



HAL
open science

Apports d'outils biologiques pour la caractérisation de tauopathies en regard de diverses présentations cliniques de pathologies neurodégénératives

J. Seguin

► **To cite this version:**

J. Seguin. Apports d'outils biologiques pour la caractérisation de tauopathies en regard de diverses présentations cliniques de pathologies neurodégénératives. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT: . tel-00635537

HAL Id: tel-00635537

<https://theses.hal.science/tel-00635537>

Submitted on 25 Oct 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1
École Doctorale Neurosciences et Cognition

Thèse pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

(Arrêté du 7 août 2006)

Discipline : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement le 5 avril 2011

APPORT D'OUTILS BIOLOGIQUES POUR LA CARACTÉRISATION
DE TAUOPATHIES EN REGARD DE DIVERSES PRÉSENTATIONS
CLINIQUES DE PATHOLOGIES NEURODÉGÉNÉRATIVES

Par **Jérémie SEGUIN**

Directeur de thèse : Pierre KROLAK-SALMON

Co-Directeur : Armand PERRET-LIAUDET

JURY

Rapporteurs : Benaïssa EL MOUALIJ

Jean-Michel VERDIER

Examineurs : Thierry BARON

Béatrice LANNES

Alain VIGHETTO

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. le Professeur L. Collet

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur J-F. Mornex

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur G. Annat

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur D. Simon

Secrétaire Général

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

UFR d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. Fleury

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Département GEP

Directeur : M. N. Siauve

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Département Physique

Directeur : Mme S. Fleck

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme le Professeur I. Daniel

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. Collignon

Observatoire de Lyon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Directeur : M. P. Fournier

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. R. Bernard

REMERCIEMENTS

À M. le **Professeur Pierre Krolak-Salmon**, pour avoir accepté de diriger cette thèse. Ce travail à tes côtés m'a été extrêmement bénéfique et formateur, autant d'un point de vue professionnel que d'un point de vue humain. Notamment par le biais de tes consultations, qui furent une source d'enseignement considérable, tu as su comprendre et renforcer mon intérêt sans cesse grandissant pour la médecine ainsi que sa pratique et je t'en remercie sincèrement. Reçois en ces quelques lignes la marque de ma profonde considération.

À M. le **Docteur Armand Perret-Liaudet**, tu as été à l'initiative de ce projet et après de nombreuses années nous en sommes enfin arrivés au bout. Malgré des aléas scientifiques et techniques auxquels j'ai été longuement confronté (contribuant à rendre les objectifs lointains voire inaccessibles...), des périodes de découragements toujours compliquées dans un tel contexte ainsi que des étapes parfois chaotiques et difficiles, tu as toujours su trouver les mots et l'écoute nécessaire pour m'encourager à mener à bien ce travail. Tes éclairs de génie redoutables, ta ténacité, ton sens du partage et tes valeurs humaines (d'une manière générale), font de toi une personne riche sur bien des plans. Je te remercie de m'avoir accordé ta confiance et reçois, en ces quelques mots, la marque de ma sincère amitié.

À M. le **Docteur Benaissa El Moualij**, pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Je vous remercie sincèrement d'avoir si aimablement accepté de juger ce travail dans un si court délai et de vous être déplacé depuis Liège. Veuillez recevoir, dans ces quelques lignes, le témoignage de ma plus haute considération.

À M. le **Professeur Jean Michel Verdier**, pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Je vous remercie sincèrement d'avoir si aimablement accepté de juger ce travail dans un si court délai et de vous être déplacé depuis Montpellier. Veuillez recevoir, dans ces quelques lignes, le témoignage de ma plus haute considération.

À M. le **Docteur Thierry Baron**, pour avoir aimablement accepté d'examiner mon travail. La collaboration que j'ai pu avoir avec vous concernant les isopeptides n'a malheureusement pas été fructueuse mais je reste convaincu qu'une piste étiopathogénique reste encore à déterminer. J'espère pouvoir continuer à avoir des discussions toujours aussi enrichissantes avec vous ; veuillez croire en mon plus grand respect.

À Mme le **Docteur Béatrice Lannes**, pour avoir aimablement accepté d'examiner mon travail et de vous être déplacé depuis Strasbourg. L'anatomopathologie a été une pierre angulaire de ce travail et s'est révélée par la suite une composante majeure de mes conclusions. J'espère pouvoir trouver matière à une collaboration avec vous dans le futur ; veuillez croire en mon plus grand respect.

À M. le **Professeur Alain Vighetto**, pour avoir aimablement accepté d'examiner mon travail. Ces années passées au sein de votre service ont été d'une richesse incroyable, que se soit en termes d'enseignement et d'apprentissage, d'humanité ou de rencontres. Vous m'avez parfois perçu dans certaines étapes difficiles et j'ai pu apprécier tout le soutien que j'ai reçu de votre part au cours de ces années. Je vous remercie donc très sincèrement pour votre bienveillance à mon égard et vous pouvez être assuré de ma plus haute estime.

À mes parents, sans qui je n'en serais bien évidemment pas là. Merci pour votre soutien toujours sans bornes et pour cet amour inconditionnel...

... à toute ma famille.

À mes amis, nombreux et chers, c'est une chance incroyable que de vous avoir à mes côtés.

À ma Viri, notre rencontre hospitalière a été un de mes plus grands moments (it's too late, apologize !), nous en avons traversé des choses tous les deux... et il faut bien avouer qu'actuellement je serais dénutri et cachectique sans tes talents culinaires (mais je ne ferais pas référence ici à tes lasagnes comme d'autres l'ont déjà fait avant moi). Ton soutien, ta loyauté et tout ce qui fait notre relation d'exception est un cadeau rare. Je ne peux pas ne pas mentionner ici notre « famille urbaine » et plus particulièrement Val et Franck (non ca n'était pas le 11 mars) avec l'un des plus beaux mariages auquel j'ai été convié (LOL). Tatiana, après ton long parcours médical radiologico-salsa, j'espère que tu trouveras un jour ton bonheur dans la médecine vétérinaire.

Tania, nous en avons fait du chemin tous les deux. Toutes ces aventures que nous avons partagées et qui me paraissent déjà si lointaines sont en moi, résolument. Vince, je te souhaite tout le meilleur, tu feras un parfait bûcheron canadien. Et bien sur je pense à Anna (c'est pour quand le voilier ?), Elise, Mel et Raphaël (j'attends avec impatience la suite des œuvres de Marcel Asraoui).

Anaëlle, que j'ai connu il y a bien longtemps, et nous étions loin à l'époque de tes différentes identités actuelles dans le milieu de l'art contemporain. Gaëlle D. notre ancienne colloc (qui nous a rudement abandonné bien entendu) pour une nouvelle vie canadienne ?

Victoria, même de Montpellier tu as été très présente et ton amitié est précieuse ; j'ai énormément appris médicalement avec toi lorsque tu étais chef de clinique à Lyon, nos longues conversations sont toujours un plaisir et ton humanité, ta gentillesse et ta philosophie de vie font de toi une personne remarquable.

Ju, Oliv et J  pour toutes nos soirées agitées à refaire le monde (ou pas). Aurel et le Libanais pour tous ces moments de vie parisiens (toute une époque). Baptiste, je me souviens de toutes ces soirées ou nos discussions nous portaient jusqu'à parfois très tôt le matin et même lorsque tu devais réviser pour l'internat. Marine et Lex, votre sérénité m'étonnera toujours. Zaza, pour ta vision de la vie si peu conventionnelle. Aurélien, perdu dans ton post-doc, il est loin le temps de Barcelone avec notre p'tit Seb. Hanane et ta vie entre Londres, Stockholm, New York et Tel Aviv... garde espoir, on se ressemble beaucoup : courage pour ta thèse et ne perds jamais ce goût des voyages et des rencontres. Nutabi, des Pays Bas c'est toi la prochaine, courage. Gerg , milyen szomoru vagyok  n ma, minden l ng csak r szekben lobban, minden szerelem darabokban! Sarah et Nico pour votre nouvelle vie à Boston. Hussam (Youssouf) pour ces grands moments passés avec toi au 402 et notre collaboration de vidéastes amateurs avec Viri (« c'est nous quoi ! »). Sébastien G., tu as beau être mon premier fan, je doute encore et toujours ; j'espère un jour faire partager ce que j'ai dans la tête. Fred, merci de croire en moi et à cette future collaboration que j'espère prometteuse. Thomas, le futur marié, Julie et Rémi pour une nouvelle vie d'infirmiers internationaux que j'espère remplie et heureuse, Sonia pour ces moments hospitaliers décalés. Aux internes du labo de Neurobiologie, mes acolytes : Bedim (« t'as fais un ratio ? ») et Yatho (Yabbicks Noulance) sans qui certains jours (et certaines nuits !) seraient bien mornes ; un petit mot particulier pour un immense merci à ce dernier qui a toujours été là dans son optimisme débordant (  toute épreuve) et qui m'a soutenu et aidé jusqu'à la fin.

  toute l'équipe du laboratoire de Neurobiologie présente et passée: Françoise (qu'aurais-je fais techniquement sans ton aide précieuse et ton expérience !), Sylvie, Elisabeth, Aline, Corinne, Séverine, Céline et Mado notre secrétaire.   Isabelle pour ces moments passés à parcourir l'Europe lors des réunions du *consortium*. Et bien sur à Gliocy, courage pour ce qu'il te reste à faire, c'est bientôt la fin.

  toute l'équipe de l'Unité 402 :   Mme le Professeur Caroline Tilikete, tu m'as appris énormément lorsque je faisais encore le tour clinique au 402 et je t'en remercie profondément, mais aussi pour toutes nos discussions non médicales et ta grande curiosité cinématographique. Ma t  pour notre collaboration fructueuse et ton syndrome frontal si attachant ; Isabelle : comment ne pas évoquer ton travail de recherche conséquent et nos moments passés à éplucher les dossiers médicaux à la recherche de diagnostics ; Nadège qui fut une colloc de bureau formidable. Bernadette pour ton panache et ton dynamisme.

Comment ne pas faire mention des infirmiers et aides soignants formidables de ce service, toujours à l'écoute, et bien sur à certains qui sont devenus des amis.

À la collaboration avec le laboratoire de Neuropathologie du Groupement Hospitalier Est et particulièrement Rachel et le Dr. Nathalie Streichenberger : tu m'as fait rencontrer Armand il y a de ça quelques années maintenant, cette collaboration avec toi a été très riche d'enseignements (aussi bien théoriques que pratiques) et je t'en remercie.

À toute l'équipe du *consortium* européen Neuroscreen.

À M. le Professeur Nicolas Kopp, pour votre investissement considérable dans le domaine de l'éthique médicale. Travailler à vos côtés est toujours riche d'enseignements et vous pouvez être assuré de mon plus grand respect.

À toute l'équipe du laboratoire INSERM U821.

À Marie Pierre Rethy de la bibliothèque médicale, pour votre grande efficacité dans la recherche documentaire et votre bonne humeur, bonne retraite à vous.

À tous ceux que j'ai très certainement oublié.

À tous ceux qui ne sont plus vraiment là et qui l'ont pourtant tellement été...

... à toutes mes rencontres passées, présentes et futures qui ont fait et feront ce que je suis.

Liste des publications présentées dans ce travail

Jérémie Seguin, Maité Formaglio, Armand Perret-Liaudet, Isabelle Quadrio, Yannick Tholance, Olivier Rouaud, Catherine Thomas-Anterion, Bernard Croisile, Hélène Mollion, Olivier Moreaud, Martin Salzmann, Aline Dorey, Marc Bataillard, Marie-Hélène Coste, Alain Vighetto, Pierre Krolak-Salmon

Cerebrospinal fluid biomarkers in posterior cortical atrophy.

Neurology, 2011 in press

Gabor G. Kovacs, **Jérémie Seguin**, Isabelle Quadrio, Romana Höftberger, István Kapás, Nathalie Streichenberger, Anne Gaëlle Biacabe, David Meyronet, Raf Sciot, Rik Vandenberghe, Katalin Majtenyi, Lajos László, Thomas Ströbel, Herbert Budka, Armand Perret-Liaudet

Genetic Creutzfeldt-Jakob disease associated with the E200K mutation: characterization of a complex proteinopathy.

Acta Neuropathol, 2011; 121(1):39-57

Table des matières

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	16
CONTEXTE ET ÉTAT DE L'ART.....	20
<u>CHAPITRE I : LES DÉMENCES NEURODÉGÉNÉRATIVES.....</u>	21
1 LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	22
1.1 ÉPIDEMIOLOGIE.....	23
1.2 DIAGNOSTIC.....	24
1.2.1 Évaluation clinique et neuropsychologique.....	24
1.2.2 Imagerie.....	26
1.2.3 Neuropathologie.....	31
1.2.3.1 Dépôts amyloïdes.....	32
1.2.3.2 Lésions tauopathiques.....	34
1.2.3.3 Maladie d'Alzheimer et démences mixtes.....	38
1.2.3.4 Évolution des critères diagnostiques de la maladie d'Alzheimer.....	39
1.3 FACTEURS DE RISQUE ET FORMES DE MALADIE D'ALZHEIMER.....	40
1.4 TRAITEMENTS.....	41
2 LES ATROPHIES FOCALES.....	42
2.1 LES DÉGENERESCENCES LOBAIRES FRONTOTEMPORALES.....	42
2.1.1 Les démences frontotemporales.....	42
2.1.2 Aphasie primaire progressive.....	46
2.2 LES ATROPHIE CORTICALES POSTERIEURES OU SYNDROME DE BENSON	48
3 LA DÉMENCE À CORPS DE LEWY.....	49
4 MALADIE DE PARKINSON.....	53

5 AUTRES SYNDROMES PARKINSONIENS.....	54
5.1 DÉGENERESCENCE CORTICOBASALE.....	55
5.2 PARALYSIE SUPRANUCLÉAIRE PROGRESSIVE.....	56
6 MALADIES À PRION : ENCÉPHALOPATHIES SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES.....	56
6.1 LES FORMES SPORADIQUES : MALADIE DE CREUTZFELDT JAKOB.....	56
6.2 LES FORMES GÉNÉTIQUES.....	57
6.3 LES FORMES ACQUISES.....	58
6.3.1 Le Kuru.....	58
6.3.2 Formes iatrogènes.....	58
6.3.3 Nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob.....	58
6.4 DIAGNOSTIC DES ENCÉPHALOPATHIES SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES : EXAMENS PARACLIQUES ET NEUROPATHOLOGIE.....	59
7 DÉMENCES ET FORMES PRODROMALES.....	60
<u>CHAPITRE II : PROTÉINOPATHIES.....</u>	65
1 PHÉNOMÈNE D'AGRÉGATION.....	66
2 PHYSIOLOGIE ET ÉTIOPATHOGENÈSE DES PROTÉINOPATHIES.....	69
2.1 TAUOPATHIES.....	69
2.1.1 Protéine tau.....	70
2.1.2 Physiopathologie de la protéine tau.....	71
2.2 AMYLOIDOPATHIES.....	78
2.2.1 Le peptide A β	78
2.2.2 Physiopathologie du peptide A β	79
2.3 ALPHA-SYNUCLÉOPATHIES.....	80
2.3.1 α -synucléine.....	81
2.3.2 Physiopathologie de l' α -synucléine.....	81

2.4 MALADIES À PRION.....	82
2.4.1 Protéine Prion.....	82
2.4.2 Physiopathologie de la protéine Prion.....	83
2.5 TDP43-PATHIES.....	84
2.6 LE CAS DES ISOPEPTIDES : VERS UNE ÉTIOPATHOGENÈSE COMMUNE DES PROTÉINOPATHIES ?.....	85
2.7 SYNTHÈSE.....	86

3 PERSPECTIVES POUR UNE THÉRAPEUTIQUE ÉTIOLOGIQUE..... 87

CHAPITRE III : BIOLOGIE DES DÉMENCES..... 89

1 MARQUEURS ÉTIOLOGIQUES..... 90

1.1 PROTÉINES TAU.....	91
1.1.1 Protéines tau totales.....	91
1.1.2 Protéines tau phosphorylées.....	93
1.2 PEPTIDE A β	96
1.3 α -SYNUCLÉINE.....	100
1.4 PROTÉINE PRION.....	101
1.4.1 Protéine Prion et diagnostic de certitude.....	101
1.4.2 La PrP dans les tissus périphériques : une aide au diagnostic <i>ante-mortem</i>	102
1.4.3 La PrP dans le liquide céphalorachidien.....	103
1.4.4 La PrP dans les fluides biologiques périphériques.....	104
1.5 COMBINAISONS DE MARQUEURS.....	105

2 AUTRES MARQUEURS BIOLOGIQUES..... 109

2.1 MARQUEURS BIOLOGIQUES POUR LE DIAGNOSTIC DE LA MALADIE D'ALZHEIMER ET DES SYNDROMES APPARENTÉS.....	109
2.2 DANS LE CADRE D'UNE MALADIE DE CREUTZFELDT-JAKOB.....	110
2.2.1 Protéine 14.3.3.....	110
2.2.2 Autres marqueurs.....	112

TRAVAIL DE THÈSE.....	113
------------------------------	------------

<u>PARTIE 1</u>.....	114
-----------------------------	------------

PERFORMANCE DIAGNOSTIC DES BIOMARQUEURS DU LCR POUR LE DIAGNOSTIC DE LA MALADIE D'ALZHEIMER ET DES SYNDROMES APPARENTÉS : APPLICATION POUR L'IDENTIFICATION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER LORS DE PRESENTATIONS CLINIQUES FOCALES DE LA MALADIE

1 PATIENTS ET METHODES.....	116
------------------------------------	------------

1.1 SÉLECTION DES PATIENTS.....	116
---------------------------------	-----

1.1.1 Patients pour l'évaluation de la performance du dosage des marqueurs du LCR utilisés en routine.....	116
--	-----

1.1.2 Patients pour l'évaluation de la performance du dosage du peptide A β ₄₀ dans le LCR et du ratio A β ₄₂ /A β ₄₀ associés aux protéines T-tau et p-tau ₁₈₁	117
---	-----

1.1.3 Patients pour l'évaluation de la performance du dosage des marqueurs du LCR lors de présentations focales de démences neurodégénératives.....	117
---	-----

<i>1.1.3.1 Classification clinique.....</i>	<i>118</i>
---	------------

<i>1.1.3.2 Classification biologique.....</i>	<i>118</i>
---	------------

1.2 ANALYSES BIOLOGIQUES DU LIQUIDE CÉPHALORACHIDIEN.....	119
---	-----

1.2.1 Récolte des échantillons biologiques et conservation.....	119
---	-----

1.2.2 Dosage des biomarqueurs du liquide céphalorachidien.....	119
--	-----

1.3 ANALYSES STATISTIQUES.....	120
--------------------------------	-----

2 RESULTATS.....	120
-------------------------	------------

2.1 ÉVALUATION DE LA PERFORMANCE DU DOSAGE DES BIOMARQUEURS DU LCR UTILISÉS EN ROUTINE POUR LE DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL DE LA MALADIE D'ALZHEIMER : T-TAU, P-TAU ₁₈₁ ET A β ₄₂	120
---	-----

2.1.1 Présentation des résultats globaux.....	121
---	-----

2.1.2 Présentation des résultats dans un contexte de diagnostic différentiel.....	123
---	-----

2.2 ÉVALUATION DE LA PERFORMANCE DU DOSAGE DU PEPTIDE A β ₄₀ DANS LE LCR ET DU RATIO A β ₄₂ /A β ₄₀ ASSOCIÉS AUX PROTÉINES T-TAU ET P-TAU ₁₈₁ POUR LE DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL DE LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	128
2.3 ÉVALUATION DE LA PERFORMANCE DU DOSAGE DES BIOMARQUEURS DU LCR LORS DE PRÉSENTATIONS CLINIQUES FOCALES DE DÉMENCES NEURODÉGÉNÉRATIVES.....	134
2.3.1 Syndrome Amnésique.....	134
2.3.2 Syndrome frontal.....	136
2.3.3 Syndrome aphasique.....	137
2.3.4 Syndrome corticobasal.....	139
2.3.5 Syndrome de Benson	140
2.3.6 Syndrome de PSP	142
3 DISCUSSION.....	142
3.1 VALIDATION DES SEUILS DES BIOMARQUEURS DU LCR UTILISÉS EN ROUTINE POUR LE DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL DE LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	142
3.2 ANALYSE DE LA PERFORMANCE DIAGNOSTIC DU DOSAGE DU PEPTIDE A β ₄₀ DANS LE LCR ET DU RATIO A β ₄₂ /A β ₄₀ ASSOCIÉ AU DOSAGE DES PROTÉINES T-TAU ET P-TAU ₁₈₁	144
3.3 ÉVALUATION DE LA PERFORMANCE DES BIOMARQUEURS DU LCR LORS DE PRÉSENTATIONS FOCALES DE DÉMENCES NEURODÉGÉNÉRATIVES.....	146
4 BIOMARQUEURS DU LCR DANS L'ATROPHIE CORTICALE POSTÉRIEURE...	151
<u>PARTIE 2</u>.....	160
EXTRACTION DES PROTÉINES TAU PATHOLOGIQUES CÉRÉBRALES ET DIAGNOSTIC BIOCHIMIQUE DE CERTITUDE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER ET DES AUTRES TAUOPATHIES : APPLICATION POUR L'AIDE A LA CARACTERISATION DE PATHOLOGIES TAU DANS LA MUTATION E200K DE LA MALADIE DE CREUTZFELDT-JAKOB	

1 PATIENTS ET METHODES.....	162
1.1 PATIENTS.....	162
1.2 EXTRACTION DES PHF INTRACÉRÉBRALES.....	162
1.3 WESTERN BLOT.....	163
2 RÉSULTATS.....	164
3 DISCUSSION.....	165
4 MALADIE DE CREUTZFELDT-JAKOB LIÉE À LA MUTATION E200K : CARACTERISATION D'UNE PROTÉINOPATHIE COMPLEXE.....	168
<u>PARTIE 3</u>.....	189
CONCEPTION ET CARACTERISATION D'ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGÉS CONTRE LA PROTÉINE TAU ET SES PHOSPHORYLATIONS	
1 MATÉRIEL ET METHODES.....	190
1.1 CONCEPTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX.....	190
1.2 CARACTÉRISATION DES ANTICORPS.....	191
1.2.1 Patients et échantillons.....	191
1.2.1.1 <i>Patients</i>	191
1.2.1.2 <i>Échantillons</i>	192
1.2.1.2.1 <i>Reconformation des PHF dans leurs formes biologiques natives</i>	192
1.2.1.2.2 <i>Déphosphorylation des protéines tau dans le LCR et des PHF</i>	192
1.2.2.2 <i>Dot Blot</i>	193
1.2.2.3 <i>Western Blot</i>	193
1.2.2.4 <i>Immunohistochimie</i>	194

2 RESULTATS.....	194
2.1 RÉACTIVITÉ DES CLONES.....	194
2.2 SPÉCIFICITÉ DES CLONES.....	195
2.2.1 Immunohistochimie.....	195
2.2.2 Western Blot.....	196
3 DISCUSSION.....	200
<u>PARTIE 4</u>.....	202
 MISE AU POINT D'UN OUTIL IMMUNOLOGIQUE DE TYPE ELISA POUR LE DOSAGE DE LA PROTÉINE TAU PHOSPHORYLÉE SUR L'ACIDE AMINÉ 231	
1 MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	203
1.1 ÉCHANTILLONS.....	203
1.2 MÉTHODOLOGIE.....	203
1.2.1 Détermination des paramètres initiaux.....	204
1.2.1.1 Détermination de la concentration optimale de l'anticorps de capture pour sa fixation.	204
1.2.1.2 Détermination de la nature et de la concentration du saturant à utiliser.....	205
1.2.2 Mise au point de la détection de la p-tau ₂₃₁ dans le liquide céphalorachidien.....	205
1.2.2.1 Détection par le système biotine-avidine.....	205
1.2.2.2 Détection par le système HRP.....	206
2 RÉSULTATS.....	206
2.1 DÉTECTION PAR LE SYSTÈME BIOTINE-AVIDINE.....	206
2.1.1 Détermination des paramètres initiaux.....	206
2.1.2 Mise au point de la détection de la p-tau ₂₃₁ dans le liquide céphalorachidien.....	208
2.2 DÉTECTION PAR LE SYSTÈME HRP.....	215

3 DISCUSSION.....	219
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	223
ANNEXES.....	228
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	259

Liste des figures

<u>Figure 1.</u> Progression de l'atrophie corticale observée à l'IRM au cours d'une maladie d'Alzheimer.....	28
<u>Figure 2.</u> Pathologie cérébrovasculaire vue à l'IRM (séquence FLAIR) chez un patient atteint par une maladie d'Alzheimer.....	29
<u>Figure 3.</u> TEP au ¹¹ C-PIB chez un patient atteint par une maladie de Parkinson et un patient atteint par une démence à corps de Lewy.....	31
<u>Figure 4.</u> Coupe de tissu cérébral au sein duquel plusieurs formes de pathologies amyloïdes sont retrouvées.....	33
<u>Figure 5.</u> DNF et fibres tortueuses dans la maladie d'Alzheimer.....	34
<u>Figure 6.</u> Coupes de tissus cérébraux marquées avec l'anticorps AT8 représentant les 6 stades de Braak observés dans la maladie d'Alzheimer.....	36
<u>Figure 7.</u> Évolution des DNF intracérébrales selon les stades de Braak.....	37
<u>Figure 8.</u> Hémisphère cérébrale gauche d'un patient atteint par une démence frontotemporale (sous-type maladie de Pick).....	44
<u>Figure 9.</u> DATSCAN.....	51
<u>Figure 10.</u> Relations clinicopathologiques entre la maladie d'Alzheimer et les pathologies liées aux corps de Lewy (maladie de Parkinson et démence à corps de Lewy).....	53
<u>Figure 11.</u> Progression lésionnelle de la maladie d'Alzheimer en fonction de la symptomatologie de la maladie.....	62
<u>Figure 12.</u> Structure et isoformes de la protéine tau.....	70
<u>Figure 13.</u> Séquence d'apparition des coupures protéolytiques de la protéine tau et rôles dans la physiopathologie de la formation et de la maturation des DNF.....	73
<u>Figure 14.</u> Physiopathologie de la fibrillation de la protéine tau et genèse des DNF.....	75
<u>Figure 15.</u> Profils électrophorétiques des PHF en WB dans différentes tauopathies.....	77
<u>Figure 16.</u> Profils électrophorétiques des PHF en WB et isoformes de protéines tau intervenant dans différentes tauopathies.....	77
<u>Figure 17.</u> Coupures protéolytiques de la protéine « APP » : voie amyloïdogène.....	78
<u>Figure 18.</u> Modèles de conversion conformationnelle de la protéine prion native en protéine prion pathologique.....	84
<u>Figure 19.</u> Classification histologique et protéique des démences neurodégénératives sporadiques.....	87
<u>Figure 20.</u> Formes majoritaires d'Aβ retrouvées dans le LCR.....	98

