 614-29

Recommandation d'une
association systématique
à la clinique
de l'imagerie TEP ou
de la biochimie du LCR

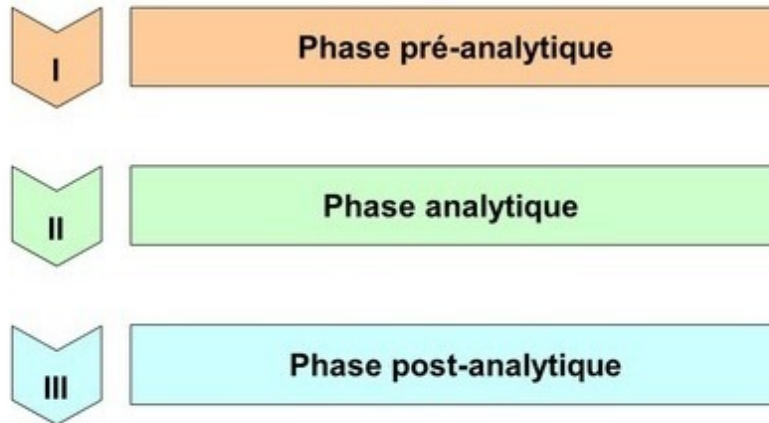
Réalisation d'une **combinaison** de 3/4 biomarqueurs

Peptides A β 42- A β 40

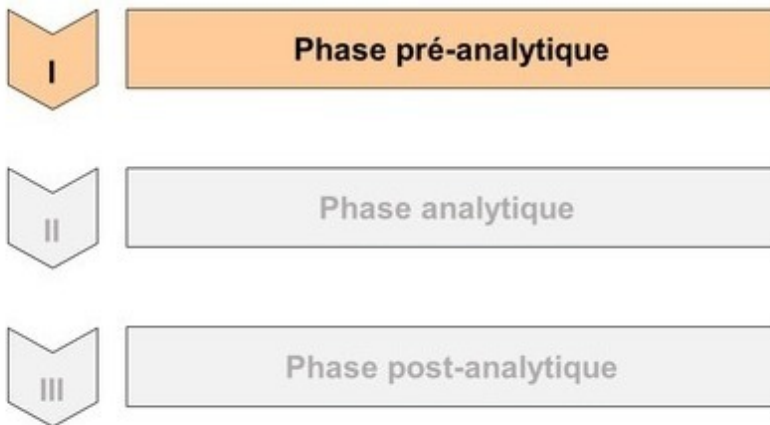
Protéine Tau

Protéine Tau phosphorylée

Pratique clinique des dosages des biomarqueurs de la MA dans le LCS



Pratique clinique des dosages des biomarqueurs de la MA dans le LCS



Phase pré-analytique : prélèvement du LCS

Conditions de réalisation de la PL

- Variation nyctémérale faible (privilégier fin matinée)
- Pas besoin d'être à jeun
- Pas d'interférence de la position du patient
- Ponction en L3-L4 ou L4-L5

Aiguille de prélèvement

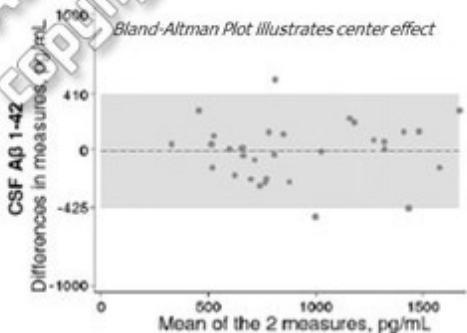
- Privilégier une **aiguille atraumatique** de **faible diamètre** :
- Aiguille de 22G
 - Diamètre externe 0,7 mm



Moins de 3% d'effets indésirables après une PL (essentiellement des céphalées)

Importante variabilité intercentre

Paris vs Lille



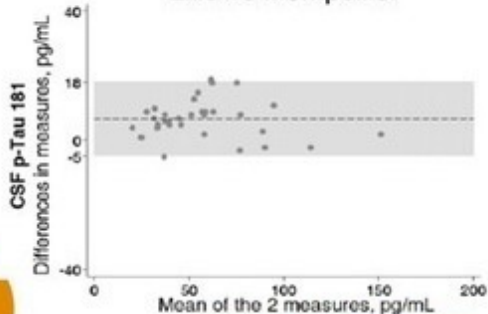
Alzheimer's & Dementia 9 (2013) 406–413

Alzheimer's
&
Dementia

Intersite variability of CSF Alzheimer's disease biomarkers in clinical setting

Julien Dumurgier^{a,*}, Olivier Vercurysse^{b,c}, Claire Paquet^{a,d}, Stéphanie Bombois^b, Chloé Chaulet^e,
Jean-Louis Laplanche^f, Katell Peoc'h^h, Susanna Schraen^c, Florence Pasquier^b, Jacques Touchon^e,
Jacques Hugon^{a,d}, Sylvain Lehmann^g, Audrey Gabelle^{e,j}

Lille vs Montpellier



CEM Montpellier
Center of Excellence for Neurodegenerative Disorders

→ Amélioration de la variabilité et de la
précision en utilisant même protocole,
même lots de kits....etc...

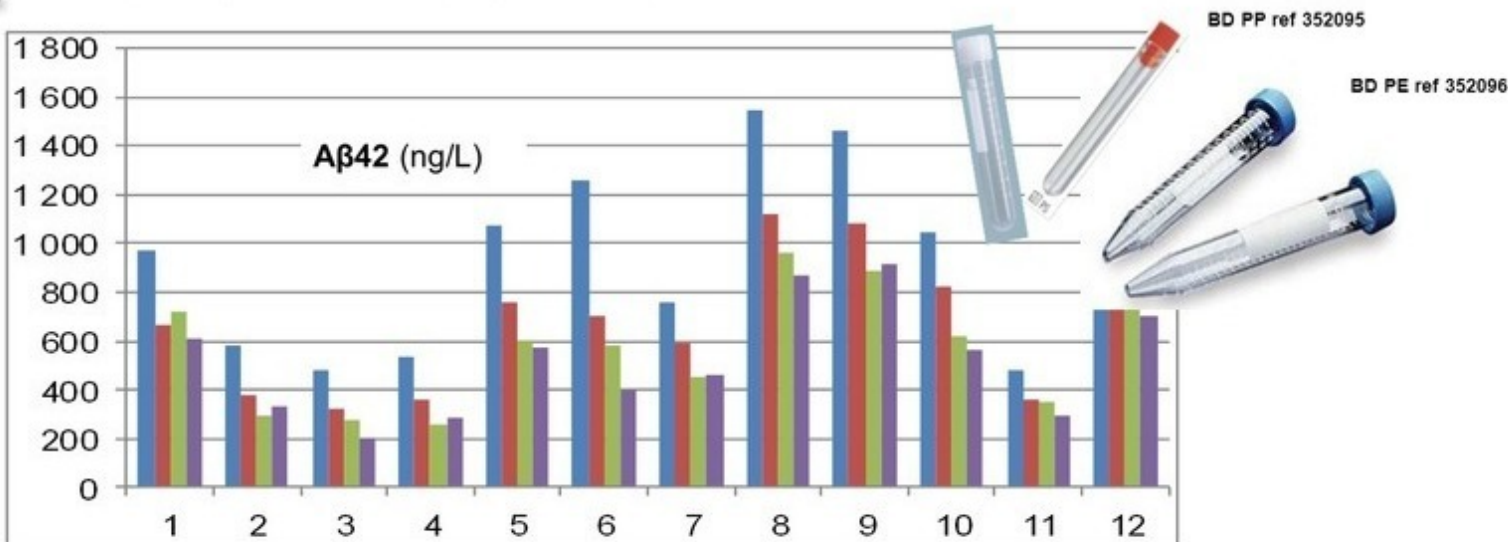
Comparaison entre 3 centres mémoires (CMRR)

Biomarqueurs	AUC	Cutt-off	Sensibilité	Spécificité
Paris				
A β 1-42	72	515	76	65
Tau	88	289	90	83
p-Tau 181	89	65	85	89
Lille				
A β 1-42	73	368	71	70
Tau	80	353	70	78
p-Tau 181	83	59.2	82	77
Montpellier				
A β 1-42	70	582	73	63
Tau	82	322	85	69
p-Tau 181	83	54	83	76