<u>Figure 21.</u> Comparaison des concentrations des protéines T-tau, p-tau ₁₈₁ et du peptide A β ₄₂ dans le LCR entre les patients souffrants d'une maladie d'Alzheimer, ceux atteints par une autre démence et les patients sans processus dégénératifs.....	122
<u>Figure 22.</u> Courbes ROC des 3 biomarqueurs du LCR dans le diagnostic différentiel de la maladie d'Alzheimer par rapport aux atteintes neurologiques non dégénératives et aux autres démences neurodégénératives.....	123
<u>Figure 23.</u> Comparaison des concentrations des protéines T-tau, p-tau ₁₈₁ et du peptide A β ₄₂ dans le LCR dans différentes démences neurodégénératives.....	124
<u>Figure 24.</u> Courbes ROC des 3 biomarqueurs du LCR dans le diagnostic différentiel de la maladie d'Alzheimer par rapport à toutes les démences neurodégénératives étudiées.....	125
<u>Figure 25.</u> Comparaison des concentrations des peptides A β ₄₂ et A β ₄₀ dans le LCR ainsi que du ratio A β ₄₂ /A β ₄₀ entre les patients atteints par une maladie d'Alzheimer, ceux atteints par une autre démence et les patients sans processus dégénératifs.....	129
<u>Figure 26.</u> Comparaison des concentrations des peptides A β ₄₂ et A β ₄₀ dans le LCR ainsi que du ratio A β ₄₂ /A β ₄₀ entre les patients atteints par une maladie d'Alzheimer et ceux atteints par une autre démence.....	130
<u>Figure 27.</u> Courbes ROC des T-tau, p-tau ₁₈₁ , A β ₄₂ et A β ₄₀ dans le LCR ainsi que du ratio A β ₄₂ /A β ₄₀ dans le diagnostic différentiel de la maladie d'Alzheimer par rapport aux atteintes neurologiques non dégénératives et aux autres démences neurodégénératives.....	131
<u>Figure 28.</u> Courbes ROC des T-tau, p-tau ₁₈₁ , A β ₄₂ et A β ₄₀ dans le LCR ainsi que du ratio A β ₄₂ /A β ₄₀ dans le diagnostic différentiel de la maladie d'Alzheimer par rapport à toutes les démences neurodégénératives étudiées.....	132
<u>Figure 29.</u> Distributions des diagnostics cliniques et biologiques des patients présentant un syndrome amnésique.....	135
<u>Figure 30.</u> Répartition des diagnostics cliniques des patients amnésiques avec une biologie du LCR normale (A), typique de la maladie d'Alzheimer (B) ou atypique (C).....	135
<u>Figure 31.</u> Distributions des diagnostics cliniques et biologiques des patients présentant un syndrome frontal.....	136
<u>Figure 32.</u> Confrontation des diagnostics cliniques et biologiques chez les patients présentant un syndrome frontal.....	137
<u>Figure 33.</u> Distributions des diagnostics cliniques et biologiques des patients présentant une aphasie primaire progressive.....	138
<u>Figure 34.</u> Répartition des profils biologiques au sein des différentes populations aphasiques.....	138

<u>Figure 35.</u> Confrontation des diagnostics cliniques et biologiques chez les patients présentant un syndrome aphasique.....	139
<u>Figure 36.</u> Distributions des diagnostics cliniques et biologiques des patients présentant un syndrome corticobasal.....	140
<u>Figure 37.</u> Confrontation des diagnostics cliniques et biologiques chez les patients présentant un syndrome corticobasal.....	140
<u>Figure 38.</u> Distributions des diagnostics cliniques et biologiques des patients présentant une atrophie corticale postérieure.....	141
<u>Figure 39.</u> Confrontation des diagnostics cliniques et biologiques chez les patients présentant une atrophie corticale postérieure.....	141
<u>Figure 40.</u> Distributions des diagnostics biologiques des patients présentant un syndrome de paralysie supranucléaire progressive.....	142
<u>Figure 41.</u> Western Blots de PHF extraites de différentes zones cérébrales de deux patients atteints par une maladie d'Alzheimer à des stades de Braak 5 et 1 révélés avec l'anticorps T46.....	164
<u>Figure 42.</u> Western Blots des PHF dans le cadre d'une mutation S305I et d'une maladie de Pick révélés avec l'anticorps monoclonal T46.....	165
<u>Figure 43.</u> Dot Blot des meilleurs clones sélectionnés parmi les 80 clones testés pour leurs réactivités.....	195
<u>Figure 44.</u> Coupes de tissus cérébraux de patients atteints par différentes tauopathies révélés par les anticorps 4C10, 2B11, 5G7 et 9D8.....	196
<u>Figure 45.</u> Western Blots de PHF extraites de cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer à des stades de Braak 1 et 5 révélées par les anticorps monoclonaux 4C10 et 6F4.....	197
<u>Figure 46.</u> Western Blots de PHF extraites de cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer à des stades de Braak 1 et 5 révélées par les anticorps monoclonaux 2B11, 3G3, 5G7 et 9D8.....	198
<u>Figure 47.</u> Western Blots des PHF dans le cadre d'une mutation S305I et d'une maladie de Pick révélés avec les anticorps monoclonaux 5G7, 2B11 et 9D8.....	199
<u>Figure 48.</u> Détection des PHF en fonction de la concentration de T46 fixée sur la plaque 96 puits avec 3 saturations courantes.....	207
<u>Figure 49.</u> Détermination de la saturation optimale avec l'anticorps de capture 2B11.....	207
<u>Figure 50.</u> Meilleures saturations pour l'anticorps de capture 2B11.....	208

<u>Figure 51.</u> Détection de la tau phosphorylée sur l'acide aminé 231 dans le LCR avec le 2B11.....	209
<u>Figure 52.</u> Incubation de l'anticorps de détection 2B11 à 4°C pendant 12 heures	210
<u>Figure 53.</u> Détection de la p-tau ₂₃₁ dans le LCR dilué (1/2) dans du PBS (pH 7.4) contenant du Triton X-100 à 0.05% (vol/vol) révélé par le 2B11	212
<u>Figure 54.</u> Détection de la p-tau ₂₃₁ dans le LCR dilué (1/2) dans du PBS (pH 7.4) contenant du Triton X-100 à 0.05% (vol/vol) incubé à 4°C et révélé par le 2B11.....	213
<u>Figure 55.</u> Détection de la p-tau ₂₃₁ dans le LCR dilué (1/2) dans du PBS (pH 7.4) contenant du Triton X-100 à 0.05% (vol/vol) incubé à 4°C et révélé par le 5G7.....	214
<u>Figure 56.</u> Détection de la p-tau ₂₃₁ dans le LCR révélé par le 2B11 avec une saturation au lait.....	216
<u>Figure 57.</u> Détection de la p-tau ₂₃₁ dans le LCR révélé par le 2B11 avec une saturation à la BSA et HSA.....	216
<u>Figure 58.</u> Détection de la p-tau ₂₃₁ dans le LCR déposé pur et révélé par le 2B11.....	217
<u>Figure 59.</u> Détection de la p-tau ₂₃₁ dans le LCR déposé pur et révélé par le 2B11.....	218
<u>Figure 60.</u> Détection de la protéine prion dans le LCR déposé pur et révélée par le 15F5...	218
<u>Figure 61.</u> Coupes de tissus cérébraux arborant des lésions tauopathiques marquées par des anticorps anti-prion en immunohistochimie.....	222

Liste des tableaux

<u>Tableau 1.</u> Répartitions allélique du génotype de l'ApoE en fonction du statut pathologique (sujets sains ou sujets atteints d'une maladie d'Alzheimer)	41
<u>Tableau 2.</u> Principales inclusions protéiques responsables d'une démence frontotemporale.....	45
<u>Tableau 3.</u> Classification des sous-types cliniques de MCI avec leurs étiologies présumées.....	63
<u>Tableau 4.</u> Protéines et protéinopathies.....	68
<u>Tableau 5.</u> Récapitulatif des variations de concentrations dans le LCR des marqueurs étiologiques dans les principales démences.....	100
<u>Tableau 6.</u> Moyennes des MMS et des concentrations des protéines T-tau, p-tau ₁₈₁ et du peptide A β ₄₂ dans le LCR selon les différents groupes de patients.....	121
<u>Tableau 7.</u> Détermination des seuils optimaux des concentrations des 3 biomarqueurs pour le diagnostic différentiel de la maladie d'Alzheimer.....	126
<u>Tableau 8.</u> Apport des 3 biomarqueurs du LCR pour le diagnostic différentiel de la maladie d'Alzheimer.....	127
<u>Tableau 9.</u> Moyenne des ages, scores du MMS et concentrations des biomarqueurs du LCR avec le ratio A β ₄₂ /A β ₄₀ obtenus selon les différents groupes de patients étudiés.....	128
<u>Tableau 10.</u> Meilleurs seuils des concentrations des peptides A β ₄₂ et A β ₄₀ dans le LCR ainsi que du ratio A β ₄₂ /A β ₄₀ pour le diagnostic différentiel de la maladie d'Alzheimer	133
<u>Tableau 11.</u> Performance diagnostique de l'association des protéines T-tau, p-tau ₁₈₁ et du ratio A β ₄₂ /A β ₄₀ pour le diagnostic différentiel de la maladie d'Alzheimer	134

Liste des abréviations

α -Syn :	α -synucléine
A β :	amyloïde bêta
ACP :	atrophie corticale postérieure
APNF:	aphasie primaire non fluente
ApoE:	apolipoprotéine E
APP:	aphasie primaire progressive
CL:	corps de Lewy
DCB:	dégénérescence corticobasale
DCL:	démence à corps de Lewy
DFT:	démence frontotemporale
DFTP-17:	démence frontotemporale liée au chromosome 17
DLFT:	dégénérescence lobaire frontotemporale
DNF:	dégénérescence neurofibrillaire
EEG:	électroencéphalogramme
EST:	encéphalopathie spongiforme transmissible
GSS:	Gerstman-Straussler-Sheinker
IFF:	insomnie fatale familiale
IRM:	imagerie par résonance magnétique
IRS:	inhibiteur de la recapture de la sérotonine
LCR:	liquide céphalorachidien
M:	méthionine
MA:	maladie d'Alzheimer
MCI:	mild cognitive impairment = troubles cognitifs légers
MCJ:	maladie de Creutzfeldt-Jakob
MMS:	mini mental state evaluation
MP:	maladie de Parkinson
MT:	microtubules
ND:	non-dégénératif
OD:	autres démences
PHF :	« Paired Helical Filament » (paires de filaments hélicoïdaux)
PK:	protéinase K
PrP:	protéine Prion

PS:	plaque sénile
p-tau:	protéines tau phosphorylées
SCB:	syndrome corticobasal
SLA:	sclérose latérale amyotrophique
SP:	paralysie supranucléaire progressive
SPSP:	syndrome de paralysie supranucléaire progressive
TEP:	tomographie par émission de positron
TG:	transglutaminase
T-tau:	protéines tau totales
V:	valine
vMCJ:	variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob
WB:	western blot

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La maladie d'Alzheimer est la démence neurodégénérative la plus fréquemment rencontrée dans nos sociétés occidentales. Elle touche principalement les sujets de plus de 70 ans. Néanmoins, avec l'allongement de l'espérance de vie, le nombre de patients atteints par cette pathologie ne va cesser d'augmenter dans les années à venir. Le diagnostic de la maladie d'Alzheimer représente donc un enjeu de santé publique important. La précocité du diagnostic devrait permettre de proposer plus précocement aux patients une prise en charge adaptée. Concernant la prise en charge thérapeutique, il a été montré récemment que l'instauration de traitements adaptés à des stades débutants ou peu évolués de la maladie permettait de retarder l'entrée dans la démence et par voie de conséquence la mise en institution de ces patients.

Pourtant, le diagnostic de la maladie d'Alzheimer n'est pas aisé, notamment à cause de la fréquence de présentations cliniques atypiques pouvant correspondre à d'autres affections neurodégénératives. En ce sens, les examens paracliniques (imagerie et biologie notamment) permettent d'améliorer, en association avec l'expertise clinique, le diagnostic de cette pathologie. Dans ce domaine, la biologie, et notamment l'analyse d'anomalies retrouvées dans le liquide céphalorachidien, permet d'obtenir de bonnes performances diagnostiques et améliorent considérablement l'identification des pathologies sous-jacentes face à un syndrome démentiel. Cependant, et comme nous le verrons au cours de ce travail, les lésions cérébrales responsables des différentes étiologies neurodégénératives (en apparence cliniquement bien définies) peuvent coexister au sein d'un même patient. Ce phénomène n'est pas rare et contribue aux erreurs diagnostiques, autant d'un point de vue clinique et radiologique que biologique.

C'est donc dans ce contexte diagnostique étiologique difficile de présentations cliniques non amnésiques de la maladie d'Alzheimer que se situe les objectifs de ma thèse, financée par le projet européen Neuroscreen (EU FP6) et initiée par un PHRC régional (Pierre Krolak-Salmon, 2004) : dresser un état des lieux avec les outils biologiques commerciaux existants et développer des outils susceptibles d'améliorer le diagnostic différentiel de la maladie d'Alzheimer du vivant du patient dans le liquide céphalorachidien.

L'objectif de la première partie de notre travail a été d'évaluer la performance des marqueurs du liquide céphalorachidien proposés dans le cadre du diagnostic de routine de la maladie d'Alzheimer depuis son introduction en 2007 au sein du laboratoire de Neurobiologie du groupement hospitalier Est (Lyon). Il semblait admis par la communauté scientifique

internationale que la diminution de la concentration du peptide amyloïde β de 42 acides aminés dans le LCR témoignait de la présence de dépôts amyloïdes cérébraux en reflétant la séquestration intracérébrale de ce peptide. Récemment, les premières publications concernant la charge intrathécale totale des peptides amyloïdes β suggèrent que la concentration du peptide de 42 acides aminés puisse résulter d'une part de son catabolisme et d'autre part de la charge totale de ce peptide. Nous avons donc effectué la première évaluation de marqueurs complémentaires du peptide amyloïde β (introduit au sein du laboratoire en 2010) susceptibles d'améliorer la sensibilité et la spécificité du diagnostic biologique, comparativement aux marqueurs usuels, dans un cadre de démence. L'intérêt diagnostique de ces marqueurs a ensuite été étudié au sein d'une cohorte de patients répartis en fonction de leurs présentations cliniques syndromiques afin d'identifier biologiquement les maladies d'Alzheimer à présentation clinique focale.

Dans une seconde partie nous avons mis en place au sein du laboratoire une technique biochimique d'extraction des protéines pathologiques responsables d'une des deux lésions cérébrales rencontrées dans la maladie d'Alzheimer (protéines tau). Ces extractions à partir de tissus cérébraux permettent d'apporter un argument complémentaire au diagnostic anatomopathologique de certitude grâce à l'immuno-empreinte de ces protéines tau pathologiques séparées électrophorétiquement. Cette technique a notamment permis d'aider à caractériser des pathologies concomitantes dans une forme génétique de maladie de Creutzfeldt-Jakob lors d'une étude multicentrique.

Dans un contexte d'amélioration des outils biologiques préexistants, la troisième partie de ce travail a été de concevoir et de caractériser des outils immunologiques dirigés contre certaines phosphorylations de la protéine tau, notamment la phosphorylation en position 231. En effet, à côté du dosage dans le LCR de la protéine tau phosphorylée en 181 et réalisé en routine, d'autres phosphorylations de cette protéine présentant un intérêt pour le diagnostic ont été décrites. L'anticorps développé contre la phosphorylation 231 avait été testé par l'équipe du Dr. Perret-Liaudet avant mon arrivée au sein du laboratoire dans le cadre d'une collaboration avec la société bioMérieux et le Dr. Ray Zinkowski. Ces essais avaient montré, sur une petite cohorte de patients, son intérêt pour le diagnostic précoce. En revanche, le manque de praticabilité avec notamment des temps d'incubation supérieurs à 66 heures ne permettait pas d'envisager de déboucher sur un test de routine visant à être réalisé à grande échelle dans un laboratoire de biochimie clinique. Conçus au sein d'un *consortium* européen, les outils mis à

notre disposition ont été systématiquement sélectionnés et caractérisés notamment à l'aide des techniques mises en œuvre lors de la deuxième partie.

Après la sélection des meilleurs anticorps validés sur des prélèvements cérébraux nous nous sommes attelé dans la quatrième partie, au transfert technologique de ces nouveaux outils pour une application dans le liquide céphalorachidien avec comme objectif final un test ELISA susceptible de doser notamment la protéine tau phosphorylée sur l'acide aminé 231 particulièrement présente dans le liquide céphalorachidien de patients atteints par la maladie d'Alzheimer lors des stades initiaux de la maladie.

CONTEXTE ET ÉTAT DE L'ART

CHAPITRE I : LES DÉMENCES NEURODÉGÉNÉRATIVES

La démence est un syndrome clinique résultant d'une affection cérébrale, caractérisé par un déclin progressif des fonctions cognitives, associant notamment des troubles du jugement ou de la personnalité ainsi qu'une perte d'autonomie.

Le syndrome démentiel peut être réversible ou irréversible selon l'étiologie. Le champ étiologique de la démence est non seulement étendu mais aussi complexe, et nécessite une investigation rigoureuse pour parvenir au diagnostic étiologique. Les causes de la démence peuvent être multiples : les démences pouvant être post-traumatiques, secondaires d'hydrocéphalies ou de syndromes néoplasiques, induites par des toxiques (tels que l'alcool, le monoxyde de carbone ou encore les psychotropes), d'origine infectieuse (encéphalopathie syphilitique, herpétique et virus de l'immunodéficience humaine [VIH] par exemple), inflammatoire (sclérose en plaques), d'ordre métabolique (déficits en vitamines B12, PP, B1, ou dysthyroïdies), psychiatriques (schizophrénie, syndromes dépressifs), vasculaire et enfin neurodégénérative. Les démences neurodégénératives représentent à elles seules un champ pathologique des plus étendus et se distinguent en général cliniquement suivant la localisation anatomique du *primum movens* lésionnel ainsi que par les protéines mises en jeu dans l'établissement de ces lésions. Se sont des maladies au pronostic très sombre pour lesquelles aucun traitement curatif n'est disponible à l'heure actuelle. Les démences neurodégénératives restent encore sous diagnostiquées puisque 50% des personnes atteintes ne sont pas diagnostiquées selon le rapport de l'office parlementaire d'évaluation des politiques de santé (OPEPS, 2005).*

1 LA MALADIE D'ALZHEIMER

La maladie d'Alzheimer (MA) débute de façon insidieuse par des manifestations cognitives aboutissant, après plusieurs années, à des troubles mnésiques sévères. La durée de la maladie varie de 2 à 20 ans ; selon une étude présentant une large cohorte de patients atteints par la MA (n=821) la médiane de survie varie de 5.6 à 5.9 ans après les premiers symptômes.¹

L'incapacité de retenir des informations récentes est le mode d'entrée classique dans la maladie, les personnes atteintes se souvenant, à ce stade précoce, d'informations et souvenirs plus anciens. Au cours de la progression de la maladie, d'autres fonctions cognitives sont

* Rapport sur la maladie d'Alzheimer et les maladies apparentées par Mme Cecile Gallez, Députée, paru en 2005.

altérées telles que le langage, les fonctions exécutives ou encore la capacité décisionnelle. Des troubles thymiques* ainsi qu'un émoussement affectif† peuvent souvent accompagner le déclin cognitif et il n'est pas rare de retrouver une comorbidité entre la dépression et la MA.² De même, certains troubles tels que des manifestations d'ordre psychotiques (hallucinations notamment) ou encore un syndrome extrapyramidal peuvent être retrouvés au cours de la MA bien que cette symptomatologie ne soit pas typique de l'histoire naturelle de la maladie.^{3, 4} L'étendue des présentations cliniques de la MA s'associent donc volontiers en un syndrome, faisant du diagnostic de la MA un diagnostic difficile et une démarche rigoureuse pour le clinicien puisque certaines atypies cliniques, troubles psychiatriques ou un syndrome dysexécutif, vont plutôt évoquer d'autres démences neurodégénératives comme la démence à corps de Lewy (DCL) ou la démence frontotemporale (DFT). Le diagnostic différentiel de la MA peut ainsi être très étendu.⁵

1.1 Épidémiologie

La MA est la principale cause de démence, représentant plus de 60% des démences, en regard de la DCL, des dégénérescences lobaires frontotemporale (DLFT) ou de la démence vasculaire. La prévalence des démences, évaluée à plus de 20% dans la population âgée de plus de 85 ans, augmente linéairement avec l'âge.⁶ C'est dans un contexte démographique vieillissant que s'inscrit l'augmentation du nombre de ces malades dans les années à venir. En effet, la démence du sujet âgé est l'une des principales causes de dépendance, représentant un problème de santé publique prégnant. Une étude internationale sur l'impact de la MA dans le monde estime à plus de 24 millions de malades atteints par une démence neurodégénérative avec près de 4.6 millions de nouveaux cas par an.⁶ En France, 754 000 cas de MA et syndromes apparentés ont ainsi pu être recensés en 2010, dont plus de 70% serait des femmes, avec une incidence de 152 000 nouveaux cas par an.⁷

* Troubles de l'humeur.

† Diminution des réactions émotionnelles, autant positives que négatives.

1.2 Diagnostic*

Le diagnostic de la MA est actuellement fondé sur un faisceau d'arguments cliniques, neuropsychologiques, neuroradiologiques et biologiques. Nous détaillerons ici ces arguments, le diagnostic biologique étant développé dans un chapitre ultérieur.[†]

Le diagnostic de certitude de MA n'est porté qu'après examen neuropathologique du cerveau, avec la mise en évidence des lésions spécifiques de cette pathologie[‡]. Un diagnostic de « MA probable » est porté du vivant du patient si les critères typiques de MA sont remplis et de « MA possible » si des atypies sont retrouvées au sein du tableau clinique. La performance du diagnostic clinique de la MA probable reste modeste puisqu'il obtient une sensibilité d'environ 80% avec une spécificité de 70%.[§] Il existe en effet un recouvrement clinique entre les démences ayant pour origine une MA et les démences d'autres étiologies, favorisant la faible précision du diagnostic clinique, sa spécificité dans la MA possible étant inférieure à 50%.[§] Les examens morphologiques (imagerie), électrophysiologiques[§] et biologiques permettent non seulement d'améliorer la précision du diagnostic différentiel mais aussi, comme nous le verrons plus loin, la précocité de ce diagnostic.

1.2.1 Évaluation clinique et neuropsychologique

Les aspects cliniques sont essentiels pour porter le diagnostic de MA. Le début de la maladie se caractérise par un déclin cognitif progressif avec, au premier plan, des troubles mnésiques associés à au moins une autre atteinte cognitive d'un autre domaine (aphasie, apraxie, agnosie, syndrome dysexécutif) selon les critères de définition de la MA du DSM-IV.^{**9} Une batterie d'examens neuropsychologiques, dont le Mini Mental State Evaluation^{††} ou MMS,¹⁰

* Excepté le diagnostic biologique.

† Cf. **Chapitre III : Biologie des démences**.

‡ Cf. **1.1.3 : Neuropathologie** au sein de ce chapitre.

§ Tracés électroencéphalographiques.

** Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4^e édition, cf. Annexe 1.

†† Test simple et rapide permettant d'évaluer l'état cognitif du patient, ce test est scoré sur 30 et évalue les différents domaines cognitifs. Ce test permet notamment le suivi mais aussi le classement des patients atteints d'une MA selon l'intensité de leurs troubles et le stade de la démence. Un MMS de 30 à 28 n'est pas considéré comme pathologique (ou pouvant correspondre à un stade infra-clinique de la maladie), on parle alors de démence légère si il est compris entre 26 et 20, de démence modérée entre 19 et 10 et de démence sévère si il est inférieur à 10. Un MMS utilisé couramment en pratique clinique est reproduit en Annexe 2.

et le test des 5 mots de Dubois,^{*} permettent de préciser l'atteinte cognitive du tableau clinique, tableau investigué plus précisément par la suite grâce à l'apport d'examen cliniques et paracliniques. Les critères diagnostiques utilisés sont ceux du NINCDS-ADRDA[†].¹¹ Ces critères ne permettent cependant pas de dresser un diagnostic de MA à des stades précoces de la maladie lorsque le patient n'est pas encore installé dans la démence.

La mémoire épisodique est la mémoire la plus spécifiquement touchée dans la MA. Cette mémoire permet le processus d'encodage, de stockage et de récupération des informations. Les souvenirs, liés à des événements vécus, en opposition à la mémoire sémantique,[‡] ont du être encodés *via* la mémoire épisodique grâce à une structure neuroanatomique appelée cortex temporal interne[§] et intervenant dans le circuit de Papez.^{**} Le syndrome amnésique rencontré dans la MA se définit par une amnésie antérograde, altérant en premier lieu la mémoire des événements les plus récents.

Au cours de la progression de la maladie, d'autres déficits apparaissent tels que des troubles visuo-perceptifs^{††}, des troubles du langage ou moteurs (dus à l'apparition de lésions dans les aires cérébrales associatives). Le patient développe également une anosognosie, le patient n'ayant plus conscience de ses troubles. De plus, comme nous l'avons vu au début de ce paragraphe, des troubles psychologiques peuvent apparaître lors de la progression de la MA tels que des troubles thymiques, psychotiques, une agitation, ainsi que des troubles du sommeil. Cette symptomatologie étant couramment observée dans les DCL^{‡‡}, le recouvrement clinique des différentes étiologies rend donc le diagnostic d'autant plus difficile, surtout lorsque ces symptômes sont le mode d'entrée de la maladie.

* Test permettant de tester les capacités de mémorisation et d'objectiver un trouble caractéristique de la MA, cf. Annexe 3.

† Cf. Annexe 4.

‡ Mémoire des faits et des concepts principalement touchée dans certaines pathologies telles que la démence sémantique. Cette pathologie est exposée au sein de ce chapitre dans la partie **2.1.2 : Aphasie primaire progressive**

§ Constitué par le cortex entorhinal, transentorhinal et l'hippocampe.

** Ensemble de structures nerveuses comprenant notamment le cortex entorhinal, l'hippocampe, le thalamus, les corps mamillaires et le gyrus cingulaire. Cette organisation joue un rôle clef dans l'apprentissage et la mémoire. L'information arrivant au niveau du cortex temporal interne va ensuite transiter par les différentes structures de ce circuit pour être encodée au sein du néocortex cérébral et former les souvenirs.

†† Difficulté à distinguer un signe graphique d'un autre, souvent assez proche au niveau de leurs transcriptions.

‡‡ Cf. **3 : La démence à corps de Lewy** au sein de ce chapitre.

Bien qu'une altération précoce de la mémoire épisodique, reflétant l'atteinte du cortex enthorinal, est classiquement observée dans la MA, le mode d'entrée peut se produire avec une préservation relative de cette mémoire épisodique.¹² D'autres atteintes cognitives peuvent apparaître précocement telles que la mémoire sémantique.^{13, 14} Un syndrome dyséxecutif* est communément observé au cours de la MA, cependant ce signe peut être initial avec une préservation de la mémoire chez certains patients et l'apparition d'un syndrome frontal prédominant au premier plan du tableau clinique.^{15†} Ce mode d'entrée non conventionnel n'est pas isolé puisque certains patients peuvent encore présenter des troubles du langage, un déficit visuospatial ou encore un syndrome de Balint‡ de façon précoce, ces signes étant usuellement rencontrés lors des stades avancés de la maladie. Comme nous le verrons plus loin dans ce chapitre avec les atrophies focales,§ la MA peut revêtir d'autres symptomatologies. Ces présentations cliniques reflètent la localisation anatomique du *primum movens* lésionnel de la maladie. La distribution des lésions, tout comme la nature des lésions elles-mêmes, changent le tableau clinique, il apparaît alors pertinent de considérer la MA au sein d'un spectre clinico-pathologique pouvant aussi revêtir cliniquement la forme de syndromes focaux.¹⁶

1.2.2 Imagerie

L'imagerie structurale est d'importance pour le diagnostic de la MA, car elle permet non seulement d'éliminer une autre étiologie potentiellement traitable chirurgicalement (telles qu'une tumeur ou encore une hydrocéphalie chronique de l'adulte), mais également d'objectiver des changements anatomiques particuliers rencontrés dans la MA. Le scanner et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) sont deux techniques couramment employées lors de l'enquête diagnostique. Cependant l'IRM reste l'examen morphologique le plus

* Perturbation des fonctions exécutives telles que l'anticipation, la sélection de buts, la formulation de plans, l'évaluation et le contrôle du comportement, les fonctions attentionnelles telles que la sélectivité et la persistance. Ce syndrome est notamment présent lors de lésions cérébrales au niveau du lobe frontal. Cependant et étant donné la densité des connections frontales aux autres aires cérébrales, il n'y a pas toujours une correspondance stricte entre ce syndrome et une localisation frontale des lésions ; des aires lésées fortement connectées au lobe frontal pouvant produire une symptomatologie similaire.

† Cf. 2.1.1 : **Les démences frontotemporales** au sein de ce chapitre.

‡ Incapacité d'orienter le regard volontairement dans le champ visuel périphérique (apraxie optique), associée à une incapacité de coordonner la vision et la motricité des membres (ataxie optique) et une simultagnosie (trouble de l'interprétation globale d'une image, le patient ne percevant que des détails non reliés entre eux) par atteinte bilatérale des régions pariéto-occipitales et associée à une dysfonction frontale probable.

§ Cf. 2 : **Les atrophies focales** au sein de ce chapitre.

sensible pour identifier des atteintes vasculaires telles que des micro-infarctus et des signes correspondants à d'autres maladies neurodégénératives comme la paralysie supranucléaire progressive, la dégénérescence corticobasale ou la maladie de Creutzfeldt Jakob.¹⁷

Au cours d'une MA, une atrophie corticale associée à un élargissement des sillons corticaux ainsi que des ventricules cérébraux est visible à l'imagerie. L'atrophie corticale, plus précisément hippocampique, est un signe précocement observé à l'examen morphologique (figure 1). Elle permet une détection des patients atteints par une MA avec une sensibilité de plus de 80% et une spécificité de 90%.¹⁸ Ce signe apparaît comme très discriminatif dans la distinction d'une MA par rapport à d'autres démences (DCL et démence vasculaire notamment) selon une récente étude neuroradiologique avec confirmation neuropathologique.¹⁹ De plus, l'atrophie corticale objectivée à l'IRM au sein du lobe temporal interne est fortement corrélée à la neuropathologie de l'hippocampe ; cette atrophie étant liée à la perte neuronale précoce ayant lieu dans ces régions dans la MA.^{20, 21} Une étude a d'ailleurs confirmée la forte implication des lésions tauopathiques, lésions constituées par des protéines tau pathologiques,* par rapport aux dépôts amyloïdes dans cette atrophie hippocampique.¹⁹

* Cf. **1.1.3 : Neuropathologie** ; ainsi que le chapitre II consacré aux protéinopathies.

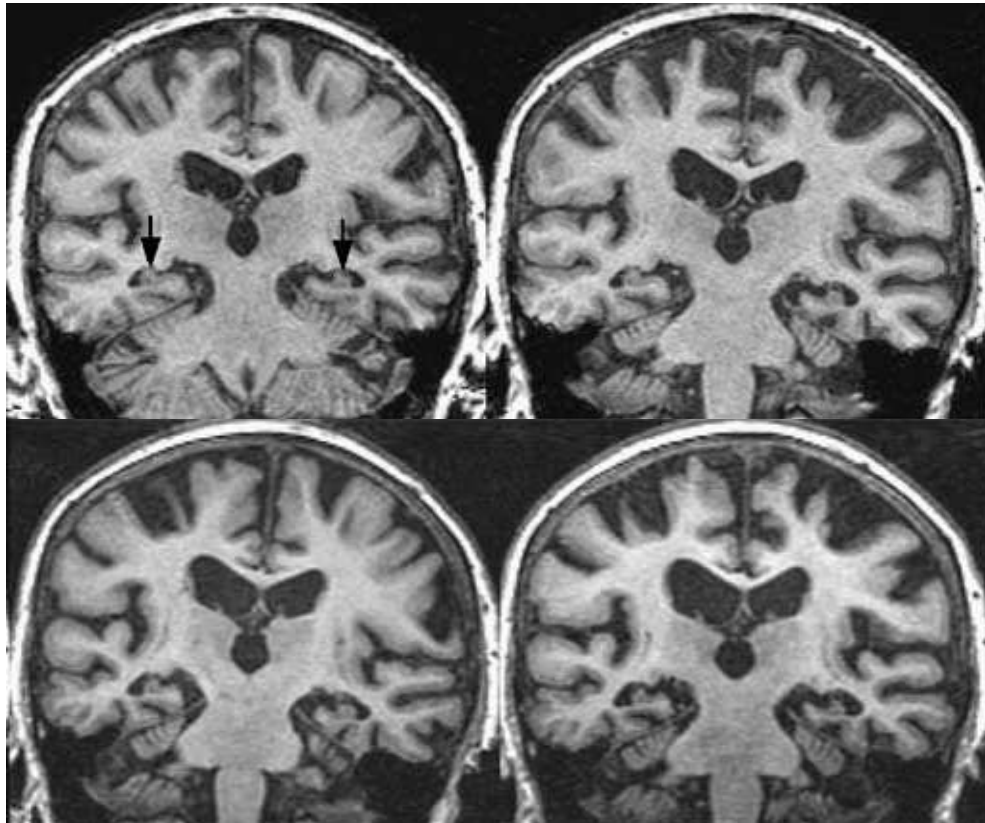


Figure 1. Progression de l'atrophie corticale observée à l'IRM au cours d'une maladie d'Alzheimer. De gauche à droite et de haut en bas, IRM annuelles d'un même patient, les hippocampes sont marqués par les flèches noires au début de la maladie. On note la progression de l'atrophie hippocampique et parahippocampique puis corticale ainsi que l'élargissement des ventricules cérébraux au cours du processus dégénératif (d'après Lehéricy et al., 2007²²).

Cependant, une atrophie corticale au niveau du lobe temporal interne peut signer d'autres syndromes apparentés à la MA. Ce processus, bien que très présent dans la MA n'est donc pas pathognomonique de la maladie. Une atrophie hippocampique peut en effet être retrouvée dans les DLFT mais aussi chez les patients atteints par une DCL ou une démence vasculaire.²³⁻²⁵ Les bases neuropathologiques aboutissant à une morphologie évocatrice d'une MA sont complexes et plusieurs événements physiopathologiques autres qu'une pathologie de type Alzheimer peuvent en être la cause.^{23, 26}

Comme à l'examen clinique, l'imagerie peut révéler des pathologies concomitantes. Il n'est pas rare de trouver des atteintes vasculaires chez des patients atteints par la MA et plus particulièrement dans les formes tardives de MA.²⁷ On parle alors de MA à composante cérébrovasculaire (figure 2).

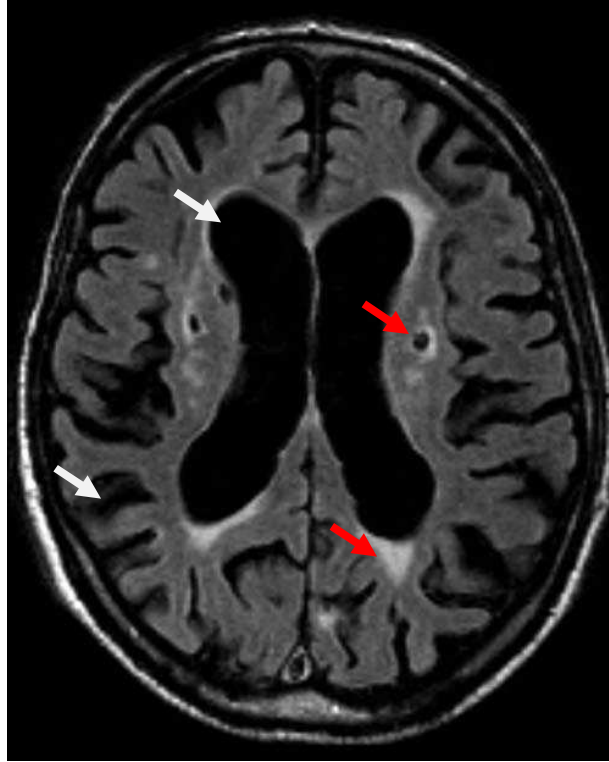


Figure 2. Pathologie cérébrovasculaire vue à l'IRM (séquence FLAIR) chez un patient atteint par une maladie d'Alzheimer. On remarque l'élargissement des sillons corticaux et des ventricules cérébraux (flèches blanches) signant une pathologie neurodégénérative ainsi que des hypersignaux de la substance blanche périventriculaire (flèches rouges) objectivant une pathologie vasculaire et un infarctus lacunaire bilatérale des ganglions de la base (d'après Scheltens 2009¹⁷).

En effet, comme nous l'indique plus spécifiquement la neuropathologie, d'autres pathologies neurodégénératives peuvent agir en regard d'une MA chez un même patient.* Il n'est pas aisé de comprendre de quelle façon concourent des pathologies co-occurentes dans l'établissement du tableau clinique, particulièrement pour les MA à composantes cérébrovasculaires. Cependant de nombreuses études radiologiques ont montré l'association d'accidents vasculaires cérébraux silencieux chez la personne âgée avec l'altération des fonctions cognitives.^{28, 29} Cette mixité pathologique semblerait avoir une action synergique l'une envers l'autre au sein du tableau clinique.³⁰ De plus, une pathologie vasculaire sous-jacente augmenterait la conversion des patients ayant un trouble cognitif léger[†] vers la démence.³¹ Les renseignements que nous fournit la neuroradiologie sur les atteintes vasculaires dans les maladies neurodégénératives peuvent ainsi permettre de ralentir la

* Cf. 1.1.3 : Neuropathologie – 1.1.3.3 : Maladie d'Alzheimer et démences mixtes.

† Cf. 7 : Démences et formes prodromales.

progression de la démence par l'instauration de traitements adaptés tels que des antihypertenseurs par exemple.

De nouvelles techniques d'imagerie, encore au stade de recherche, ont fait leur apparition ces dernières années. Elles permettent de cibler plus particulièrement les événements physiopathologiques rencontrés au cours d'une MA. Ces techniques d'imagerie fonctionnelle et métabolique mettent ainsi en évidence *in vivo* des caractéristiques neuropathologiques jusqu'ici seulement détectables après autopsie et examen anatomopathologique du cerveau. De plus, ces nouvelles techniques concourent à identifier certains substrats physiopathologiques avant que les changements structuraux ne soient visibles sur l'IRM anatomique.³²

Les changements métaboliques, précédant les altérations anatomiques des maladies neurodégénératives, peuvent être étudiés *via* la tomographie par émission de positron (TEP)*. En effet, un hypométabolisme du glucose, visualisé à l'aide du traceur [18F]fluorodesoxyglucose, est observé dans la MA au sein des lobes pariétaux, temporaux et cingulaire postérieur avec une sensibilité et une spécificité supérieure à 90% dans la distinction de patients MA et de sujets sans processus dégénératifs.³³ De plus, cette technique semble intéressante sur le plan des diagnostics différentiels puisqu'elle permet non seulement d'augmenter la précision des diagnostics de MA et de DFT mais également d'améliorer leurs distinctions entre elles.³⁴

De nouvelles applications de la TEP, ciblant plus particulièrement les protéines mises en jeu dans l'établissement des lésions cérébrales responsables de la MA, ont vu le jour ces dernières années. Ainsi le peptide amyloïde, connu pour s'accumuler de façon anormale dans la MA et former les plaques séniles,† peut être visualisé *in vivo* à l'aide de traceurs tels que le 2-(1-{6-[(2-¹⁸F-fluoroethyl)(methyl)amino]-2-naphthyl}ethylidene)malonitrile) (¹⁸F-FDDNP) et le N-methyl-¹¹C-2-(4'-methylamino-phenyl)-6-hydroxy benzothiazole (¹¹C-PIB). Ces deux composés, par leurs affinités particulières pour l'amyloïde, permettent de visualiser les lésions cérébrales spécifiquement rencontrées dans la MA. Ainsi, l'imagerie des patients atteints de

* Méthode d'imagerie fonctionnelle cérébrale permettant d'étudier, de façon quantitative et locale, le devenir de différentes molécules dans le cerveau. Des éléments radioactifs sont incorporés à la place de leurs isotopes naturels dans des molécules biologiques qui sont ensuite injectées aux sujets.

† Cf. 1.1.3 : Neuropathologie au sein de ce chapitre et Chapitre II : Protéinopathies.

MA, montre une rétention des composés ^{18}F -FDDNP et ^{11}C -PIB plus importante que celle présente chez les sujets contrôles sans processus dégénératif.³⁵ De nouvelles molécules permettant de tracer les lésions intracérébrales de la MA sont en cours de développement et pourraient devenir disponibles pour la pratique clinique, comme les TEP au florbetapir* actuellement en étude de phase III.³⁶ Cependant, bien que les techniques d'imageries permettant de tracer l'amyloïde intracérébrale aient une bonne sensibilité pour le diagnostic de la MA, ces lésions sont également rencontrées dans d'autres pathologies neurodégénératives comme les DCL (figure 3) ou certaines pathologies vasculaires mettant en jeu ce peptide telles que l'angiopathie amyloïde.^{†37}

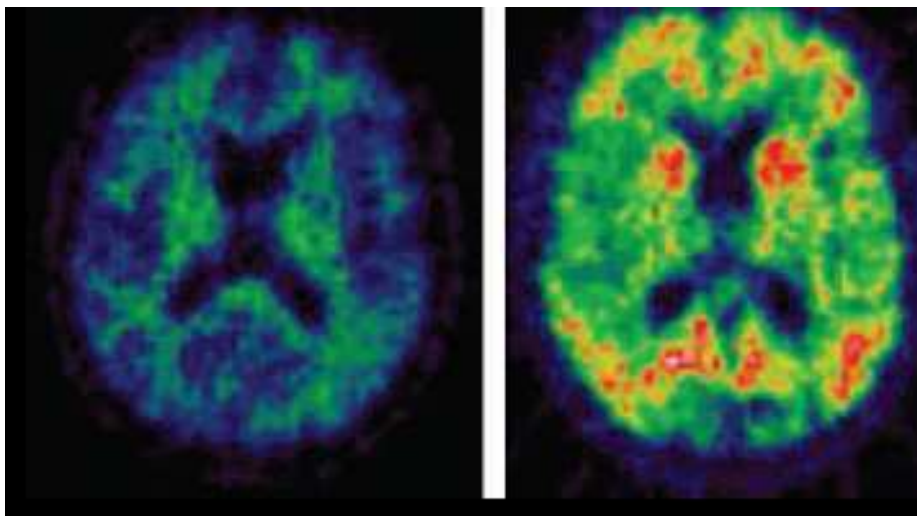


Figure 3. TEP au ^{11}C -PIB chez un patient atteint par une maladie de Parkinson et un patient atteint par une démence à corps de Lewy. Cliché de gauche : image cérébrale typique d'un patient sans dépôts amyloïdes, le cliché de droite chez le patient avec une DCL montre une quantité importante de dépôts amyloïdes intracérébraux (d'après Edison et al., 2008³⁷).

1.2.3 Neuropathologie

La MA, comme les autres maladies et démences neurodégénératives, est une maladie d'accumulation protéique aboutissant à des lésions cérébrales irréversibles.[‡] Dans la MA, deux protéines sont en jeu : la protéine précurseur de l'amyloïde (protéine « APP ») à la base

* Radiotracer ayant une affinité et une spécificité élevée pour le peptide amyloïde.

† Accumulation de dépôts amyloïdes dans la paroi des vaisseaux cérébraux. Cette pathologie est entre autre responsable d'hémorragies cérébrales, de certains infarctus cérébraux mais est aussi de leucoencéphalopathies.

‡ Cf. **Chapitre II : Protéinopathies.**

du métabolisme du peptide amyloïde β ($A\beta$) responsable de dépôts extracellulaires et la protéine tau constituant des lésions intracellulaires. Ces deux protéines, constituants physiologiques de la cellule, vont adopter une structure fibrillaire anormale à la base de la formation des dépôts observés neuropathologiquement.* La détection de ces deux types de lésions est indispensables pour l'établissement d'un diagnostic *post-mortem* de MA.^{38, 39}

1.2.3.1 Dépôts amyloïdes

Il s'agit de dépôts extracellulaires rencontrés non seulement dans la MA mais aussi chez les personnes âgées asymptomatiques (au cours du vieillissement normal),⁴⁰ les patients atteints par des troubles cognitifs légers n'ayant pas développés de MA[†] ou encore les personnes atteintes par une trisomie 21 ou une DCL. Ces dépôts, appelés plaques séniles (PS), sont majoritairement constitués d' $A\beta$ et distribués dans la quasi-totalité du néocortex. On parle alors de PS diffuses. Les conformations en feuillets β de ces protéines[‡] au sein de ces agrégats leur confèrent une haute capacité à se lier au rouge Congo et à être biréfringents en lumière polarisée, caractéristique de toutes les formations amyloïdes.

De nouvelles méthodes permettant de cibler neuropathologiquement les protéines en jeu dans les lésions ont permis une meilleure spécificité du diagnostic post mortem. L'immunohistochimie, grâce à des anticorps spécifiquement dirigés contre des protéines telles que l' $A\beta$, permet de mettre en évidence, au sein de tissu cérébral, les lésions spécifiques et responsables de démences neurodégénératives (figure 4). L'avènement de cette technique a fait rentrer les pathologies neurodégénératives dans un cadre nosologique protéique, définissant un ensemble de protéinopathies.[§]

Les PS sont constituées d'un noyau central d' $A\beta$ agrégées,⁴¹ cependant d'autres composés renforcent la lésion engagée par l' $A\beta$. Les dépôts parenchymateux d' $A\beta$ sont ainsi associés à d'autres protéines telles que les protéines tau elles mêmes (les neurites dystrophiques qui vont

* Cf. **Chapitre II : Protéinopathies**. La physiologie de ces protéines ainsi que les différents mécanismes mis en jeu lors de l'agrégation sont développés dans ce chapitre.

† Cf. **7 : Démences et formes prodromales**.

‡ Cf. **Chapitre II : Protéinopathies**.

§ *ibid* – Tableau 1.

entourer la PS)^{*} ou encore le génotype de l'apolipoprotéine E,[†] mais aussi des lipides comme le cholestérol et des constituants de la matrice extracellulaire ; ces composés contribuant à former la couronne de la PS.⁴²⁻⁴⁵ Bien que la séquence d'apparition de ces lésions paraisse plus confuse que pour les lésions de la protéine tau, une équipe a dégagé une séquence de propagation lésionnelle des dépôts d'A β en 5 phases dans la MA.⁴⁶ La première phase correspondant aux PS néocorticales, les lésions se propagent par la suite au sein de l'allocortex[‡] (phase 2), des noyaux gris centraux (phase 3), des noyaux du tronc cérébral (phase 4) et enfin du cervelet (phase 5).

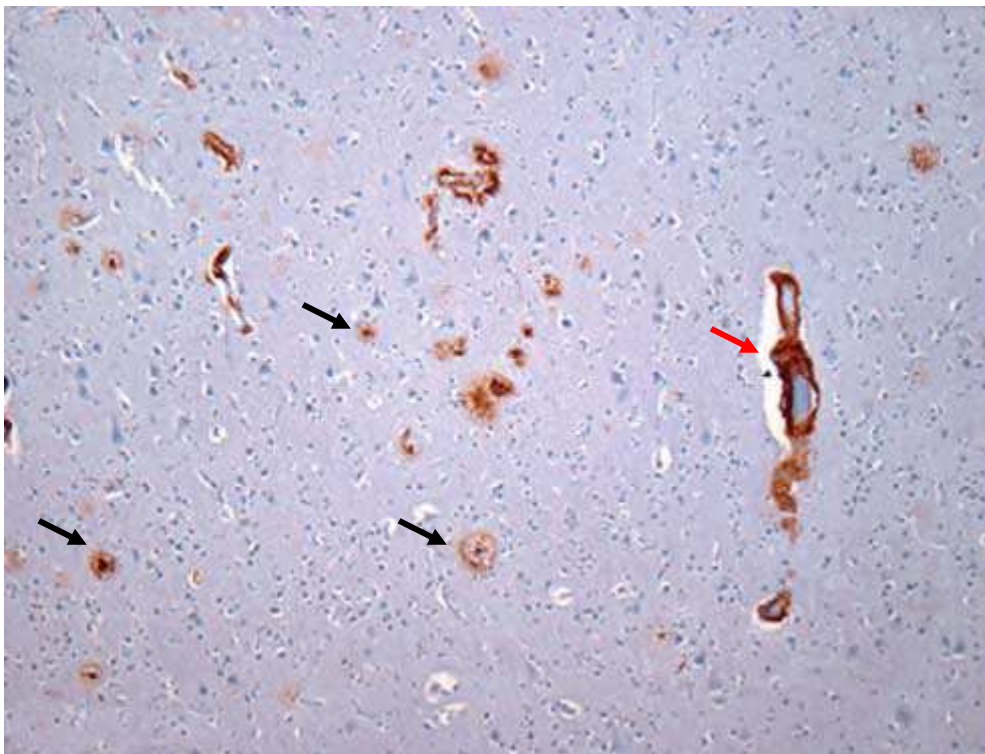


Figure 4. Coupe de tissu cérébral au sein duquel plusieurs formes de pathologies amyloïdes sont retrouvées. Technique d'immunohistochimie utilisant l'anticorps dirigé contre l'A β humaine (clone 6F/3D) et mettant en évidence des PS diffuses (flèches noires) ainsi qu'une angiopathie amyloïde (flèche rouge) (d'après Bacskai et al., 2007⁴⁷).

Les critères permettant de dresser un diagnostic de confirmation de MA après autopsie du patient et basé sur l'A β sont définis par la Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's

* Cf. 1.1.3.2 : Lésions tauopathiques au sein de ce chapitre.

† Cf. 1.2 : Facteurs de risques et formes de maladie d'Alzheimer.

‡ Partie primitive du cortex cérébral (comparativement au néocortex représentant 90% du manteau cortical) dans laquelle on retrouve notamment le bulbe olfactif, l'hippocampe et le gyrus cingulaire.

Disease (CERAD), établi en 1991 afin de standardiser les procédures d'évaluation et de diagnostic de la MA.³⁹ Ces critères reposent sur la densité observée de PS intraparenchymateuses en comparaison à des lames histologiques types permettant de distinguer des qualités de densité : faible, moyenne ou élevée.