Author's
copyright ©

Importance du pré-analytique: tubes de prélèvements

Une différence > 50% de concentration en amyloïdes selon les tubes utilisés
(même pour des tubes polypropylènes comme recommandé initialement)



Perret-Liaudet, Lehmann
et al., 2011, 2012




52^e JBP 2013 S. LEHMANN

Author's
copyright ©

Préanalytique : prélèvement, transport, stockage

- Le prélèvement se fait directement dans des tubes spécifiques Sarstedt en polypropylène **uniquement**
- Acheminement à 4°C (maximum 4-5j), ou congelé après centrifugation (→ -20°C -80°C)
- Centrifugation préférable (LCS hémorragiques)
- Aliquots dans microtubes (-80°C), conservation plusieurs années possible

 **SARSTEDT**

Volume ml	Order Number Material	Length/∅ mm	Packaging Pcs./Case	Description	Base Shape
10	62.610.201 PP	92/15.3	500	neutral cap, assembled, sterile	

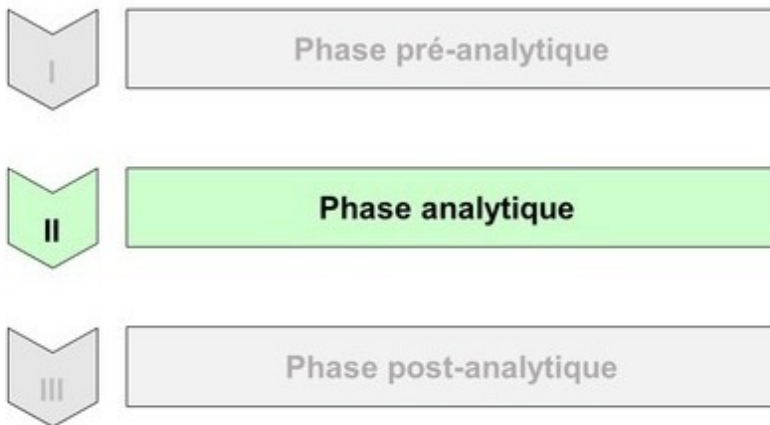


Société Française
de Biologie Clinique



52 JBP 2019 S. LEHMANN

Pratique clinique des dosages des biomarqueurs de la MA dans le LCR

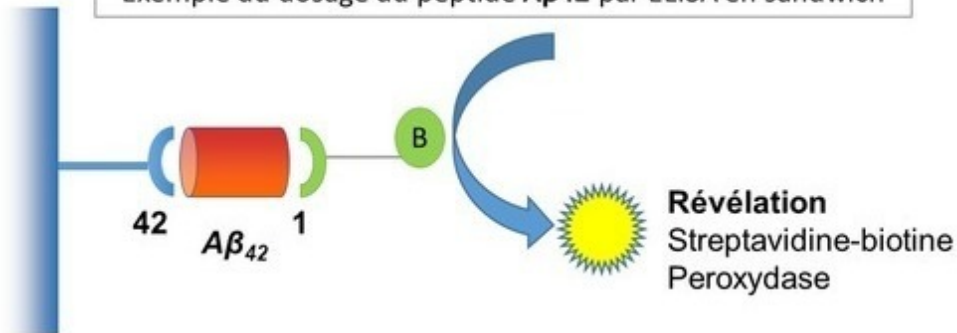


© Dosages des biomarqueurs dans le LCS par ELISA (CE IVD)

- Protéine Tau totale (Tau)
- Protéine Tau phosphorylée (P-Tau)
- Peptide bêta amyloïde 1-42 ($A\beta_{42}$) et 1-40 ($A\beta_{40}$)



Exemple du dosage du peptide $A\beta_{42}$ par ELISA en sandwich



FUJIREBIO

EUROIMMUN

Plaque 96 puits

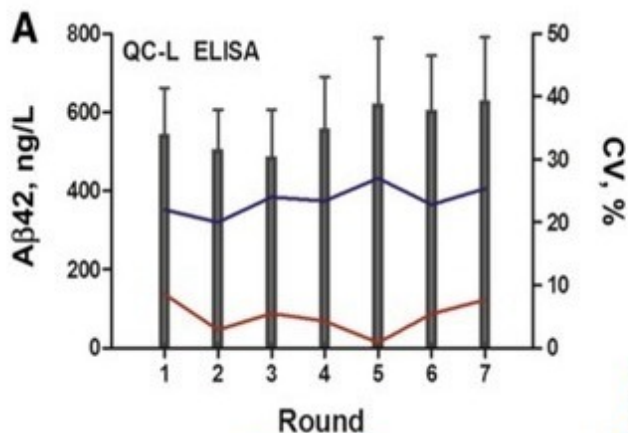
Importantes variabilités analytiques persistent par ELISA

Principaux facteurs de variation

- **Répétabilité** entre les duplicates
- **Reproductibilité** intra-laboratoire
- Variabilité due aux **différents lots et kits** utilisés

Répétabilité des duplicates : CV < 4%

Round	A β 42	T-tau	P-tau
4	3.2 (1.2, 6, 29)	3.0 (2.0, 5.2, 32)	2.1 (1.0, 3.7, 31)
5	2.5 (1.7, 4.7, 43)	3.0 (1.4, 6.9, 46)	1.6 (0.5, 2.9, 44)
6	3.7 (1.7, 6.6, 47)	3.4 (1.9, 7.3, 50)	1.6 (0.9, 4.8, 48)
7	2.7 (1.7, 4.2, 52)	2.9 (0.9, 5.8, 52)	2.0 (0.7, 4.2, 53)



Suivi longitudinal d'un même échantillon

-> concentrations identiques attendues

- Ensemble des labos : CV > 20%
- Laboratoires de référence : CV < 10%

Nouvelles plateformes automatisées (random access, chemiluminescence...)

FUJIREBIO

Lumipulse



- Tau
- P-Tau (181)
- A β 42
- A β 40

Suivi longitudinal d'un même échantillon
-> concentrations identiques attendues

- Ensemble des labos : CV 4-8%
- Laboratoires de référence : CV < 4%
- Ref méthode et standard (CRM) pour A β 42

Roche

Elisys



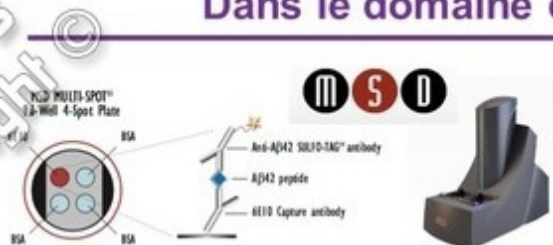
- Tau
- P-Tau (181)
- A β 42

EUROIMMUN



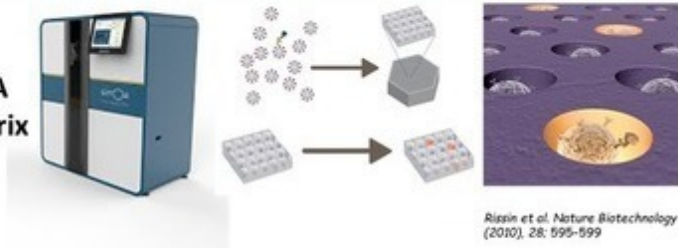
- A β 42
- A β 40

Dans le domaine de la recherche clinique (R&D)



Meso Scale Discovery (MSD)
-> détection multiplexe par
électrochimieluminescence

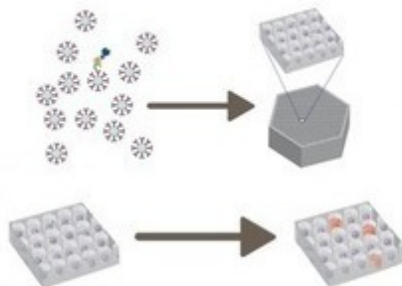
SIMOA
Quanterix



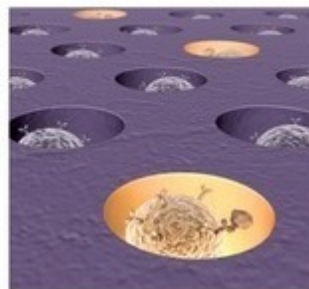
Digital ELISA
-> Ultrasensible (sang..)