1.2.3.2 Lésions tauopathiques

Il existe trois types de lésions impliquant la protéine tau dans la MA : les dégénérescences neurofibrillaires (DNF), les neurites dystrophiques et les fibres tortueuses. Cependant la composante lésionnelle majoritaire de la MA est la DNF.* Les neurites dystrophiques sont des structures dendritiques composées de protéines tau pathologiques, rencontrées parfois au sein de la couronne de la PS. Néanmoins les neurites dystrophiques ne sont pas spécifiques de la MA puisqu'ils peuvent être visualisés notamment dans certaines DLFT. Les fibres tortueuses, quant à elles, courts prolongements fibrillaires siégeant dans le neuropile,† sont secondaires à une accumulation de protéines tau pathologiques dans les dendrites. Elles sont rencontrées fréquemment dans la MA mais rarement dans les autres tauopathies.⁴⁸

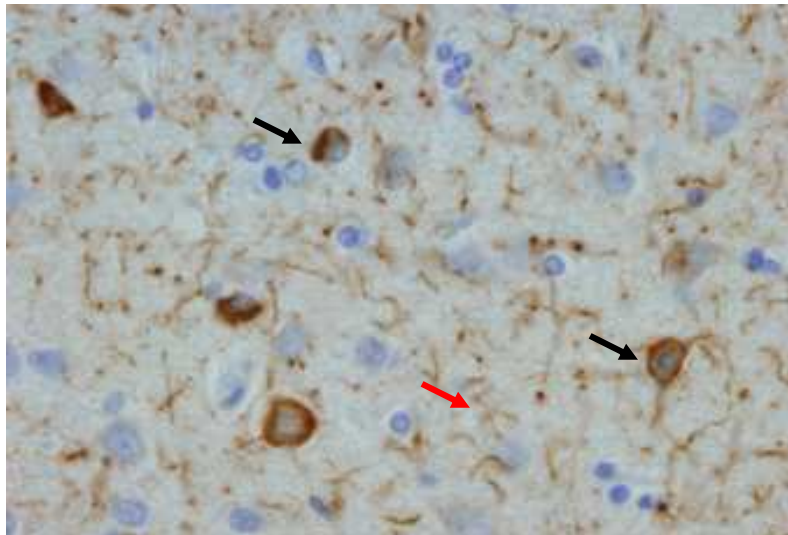


Figure 5. DNF et fibres tortueuses dans la maladie d'Alzheimer. Inclusions de protéines tau révélées par l'anticorps AT8 reconnaissant des sites phosphorylés de la protéine ; les DNF sont marquées par une flèche noire et les fibres tortueuses par une flèche rouge (d'après Yoshida 2006⁴⁹).

* La nature de cette lésion ainsi que les processus physiopathologiques aboutissant à sa formation sont développés dans le **Chapitre II – 2.1 Tauopathies**.

† Partie de la substance grise constituée par des prolongements dendritiques, des collatérales axoniques et autres enchevêtrements de prolongements gliaux (oligodendrocytes et astrocytes).

Les DNF semblent être un substrat important de l'altération cognitive observée dans la MA puisque sa quantité au sein du cortex cérébral est mieux corrélée à la sévérité de la démence que la densité de PS intracérébrales.^{50, 51} Cependant les DNF, lésions matures, sont absentes du néocortex dans 10% des cas de MA et près de 50% des cas de MA modérée, ces stades présentant plutôt des DNF allocorticales.⁵² De la même manière la localisation cérébrale des DNF, notamment lors de son apparition, semble confirmer son rôle dans l'instauration des troubles observés cliniquement. En effet la MA débute de façon progressive par une amnésie antérograde, ce syndrome étant connu pour toucher les formations hippocampiques où se forment les premières DNF dans cette maladie.³⁸ Les DNF suivent en effet une progression lésionnelle stéréotypée et prédictible en partant du lobe temporal interne (et en premier lieu l'hippocampe) pour ensuite investir le lobe temporal externe puis l'ensemble du néocortex jusqu'au lobe occipital (figures 6 et 7). Cette progression est définie par six stades, appelés stades de Braak, permettant d'apprécier la sévérité de l'atteinte corticale.⁵³

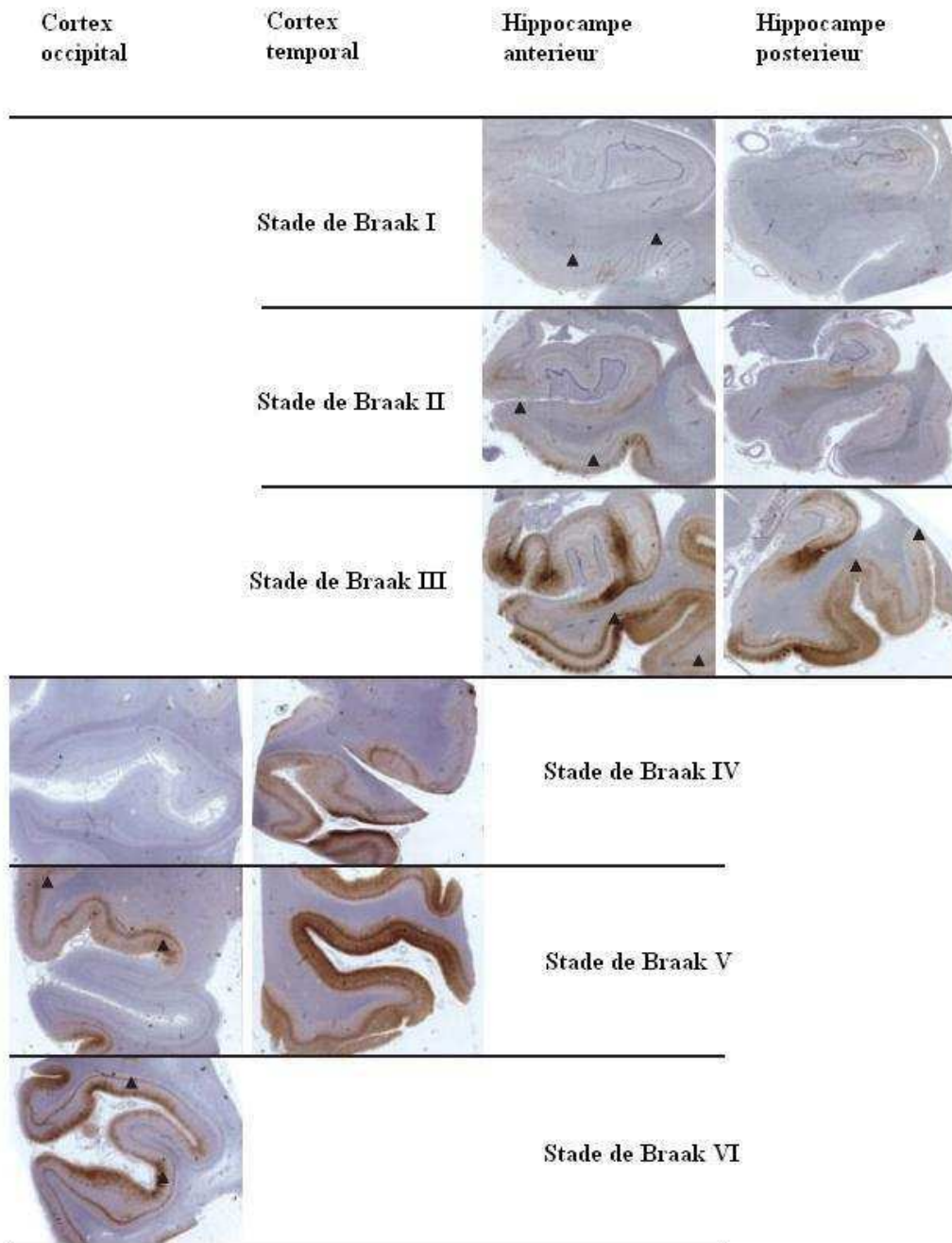


Figure 6. Coupes de tissus cérébraux marquées avec l'anticorps AT8 représentant les 6 stades de Braak observés dans la maladie d'Alzheimer. L'anticorps AT8 est dirigé contre des protéines tau phosphorylées, de gauche à droite : cortex occipital incluant la scissure calcarine* ; cortex temporal ; hippocampe antérieur au niveau de l'uncus ; hippocampe postérieur au niveau du corps géniculé latéral† (d'après Alafuzoff et al., 2008⁵⁴).

* Siège du cortex visuel primaire.

† Partie du thalamus traitant l'information visuelle provenant de la rétine et la renvoyant au cortex visuel primaire.

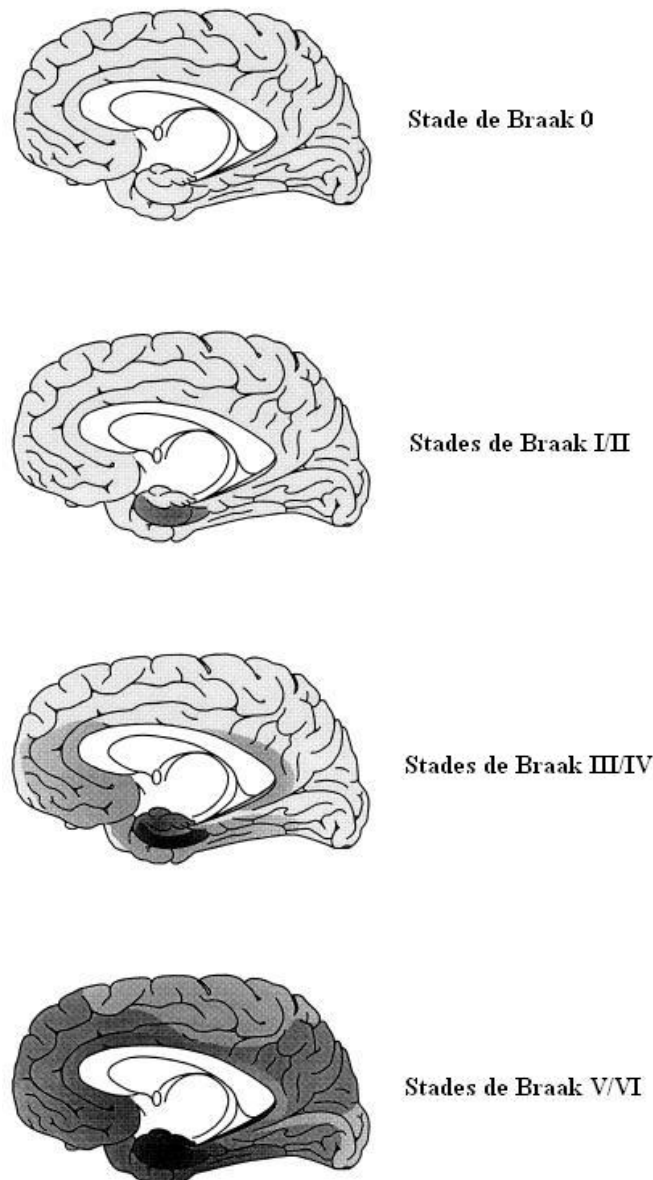


Figure 7. Évolution des DNF intracérébrales selon les stades de Braak. Le stade 0 représente une absence de lésions, les DNF s'accumulent ensuite dans le cortex entorhinal et transentorhinal (stades I et II). Les lésions se propagent alors dans tout le lobe temporal interne, le gyrus temporo-occipital et le cortex temporal (stades III et IV) pour gagner les aires associatives et le néocortex (d'après Braak et Braak, 1997⁵⁵).

Les premières lésions observées lors des premiers stades peuvent apparaître relativement précocement, à partir de 30 ou 40 ans. Il en est de même pour les lésions faisant intervenir l'A β vu précédemment ; ces lésions semblent se développer de manière très précoce chez les jeunes adultes.⁵⁵ Le stade de Braak I est asymptomatique, le stade II correspondrait quant à lui

à une forme prodromale de MA s'exprimant par des troubles cognitifs légers.* On parle véritablement de MA à partir des stades III et IV, correspondant cliniquement à une MA débutante à légère. Viennent ensuite les stades V et VI de Braak traduisant cliniquement une MA modérée et sévère. La démence de MA apparaît au stade V alors que le lobe temporal interne est très sévèrement touché et que les DNF ont investi le reste des territoires cérébraux. Cependant, certains facteurs tels que d'autres pathogénèses de la MA (mutations génétiques par exemple),[†] des facteurs de risque comme la variabilité du gène de l'apolipoprotéine E (ApoE)[‡] ou encore une pathologie concomitante peuvent influencer ce trajet lésionnel.⁵⁴

1.2.3.3 Maladie d'Alzheimer et démences mixtes

Ces bases neuropathologiques, développées plus haut, ne sont pourtant pas toujours le reflet de la réalité pathologique. Des lésions associées ne représentant pas le substrat pathologique de la MA sont très couramment rencontrées chez les patients ayant une MA confirmée après autopsie.⁵⁶ Une étude autopsique longitudinale conduite sur une large cohorte de patients (n=483) rapporte que plus de 45% des patients ayant une MA probable cliniquement sont atteints de pathologies mixtes.⁵⁷ Tout porte à croire que ce phénomène physiopathologique commun entourant les démences neurodégénératives (dépôts fibrillaires de protéines) répond plus d'un continuum clinicopathologique que d'une véritable classification aux frontières bien définies.

Comme pour la MA, la prévalence des pathologies vasculaires augmente avec l'âge, qu'elles soient symptomatiques ou silencieuses. De nombreuses études autopsiques, étudiant les démences, rapportent une pathologie vasculaire co-existante avec une démence neurodégénérative de type Alzheimer.⁵⁸⁻⁶⁰ Cette mixité n'est pas sans conséquence du point de vue clinique et appelle des critères élargis rendant compte de cette coexistence ; cette traduction clinique étant dépendante de la topographie des lésions vasculaires.⁶¹ Néanmoins l'instauration d'un tableau clinique ne présage pas toujours de la nature et de la distribution des lésions cérébrales. Il existe une variabilité interindividuelle dans la traduction clinique des lésions cérébrales puisqu'une étude autopsique, conduite sur une cohorte de 209 patients,

* Cf. 7 : **Démences et formes prodromales.**

† Cf. paragraphe suivant : 1.2 : **Facteurs de risques et formes de maladie d'Alzheimer.**

‡ *Ibid.*

nous indique que plus de 30% des sujets n'étant pas atteints par une démence remplissent pourtant les critères neuropathologiques d'une MA.⁵⁹ De la même façon, la présence de dépôts d' α -synucléïne* (α -Syn) retrouvés chez des patients atteints par une MA, ne présage pas de la symptomatologie couramment associée aux désordres de l' α -Syn (syndrome extrapyramidal notamment) ; bien que ce symptôme ne soit pas rare dans la MA, la présence d' α -Syn intracérébrale n'est pas toujours responsable de ce phénotype clinique.⁶² Cependant, tout comme les atteintes vasculaires, ces lésions semblent jouer un rôle synergique au sein du tableau clinique de la MA et contribueraient à la sévérité des troubles cognitifs observés.⁶³ Les pathologies mixtes seraient en effet plus agressives et les patients subiraient un déclin cognitif plus prononcé et massif que ceux atteints d'une MA « pure ».⁶⁴

L'association d'une pathologie de type Alzheimer et de dépôts d' α -Syn, appelés corps de Lewy (CL) ainsi que les neurites de Lewy, n'est pas rare, à tel point que certains auteurs parlent de variante à CL de la MA ou de MA à CL.^{65, 66} En effet, entre 15% et 50% des patients atteints par une MA définie *post-mortem* présentent une pathologie à CL associée.^{67, 68} De même, les inclusions de TDP-43[†] coexistent avec les lésions cérébrales de la MA. Ces inclusions sont spécifiques de certaines DLFT[‡] ou encore de la sclérose latérale amyotrophique. Néanmoins elles sont présentes dans plus de 20% des cas de MA constatés neuropathologiquement.⁶⁹ Cette pathologie associée semblerait colocaliser en partie avec l' α -Syn dans les cas de MA à CL.⁷⁰

1.2.3.4 Évolution des critères diagnostiques de la maladie d'Alzheimer

Le diagnostic de la MA est actuellement en révision afin de permettre une meilleure précision du diagnostic à des stades cliniques mais également de façon plus précoce aux stades prodromaux ainsi que précliniques de la maladie.^{§71} Ces nouveaux critères sont révisés sur la base d'une définition clinico-biologique de la MA, prenant en compte des arguments provenant de la biologie ainsi que de l'imagerie fonctionnelle et métabolique.⁷² De plus, ces nouveaux critères intégreront des données anatomopathologiques plus précises en considérant les mixités pathologiques fréquemment observées au cours de cette maladie. Enfin, les

* Cf. 3 : Démences à corps de Lewy ; 4 : Maladie de Parkinson et Chapitre II : Protéinopathies.

† Cf. Chapitre II – 2.5 : TDP-43pathies.

‡ Cf. 2.1 : Les dégénérescences lobaires fronto-temporales.

§ Cf. 7 : Démences et formes prodromales.

relations entre les lésions cérébrales et leurs manifestations cliniques ne sont pas toujours évidentes puisque des sujets asymptomatiques présentent des lésions cérébrales de type Alzheimer dans plus de 30% des cas.^{59, 73} Ces nouveaux critères vont alors distinguer la MA (forme clinique) de la pathologie Alzheimer mise en évidence après autopsie, ne faisant plus intervenir la notion de « MA certaine ».*

1.3 Facteurs de risque et formes de maladie d'Alzheimer

La MA est le plus communément sporadique, bien que le facteur de risque le plus couramment rencontré soit des antécédents familiaux de démence.⁷⁴ Bien que rares, des formes familiales ont été largement décrites, de même que certaines susceptibilités génétiques rentrant dans le cadre de la MA sporadique.⁷⁵

Dans une faible proportion (< 5% des cas), la MA est d'origine familiale sur un mode de transmission autosomique dominant dans plus de 10% de ces cas familiaux.⁷⁶ De nombreuses mutations dans les gènes de l'Amyloid Precursor Protein (APP) situés sur le chromosome 21 et des présénilines 1 et 2, respectivement localisés sur les chromosomes 14 et 1, sont impliquées dans la pathogénèse de ces formes de MA. Ces mutations augmentent considérablement la production du peptide A β constituant les PS dans la MA. A titre d'exemple, la quasi totalité des personnes atteintes du syndrome de Down développent une MA du fait de la triplication du chromosome 21. Le début de la maladie survient généralement bien plus tôt que dans les formes sporadiques, parfois avant 30 ans mais des cas tardifs ont été recensés. La symptomatologie de ces formes de MA est la même que pour les cas sporadiques, les troubles de la mémoire étant au premier plan du tableau clinique. Des paraparésies spastiques[†] ainsi que des troubles précoces des fonctions exécutives associés à un déficit frontal précoce ont toutefois été retrouvés chez certains patients portant des mutations sur le gène de la preseniline 1.^{77, 78}

Beaucoup de gènes présentant une potentielle susceptibilité dans le développement de la MA ont été étudiés, cependant le facteur de risque le plus évident (confirmé épidémiologiquement)

* Pour plus de renseignements sur l'élaboration de ces nouveaux critères, se reporter à <http://www.alz.org/research/diagnostic%5Fcriteria/>

† Atteinte médullaire correspondant à la voie pyramidale et se traduisant par des déficits moteurs variables des membres inférieurs.

est le génotype de l'ApoE. Cette glycoprotéine est exprimée dans différents organes ; le foie et le cerveau* étant ses principaux organes d'expression. Physiologiquement, elle joue un rôle de ligand des récepteurs permettant l'endocytose des lipoprotéines. Présente dans le plasma, l'ApoE est associée à ces lipoprotéines. Il existe 3 isoformes de la protéine : ApoE2, ApoE3 et ApoE4 et ce polymorphisme change profondément la structure et la fonction de la protéine.⁷⁹ La répartition allélique de ce génotype a montré de grandes différences dans les risques de développer une MA (tableau 1). L'allèle ε2 semblerait protecteur alors que l'allèle ε4 serait associé à un très grand risque de développer une MA.^{80, 81} De plus ce dernier allèle serait également associé à une forme plus précoce de la maladie.⁸²

Tableau 1. Répartitions allélique du génotype de l'ApoE en fonction du statut pathologique (sujets sains ou sujets atteints d'une maladie d'Alzheimer). Modifié d'après Bird, 2008⁸³ selon les données de Jarvik et al., 1996.⁸⁴

Génotype de l'ApoE	Contrôles non MA (n=304)	Patients MA (n=233)
ε2/ε2	1.3%	0%
ε2/ε3	12.5%	3.4%
ε2/ε4	4.9%	4.3%
ε3/ε3	59.9%	38.2%
ε3/ε4	20.7%	41.2%
ε4/ε4	0.7%	12.9%

1.4 Traitements

Il existe à l'heure actuelle des traitements symptomatiques de la MA permettant de rallonger la durée de vie des patients mais également de retarder de 2 ans en moyenne l'entrée dans la démence s'il s'agit de patients atteints d'une MA débutante. Malgré le nombre de recherches concernant la thérapeutique, la MA reste fatale, aucun traitement curatif n'existant pour cette maladie à l'heure actuelle.

Les traitements symptomatiques actuellement utilisés en pratique dans le cadre d'une MA reposent sur la conception synaptique de la démence. Les molécules prescrites permettent

* Expression cérébrale par les cellules gliales et notamment les astrocytes ; les neurones pouvant en produire sous certaines conditions.

ainsi de renforcer la communication *via* les liaisons synaptiques afin de minimiser l'impact cognitif et cérébral causé par la perte de synapses induite par la maladie. Il n'existe que deux types de médicaments approuvés par la Food and Drug Administration : les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase* (donepezil, rivastigmine et galantamine) et les antagonistes des récepteurs NMDA† (memantine).

L'apport des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase reste relativement modeste puisqu'ils n'empêchent pas la progression de la pathologie cependant ils permettent non seulement au patient de rester cliniquement stable pendant plus d'un an, mais également un regain de capacité cognitive avec une régression des troubles comportementaux sur une période de 6 mois ; la progression du déclin cognitif est par la suite plus lente que pour les patients ne recevant pas ce traitement.⁸⁵ Il convient de noter qu'il n'a pas été observé de différence significative dans l'efficacité thérapeutique de ces trois molécules : donepezil (Aricept®), rivastigmine (Exelon®) et galantamine (Reminyl®).⁸⁶ Il en est de même pour la memantine (Ebixa®) qui montre une légère réduction de l'altération cognitive chez des patients atteints d'une MA modérée à sévère.⁸⁷ Cependant ce médicament est couramment utilisé en pratique clinique lors des stades sévères de la maladie en complément des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, prescrits en première ligne thérapeutique.

2 LES ATROPHIES FOCALES

2.1 Les dégénérescences lobaires frontotemporales

Les DLFT regroupent des pathologies neurodégénératives dues à une atrophie prédominante des lobes cérébraux frontaux et temporaux souvent asymétriques.⁸⁸ Les différentes présentations cliniques observées dans les DLFT sont dépendantes des régions cérébrales atrophiées. Cependant ces syndromes, même s'ils sont bien systématisés, ne présagent pas de la pathologie neurodégénérative sous-jacente. L'étude neuropathologique des DLFT est

* L'acétylcholinestérase est une enzyme localisée dans la synapse et permettant de cataboliser l'acétylcholine restée dans la fente synaptique dans le but de réduire le signal en l'absence de stimuli. Les inhibiteurs de cette enzyme vont alors permettre au neuromédiateur de ne pas être dégradé, renforçant potentiellement les signaux délivrés au sein du système cholinergique.

† N-méthyl-D-Aspartate (NMDA) pour son agoniste spécifique, ce récepteur principalement post-synaptique est activé par le glutamate et serait à la base de l'excitotoxicité neuronale délétère dans la MA. L'emploi d'un antagoniste inhibant cette excitotoxicité neuronale permettrait une préservation relative de l'architecture cérébrale.

complexe et montre une hétérogénéité étiologique, dont la MA, responsable de ces tableaux cliniques focaux.

2.1.1 Les démences frontotemporales

La DFT représente 5 à 10% des démences.⁸⁸ Les critères diagnostiques et cliniques de la DFT ont été défini en 1994 par les groupes de Lund et Manchester,⁸⁹ puis revus dans un article plus récent.⁸⁸ Il existe principalement deux formes de présentations cliniques corrélées à la localisation cérébrale de l'atrophie : une forme frontale comportementale et une forme temporale avec des troubles du langage. Nous avons choisi de ne traiter dans ce paragraphe que la forme comportementale, les formes temporales et aphasiques seront traitées dans le paragraphe suivant.*

La DFT est majoritairement sporadique. L'âge d'entrée étant généralement inférieur à 65 ans, la DFT est une maladie à début plus précoce que la MA. La prédominance frontale de l'atrophie bilatérale (figure 8) conduit sémiologiquement à un tableau frontal avec altération de la personnalité (irritabilité, désinhibition sexuelle) et des conduites sociales (perte des convenances sociales), dans lequel on retrouve un émoussement affectif, une négligence de l'hygiène et de l'aspect corporel, une rigidité mentale, une hyperoralité[†] ainsi qu'un comportement persévérant. Vont s'ajouter à ces symptômes pseudo-dépressifs des points d'appel neurologiques comme l'apparition d'un syndrome dysexécutif, un parkinsonisme ainsi que la libération des réflexes archaïques : réflexe naso-palpébral inépuisable, apparition d'un grasp et parfois d'un réflexe palmomentonnier. Au court de la maladie, l'atrophie va s'étendre aux autres territoires cérébraux.⁹⁰

* Cf. 2.1.1 : **Aphasie primaire progressive** au sein de ce chapitre.

† Modification des habitudes alimentaires, lubies et consommation excessive de tabac et l'alcool, exploration buccale des objets.

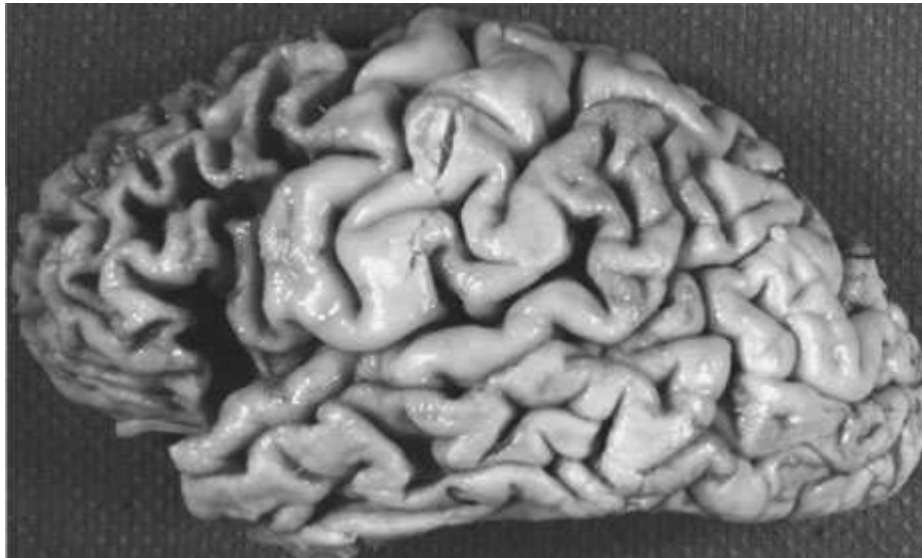


Figure 8. Hémisphère cérébral gauche d'un patient atteint par une démence frontotemporale (sous-type maladie de Pick). Atrophie prononcée « en lame de couteau » des circonvolutions frontales (d'après Graff-Radford et al., 2007⁹¹).

Sur le plan neuropsychologique, il n'y a pas de désorientation temporo-spatiale ni d'atteinte mnésique, l'amnésie antérograde étant un critère d'exclusion pour le diagnostic de DFT. Snowden a décrit en 2001 deux formes cliniques distinctes au sein de ce variant comportemental : une forme apathique associant une perte d'intérêt dans les activités, un émoussement affectif ainsi qu'une diminution de la réponse à la douleur ; et une forme désinhibée ou pseudo-maniaque caractérisée par une hyperoralité, une réponse sensorielle exagérée et des comportements moteurs répétitifs.⁹² Les patients atteints de DFT présentent des comportements sociaux inadéquats et bousculent les normes sociales. Des conduites stéréotypées ou rituelles peuvent apparaître, comme des répétitions de phrases ou encore des manies ou collectionnismes, se sont les symptômes pseudo-obsessionnels de la maladie. Cette symptomatologie frontale et comportementale de la DFT pourrait faire évoquer des troubles psychiatriques, néanmoins l'étiopathogénèse est neurodégénérative. L'imagerie permettant d'étayer un diagnostic de DFT met en évidence une atrophie frontale bilatérale dans la maladie de Pick et une atrophie temporale prédominante à gauche pour une DFT à inclusion d'ubiquitine.⁹³

La neuropathologie des DFT répond à une nosologie complexe. Plusieurs types de lésions pouvant mener à un syndrome de DFT existent (tableau 2). La nature de ces lésions n'est pas sans conséquences sur le syndrome observé. Un sous-type clinique de DFT lié à la sclérose

latérale amyotrophique (SLA) a été décrit.⁹⁴ Ce syndrome mixte DFT-SLA est présent dans 15% des cas de DFT. Le substrat pathologique de cette forme de DFT (TDP-43) est le même que celui retrouvé dans les SLA pures, suggérant différentes manifestations cliniques d'une même entité pathologique.⁹⁵

Tableau 2. Principales inclusions protéiques responsables d'une démence frontotemporale

Sous type de DFT	Types d'inclusions protéiques
DFT-tau positive : maladie de Pick	Protéine tau : inclusions à corps de Pick
DFT-TDP43 – DFT-SLA	TDP-43
DFT-ubiquitine positive (tau-/TDP43-)	Ubiquitine
Maladie à inclusions de filaments intermédiaires	Filaments intermédiaires
DFT sans histologie distincte	Protéines non identifiées

La majorité des DFT présentent des inclusions cellulaires de protéines tau, se révélant cliniquement par un sous-type de DFT appelé maladie de Pick, ou de TDP-43. La maladie de Pick est une distinction neuropathologique de la DFT, avec des inclusions à corps de Pick composés de protéines tau. Dans environ 10 à 15% des cas de DFT il n'est pas retrouvé de protéines pathologiques identifiables neuropathologiquement.

Une étude rétrospective a permis de mettre en évidence la prégnance de certains profils sémiologiques entre les différents aspects neuropathologiques de la DFT.⁹⁶ Les patients atteints d'une DFT-tau positive présenteraient plus de déficits visuospatiaux ainsi qu'un syndrome extrapyramidal par rapport aux patients à inclusions cérébrales d'ubiquitine ou de TDP-43. De la même manière, ces derniers patients seraient plus sujets à des troubles du langage et des troubles des fonctions exécutives que les patients atteints d'une tauopathie.

Même si la majorité des DFT sont sporadiques, une composante génétique de la DFT existe, le plus souvent sur un mode autosomique dominant impliquant les gènes de la protéine tau (DFT avec parkinsonisme liée au chromosome 17) ou encore de la progranuline. La pathogénèse de certaines DFT/SLA peut également être due à certaines mutations génétiques.⁹⁷

Le diagnostic de la DFT reste donc difficile, une symptomatologie ne présageant pas de l'étiologie de la pathologie sous-jacente. En effet, un peu moins de 20% des patients avec un diagnostic *ante mortem* de DFT se révèlent être des MA confirmées neuropathologiquement.⁹⁸ D'autres pathologies comme la DCL, la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) ou encore une démence vasculaire peuvent être responsables de ce syndrome comportemental.⁹⁹ Comme nous l'avons vu plus haut en traitant la MA, des présentations frontales de la MA existent. De même il n'est pas surprenant de retrouver un recouvrement clinique entre des pathologies comme la DFT, l'aphasie primaire progressive (variante temporale des DLFT), la dégénérescence corticobasale ou la paralysie supranucléaire progressive.^{100, 101} De façon plus surprenante, une DFT peut se manifester cliniquement par des troubles pouvant faire évoquer une DCL.¹⁰² De fait, des examens paracliniques, biologiques notamment, permettant d'approcher la neuropathologie du vivant du patient pourraient permettre d'augmenter considérablement la précision du diagnostic différentiel.*

Il n'existe pas de traitements médicamenteux spécifiques des DFT. Les bases neuropharmacologiques des DFT sont fortement associées à un déficit en sérotonine ; certaines études clinico-biologiques ayant montré une déplétion en métabolites de la sérotonine dans le liquide céphalorachidien de ces patients ainsi qu'une perte neuronale du système sérotoninergique mise en évidence à l'autopsie.^{103, 104} Beaucoup de symptômes comportementaux rencontrés dans les DFT répondent du système sérotoninergique, la mise en place d'un traitement à base d'inhibiteur de la recapture de la sérotonine (fluoxétine, sertraline et paroxétine notamment) peut permettre de diminuer ces troubles. De plus, l'instauration d'antipsychotiques (risperidone par exemple) est une alternative en cas de troubles sévères pharmacorésistants aux inhibiteurs de la recapture de la sérotonine. Les traitements usuellement prescrits pour une MA n'ont pas de bénéfices dans les DFT.

2.1.2 Aphasie primaire progressive

L'aphasie primaire progressive (APP) ou syndrome de Mesulam, variante temporale des DLFT, fut décrite pour la première fois en 1982.¹⁰⁵ Le décès survient généralement 6 à 7 ans après le début de la maladie.¹⁰⁶ Ce syndrome a été divisé depuis quelques années en trois

* Cf. Chapitre III : Biologie des démences

variantes : l'aphasie progressive non fluente, la démence sémantique et l'aphasie ou atrophie logopénique.¹⁰⁷

Aphasie progressive non fluente : forme caractérisée par un débit verbal non fluent, une articulation difficile, un agrammatisme,* une difficulté dans la compréhension des structures syntaxiques complexes et un manque du mot mais une préservation de la compréhension des mots isolés.

Démence sémantique : variante avec une fluence verbale et syntaxique normale ainsi qu'une relative préservation de la compréhension syntaxique, mais une anomie[†] et des troubles de la signification des mots et des objets. La compréhension orale et écrite est altérée associant dysgraphie[‡] et dyslexie de surface.[§]

Aphasie logopénique : se caractérise par un débit de parole ralenti, une fluence conservée mais marquée par des pauses dues à un manque du mot. Sans réel agrammatisme, les structures grammaticales et syntaxiques étant simplifiées mais correctes, il n'y a pas de difficulté à la compréhension des structures syntaxiques comme dans l'aphasie progressive non fluente. De même, il n'est pas retrouvé de troubles dans la compréhension des mots ou des objets comme dans la démence sémantique.

L'atrophie touche principalement la région périsylvienne gauche,** le lobe temporal antérieur de façon bilatérale avec une atteinte plus marquée à gauche et les ganglions de la base bilatéralement.¹⁰⁷ Cependant, il existe quelques différences dans la localisation de l'atrophie entre les trois variantes de l'APP, l'atrophie ayant une tendance à s'étendre aux lobes temporaux antérieurs et internes dans la démence sémantique.¹⁰⁸

La neuropathologie des APP est tout à fait comparable à celle des DFT : inclusions à corps de Pick, inclusions d'ubiquitine et de TDP-43. Cependant, les lésions retrouvées peuvent être

* Débit de parole ralenti, réduction du vocabulaire, simplification des structures syntaxiques disponibles et brièveté des phrases.

† Difficulté à la dénomination.

‡ Difficulté dans l'écriture.

§ Déficit de la voie lexicale, le lecteur ne passe que par la phonologie pour lire un mot (difficulté à lire « tabac » qui sera lu en « tabak » par exemple). Le lien entre le mot et son sens est rompu et la compréhension est altérée.

** Région cérébrale dévolue aux fonctions du langage

spécifiques d'autres pathologies telles que la dégénérescence corticobasale (DCB) ou la paralysie supranucléaire progressive (PSP).^{99, 109} Ces deux dernières pathologies ont été regroupées avec les DLFT par Kertesz au sein d'une entité clinicopathologique portant le nom de complexe de Pick.^{110*}

Il existerait une tendance à des neuropathologies distinctes entre les trois variantes de l'APP. En effet, et comme nous l'indique une récente étude autopsique conduite sur des patients atteints des 3 variantes cliniques de l'APP (n=18), le phénotype clinique serait corrélé à la nature des lésions cérébrales.¹¹¹ Les patients atteints par une aphasie non fluente progressive ont préférentiellement des lésions de types tauopathies du complexe de Pick (PSP, DCB, maladie de Pick) ou alors des inclusions d'ubiquitine et de TDP-43. Les patients ayant une démence sémantique ont plutôt des lésions cérébrales d'ubiquitine et de TDP-43 alors que ceux atteints de la forme logopénique sont principalement d'étiologie Alzheimer, ce dernier résultat confirmant des études précédentes.^{107, 112} Quoiqu'il en soit, de nombreuses études neuropathologiques rapportent une proportion importante de patients atteints par ce syndrome APP ayant finalement une MA à l'examen *post-mortem*.^{16, 99, 109, 112}

2.2 Les atrophies corticales postérieures ou syndrome de Benson

C'est en 1988 que fut décrit et isolé pour la première fois ce syndrome grâce à une série de 5 patients atteints d'une démence et répondant d'un même cadre nosologique.¹¹³ L'atrophie corticale postérieure (ACP) a par la suite été mentionnée sous le nom de syndrome de Benson par de nombreux auteurs. Ce syndrome clinique est rare, il se caractérise par une plainte visuelle d'apparition progressive associée à une atrophie bilatérale des régions corticales postérieures (occipito-pariéto-temporales). Les caractéristiques cliniques de ce syndrome incluent précocement des troubles visuoconstructifs,[†] une hémignégligence spatiale,[‡] une agnosie environnementale,[§] une anomie, une alexie^{**} ainsi qu'un syndrome de Gerstmann^{*} et

* Concept permettant d'unifier les syndromes cliniques de DFT, d'APP, de DCB et de PSP ainsi que leurs caractéristiques neuropathologiques pour lesquels il existe un grand recouvrement.

† Perturbation de la capacité d'assembler des parties pour en faire un tout lié à une difficulté à percevoir les relations spatiales entre les différentes parties d'une entité globale.

‡ Tendance à ne pas détecter ou explorer toutes stimulations localisées dans l'hémi-espace controlatéral à la lésion.

§ Incapacité à identifier les stimuli de l'environnement.

** Perte de la compréhension du langage écrit.

un syndrome de Balint.[†] L'installation d'un tableau démentiel s'instaure en moyenne cinq ans après l'apparition des premiers troubles visuels associant amnésie et anosognosie. La survenue d'hallucinations visuelles n'est pas rare et des syndromes de Capgras[‡] et de Fregoli[§] ont été décrits dans les ACP.¹¹⁴ De récents articles permettent de dresser un cadre nosologique plus précis et de constituer les critères cliniques et neuropsychologiques des ACP.¹¹⁴⁻¹¹⁶ L'examen neuroradiologique met en évidence une atrophie cérébrale ainsi que des changements métaboliques et moléculaires prédominant dans les régions postérieures.^{117, 118}

Comme nous l'indique la neuropathologie, l'étiologie de ce syndrome est complexe. Plusieurs études neuropathologiques rapportent cette hétérogénéité avec des cas de gliose sous-corticale, de MCJ, de DCL ou encore de DCB restreintes aux régions cérébrales postérieures.^{116, 119-121} Ces caractéristiques pathologiques pourraient expliquer certains recouvrements cliniques avec d'autres pathologies comme la DCL et la survenue d'hallucinations visuelles.¹²² Cependant l'examen neuropathologique des cerveaux de patients atteints par une ACP révèle une MA sous-jacente dans une majorité de cas, à tel point que ce syndrome fut appelé « le variant visuel de la maladie d'Alzheimer » par certains auteurs.^{16, 123-125}

3 LA DEMENCE A CORPS DE LEWY

La DCL représente environ 15% des démences neurodégénératives après confirmation neuropathologique.¹²⁶ Cette pathologie reste néanmoins très difficile à diagnostiquer en regard de la MA. La maladie est d'installation progressive avec des troubles cognitifs mnésiques pouvant toucher d'autres domaines. La mémoire n'est pas toujours atteinte d'emblée et certains tableaux cliniques débutent par des mouvements anormaux. En effet, il faut au moins deux des trois atteintes suivantes pour établir un diagnostic de DCL probable : fluctuations cognitives,^{**} hallucinations visuelles et syndrome extrapyramidal. D'autres signes, associés

* Syndrome constitué par une indistinction droite-gauche, une agnosie digitale (incapacité de désigner les doigts d'une main) associés à une agraphie (incapacité d'écriture) et une acalculie (incapacité de reconnaître les chiffres et d'effectuer des opérations).

† Apraxie optique, ataxie optique et simultagnosie.

‡ Illusion des sosies où le patient ne reconnaît pas une personne et croit qu'elle a été remplacée par un imposteur.

§ Fausses reconnaissances de plusieurs personnes sans ressemblance comme étant la même personne.

** Alternance de périodes de déficits globaux dans les différents domaines cognitifs et de performances normales.

plus généralement aux pathologies impliquant l' α -Syn, tel que des mouvements oculaires rapides associés à une activité musculaire durant le sommeil peuvent apparaître très précocement dans l'histoire de la maladie, bien avant les premiers éléments en faveur d'une synucléopathie.¹²⁷ Ces épisodes d'agitations nocturnes sont présents dans la DCL mais également dans la maladie de Parkinson (MP) ou les atrophies multisystématisées.¹²⁸ La distinction clinique entre la DCL et la démence de la MP n'est pas aisée. Elle repose sur l'intervalle temporel entre l'apparition du syndrome parkinsonien et les troubles cognitifs ; ces deux maladies appartenant au même spectre clinicopathologique. La mémoire épisodique est peu touchée dans les premiers stades de la DCL par rapport à la MA, cependant les troubles mnésiques apparaissent et deviennent de plus en plus importants lorsque la maladie progresse. Les patients atteints par la DCL ont préférentiellement des troubles de la perception visuo-spatiale, ainsi que des troubles attentionnels, des fonctions exécutives et une distractibilité. Les critères pour établir un diagnostic de DCL ont été revus en 2005 afin d'intégrer de nouvelles techniques d'imageries métaboliques permettant d'objectiver une pathologie due à l' α -Syn.¹²⁹

L'imagerie morphologique permet, comme nous l'avons vu dans la MA, de mettre en évidence une pathologie vasculaire co-occurrence mais ne permet pas réellement de distinguer une DCL d'une MA. Cependant, il peut exister une relative préservation morphologique du lobe temporal interne dans la DCL, cette atrophie étant bien moins présente à l'IRM que dans la MA.¹³⁰ Une réelle discrimination à l'imagerie se trouve dans l'utilisation de la scintigraphie cérébrale au DaTSCAN.* Ce traceur permet d'apprécier l'intégrité de la voie nigro-striée.† Dans la DCL, on observe une dégénérescence de ce réseau dopaminergique et une atteinte des noyaux gris centraux (putamen et noyau caudé) par perte des neurones présynaptiques dopaminergiques (figure 9). Le diagnostic clinique de la DCL a une mauvaise spécificité (environ 40%) et une modeste sensibilité de 75%.¹³¹ Cet examen radiologique permet d'augmenter considérablement la précision du diagnostic *ante-mortem* de la DCL en augmentant sa sensibilité (environ 90%) et sa spécificité (100%).¹³¹

* Ioflupane [¹²³I] : analogue de la cocaïne, présente une affinité élevée pour le transporteur présynaptique de la dopamine.

† Réseau neuronal dopaminergique impliqué dans le control moteur.

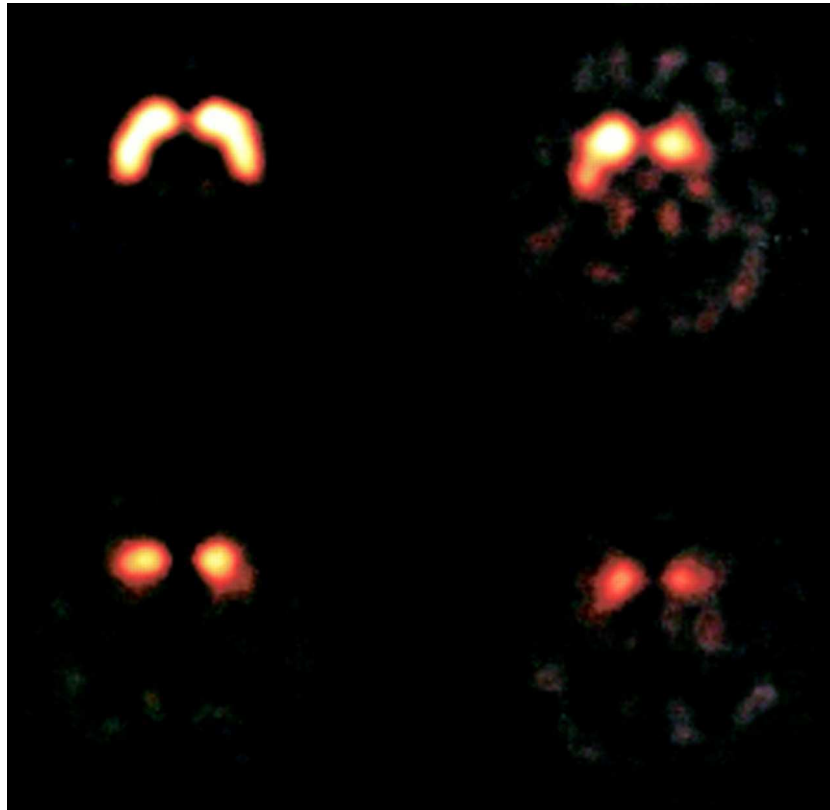


Figure 9. DaTSCAN. Traçage normal chez un sujet sain : fixation importante au niveau du putamen et du noyau caudé (en haut à gauche), puis (de gauche à droite et de haut en bas) diminution progressive du signal chez des patients atteints de parkinsonisme léger, modéré et sévère (d'après Bain 2002¹³²).

Cependant la distinction entre patients atteints de MA et ceux atteints de DCL se révèle complexe dans la pratique clinique puisqu'il existe un recouvrement clinique entre ces deux pathologies pouvant parfois être dû à une coexistence fréquente de leurs lésions cérébrales respectives à l'autopsie.*

La thérapeutique à envisager lors d'une DCL est limitée. Les patients atteints par la DCL ont une mauvaise réponse aux neuroleptiques avec une aggravation du syndrome extrapyramidal et du syndrome confusionnel, pouvant aller jusqu'au décès. Cette sensibilité aux neuroleptiques est un signe non négligeable de la DCL, cependant il n'intervient que dans 50% des cas de DCL.¹³³ L'établissement du diagnostic permet non seulement d'éviter la prescription délétère de neuroleptiques mais aussi d'instaurer des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase ayant prouvé leur efficacité dans cette pathologie.¹³⁴

* Cf. 1.1.3.3 : Maladie d'Alzheimer et démences mixtes.

On retrouve des CL intracérébraux ainsi que des neurites de Lewy chez les patients atteints d'une DCL après l'examen *post mortem* du cerveau. Les lésions sont des inclusions neuronales intracytoplasmiques, le plus souvent sphériques pour les CL, filamenteuses et diffuses pour les neurites de Lewy, composées d' α -Syn et d'ubiquitine. Du point de vue neuropathologique, les DCL sont divisées en 3 sous-types en fonction de la distribution topographique des CL : forme prédominant dans le tronc cérébral, forme limbique* (pouvant être vue comme une forme transitionnelle) et forme néocorticale.¹³⁵ Cette classification est définie en 6 stades de Braak, comme pour la pathologie intéressant les DNF, en fonction de l'étendue lésionnelle des CL dans le cerveau.¹³⁶ Ainsi les deux premiers stades intéressent l'étage médullaire, les stades 3 et 4 correspondent aux lésions retrouvées au niveau du mésencéphale (et particulièrement la substance noire[†]) et les stades 5 et 6 à l'extension des lésions au néocortex. Toutefois, plus de 20% des sujets sans trouble ont une pathologie à CL.¹³⁷ Comme nous l'avons mentionné plus haut, la coexistence de lésions n'est pas rare et on estime qu'une grande majorité de patients présentant une DCL (environ 90%) ont des dépôts amyloïdes associés (figure 10). De plus les DNF, deuxième lésion caractéristique de la MA, sont fréquemment observés dans les DCL. Cette présence contribuerait d'ailleurs à une modification dans l'expression de la maladie qui tendrait vers un profil cognitif de type MA ; contribuant à la difficulté et l'imprécision du diagnostic clinique de ces pathologies.¹³⁸

* Le système limbique est un groupe de structures cérébrales sous-corticales comprenant l'hippocampe, l'amygdale, le gyrus cingulaire, le fornix et l'hypothalamus.

† Noyau pigmenté par la neuromélanine appartenant au mésencéphale et composé en partie de neurones dopaminergiques. La substance noire est dépigmentée lors d'une maladie de Parkinson ou d'une maladie à corps de Lewy à cause de l'atteinte préférentielle de ce système dopaminergique par ces pathologies.

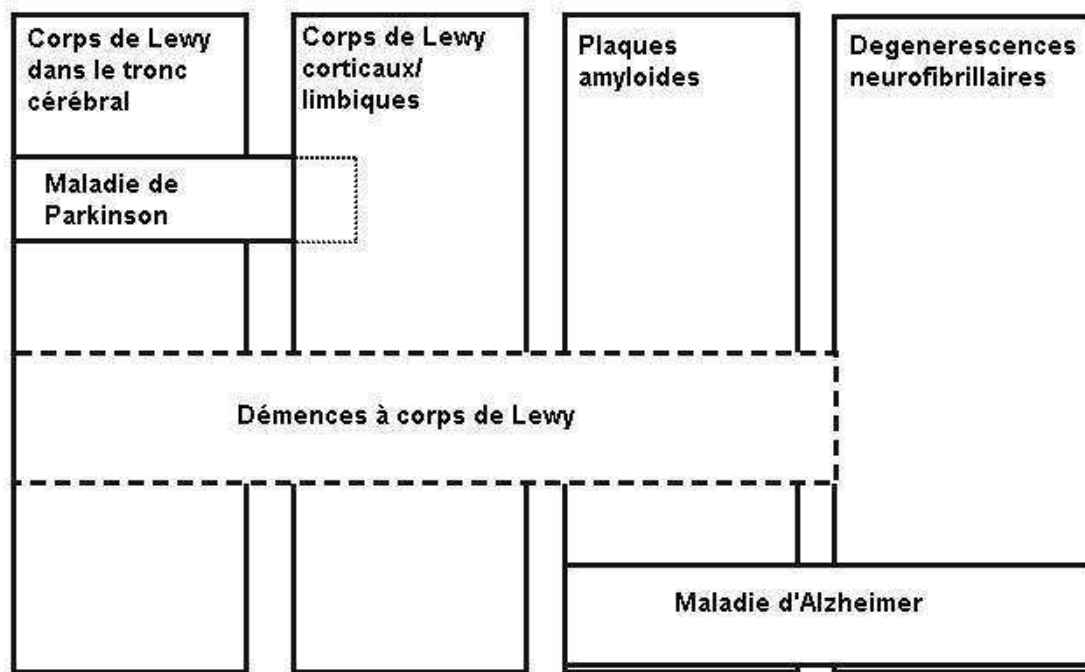


Figure 10. Relations clinicopathologiques entre la maladie d'Alzheimer et les pathologies liées aux corps de Lewy (maladie de parkinson et démence à corps de Lewy). (D'après Tröster 2008¹³⁹).