Dans le domaine de la recherche clinique (R&D)

SimOa (SINgle-MOLEcule Array)
technology, Quanterix



Digital ELISA



Rissin et al. Nature Biotechnology
(2010), 28, 595-599

"Digital ELISA"

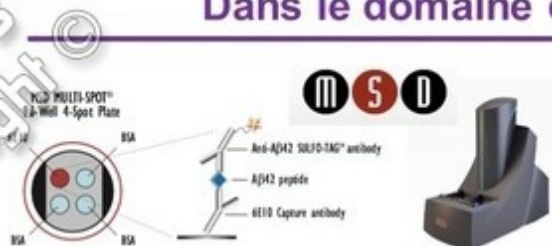
Capture magnetic bead



Protein	SiMoA LOD (pg/mL)
IL-1 β	0.001
TNF- α	0.003
GM-CSF	0.003
p24	0.005
IL-6	0.005
PSA	0.006
A β 42	0.02
tau	0.02
IL-10	0.024
GLP-1	0.033
p-tau (181 + 231)	0.04
IL-5	0.049
troponin	0.05
p-tau-231	0.05
p-tau-181	0.1

Dans le domaine de la recherche clinique (R&D)

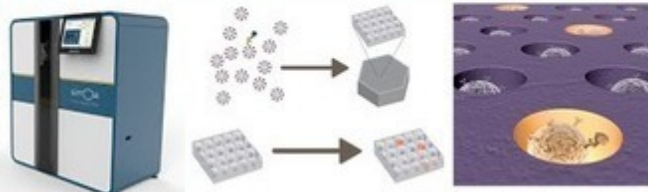
Author's
copyright



Meso Scale Discovery (MSD)

-> détection multiplexe par électrochimieluminescence

SIMOA Quanterix



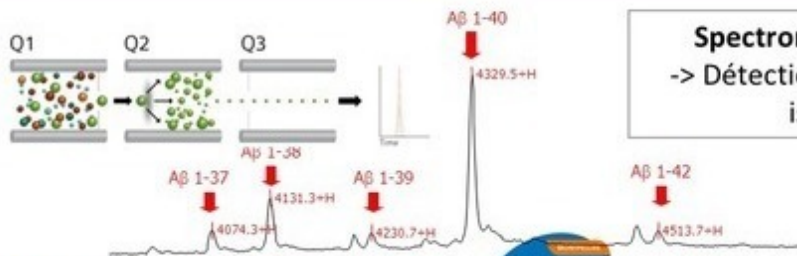
Digital ELISA

-> Ultrasensible (sang..)

Riesin et al. Nature Biotechnology (2010), 28: 995-999

Pre-fractionation,
Trypsin digestion...

LC
C18.



Spectrométrie de masse

-> Détection de nombreuses isoformes

CoEN Centre d'Excellence pour les Maladies Neurodégénératives
Montpellier

CHU

MUSE

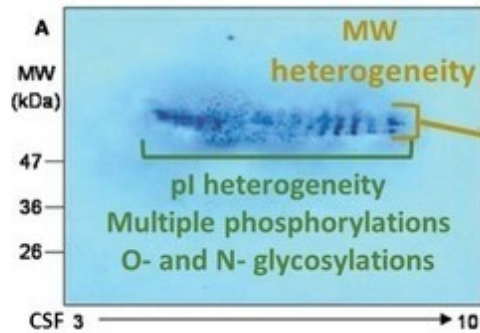
KEY INITIATIVE

BIOMARKERS & THERAPY

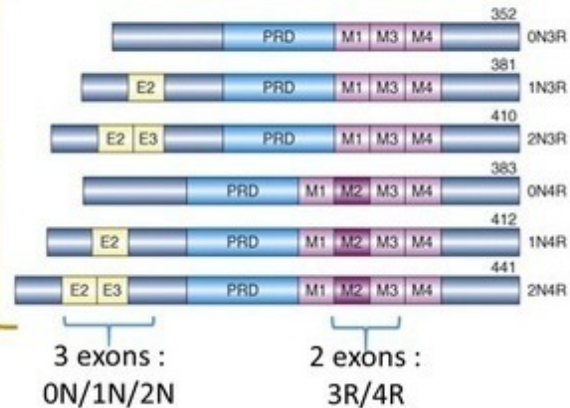
SFBC

Detection de la protéine Tau par spectrométrie de masse

- Multiples Tau proteoforms



6 isoforms (alternative splicing)

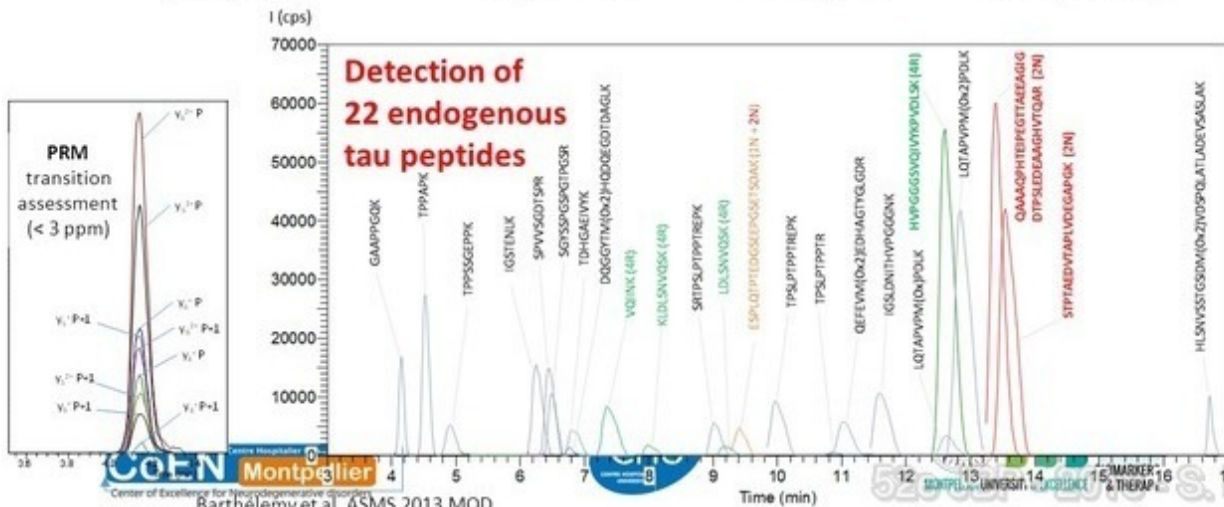
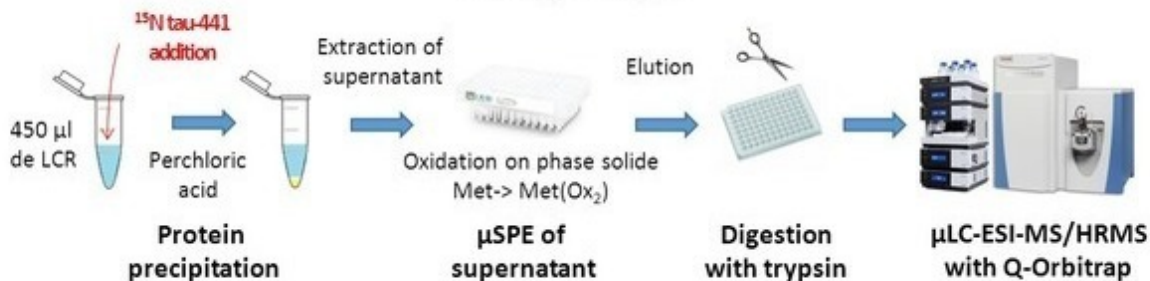


Hanisch et al. Journal of Proteome Research 2010, 9, 1476-1482

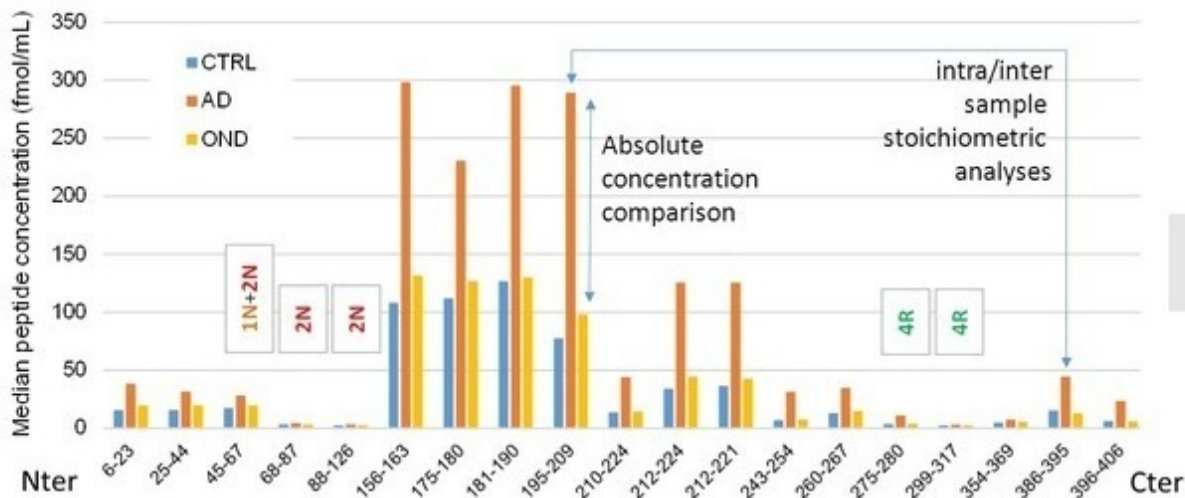
Detection de la protéine Tau par spectrométrie de masse

Author's
copyright ©

Study design



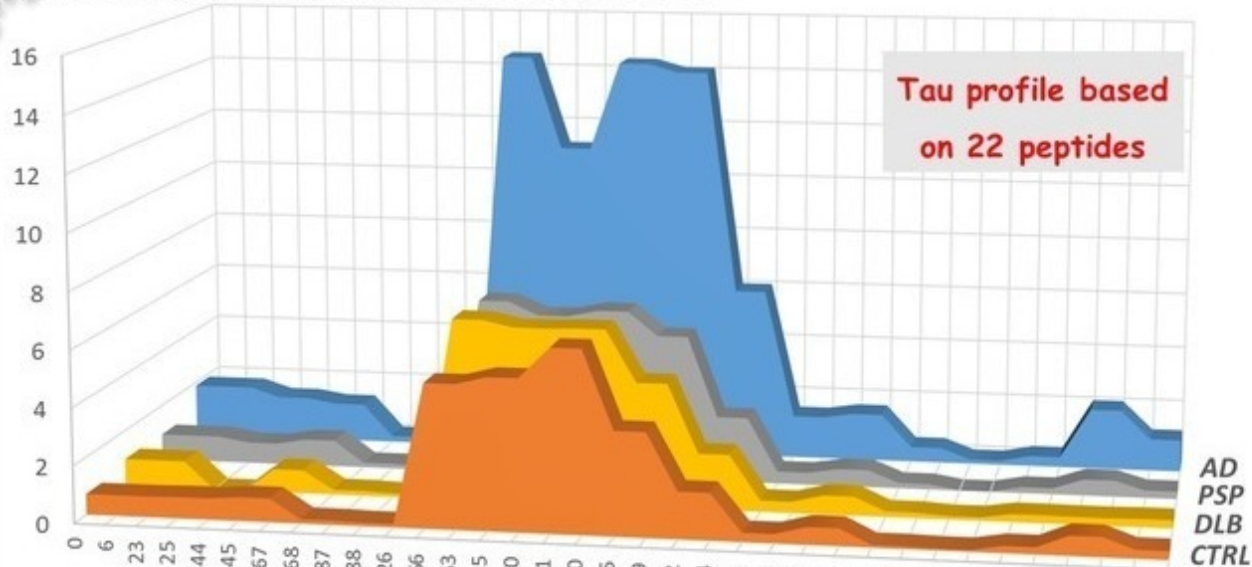
Detection de la protéine Tau par spectrométrie de masse



Tau profile based on 22 peptides

Detection de la protéine Tau par spectrométrie de masse

Tau molecular profile in human cerebrospinal fluid



CoEN Montpellier
Center of Excellence for Neurodegenerative Disorders

CHU

52 JBP
UNIVERSITY OF MONTPELLIER
BIOLOGICAL SCIENCES & THERAPY

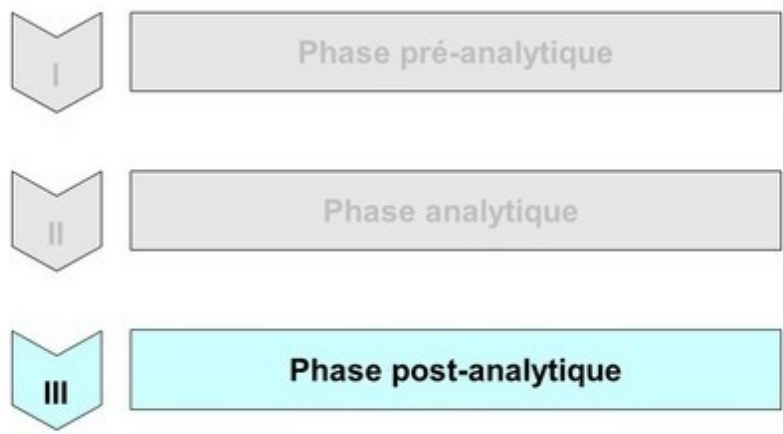
SF BC

Author's copyright ©

52 JBP
Journées de Biologie Praticienne

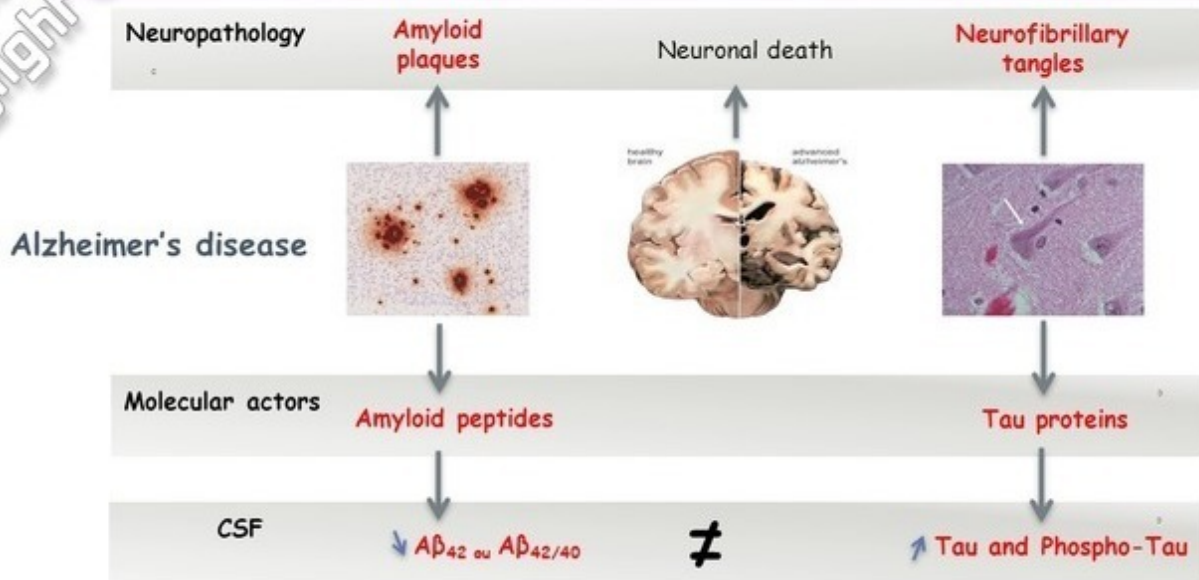
Pratique clinique des dosages des biomarqueurs de la MA dans le LCS