4 MALADIE DE PARKINSON

La MP est une maladie d'instauration progressive dont les caractéristiques principales sont des mouvements anormaux, apparaissant généralement après 50 ans. Les manifestations cliniques précoces de la MP permettent d'en faire le diagnostic sur la base de signes cardinaux (syndrome parkinsonien : akinésie ou bradykinesie,* rigidité† et tremblements de repos‡) associés à des signes apparaissant secondairement dans l'histoire naturelle de la maladie et incluant notamment et de façon non systématique une symptomatologie sensitive (douleur et paresthésies notamment), une hyposmie,§ des troubles du sommeil ainsi qu'une dépression. Les critères diagnostiques permettant d'évoquer une MP sont basés essentiellement sur la clinique et l'anamnèse.¹⁴⁰

* Réduction de la motricité automatique volontaire se traduisant par une diminution du ballant du bras à la marche, une raréfaction du clignement palpébral et de l'expression des émotions du visage.

† Touchant les membres supérieurs dans un premier temps puis devenant axial au cours de l'évolution de la maladie.

‡ Souvent asymétriques, ils cessent à l'initiation d'un mouvement volontaire et peuvent être majorés lors d'un stress ou d'un état de fatigue.

§ Perte partielle de l'odorat.

Le syndrome parkinsonien provient de la dégénérescence du système dopaminergique central par le même processus neurodégénératif spécifique de la DCL avec les CL. Après l'établissement du diagnostic, les manifestations de la maladie subissent un changement découlant de l'instauration du traitement médicamenteux. La prescription de L-Dopa (précurseur de la dopamine) permet de minorer les troubles moteurs mais induit cependant des effets tels qu'une dyskinésie* ou encore des hallucinations. La progression de la maladie va jusqu'à une perte d'autonomie et parfois une démence associée appelée démence de la MP. Cette démence, apparaissant tardivement dans la MP, est une pathologie cliniquement et anatomopathologiquement semblable à la DCL.†

Le substrat biologique de la MP est dû à une dénervation importante du réseau dopaminergique nigro-striatal.‡ On considère que 80% des neurones dopaminergiques doivent être atteints et lésés pour avoir un retentissement clinique de cette dénervation et ainsi pouvoir porter un diagnostic de MP. Les caractéristiques anatomopathologiques de la MP sont tout à fait comparables à celles des DCL évoquées dans le paragraphe précédent.^{136, 141} Cependant, et contrairement aux DCL, les CL investissent rarement les étages cérébraux supérieurs (néocortex).

5 AUTRES SYNDROMES PARKINSONIENS

Nous avons choisis de traiter brièvement dans cette partie deux pathologies qui auraient tout aussi bien pu trouver leur place au sein du paragraphe consacré aux DLFT. En effet, la DCB ainsi que la PSP appartiennent, comme nous l'avons mentionné plus haut, aux maladies du complexe de Pick.¹¹⁰ Cependant nous avons classé ces deux maladies selon leurs symptomatologies parkinsoniennes. Bien que ces deux pathologies se caractérisent par un syndrome parkinsonien, ça n'est pas l' α -Syn qui est responsable de la dégénérescence cérébrale, mais la protéine tau.

* Anomalie des mouvements se traduisant notamment par des spasmes, une incoordination et une parésie.

† Cf. 3 : La démence à corps de Lewy.

‡ *Ibid*

5.1 Dégénérescence corticobasale

La DCB est une maladie neurodégénérative impliquant à la fois le cortex et les noyaux gris centraux. Elle fut décrite pour la première fois par Rebeiz et al.¹⁴² mais il aura fallu plusieurs décennies (en 1989) avant que ce phénotype clinique ne parvienne à trouver son nom de DCB.¹⁴³

La DCB se caractérise cliniquement par un syndrome akineto-rigide asymétrique de survenue progressive auquel s'associe une importante apraxie idéomotrice, des myoclonies, des troubles sensitifs corticaux, une atteinte oculomotrice et des troubles cognitifs. Bien qu'il ait été reconnu que la démence soit une présentation commune de la DCB,¹⁴⁴ le syndrome parkinsonien unilatéral s'avère être la présentation clinique la plus classiquement retrouvée.¹⁴⁵ Le diagnostic clinique de la DCB n'est pas aisé, en partie à cause de l'hétérogénéité de sa symptomatologie mais également parce que certains symptômes qui lui sont associés peuvent se retrouver dans d'autres affections neurologiques appartenant au complexe de Pick notamment (DLFT), ainsi que d'autres syndromes parkinsoniens tels que l'atrophie multisystématisée, la MP, la maladie de Huntington, la maladie de Creutzfeldt Jakob ou encore la MA. Un tel recouvrement clinique, en particulier avec la PSP, aboutie à une sensibilité du diagnostic clinique n'excédant pas 40%.¹⁴⁶ De plus, les symptômes de la DCB se retrouvent dans d'autres affections neurologiques (principalement la MA) sans que la DCB en soit l'étiologie, poussant de nombreux auteurs à parler de syndrome de DCB ou syndrome corticobasal.^{101, 147, 148}

L'imagerie, la plupart du temps normale aux stades précoces de la maladie, montre une atrophie corticale asymétrique préférentiellement postérieure intéressant le lobe pariétal et frontal lors de sa progression.¹⁴⁹

Des critères neuropathologiques ont été proposés et permettent de confirmer un diagnostic clinique de DCB grâce à l'observation histologique d'inclusions neuronales et gliales de protéines tau dans le cortex et le striatum.¹⁵⁰ Différents types de lésions interviennent au cours de la DCB, touchant le cortex, les noyaux gris centraux ainsi que la substance blanche. On retrouve notamment des DNF dans le cortex cérébral mais aussi dans le tronc cérébral, des fibres tortueuses, des plaques astrocytaires quasi-pathognomonique de la DCB et des

inclusions oligodendrogliales. La variabilité dans la distribution et la sévérité des lésions observées histologiquement sont le reflet de l'hétérogénéité des présentations cliniques.¹⁴⁴

5.2 Paralysie supranucléaire progressive

La PSP ou maladie de Steele-Richardson-Olszewski est un syndrome clinique se manifestant par une paralysie supranucléaire,* une instabilité posturale, une rigidité axiale progressive et une démence.¹⁵¹ Cependant plusieurs variants cliniques de cette maladie coexistent, il n'est donc pas rare de retrouver des dystonies, une apraxie, ainsi que des troubles du langage chez les patients atteints de PSP.¹⁵² Les patients présentent une atrophie prédominante du tronc cérébral souvent étendue aux noyaux gris centraux (pallidum, thalamus et noyaux sous-thalamique) et aux régions préfrontales. L'histologie révèle des lésions neuronales comprenant les DNF ainsi qu'une pathologie gliale faisant également intervenir la protéine tau et montrant une topographie lésionnelle distincte.¹⁵³

6 MALADIES A PRION: ENCEPHALOPATHIES SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES

Les maladies à Prion sont des maladies neurodégénératives rares d'issue fatale touchant à la fois l'Homme et l'animal. Chez l'animal, elles comprennent essentiellement la tremblante du mouton (« scrapie ») et l'encéphalopathie spongiforme bovine médiatisée plusieurs décennies auparavant en « maladie de la vache folle ». Toutes ont en commun d'être transmissibles entre individus et de présenter une longue période d'incubation asymptomatique. Les critères diagnostiques actuels des encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) ont été établis par le réseau européen de surveillance des maladies à prion Euro-Neuro CJD en 2003 adaptés des recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé éditées en 1998.¹⁵⁴ Nous ne présenterons dans ce paragraphe que les EST humaines.

6.1 Les formes sporadiques : maladie de Creutzfeldt Jakob

Les formes sporadiques des maladies à Prion sont les plus fréquentes et représentent environ 85% de la totalité des EST.¹⁵⁵ L'incidence est la même entre les hommes et les femmes avec

* Notamment une ophtalmoplégie supranucléaire (paralysie de la latéralité et réduction du champ visuel surtout vertical), signe le plus précoce de ce syndrome.

un âge moyen de survenue d'environ 68 ans et représentant 1.5 cas par million d'habitant et par an. La forme sporadique la plus largement répandue est la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ).

Cette forme se caractérise cliniquement par une démence d'évolution rapidement progressive associée à des myoclonies ou d'autres mouvements anormaux. Elle aboutit au décès en moins d'un an dans 90% des cas, le décès survenant le plus souvent en quelques mois. Un grand nombre de signes non spécifiques peuvent être associés à ces signes neurologiques : troubles comportementaux, troubles psychiatriques, signes pyramidaux et extrapyramidaux, ataxie ainsi qu'une cécité corticale.¹⁵⁶ De nombreux variants cliniques de la forme classique présentée plus haut sont décrits telle que la forme ataxique présentant des signes inauguraux cérébelleux ou encore le variant d'Heidenhain caractérisé par une atteinte visuelle au premier plan de la présentation clinique et précédant l'apparition de la démence. De plus, une forme très rare d'insomnie fatale sporadique a été décrite avec une symptomatologie identique à l'insomnie familiale fatale que nous verrons plus loin sans aucune anomalie génétique.

6.2 Les formes génétiques

L'incidence de ces formes est variable d'un pays à l'autre, représentant moins de 10% des cas d'EST en France jusqu'à 25% des cas en Israël.¹⁵⁵ Ces formes se transmettent sur un mode autosomique dominant, bien qu'il n'y ait pas d'antécédents familiaux connus dans près de la moitié des cas. On compte parmi ces formes génétiques le syndrome de Gerstman-Straussler-Sheinker (GSS), l'insomnie fatale familiale (IFF) et la MCJ familiale dont la mutation la plus fréquente est E200K.

Le syndrome de GSS se caractérise cliniquement par une ataxie cérébelleuse, un syndrome pyramidal et l'apparition plus tardive d'une démence alors que la démence est au premier plan du tableau clinique lors d'une mutation E200K, tableau classiquement enrichi par une ataxie et des myoclonies. L'IFF quant à elle, se caractérise par des insomnies, des troubles dysautonomiques et moteurs avec une altération cognitive plus tardive.¹⁵⁷ Depuis l'essor des analyses génétiques et le recensement croissant de telles mutations, il devient difficile de relier une anomalie à un phénotype clinique qui peut s'avérer très variable selon la mutation. Le diagnostic différentiel s'avère d'autant plus difficile que les anomalies sont rares, la

symptomatologie pouvant répondre à d'autres étiologies neurodégénératives. Il est alors possible qu'un grand nombre de cas ne soit pas détecté.¹⁵⁸

6.3 Les formes acquises

6.3.1 Le Kuru

La maladie du Kuru a été découverte dans les années 1950 et concerne une population aborigène de Papouasie Nouvelle Guinée. Son mode de transmission était liée aux rites anthropophagiques funéraires afin de s'imprégner de la force physique et spirituelle du défunt. A la suite de l'interdiction par l'administration australienne de ces rites cannibales à la fin des années 1950, la maladie a aujourd'hui quasiment disparu, les quelques cas actuels étant nés avant 1950. La période d'incubation moyenne est de 12 ans mais quelques cas semblent avoir eu une incubation plus longue de l'ordre de 50 ans. Cette maladie débute classiquement par des tremblements et une forme ataxique. La démence survient plus tardivement mais n'enrichit pas toujours le tableau clinique.¹⁵⁹

6.3.2 Formes iatrogènes

Les formes de MCJ ayant pour origine une action thérapeutique représentent 1% des cas de MCJ. On connaît deux causes principales à ces contaminations : les greffes de dure-mère (majoritairement au Japon) et les injections intramusculaires d'hormone de croissance extractives (plus de 200 cas recensés en 2010 dont 119 en France selon l'Institut de veille sanitaire). La majorité des transmissions iatrogènes en France s'est effectuée à travers l'utilisation de lots dérivés d'hormones hypophysaires d'origine humaine contaminés. Les signes inauguraux de la maladie sont cérébelleux avec une durée d'incubation relativement longue de plus de 10 ans en moyenne et pouvant aller jusqu'à 30 ans. D'autres cas beaucoup plus rares ont pu être reliés à des greffes de cornées où encore à l'implantation d'électrodes neurochirurgicales.¹⁶⁰

6.3.3 Nouveau variant de la MCJ

Cette forme récente, décrite pour la première fois en 1996 par une équipe française et une équipe britannique, présente des caractéristiques différentes des autres MCJ.^{161, 162} Un lien

causal avec l'épidémie d'encéphalopathie spongiforme bovine a été évoqué dès les premiers cas.¹⁶² Des études expérimentales ont rapidement étayé cette hypothèse : des similitudes observées entre les lésions induites par la protéine Prion (PrP)* dans les cas d'encéphalopathies spongiformes bovines et de variant de la MCJ (vMCJ) de même que des études de transmission orale chez le chimpanzé précisant le mode de transmission du pathogène.^{163, 164} L'hypothèse étiologique de la contamination alimentaire *via* la viande contaminée par l'encéphalopathie spongiforme bovine est aujourd'hui largement admise. On dénombre au 1^{er} juillet 2010 : 173 cas dont 169 confirmés en Angleterre et 47 autres cas répartis entre l'Europe, l'Amérique du nord et le moyen orient dont 25 cas en France.[†]

Cette forme touche des sujets plus jeunes, âgés de 26 ans en moyenne avec une durée d'évolution plus longue (14 mois en moyenne) que pour la MCJ sporadique.¹⁶⁵ Elle se distingue cliniquement de la forme classique par sa présentation psychiatrique au premier plan du tableau clinique. Les patients présentent des troubles du comportement avec un syndrome dépressif, une anxiété ainsi qu'un repli social associés à des troubles mnésiques au cours de l'évolution de la maladie. A ces troubles vont également s'associer des douleurs diffuses et persistantes au niveau des membres inférieurs, les points d'appels neurologiques tels qu'une ataxie ou des mouvements anormaux interviennent généralement 2 mois après l'apparition des premiers troubles.

6.4 Diagnostic des EST : examens paracliniques et neuropathologie

Le diagnostic *antemortem* des EST est, comme pour les autres maladies neurodégénératives vues plus haut, un diagnostic de probabilité. Ce diagnostic est fondé sur un faisceau d'arguments cliniques, neuroradiologiques (IRM notamment), électrophysiologiques avec l'électroencéphalogramme (EEG) et biologiques.[‡] Ces différents critères permettent de classer les cas de MCJ en « possible » ou « probable », le diagnostic de certitude n'étant établi qu'après examen neuropathologique du cerveau par la mise en évidence de la PrP pathologique *via* des techniques immunohistochimiques et de Western Blot (WB).

* La physiologie de cette protéine ainsi que ses dysfonctionnements aboutissant à son caractère infectieux sont développés dans le **Chapitre II : Protéinopathies**.

† Chiffres provenant des données récoltées par The European Creutzfeldt Jakob Disease Surveillance Network (EUROCD, pour plus de renseignements se reporter à : <http://www.eurocd.ed.ac.uk/>) et de l'Institut de veille sanitaire (INVS : <http://www.invs.sante.fr/>).

‡ Cf. **Chapitre III : Biologie des démences**.

Les caractéristiques du tracé EEG évoluent en fonction de l'état d'avancement de la maladie et du type de MCJ dont le patient est atteint. On retrouve des ondes périodiques ou des complexes d'ondes lentes au tracé EEG. Cependant ce type d'ondes peut aussi être observé au cours de la MA ou encore d'une DCL.¹⁶⁶ Quoiqu'il en soit, ces signes électrophysiologiques varient fortement en fonction de la forme de MCJ, la sensibilité de cet examen ne dépassant pas 60% selon le réseau européen de surveillance (EUROCID).

L'IRM s'avère être un outil diagnostique intéressant dans la distinction des vMCJ et des cas sporadiques notamment, même si les critères internationaux n'intègrent actuellement l'imagerie que pour les cas « possibles » de vMCJ (EUROCID). L'IRM présente un hypersignal symétrique et bilatéral au niveau du thalamus postérieur en gradient de diffusion, caractéristique appelée « signe du pulvinar ». Ce signe est retrouvé chez les vMCJ avec une spécificité de 94% et une sensibilité de 81%.¹⁵⁶ Cette technique s'avère également sensible dans les cas sporadiques puisqu'on observe un hypersignal au niveau de la tête du noyau caudé et du putamen dans 70% des cas environ.¹⁶⁷

Le diagnostic de certitude de la MCJ repose sur la localisation de la triade histologique spongieuse, gliose astrocytaire et perte neuronale associée à la mise en évidence de la PrP pathologique *via* l'immunohistochimie.¹⁶⁸ Il existe plusieurs types de dépôts de PrP : synaptiques diffus, périvacuolaires, périneuronaux et en plaques.¹⁶⁹ Tout comme dans les autres démences développées plus haut, il existe des mixités pathologiques au sein de l'entité clinicopathologique des MCJ. Des coexistences lésionnelles entre la MA et la MCJ ont été décrites.^{170, 171} De plus, un patient cliniquement atteint par une MCJ et présentant des lésions caractéristiques de cette maladie mais aussi de la DCL et de la MA a récemment été rapporté.¹⁷² Une étude autopsique rétrospective effectuée sur une série de 39 patients atteints pas une MCJ E200K a décrit la fréquence des co-pathologies au sein de cette MCJ, montrant de ce fait que les cooccurrences pathologiques tenaient plus de la règle que de l'exception.¹⁷³

7 DEMENCES ET FORMES PRODROMALES

L'amélioration du diagnostic différentiel de la MA et des syndromes apparentés ainsi que la plus grande précision de ce diagnostic au cours de ces dernières années a permis de dégager des expressions cliniques de plus en plus précoces de ces pathologies. On a vu ainsi apparaître des prodromes de ces maladies.

On estime que la pathologie sous-jacente responsable de la démence, s'il s'agit d'une étiologie neurodégénérative, évolue de façon infraclinique généralement pendant 20 à 30 ans avant de libérer les premiers symptômes et devenir cliniquement apparente.¹⁷⁴ Ce stade de la maladie est caractérisé par des troubles cognitifs légers ou « Mild Cognitive Impairment » (MCI).¹⁷⁵ Ce stade MCI, très relayé dans la pratique clinique internationale ainsi que la recherche, a été décrit par Petersen en 1999 ; cependant cette notion pathologique précoce a été décrite plus de 10 ans avant ce concept de MCI que l'on nommait « troubles de la mémoire liés à l'âge », « déclin cognitif lié à l'âge » ou encore « troubles cognitif sans démence ».¹⁷⁶⁻¹⁷⁸

Bien que les troubles cognitifs légers soient le mode d'entrée privilégié d'une démence, le stade MCI n'est pas toujours associé à une étiologie neurodégénérative puisque des sujets atteints de dépression peuvent volontiers présenter un MCI. De même, cette symptomatologie peut être révélatrice d'une démence vasculaire.¹⁷⁹ Les premières études déterminant le cadre nosologique des MCI comprenaient une plainte mnésique sans atteinte cognitive d'un autre domaine comme critère diagnostique principal.¹⁷⁵ Le suivi longitudinal des patients inclus lors de ces études a permis de mettre en évidence l'hétérogénéité des populations présentant un MCI. Selon ces données de suivis, les patients atteints d'un MCI présentent un risque d'environ 15% par an d'évoluer vers un syndrome démentiel et plus de 50% des patients présentant un MCI progresseront vers une MA dans les 5 ans qui suivent l'apparition des premiers troubles. En considérant le stade MCI comme le prodrome de la MA, la progression des lésions cérébrales responsables de la maladie a lieu bien avant l'apparition des premiers troubles (Figure 11).

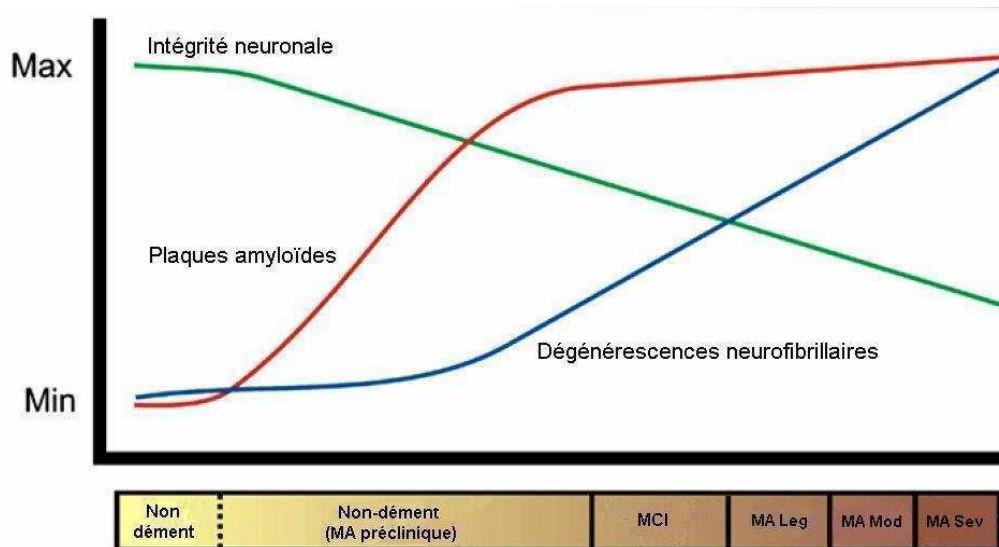


Figure 11. Progression lésionnelle de la maladie d'Alzheimer en fonction de la symptomatologie de la maladie. Stades évolutifs de la MA : les 2 premières phases sont asymptomatiques, MCI : Mild Cognitive Impairment ou troubles cognitifs légers ; MA Leg : MA légère ; MA Mod : MA modérée ; MA Sev : MA sévère (d'après Craig-Schapiro et al., 2009¹⁸⁰).

Ce prodrome n'est pas uniquement observé lors des premiers stades de la MA, on le retrouve aussi, dans des formes cliniquement différentes, à la base d'autres démences.¹⁸¹ Ainsi le stade MCI peut traduire les premiers troubles de patients atteints par une DFT, une APP, une DCL ou encore une démence vasculaire. Ce concept du MCI a ainsi été redéfini et cliniquement fragmenté en sous-types afin de traduire l'hétérogénéité étiologique de ce syndrome et de présager plus précisément de la pathologie sous-jacente.¹⁸² On distingue alors les MCI amnésiques (présentant des troubles de la mémoire) des MCI non amnésiques (ne présentant pas de troubles de la mémoire avec atteinte d'autres domaines cognitifs tels que les praxies, les fonctions exécutives, ou visuospatiales). Au sein de ces deux entrées cliniques se différencient les « multi-domaines » (atteinte de plusieurs domaines cognitifs) des « simple-domaines » avec l'atteinte d'un seul domaine cognitif (Tableau 3). Cette classification clinique des MCI laisse entrevoir une possible mixité pathologique sous-jacente.

Tableau 3. Classification des sous-types cliniques de MCI avec leurs étiologies présumées. +Amn : amnésique ; -Amn : non amnésique ; Dég : dégénératif ; Vascu : vasculaire ; Psy : psychiatrique ; Trauma : traumatique ; MA : maladie d'Alzheimer ; DCL : démence à corps de Lewy ; DFT : démence frontotemporale ; VaD : démence vasculaire ; Depr : dépression. (D'après Petersen, 2004¹⁸²).

Classifications cliniques		ETIOLOGIES			
		Dég	Vascu	Psy	Trauma
MCI amnésique		MA		Depr	
MCI multi domaine	+ Amn	MA	VaD	Depr	
	- Amn	DCL	VaD		
MCI simple domaine non amnésique		DFT			
		DCL			

L'imagerie cérébrale est une aide diagnostique importante dans la distinction des patients atteints par un MCI qui évolueront par la suite vers une MA ou une autre démence neurodégénérative. La mesure volumétrique de l'hippocampe, du cortex entorhinal mais aussi des ventricules cérébraux ou, d'une manière plus générale, la mise en évidence d'une atrophie cortico-sous-corticale affectant l'ensemble du cerveau permet de prédire la conversion d'un MCI en MA.¹⁸³ De même que chez les patients plus cliniquement caractérisés dans la MA, d'autres techniques d'imageries, telles que l'imagerie métabolique et fonctionnelle,* peuvent permettre de révéler des anomalies compatibles avec une progression vers une MA chez des patients atteints par un prodrome.^{184, 185}

Il existe peu d'études neuropathologiques sur les MCI, ce syndrome ne pouvant être directement responsable du décès des patients. Une étude clinico-pathologique de suivi longitudinal conduite sur 184 membres d'un ordre religieux catholique (The Religious Order Study) a permis de montrer que près de 60% des participants présentant un MCI avaient les lésions cérébrales de la MA.¹⁸⁶ Néanmoins les lésions vasculaires interviennent aussi avec une fréquence non négligeable (dans plus de 30% des cas) dans les caractéristiques pathologiques de ces sujets MCI. Une autre étude menée sur des patients ayant présenté un MCI amnésique

* Cf. 1.2.2 : Imagerie au sein de ce chapitre.

puis ayant progressé vers la démence a montré qu'une part importante de ces patients avaient développé une MA, cependant 20 à 30% d'entre eux ont développé une autre démence.¹⁸⁷ Le sous-type clinique amnésique chez les sujets présentant un MCI ne semble donc pas hautement spécifique d'une MA sous-jacente. L'étude neuropathologique des patients présentant un MCI paraît nécessaire pour comprendre et approcher les processus physiopathologiques de la maladie et la séquence d'instauration des lésions. Parce que le stade MCI semble représenter le premier palier symptomatique de la MA, l'approche au plus près du cerveau pourrait permettre de résoudre certaines questions étiopathogéniques.

Il est établi que l'instauration précoce d'une thérapeutique améliore de façon notable son impact sur la pathologie et la symptomatologie du patient. L'instauration des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase chez un patient MCI semble être prometteuse puisqu'elle pourrait permettre de retarder l'apparition de symptômes inhérents à l'histoire naturelle de la maladie. Bien qu'il ait été démontré que le bénéfice apporté par ces médicaments au cours de la maladie est d'autant plus important qu'ils sont instaurés précocement,^{112, 188-190} le bénéfice d'une telle thérapeutique semble très modeste chez des patients MCI,¹²⁶ une équipe ayant récemment rapporté un retard de quelques mois dans la conversion vers la démence des patients MCI sous Donepezil.¹⁷⁹ Néanmoins il apparaît nécessaire de bien identifier les pathologies sous-jacentes des patients MCI, certains traitements pouvant s'avérer délétères chez les patients avec une DCL par exemple.* De plus un diagnostic *in vivo* plus fiable à ces stades pourra permettre de mettre en place dans l'avenir des thérapeutiques ciblant directement les processus physiopathologiques associés à ces maladies neurodégénératives à leur début et stopper voire faire régresser les processus lésionnels.

* Cf. 3 : La démence à corps de Lewy au sein de ce chapitre.

CHAPITRE II : PROTÉINOPATHIES

Les déficits observés cliniquement dans les maladies neurodégénératives sont dus à un dysfonctionnement de l'activité synaptique ainsi qu'à une destruction neuronale cérébrale ou au sein de la moelle épinière dans certains cas.¹⁹¹ En effet, et plus particulièrement dans la MA, des études quantitatives et structurales ont permis de montrer une diminution importante de la densité synaptique au cours du processus pathologique de cette maladie,¹⁹² l'hippocampe étant le plus sévèrement atteint dans cette maladie. Il est, de plus, observé une neuroinflammation associée à cette perte neuronale et synaptique, caractérisée par une réaction astrocytaire et une activation microgliale, ces trois éléments (perte neuronale, synaptique et neuroinflammation) constituant le caractère anatomopathologique commun des maladies neurodégénératives.¹⁹³ Quoiqu'il en soit, l'événement central de ce processus semble fortement lié à une conformation anormale de certaines protéines du système nerveux central. Ces protéines mal conformées perdent leurs fonctions liées à leurs structures secondaires et/ou tertiaires devenant délétères jusqu'à l'acquisition d'une toxicité puis leur agrégation. Les dépôts cellulaires et extracellulaires que forment ces agrégations représentent les caractéristiques neuropathologiques principales des différentes maladies neurodégénératives et permettent une nosologie détaillée en fonction des protéines, des lésions et de leurs localisations cérébrales

Cependant l'étiopathogénèse des maladies neurodégénératives n'est pas encore complètement résolue, puisque les dépôts observés ne semblent pas être l'agent neurotoxique principal,¹⁹⁴ le stress oxydatif ainsi qu'un changement métabolique plus général intervenant lors du vieillissement pouvant être à l'origine de la fibrillation puis de l'agrégation protéique. Toutefois, certaines maladies, et notamment les maladies neurodégénératives, peuvent être classifiées et regroupées en fonction des protéines en cause dans la physiopathologie de la maladie, on parle alors de protéinopathies.

1 PHÉNOMÈNE D'AGRÉGATION

Les changements conformationnels des protéines perturbent les fonctions tissulaires jusqu'à l'étape d'agrégation. Les processus intervenant dans cette agrégation protéique sont complexes et restent encore mal maîtrisés.

Physiologiquement les chaînes polypeptidiques néosynthétisées par les ribosomes au niveau de l'ergastoplasme sont repliées en hélices α et feuillets β et subissent ensuite des modifications permettant leur bonne conformation et donc leurs fonctions au sein de la

cellule. Lors de repliements anormaux, une réponse cellulaire conduisant à la destruction des protéines mal conformées via les protéines chaperonnes est déclenchée. Les protéines défectueuses sont marquées avec de l'ubiquitine par les protéines chaperonnes, puis reconnues et détruites par le protéasome. Lorsque ces étapes sont manquantes ou déficitaires, lors des maladies de surcharge protéique par exemple, les protéines mal conformées s'agrègent en dépôts intracellulaires pouvant devenir extracellulaires après apoptose des cellules.

Le mauvais repliement protéique peut provenir d'une mutation ponctuelle mais aussi être le résultat d'un contact avec une toxine, d'aberrations dans les modifications post traductionnelles (telles que les phosphorylations ou les glycosylations), ou encore d'une altération résultant d'un phénomène oxydatif. Néanmoins, il est connu que toutes les chaînes polypeptidiques, et pas seulement les groupes de protéines impliquées dans une pathologie connue, ont une tendance à former des structures amyloïdes. De plus, le surpeuplement macromoléculaire a un effet significatif sur l'agrégation.^{195, 196} Si toutes les protéines peuvent former ces structures dans des conditions adéquates, il n'y a qu'une quarantaine de protéines intervenant dans les protéinopathies (Tableau 4).

Les maladies de surcharges protéiques, dépôts extracellulaires ou intracellulaires, peuvent être sporadiques, héréditaires et génétiques ou transmissibles comme dans certaines maladies à Prion. Bien que les processus intervenant dans la fibrillation de ces protéines semblent similaires, leurs manifestations cliniques sont différentes.

Tableau 4 : protéines et protéinopathies

Protéines agrégées	Maladies
A β	MA Angiopathies Amyloïdes Hémorragie cérébrale héréditaire de type Dutch avec amyloïdose. Myopathie à corps d'inclusion
Tau	MA DCB PSP Maladie de Pick DFT-tauopathie SLA avec parkinsonisme Syndrome de Down (trisomie 21)

α -synucléine	MP MA à variant CL DCL Maladie à CL Atrophie multisystématisée
Prion	MCJ vMCJ syndrome de GSS IFF Kuru
β -synucléine	MP Maladie à CL
γ -synucléine	MP Maladie à CL
TDP-43	SLA DFT DFT/SLA
Huntingtine	Chorée de Huntington
Récepteur aux androgènes	Maladie de Kennedy ou amyotrophie bulbo-spinale liée à l'X.
Ataxine-1/-2/-3/-7	Ataxie spino cérébelleuse de type 1/2/3/7
Sous unité α -1A du canal calcique P/Q	Ataxie spino cérébelleuse de type 6
Protéine de liaison à la boîte TATA	Ataxie spino cérébelleuse de type 17
ABri	Démence familiale britannique
ADan	Démence familiale danoise
Neuroserpine	Encéphalopathie familiale à corps de Collins
Cystatine C	Hémorragie cérébrale héréditaire avec amylose
Transthyrétine, protéine AL, protéine AA, Medine (lactadhérine), Apolipoprotéine AI, Apolipoprotéine AII, Apolipoprotéine AIV, Gelsoline, Lysozyme, Fibrinogène, β 2-microglobuline, facteur natriuretique atrial, kératines, lactoferrine	Amyloses (multiples)
Polypeptide Islet amyloïde (IAPP ; amyline)	Diabète de type II
Cristallines	Cataractes
Calcitonine	Carcinome médullaire de la thyroïde
Prolactine	Prolactinome pituitaire
Kératoépithéline	Dystrophie héréditaire de la cornée
Protéine surfactant C	Protéinose des alvéoles pulmonaires
Myosine	Myopathie

Il apparaît qu'avant la fibrillation, les polypeptides potentiellement agrégeants doivent être riches en feuillets β et/ou en hélices α . Bien que les protéines fibrillaires puissent avoir des précurseurs ainsi qu'une structure différente, elles semblent suivre un processus identique lors de la fibrillogénèse jusqu'à l'organisation intermoléculaire de feuillets β protofilamentaires.¹⁹⁷ Certaines propriétés physico-chimiques sont connues pour favoriser l'agrégation des protéines

entre elles. Ainsi une haute hydrophobicité, la présence de feuillets β , une complémentarité de charges et de liaisons hydrogènes potentielles ainsi qu'une faible charge moyenne sont classiquement retenus pour permettre l'agrégation protéique.¹⁹⁸ Bien que les maladies neurodégénératives à inclusions protéiques répondent à une nosologie complexe, tout laisse à penser que les mécanismes amenant à l'agrégation sont non seulement communs mais aussi liés entre eux. En effet, les cooccurrences pathologiques ne sont pas rares, pour exemple des CL retrouvés dans 15% à plus de 50% des MA confirmées neuropathologiquement et cliniquement diagnostiquées comme MA possibles ou probables.^{67, 68} Cette vision d'un mécanisme commun est partiellement corroborée par de nombreuses études *in vitro* démontrant notamment le pouvoir agrégeant de l'A β , de la protéine tau et de l' α -Syn entre elles.¹⁹⁹⁻²⁰¹

L'évidente toxicité des dépôts observés histologiquement est longtemps restée indiscutée au sein de la communauté scientifique et médicale, cependant certaines études laissent à penser que les inclusions observées dans ces maladies ne sont pas les formes toxiques responsables de la symptomatologie mais répondraient plutôt à un mécanisme de neuroprotection séquestrant les formes protéiques toxiques au sein d'agglomérats inertes. En effet, grâce à des études sur modèles animaux, il semblerait que les symptômes observés dans certaines maladies neurodégénératives apparaissent avant l'agrégation protéique elle-même.^{202, 203} Cette hypothèse est confirmée par de nombreuses études *in vitro* démontrant la toxicité de certains protofibrilles et oligomères pour des neurones en culture.^{204, 205} De même, il a été observé une altération cognitive, mnésique et comportementale chez le rat après injections intracérébrales de ces composés toxiques solubles.^{206, 207}

2 PHYSIOLOGIE ET ÉTIOPATHOGENÈSE DES PROTÉINOPATHIES

2.1 Tauopathies

Les tauopathies sont un groupe de pathologies caractérisées par des inclusions fibrillaires de protéines tau hyperphosphorylées parmi lesquelles on retrouve notamment la MA mais également certaines DLFT comme la maladie de Pick ou la démence frontotemporale avec parkinsonisme liée au chromosome 17 (DFTP-17), la DCB, la PSP, ainsi que la démence à grains argyrophiles, le syndrome de Down, la maladie de GSS et l'atrophie rubro-dentato-palido-luysienne.

2.1.1 Protéine Tau

La protéine tau est une protéine intraneuronale associée aux microtubules (MT). Elle est très abondante dans le système nerveux central et exprimée de manière prédominante au niveau des axones. Le gène de la protéine tau humaine est localisé sur le chromosome 17, l'épissage alternatif de son ARN messager aboutissant à six isoformes cérébrales de 352 à 441 acides aminés (revue : Buée et al., 2000²⁰⁸). Ces 6 isoformes diffèrent par la présence de 1 ou 2 inserts dans la région acide en N-terminal de la protéine, ainsi que par leur contenu en 3 (tau 3R) ou 4 (tau 4R) régions répétées en C-terminal (Figure 12). Ces régions répétées sont capables de se lier aux MT et de réguler leur assemblage ; les isoformes 4R ayant une meilleure affinité pour les MT que les isoformes 3R. Des phosphorylations dans ces régions répétées altèrent l'interaction entre la protéine tau et les MT, conduisant au détachement de ces deux protéines. Dans le système nerveux central des sujets sains, les 2 isoformes 3R et 4R de la protéine tau sont exprimées en quantité approximativement identique.²⁰⁹

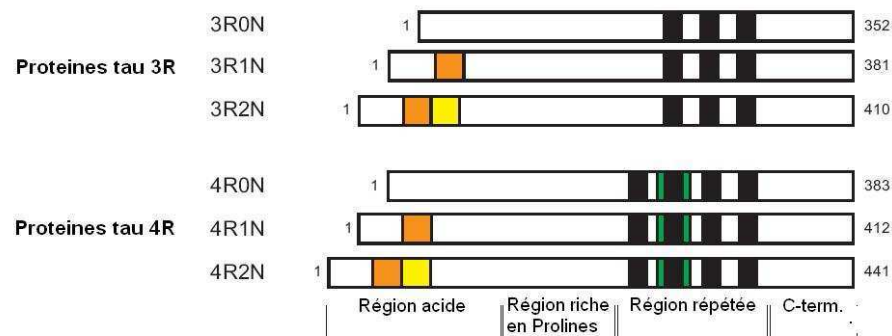


Figure 12. Structure et isoformes de la protéine tau (d'après Gendron et al., 2009²¹⁰)

Le rôle physiologique de la protéine tau est de faciliter la stabilisation des MT en se liant à ces derniers.²¹¹ Elle semble aussi intervenir dans la croissance axonale ainsi que dans le transport intracellulaire.²¹² De plus, cette protéine a été décrite dans le noyau de neurones mais aussi dans le noyau d'autres cellules et peut interagir avec l'ADN et l'ARN et pourrait participer à la structure nucléolaire et/ou à l'organisation de l'hétérochromatine des gènes ribosomiaux.²¹³

Sa fonction est régulée physiologiquement par son niveau de phosphorylation déterminée par les activités kinases et phosphatases intracellulaires.^{214, 215} Lors du développement embryonnaire, les protéines tau sont phosphorylées en de nombreux résidus, on compte à ce jour plus de 70 sites de phosphorylations connus.²¹⁶ De plus, outre les phosphorylations,

d'autres modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation, l'ubiquitinylation, la déamination, l'oxydation, la nitration, la glycation ou encore la transamination interviennent dans la régulation fonctionnelle de la protéine tau.

2.1.2 Physiopathologie de la protéine tau

Dans la MA, les protéines tau sont hyperphosphorylées, perdant ainsi leur capacités d'association aux MT pour s'agréger entre elles et former les DNF. Il est vraisemblable que l'hyperphosphorylation de la protéine tau soit la conséquence d'un déséquilibre dans la balance des activités enzymatiques kinases et phosphatases régulant son état de phosphorylation, puisque d'autres protéines hyperphosphorylées sont observées dans le cerveau de patients atteints par la MA.²¹⁷⁻²¹⁹

Les protéines tau hyperphosphorylées perdent leur capacité de liaison aux MT pour devenir solubles et changer partiellement de conformation par la suite.²²⁰ Des études *in vitro* ont permis de démontrer que ce changement de conformation accélère l'agrégation des protéines tau entre elles pour former les Paired Helical Filament (PHF),^{221, 222} unité pathologique des DNF constituées de protéines tau fibrillaires organisées en structure hélicoïdale²²³ et arborant une riche coiffe de phosphorylations.²²⁴ De nombreuses études ont permis d'identifier les domaines de phosphorylation au sein des PHF,^{225, 226} dénombant 10 phosphorylations majeures au sein des PHF isolées des cerveaux de patients atteints par la MA. Actuellement plus de 30 sites de phosphorylation ont été retrouvés sur la protéine tau constituant les DNF.²²⁷

De même, les coupures protéolytiques semblent jouer un rôle important dans la genèse des lésions cérébrales constituées de protéines tau puisque de nombreuses études ont mis en évidence l'importance de ces coupures. Ainsi les caspases, enzymes responsables des coupures de la protéine tau observées dans les DNF, apparaissent comme un des rouages clef de la pathogenèse des tauopathies. Des dépôts pathologiques précoces constitués de protéines tau tronquées en N- et C-terminal ont été rapportés, notamment un fragment coupé au niveau de la Glu-391^{228, 229} semblant intervenir de manière très précoce dans la pathogenèse de la MA et de la formation des lésions fibrillaires.²³⁰ Cette observation est corroborée par une étude *in vitro* démontrant l'inhibition de la partie C-terminale de la protéine tau exercée sur son assemblage en filament d'une part²³¹ et l'accélération de son assemblage par la coupure

de 20 acides aminés au niveau de l'acide aminé 421 d'autre part.¹⁹⁹ Ce dernier événement semblerait intervenir précocement dans la formation des lésions.^{201, 232} Néanmoins la séquence temporelle d'apparition de ces coupures protéolytiques par les caspases ne semble pas clairement définie puisqu'une autre étude a par la suite rapporté que le clivage de la protéine en Glu-391 interviendrait lors de la période intermédiaire voire tardive de la maturation des PHF.²³³ De plus, comme sa partie carboxy-terminale, le côté N-terminal de la protéine tau présente un effet inhibiteur sur l'agrégation.²³⁴ Cependant le moment de sa dégradation reste encore incertain puisqu'elle aurait lieu lors du stade tardif de la maturation des DNF selon certaines équipes²³⁵ mais serait retrouvée plus précocement pour d'autres.²³⁶ Une étude plus récente a néanmoins permis de préciser la séquence temporelle d'apparition de ces coupures qui sembleraient coexister dans le temps.²³⁷ Ces modifications pathologiques de la protéine conduisant à la formation et à la maturation des DNF sont synthétisées dans la Figure 13.

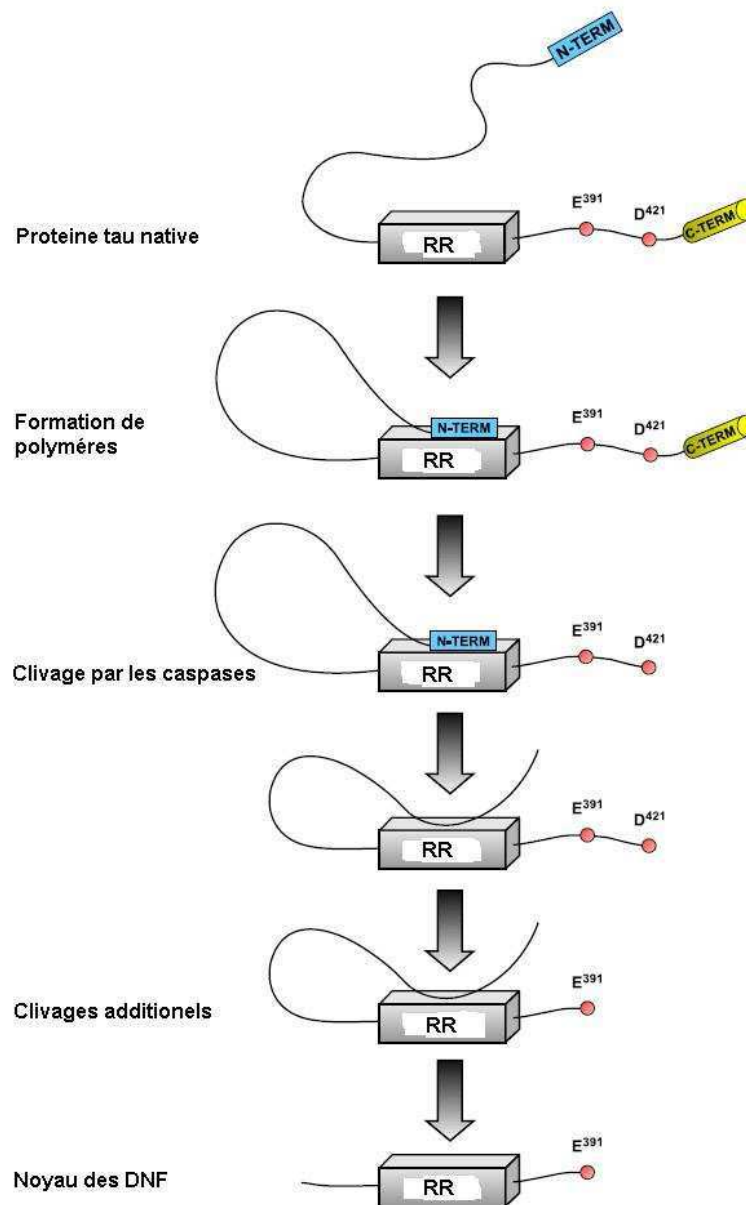


Figure 13. Séquence d'apparition des coupures protéolytiques de la protéine tau et rôles dans la physiopathologie de la formation et de la maturation des DNF. RR : région répétée (d'après Binder et al., 2005²³⁸).

Ces mécanismes physiopathologiques de la protéine tau ne sont pas propres à la MA puisque ces coupures protéolytiques ont également été retrouvées dans des lésions d'autres tauopathies telles que la maladie de Pick, les PSP et les DCB ainsi que dans les DCL.²³⁹⁻²⁴¹ De plus, ces coupures protéolytiques par les caspases sembleraient associées à l'hyperphosphorylation des protéines tau dans les maladies neurodégénératives où les DNF sont présentes. Les protéines tau tronquées sont plus sensibles à l'hyperphosphorylation qui favorise par la suite leur accumulation.^{221, 242} Tout porte à croire que la fibrillation de la protéine tau en filaments est

favorisée par une cascade de phosphorylation au niveau de sa partie amino-terminale et son clivage en C-terminal.^{243, 244}

Le rôle des caspases dans la genèse de ces lésions a été régulièrement étudié puisque l'initiation des DNF semble liée à son activation. Néanmoins cette activation enzymatique semble multifactorielle. Ainsi, dans la MA, l'A β participerait à l'activation de cette enzyme.^{199, 201} De plus certaines mutations de la protéine tau, ou encore des modifications post-traductionnelles comme son oxydation, conditionneraient cette même activation enzymatique.²⁴⁵⁻²⁴⁷ Cependant, comme l'indique des études récentes, l'hyperphosphorylation de la protéine tau semble précéder les changements conformationnels et les coupures protéolytiques dans les DNF de la MA²⁴⁸ comme il est également possible pour d'autres tauopathies telles que la maladie de Pick.²⁴¹ L'hyperphosphorylation de la protéine tau apparaît comme le *primum movens* de la fibrillation, et s'effectue bien avant la formation des DNF.⁵³ Le déclenchement de ces hyperphosphorylations reste encore mal connu, cependant de nombreux arguments sont en faveur d'une activation des kinases responsables de la phosphorylation de la protéine tau par l'A β ₄₂.^{*199}

Cette hypothèse selon laquelle l'A β serait un événement clef de l'étiopathogenèse de ces maladies est appelée « cascade amyloïde ». Très relayée dans la communauté scientifique ces dernières décennies grâce à des études à la fois *in vitro* et sur modèle animal tendant à prouver cette hypothèse, les données acquises sur les tauopathies humaines ne supportent pas complètement ce phénomène. En effet, des dépôts d'A β sous forme de PS sont retrouvés chez le sujet âgé normal sans dépôts fibrillaires de tau.²⁴⁹ De plus, une forte charge cérébrale en A β sans dépôts de tau hyperphosphorylées existe dans d'autres maladies telles que les hémorragies cérébrales héréditaires⁵³ de même que des tauopathies comme les DCB, la maladie de Pick ou DFTP-17 ne s'accompagnent pas neuropathologiquement de PS.

Les mécanismes en jeu dans la formation des DNF apparaissent complexes, et les processus amenant à la formation de ces lésions sont à l'heure actuelle encore mal connus, cependant un trajet lésionnel schématique semble se dessiner (Figure 14). Ainsi, dans la MA, les protéines tau nouvellement phosphorylées se dissocient du MT²⁵⁰ pour changer de conformation après coupures protéolytiques par les caspases. Ces protéines pathologiques adoptent alors une

* Forme de 42 acides aminés du peptide amyloïde, cf. **2.2 : Amyloïdopathies** au sein de ce chapitre.

structure en feuillets β plissés puis se dimèrisent. Ces structures en feuillets β jouent un rôle important dans l'agrégation protéique²⁵¹ et paraissent être à la base des protéinopathies. Ces dimères de protéines tau pathologiques se stabilisent ensuite et s'oligomérisent pour former des protomères de protéines tau. Les PHF sont formées de 2 protofilaments enroulés l'un autour de l'autre et sont composés de 8 à 14 monomères de protéines tau.²⁵² Ces PHF formeront par la suite les DNF dans la MA.

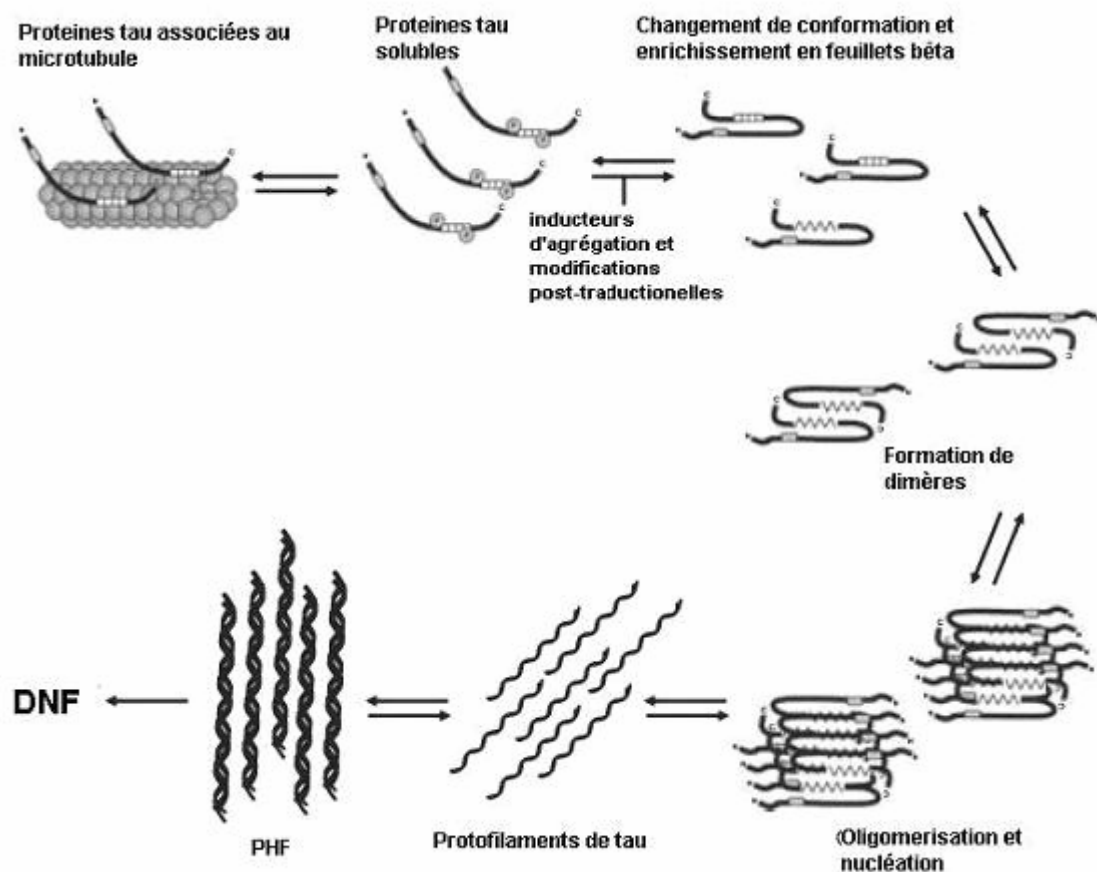


Figure 14. Physiopathologie de la fibrillation de la protéine tau et genèse des DNF

(d'après Meraz-Rios et al., 2010²⁵³).