Author's
copyright



Author's copyright ©

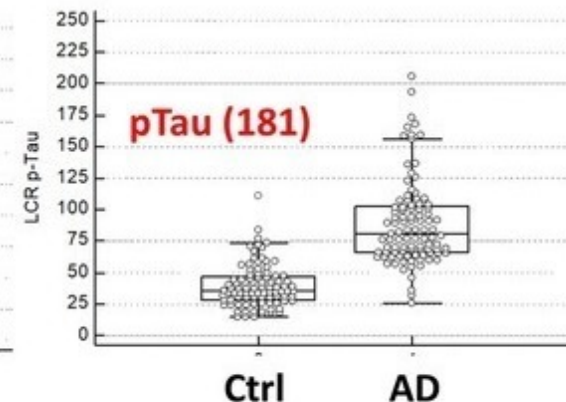
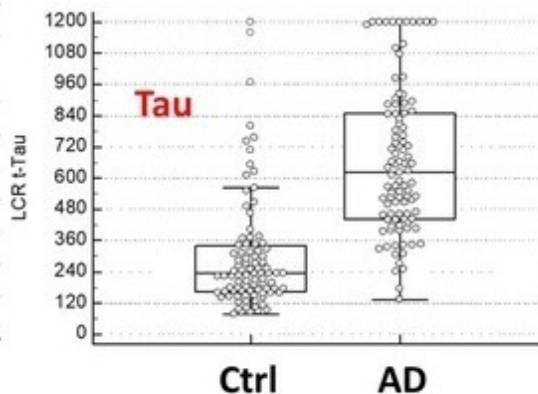
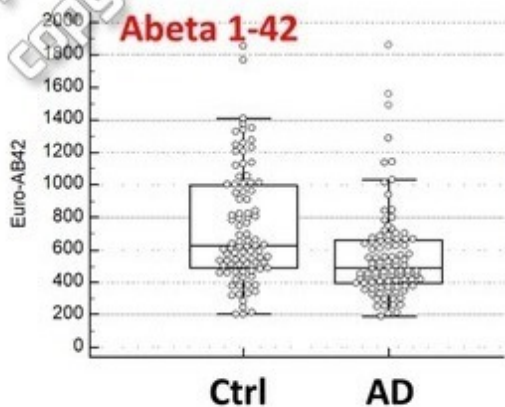
Marqueurs amyloïdes et tau dans la MA



Peptides hydrophobiques qui aggrègent dans l'espace extracellulaire et qui diminuent dans les fluides

Protéines qui se présentent sous la forme d'agrégats intra-cellulaires et qui sont libérées/secrétées

Marqueurs amyloïdes et tau dans la MA

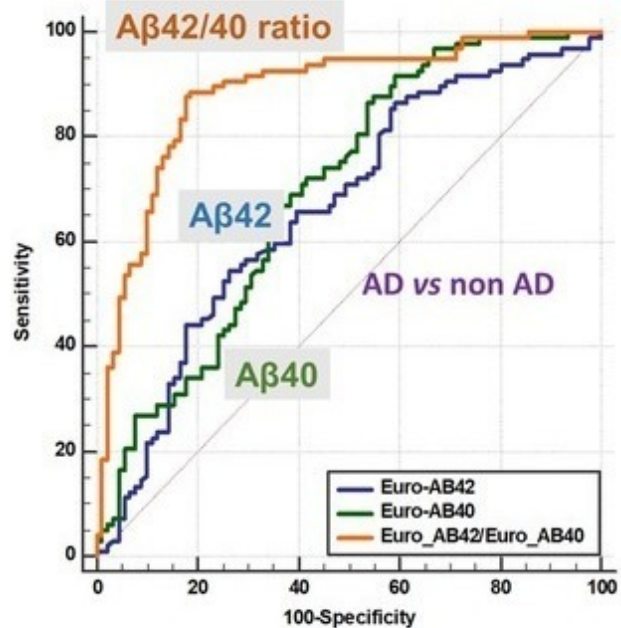
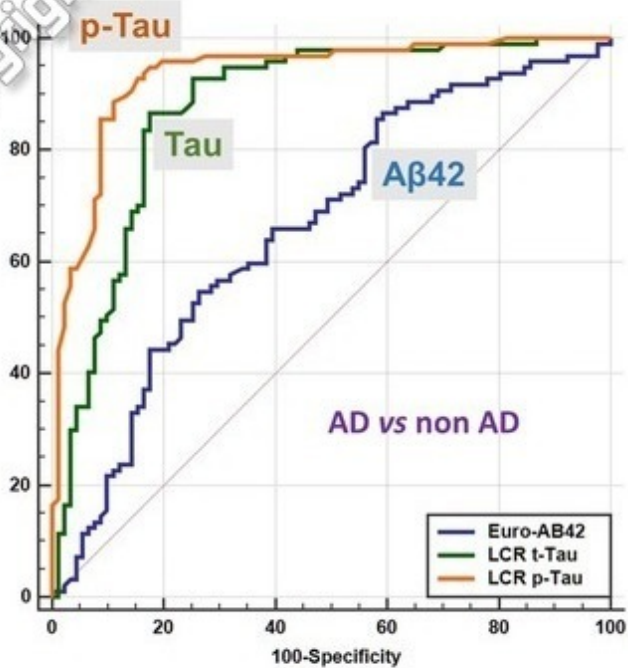


Diminution de la concentration de peptide $A\beta_{42}$ dans le LCS
< 500 ou 700 ng/L

Augmentation de la concentration dans le LCS :

- Tau > 400 ng/L (fonction de l'âge)
- P-Tau > 60 ng/L

Marqueurs amyloïdes et tau dans la MA



Comment interpréter les biomarqueurs du LCS en routine ?

Pathologies	Tau total	P-Tau (181)	Aβ1-42 ou Aβ42/40
Maladie d'Alzheimer	↗↗	↗↗	↘↘
Dépression	N	N	N
Démence Fronto-Temporale	N ou ↗	N ou ↗	N
Démence Corps de Lewy	N ou ↗	N	↘
Aphasie Primaire Progressive	↗	↗	↘
Démence sémantique	N ou ↗	N ou ↗	N ou ↘
Maladie de Creutzfeldt-Jakob	↗↗↗	N ou ↗	↘
Démence vasculaire	↗	N	N

Nouveau modèle prédictif pour le diagnostic de MA



Research

Highly accessed

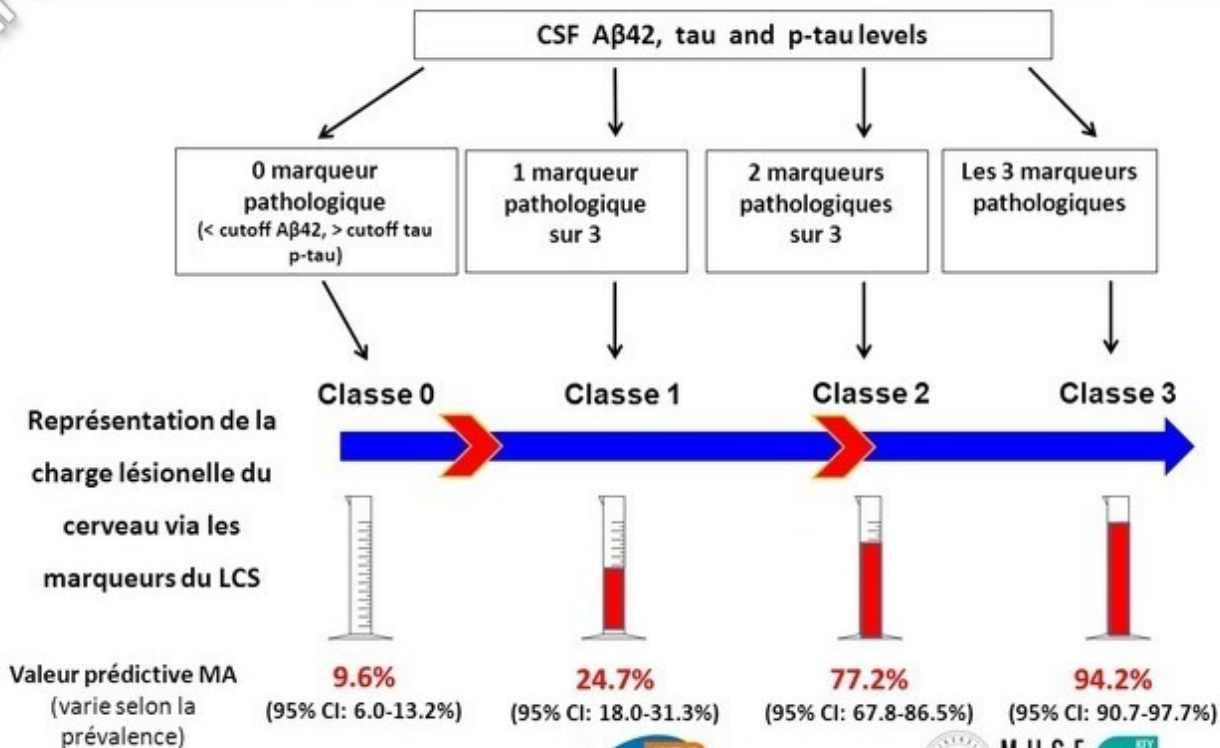
Open Access

A diagnostic scale for Alzheimer's disease based on cerebrospinal fluid biomarker profiles

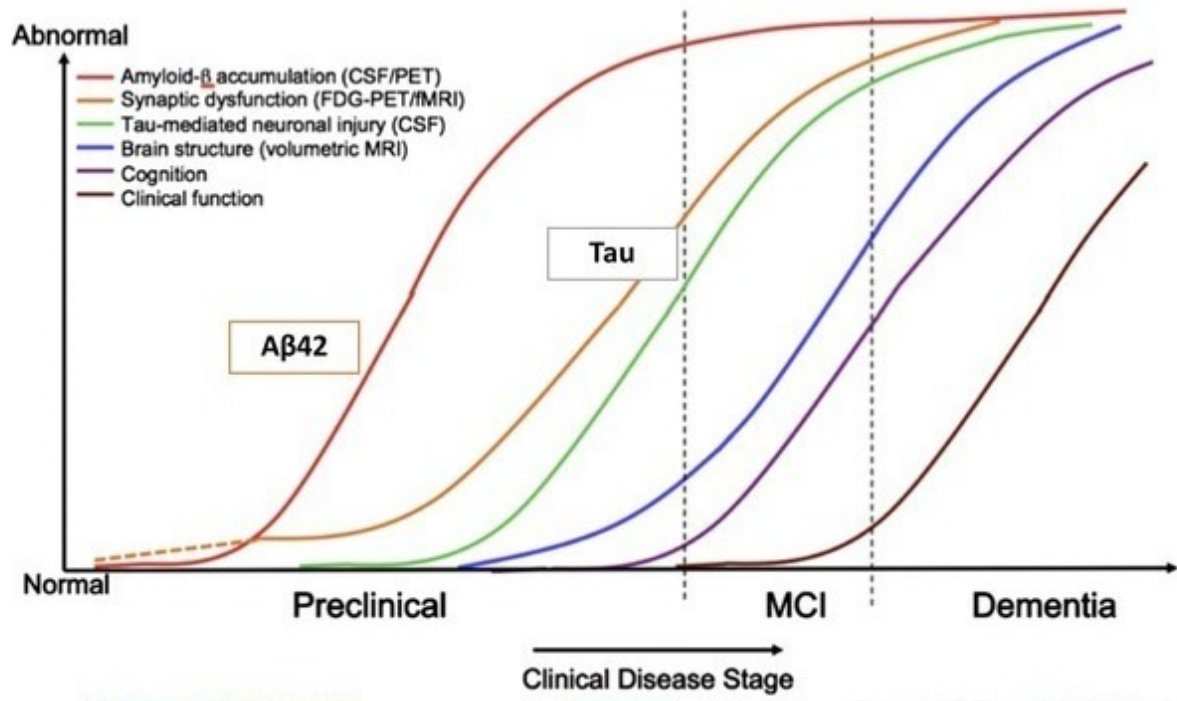
Sylvain Lehmann^{1*}, Julien Dumurgier³, Susanna Schraen³, David Wallon⁴, Frédéric Blanc^{5,6}, Eloi Magnin⁷, Stéphanie Bombois⁸, Olivier Bousiges^{1,3,5,9}, Dominique Champion⁴, Benjamin Cretin⁵, Constance Delaby¹, Didier Hannequin⁴, Barbara Jung⁵, Jacques Hugon², Jean-Louis Laplanche¹⁰, Carole Miguet-Alfonsi¹¹, Katell Peoc'h¹⁰, Nathalie Philippi^{5,6}, Muriel Quillard-Muraine⁴, Bernard Sablonnière³, Jacques Touchon¹², Olivier Vercurysse³, Claire Paquet⁸, Florence Pasquier⁸ and Audrey Gabelle^{1,12}



Nouveau modèle prédictif pour le diagnostic de MA



Modifications des biomarqueurs dans les stades précoces de la MA



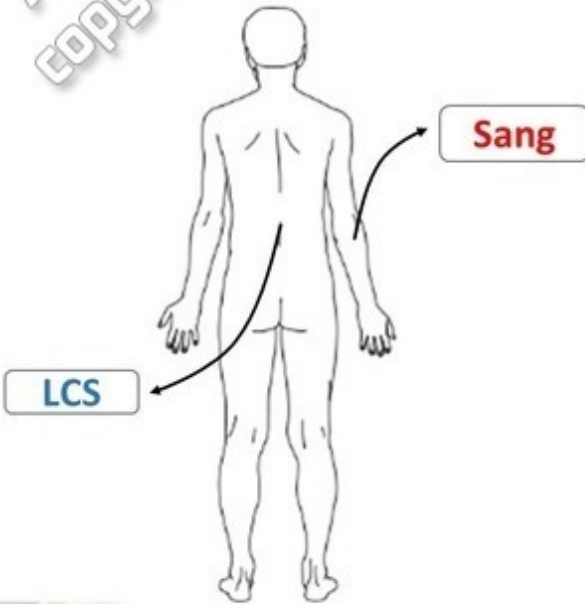
Points à retenir pour les dosages du LCS

- **Maladie d'Alzheimer** : enjeu important de santé publique
- **Pas de traitement validé** mais de nombreuses études en cours (Phase III..)
- **Plus de la moitié des syndromes démentiels** sont dus à la maladie d'Alzheimer
- Profil biochimique caractéristique de la maladie d'Alzheimer :
 - Peptide **A β 42** < 500- 700 ng/L et rapport **A β 42 / A β 40** diminué
 - Protéine **Tau totale** > 400 ng/L
 - Protéine **P-Tau** > 60 ng/L
- **Combinaison des biomarqueurs** (PLM scale): modèle probabiliste
 - **Sensibilité et Spécificité** pour la MA > 85%
- **Rôle important** des biomarqueurs dans le diagnostic des **stades pré-démentiels**
- Pas encore de marqueurs confirmés pour caractériser **l'évolution** de la MA et.. dans le **sang**...

!! Attention
préanalytique,
homogénéisation
des pratiques...

Intérêt des dosages sanguins

Author's
copyright ©



- Intérêt car **moins invasif** que la ponction lombaire → possibilité d'utilisation à plus large échelle (dépistage..) et pour le suivi
- Effet de « dilution » par rapport au LCR et d'autres origines que le cerveau (**baisse sensibilité et spécificité**)
- Nécessite méthodes innovantes **ultrasensibles** (amyloïdes, Tau, Neurofilament)

Passage du LCS → au sang

Ab (CSF): mass conc : ~500 pg/mL = 0,1 nanoM



Ab (plasma): 20 picoMolar : possible detection

Tau (CSF): mass conc : ~250 pg/mL = 5 picoM



Tau (plasma): < 1 picoMolar : ≈ undetectable

→ Need for ultrasensitive approaches



Détection des peptides amyloïdes dans le sang

Par immunodetection

Alzheimer
&
Dementia

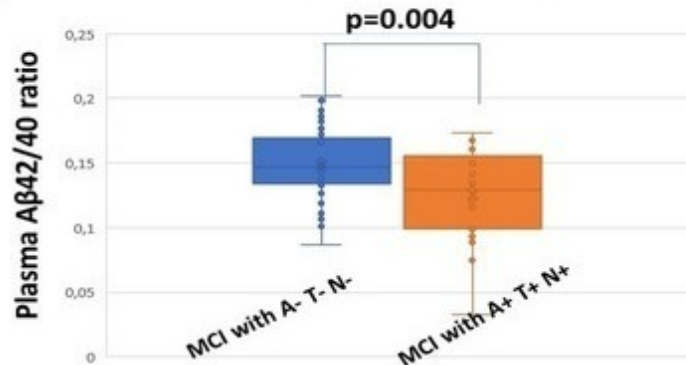
Alzheimer's & Dementia (2018) 1-11

Featured Article

Plasma amyloid levels within the Alzheimer's process and correlations with central biomarkers

Olivier Hanon^{a,b,g}, Jean-Sébastien Vidal^{a,b}, Sylvain Lehmann^c, Stéphanie Bombois^{d,e}, Bernadette Allinquant^f, Jean-Marc Tréluyer^g, Patrick Gelé^{h,i}, Christine Delmaire^{d,e}, Frédéric Blanc^{j,k}, Jean-François Mangin^l, Luc Buée^{h,i}, Jacques Touchon^m, Jacques Hugon^{n,o}, Bruno Vellas^p, Evelyne Galbrun^q, Athanase Benetos^r, Gilles Berrut^s, Elène Paillaud^t, David Wallon^{u,v}, Giovanni Castelnovo^w, Lisette Volpe-Gillot^x, Marc Paccalin^y, Philippe-Henri Robert^z, Olivier Godefroy^{aa}, Thierry Dantoine^{bb}, Vincent Camus^{cc,dd}, Joël Belmin^{ee,ff}, Pierre Vandel^{gg,hh}, Jean-Luc Novella^{ii,jj}, Emmanuelle Duron^{a,b}, Anne-Sophie Rigaud^{ab}, Suzanna Schraen-Maschke^{h,i,l}, Audrey Gabelle^{m,1}, on behalf of the BALTAZAR study group

Plasma A β 42/40 ratio by groups of MCI participants classified as A-T-N- versus A+T+N+



Détection des peptides amyloides dans le sang

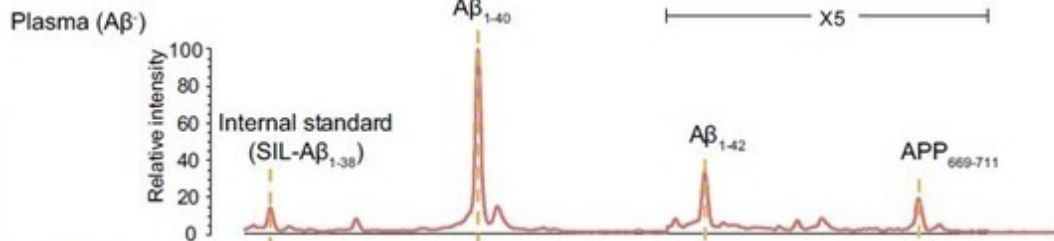
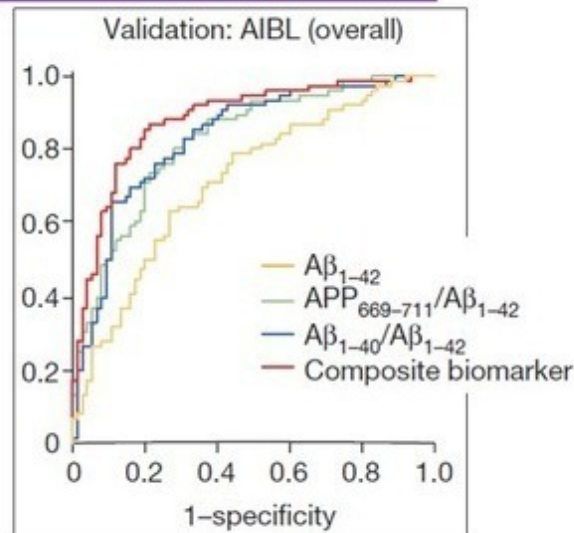
Par spectrométrie de masse (IP-MS)

LETTER

doi:10.1038/nature25456

High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer's disease

Akinori Nakamura¹, Naoki Kaneko², Victor L. Villemagne^{3,4}, Takashi Kato^{1,5}, James Doecke⁶, Vincent Doré^{1,6}, Chris Fowler⁴, Qiao-Xin Li⁴, Ralph Martins⁷, Christopher Rowe^{3,4}, Taisuke Tomita⁸, Katsumi Matsuzaki⁹, Kenji Ishii¹⁰, Kazunari Ishii¹¹, Yutaka Arahata², Shinichi Iwamoto², Kengo Ito^{1,5}, Koichi Tanaka⁷, Colin L. Masters⁴ & Katsuhiko Yanagisawa²



 **SHIMADZU**
Excellence in Science

Montpellier,
Proteomic
Platform

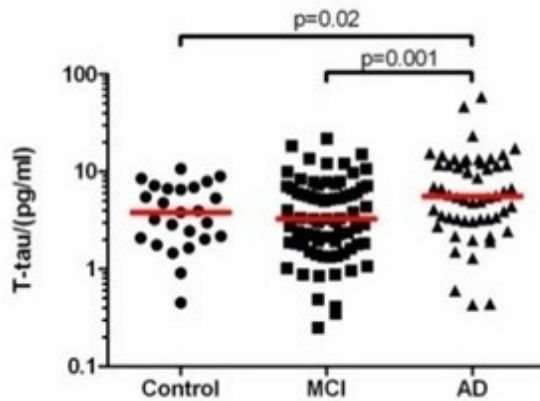


52e CIP 2018 - C. LEHMANN

Author's
copyright ©

Détection de la protéine Tau dans le sang

Plasma tau in Alzheimer's disease



Zetterberg et al., Alz Res & Ther. 2013

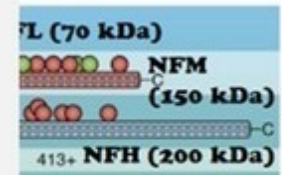
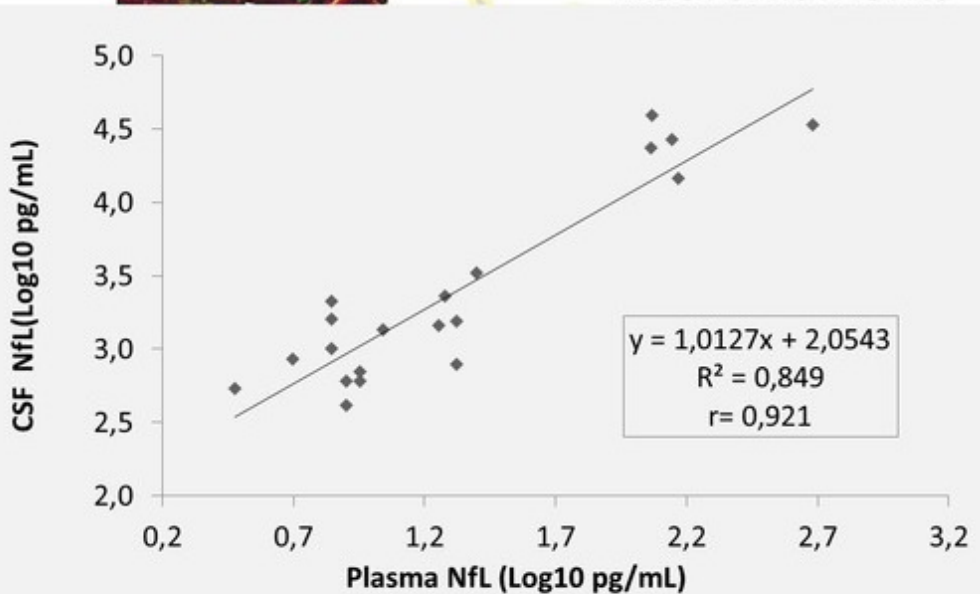


Détection des Neurofilaments dans le LCS et dans le sang

Neurofilaments (neuronal proteins) which play an important role in axonal development.

Upon neuronal cell death, many origins (horizontal neurodegenerative) they are released and detected in the

Neurofilaments



NF ELISA

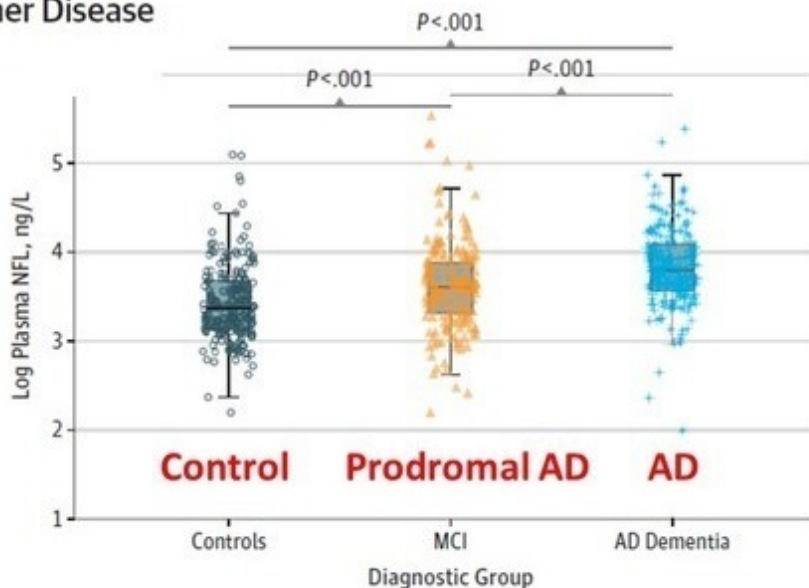
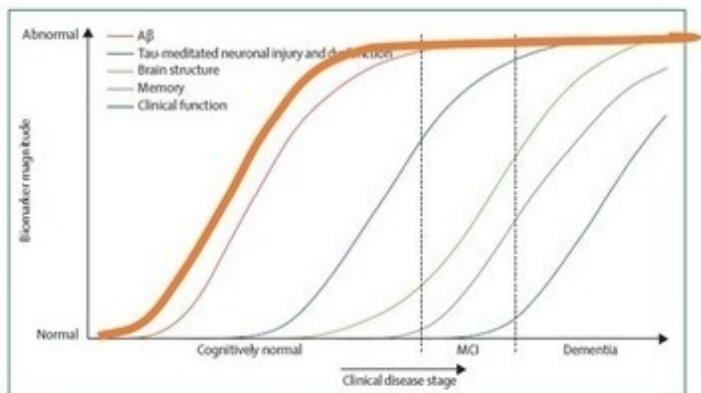
From D Holden (Queen Mary University of London)

Détection des Neurofilaments dans le LCS et dans le sang

JAMA Neurology | Original Investigation

Association of Plasma Neurofilament Light With Neurodegeneration in Patients With Alzheimer Disease

Niklas Mattsson, MD, PhD; Ulf Andreasson, PhD; Henrik Zetterberg, MD, PhD; Kaj Blennow, MD, PhD, for the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative



© Détection des Neurofilaments dans le LCS et dans le sang

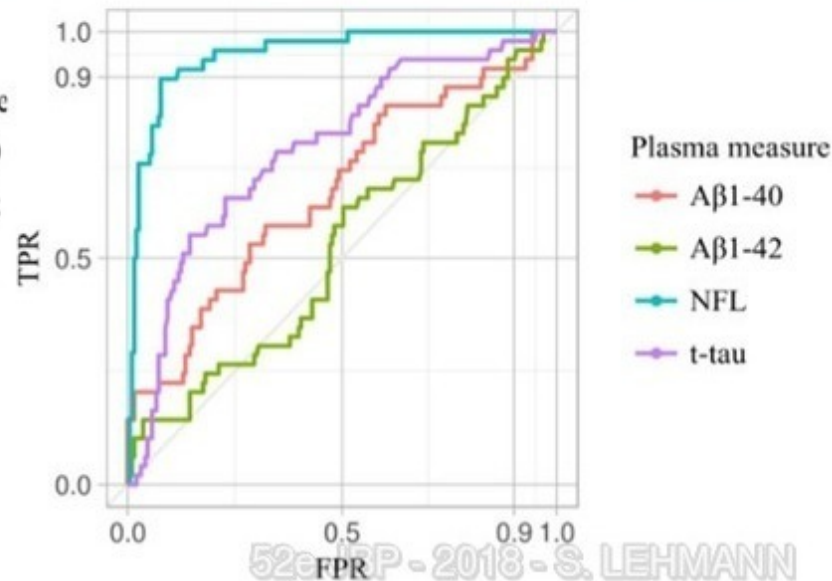
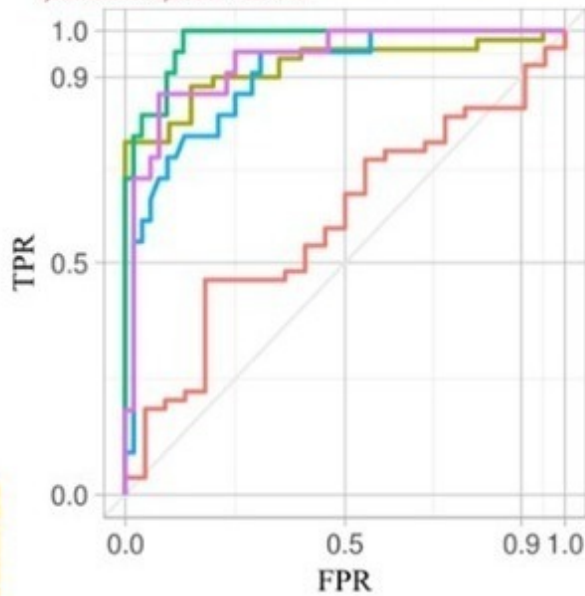
Plasma and CSF biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease in adults with Down syndrome: a cross-sectional study

Juan Fortea, María Corchona-Iragui, Bessy Benjamín, Susana Fernández, Laura Vidúa, Isabel Barroeta, Daniel Alcafea, Jordi Pegueroles, Laia Muñoz, Olivia Bafán, Moryl de Leon, Aleksandra Maleska-Maceski, Christophe Hirtz, Jordi Clarimón, Sebastián Videla, Constance Delaby, Sylvain Lehmann, Rafael Blesa*, Alberto Lleó*

Lancet Neurol 2018

Published Online

August 29, 2018



52e JEP - 2018 - S. LEHMANN

52 JBP
Journées de Biologie Praticienne
Autour's
copyright ©



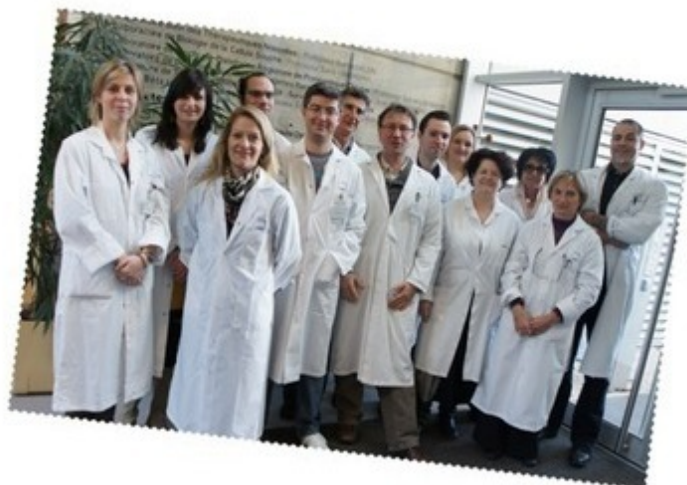
Journée biologie praticienne 7 dec 2018

Du prélèvement au diagnostic biologique, dans les neurodégénérescences, et en particulier dans la maladie d'Alzheimer

Merci pour votre attention

Carole Crozet, Audrey Gabelle, Constance Delaby, Aleksandra Maceski, Nelly Ginestet, Laurent Tiers, Cécile Monzo, Aroa Relano Gines, Jérôme Vialaret, Christophe Hirtz and Sylvain Lehmann

& collaborators in Lille, Paris, Toulouse, Lyon, Strasbourg..., Barcelone, St Louis USA...



52 JBP 2018 S. LEHMANN