Comme nous l'avons vu dans la première partie de ce chapitre, l'agrégation des protéines est un phénomène en partie induit par un surpeuplement protéique. Une augmentation de la quantité de protéines tau a été retrouvée dans le cerveau de patients atteints par la MA.²⁵⁴ Cette augmentation en quantité de protéines pourrait s'expliquer par la séquestration des protéines au sein des lésions mais aussi par un mécanisme compensatoire permettant de réguler les protéines associées aux MT quand celles-ci ne sont plus fonctionnelles en

augmentant son expression. Ainsi, une augmentation de l'expression de l'isoforme 4R de la protéine tau, isoforme ayant une meilleure affinité pour les MT que les 3R, a été observée dans les tauopathies dont la MA.²⁵⁵

D'autres facteurs interviendraient dans la formation et/ou la stabilisation des DNF. Des formes glycosylées de PHF ont été retrouvées dans les cerveaux de patients atteints par la MA.²⁵⁶ De plus les formes natives de la protéine tau sont elles aussi retrouvées glycosylées dans la MA, suggérant que ce phénomène est un événement encore plus précoce que la phosphorylation dans la MA puisque qu'il n'a pas été observé de glycosylation au niveau de la tau purifiée à partir de sujets sains.²⁵⁷ De plus, la glycosylation inhiberait la déphosphorylation et faciliterait la phosphorylation de la tau selon certaines études *in vitro*.²⁵⁷ Ce processus stabiliserait la structure des PHF et conduirait à la formation ainsi qu'à la consolidation des DNF. De même, un phénomène de glycation de la protéine tau et d'ubiquitinylation semble intervenir de manière plus tardive dans l'établissement des lésions.^{258, 259} De manière intéressante, la nitration de la protéine tau a été détectée dans différentes tauopathies alors qu'elle n'a pas été mise en évidence dans les cerveaux sains, cependant les mécanismes par lesquelles la nitration interviendrait dans la pathogenèse des lésions associées à la MA reste encore mal compris.^{260, 261} La formation des filaments pourrait être un mécanisme adopté par les neurones pour séquestrer les formes toxiques de tau hyperphosphorylées puisque les DNF ont moins d'impact que les formes phosphorylées de la protéine sur l'intégrité des MT.²⁶² De même, la polymérisation de la protéine ne semble pas être un événement suffisant pour conduire à la mort neuronale.²⁶³ Quoiqu'il en soit, les formes fibrillaires elles mêmes semblent jouer un rôle dans le développement de la pathologie puisque les PHF inhiberaient le fonctionnement du protéasome.²⁶⁴

Le profil électrophorétique des PHF est très informatif puisqu'il permet non seulement de faire un diagnostic biologique *post-mortem* de MA grâce à l'extraction de ces lésions déposées ensuite en Western Blot (WB), mais également de préciser la nature de la tauopathie grâce à une variation dans la distribution des bandes pathologiques observées entre les différentes maladies (Figure 15). L'immunoempreinte des PHF se caractérise par un triplet majeur de poids moléculaires apparents de 60, 64 et 69 kDa et une variante mineure de 74 kDa correspondant à l'isoforme la plus longue et la moins exprimée de 441 acides aminés (Figure 12).²⁶⁵

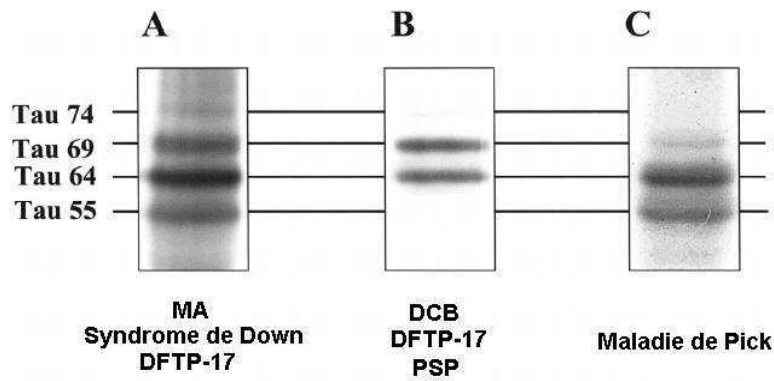


Figure 15. Profils électrophorétiques des PHF en WB dans différentes tauopathies (d'après Buée et al., 2001²⁶⁶)

Dans les tauopathies, le ratio des isoformes 3R et 4R accumulées dans le cerveau change, la MA étant la seule démence avec les deux isoformes accumulées de façon identique.²⁶⁷ Il est à présent admis que certaines maladies mais aussi des mutations changent le ratio des formes R3 et R4 et que ces isoformes modulent différemment la dynamique des MT.²⁶⁸ Ainsi certaines maladies neurodégénératives arborent des lésions cérébrales d'une isoforme de tau particulière, 3R ou 4R (Figure 16).

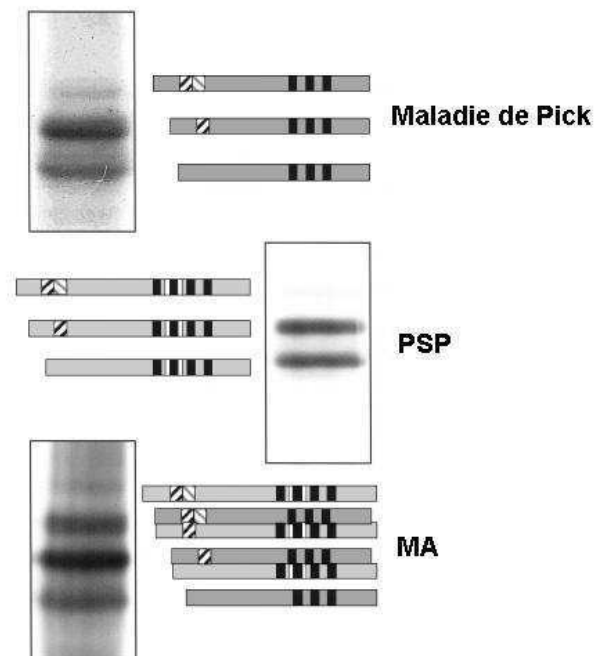


Figure 16. Profils électrophorétiques des PHF en Western Blot et isoformes de protéines tau intervenant dans différentes tauopathies (d'après Buée et al., 2001²⁶⁶).

Ainsi les PHF retrouvées dans la PSP ou la DCB sont constituées de protéines tau 4R alors que les lésions responsables de la maladie de Pick sont constituées d'isoformes 3R de tau. Il convient de rajouter que certaines mutations du gène de la protéine tau peuvent être responsables de maladies neurodégénératives et notamment de DFTP-17. Cette pathologie génétique et familiale pour laquelle de nombreuses mutations ont été isolées à ce jour se présente le plus souvent cliniquement par un syndrome frontal de type comportemental associé à un syndrome parkinsonien.^{269, 270}

2.2 Amyloïdopathies

2.2.1 Le peptide A β

La famille amyloïde β regroupe des peptides résultants du clivage protéolytique de l'*amyloid precursor protein* (protéine « APP ») par les β - et γ -sécrétases.²⁷¹ La protéine « APP » est transmembranaire et ubiquitaire. Elle contient 695 acides aminés pour l'isoforme cérébrale, dont le rôle physiologique reste encore à déterminer. La voie amyloïdogène dépendant des activités des enzymes β - et γ -sécrétases va former principalement un peptide A β de 40 acides aminés (A β_{40}) et de façon plus minoritaire un peptide A β potentiellement neurotoxique de 42 acides aminés (A β_{42}) (Figure 17). La voie non amyloïdogène est conduite quant à elle par l' α -sécrétase et n'intervient pas dans la production d'A β .

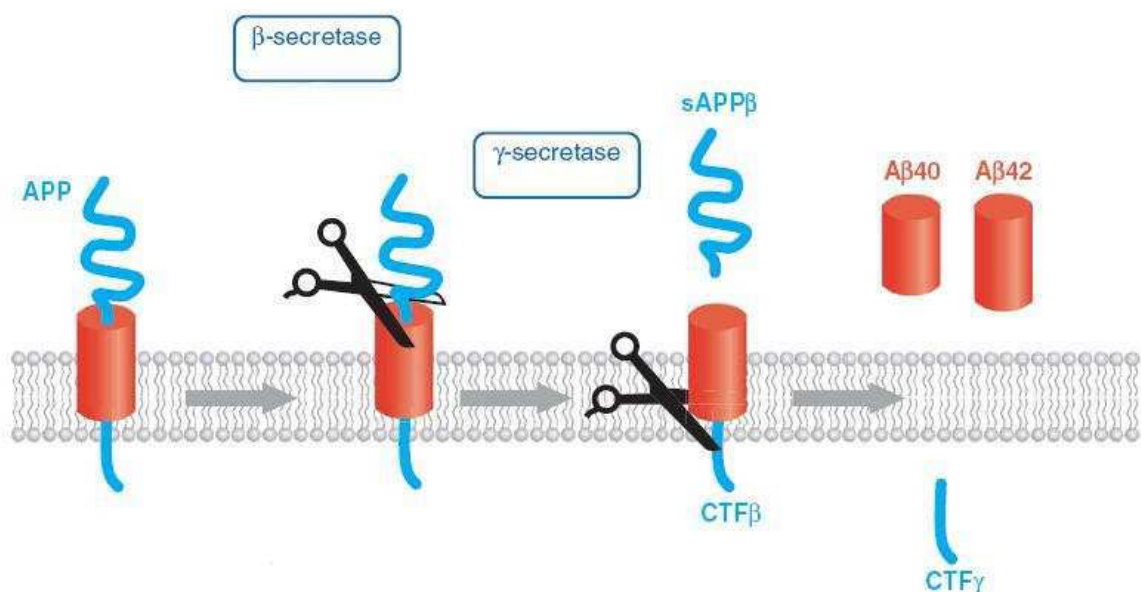


Figure 17. Coupures protéolytiques de la protéine « APP » : voie amyloïdogène (d'après Skovronsky et al., 2006²⁷²).

2.2.2 Physiopathologie du peptide A β

Les monomères d'A β ne contiennent pas d'hélices α ou de feuillets β dans les conditions physiologiques, ainsi l'apparition d'hélices α au sein de ce peptide est une voie de la fibrillation.²⁷³ Comme le suggèrent les formes génétiques de la maladie, le processus physiopathologique de la MA pourrait être sous-tendu en partie par une surproduction de l'A β , et particulièrement de la forme de 42 acides aminés.^{274, 275} Cette forme semble la plus pathogène puisqu'elle est le composant majoritaire des PS^{276, 277} et a une tendance importante à s'agréger et précipiter *in vitro*.²⁷⁸ Néanmoins, il a été récemment démontré que l'accumulation intracérébrale d'A β dans les premiers stades de la maladie proviendrait de formes tronquées N-terminales du peptide de 42 acides aminés (A $\beta_{4-5-8-9-42}$).^{279, 280} Les formes N-tronquées du peptide A β représenteraient par ailleurs plus de 60% de toutes les formes d'A β cérébrales.²⁷⁹

Quoi qu'il en soit, cette agrégation semblerait liée à la charge en acides aminés hydrophobes de ce peptide. Des études *in vitro* ont montré le rôle déterminant de l'hydrophobicité du côté carboxy-terminal du peptide A β sur son agrégation.²⁸¹

Comme il a été soulevé en début de chapitre, les dépôts observés histologiquement ne semblent pas être les formes toxiques responsables de la symptomatologie. Il existe en effet des formes agrégées intermédiaires évoluant jusqu'aux PS.²⁷³ Il a été par ailleurs suggéré que les formes oligomériques solubles d'A β générées après changements conformationnels, véritable porte d'entrée de ce processus pathologique, seraient les premières espèces toxiques.²⁸² Les formes oligomériques d'A β semblent jouer un rôle central dans la pathogenèse en détruisant le réseau synaptique conduisant à une perte des fonctions cognitives,²⁸³ hypothèse confirmée sur le modèle animal.^{206, 207} La formation de dépôts amyloïdes ferait partie d'une stratégie de défense afin de séquestrer les espèces toxiques d'A β . En effet, il existe une diminution en oligomères solubles chez les souris transgéniques surexprimant l'A β lors de la phase d'accumulation optimale de l'A β en dépôt. De plus la performance cognitive de ces souris est améliorée pendant cette phase.²⁸⁴ Grâce à des techniques d'imagerie métabolique permettant de visualiser *in vivo* les dépôts amyloïdes tels que la TEP au ¹¹C-PIB*, des PS ont été observés chez des patients ne présentant pas de troubles

* Cf. Chapitre I : Les démences neurodégénératives – 1.1.2 : Imagerie.

cognitifs.²⁸⁵ Ces découvertes ont permis de constater que la présence de PS cérébrales n'est pas corrélée à une atteinte cognitive.

La découverte des PS et de son constituant majeur comme l'une des lésions principales de la MA a permis de donner une orientation moléculaire à l'étiopathogénèse de la maladie, orientation qui fut développée sous le concept de « cascade amyloïde ».^{286, 287} Cette hypothèse place l'A β au centre de la pathogénèse de la MA, qui serait due à une augmentation de la production ou à un défaut de clairance du peptide amyloïde, l'accumulation des peptides résultant en la formation des PS. Par ailleurs, il semble que l'accumulation d'A β intracérébrale précède les premiers symptômes de la MA de plusieurs années voire de plusieurs décennies.²⁸⁸ L'événement initial de la MA semblerait donc lié au métabolisme/catabolisme de l'A β qui initierait par la suite d'autres événements délétères comme l'hyperphosphorylation des protéines tau, la perte synaptique, la neuroinflammation, la dégénérescence cérébrale. Néanmoins, cette hypothèse reste encore discutée au sein de la communauté scientifique et n'apporte pas toutes les réponses que pose la physiopathologie des démences neurodégénératives.

2.3 α -synucléinopathies

Les α -synucléinopathies, groupe de maladies neurodégénératives, sont caractérisées par des agrégats fibrillaires d' α -Syn dans le cytoplasme de populations spécifiques de neurones et de cellules gliales.

Elles se caractérisent cliniquement par un déclin chronique et progressif des fonctions motrices, cognitives, comportementales et d'autonomie dépendant de la distribution lésionnelle.* Le diagnostic différentiel s'avère parfois difficile à cause d'un recouvrement clinique important.²⁸⁹ Il existe 5 lésions impliquant l' α -Syn: CL, neurites de Lewy, inclusions gliales cytoplasmiques, inclusions neuronales cytoplasmiques et sphéroïde axonale.²⁹⁰

* Cf. **Chapitre I : Les démences neurodégénératives**. La clinique des synucléopathies est développée au sein des chapitres suivant : **3 : La démence à corps de Lewy** et **4 : La maladie de Parkinson**.

2.3.1 L' α -synucléine

L' α -Syn est une protéine cytoplasmique essentiellement exprimée dans le cerveau. Il s'agit d'une petite protéine soluble et abondante dans les neurones au niveau de l'axone présynaptique. Il existe deux isoformes principales de cette protéine : une forme majoritaire de 140 acides aminés et une forme de 112 acides aminés également retrouvée dans le cerveau fœtal.²⁹¹ La fonction de cette protéine n'est pas encore élucidée. Son association avec les vésicules synaptiques suggère un rôle dans la libération de certains neurotransmetteurs,²⁹² mais elle pourrait aussi intervenir dans la régulation de la synthèse de la dopamine,²⁹³ et avoir un rôle de protéine chaperonne.²⁹⁴

2.3.2 Physiopathologie de l' α -synucléine

L' α -Syn est impliquée dans la pathogénèse de la MP, la DCL ou encore des atrophies multisystématisées. Les principales lésions caractéristiques de ces pathologies sont les CL formés par des filaments d' α -Syn oligomérisés et les neurites de Lewy, dépôts filamenteux diffus.^{295, 296} Les CL ont été décrits en 1912 par Friedrich H. Lewy ayant utilisé des techniques histologiques classiques sur le cerveau d'un patient atteint par la MP.

La portion centrale de l' α -Syn comprend la partie hautement amyloïdogène de la molécule responsable de ses changements conformationnels en feuillets β pour former des protofibrilles puis des structures fibrillaires.^{297, 298}

Dans la DCL, les CL intraneuronaux sont disséminés dans le cortex. Une augmentation intracérébrale de l'expression de l'isoforme de 112 acides aminés associée à une déplétion de la forme de 140 acides aminés a été décrite dans cette maladie,²⁹⁹ la déplétion pouvant être en rapport avec l'oligomérisation de l' α -Syn, puis son agrégation sous forme de CL dans le cytosol. Dans les CL, 90% de l' α -Syn est phosphorylée au niveau de l'acide aminé en position 129 alors qu'une étude chez le rat a montré que seulement 4% de l' α -Syn est phosphorylée sur cet acide aminé physiologiquement.³⁰⁰ De plus, cette phosphorylation de l' α -Syn sur l'acide aminé 129 favoriserait la formation de fibrilles *in vitro*. Cette phosphorylation anormale serait donc responsable de l'agrégation fibrillaire de l' α -Syn. Par ailleurs d'autres modifications post-traductionnelles ont été retrouvées au sein de l' α -Syn constituant les CL, telles que des

coupures protéolytiques, des nitrations ainsi que des ubiquitylations jouant très certainement un rôle dans les dépôts pathologiques d' α -Syn.^{301, 302}

2.4 Maladies à Prion

Les maladies à Prion, également appelées encéphalopathies spongiformes transmissibles, touchent à la fois l'homme et l'animal. Elle comprend l'encéphalopathie spongiforme bovine et la tremblante du mouton (ou Scrapie) pour l'animal et la MCJ, le GSS, l'IFF et le kuru pour l'Homme. Il existe des formes sporadiques, génétiques et acquises dont le dernier groupe étiologique comprend le variant de la MCJ lié à l'agent pathogène responsable de la « maladie de la vache folle ». Toutes ces pathologies liées à la PrP sont transmissibles entre individus et sont capables de passer la barrière inter-espèces. Elles sont caractérisées par l'accumulation de PrP pathologiques dans le système nerveux central.

2.4.1 Protéine Prion

La PrP native est une glycoprotéine de 254 acides aminés attachée à la surface extracellulaire de la membrane plasmique qui sera ensuite internalisée au sein de la cellule par endocytose. Elle est ubiquitaire et majoritairement exprimé au niveau cérébral mais aussi des muscles squelettiques, du rein, du cœur, des organes lymphoïdes secondaires et des cellules sanguines.³⁰³

Le gène codant pour la PrP est situé sur le chromosome 20 et est très conservé entre les mammifères, pouvant atteindre 80% d'homologie entre l'Homme et le bovin notamment.^{304,}

³⁰⁵ Le domaine C-terminal est conformé en hélice α . On compte dans cette région 3 hélices α et un feuillet β , la protéine étant stabilisée par un pont dissulfure entre l'hélice α 2 et 3.³⁰⁶ La protéine peut exister sous une forme non glycosylée, mono ou diglycosylée, cependant les mécanismes moléculaires intervenant dans ces différents états de glycosylation sont encore mal connus. Sa fonction reste encore floue mais de nombreuses études indiquent qu'elle interviendrait dans de nombreux processus tels que la régulation du sommeil et le rythme circadien ou encore certaines fonctions cognitives telles que l'apprentissage.³⁰⁷

2.4.2 Physiopathologie de la protéine Prion

Le concept du Prion a été introduit en 1982 afin d'expliquer une cause pathogène donnant la Scrapie. Ce pathogène était vu comme un acide nucléique contenant une protéine essentielle pour son infectiosité.³⁰⁸ Néanmoins, seuls les procédés capables de dénaturer les protéines semblent efficaces pour réduire le titre infectieux, ceux détruisant les acides nucléiques restant sans effet. La PrP sera par la suite identifiée comme étant une protéine retrouvée chez le malade (dans sa conformation pathologique) mais aussi chez le sujet sain.³⁰⁹ Il existe une susceptibilité génétique dans le développement des EST, le polymorphisme méthionine (M) / valine (V) porté par le codon 129 du gène de la PrP semblant être un élément critique. La population caucasienne est majoritairement MV (50% des cas) les MM et VV représentant moins de 40% et plus de 10% respectivement. Le génotype MM est surreprésenté dans les populations atteintes de MCJ sporadique (MM: 66%, MV et VV: 17%).³¹⁰ De plus, cette homozygotie MM est retrouvée dans l'extrême majorité des patients ayant développés une vMCJ puisqu'à ce jour seul un cas homozygote MV a été rapporté chez un homme de 30 ans.³¹¹ Néanmoins aucune confirmation autopsique n'a été effectuée sur ce patient.

La pathogenèse des maladies à prion est axée autour du changement conformationnel de la région C-terminale de la PrP en hélice α vers une isoforme riche en feuillets β avec, de ce fait, un fort caractère agrégeant. Cette isoforme se propage ensuite elle-même en causant la conversion des formes normales en formes pathologiques.³¹² Cependant ce phénomène, bien que central dans la genèse de la maladie, reste encore mal connu. Deux hypothèses pouvant permettre d'expliquer ces changements conformationnels se sont dégagées. La première voit la PrP pathologique comme une entité exogène qui va, après introduction, induire le changement de conformation de la PrP native endogène en PrP pathologique (Figure 18A). L'autre hypothèse admet un équilibre physiologique réversible entre la forme native et la forme pathologique. Cette coexistence des deux isoformes de la PrP révolutionne le concept de la forme pathologique qui n'est, de ce fait, plus l'agent pathogène responsable de la maladie. L'agglomération de la forme pathologique va constituer les oligomères solubles toxiques de PrP qui vont s'agréger en dépôts cérébraux caractéristiques, par le recrutement des isoformes pathologiques donnant cette impression de réplication (Figure 18B).

Concernant les formes génétiques et familiales, plus de 40 anomalies sur le gène de la PrP peuvent être à l'origine d'une forme génétique chez l'Homme. La symptomatologie peut varier en fonction de la mutation, entraînant par exemple une MCJ s'il s'agit d'une mutation E200K ou un GSS en cas d'insertion répétées de séquences d'octapeptides.³¹³

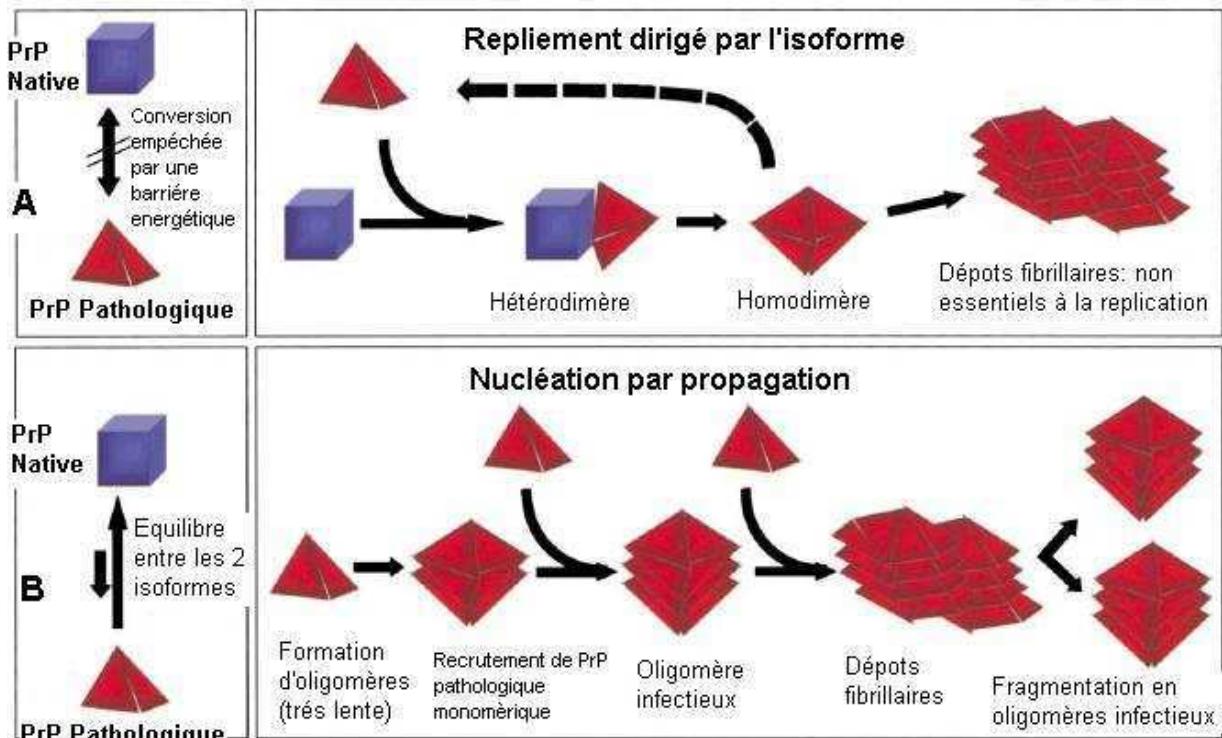


Figure 18. Modèles de conversion conformationnelle de la protéine Prion native en protéine Prion pathologique (d'après Aguzzi et al., 2004³¹⁴).

2.5 TDP-43pathies

La protéine TAR DNA binding protein 43 (TDP-43) est un facteur nucléaire qui se lie aux ARN et qui semble jouer un rôle dans de nombreux processus cellulaires comme la transcription ou encore le transport des ARN.

Il a été récemment décrit que cette protéine est le composant majoritaire des inclusions intracellulaires observées dans les neurones de patients atteints par plusieurs maladies neurodégénératives telles que les DLFT ubiquitine positives, la SLA et la MA.^{69, 95} Comme le suggèrent certaines études *in vitro*, la formation de structures agrégées ne se produit pas avec la forme complète de la protéine, sa dégradation produisant des fragments de TDP-43 ayant

une forte tendance à l'agrégation.³¹⁵ De plus, la formation de ces fragments permet une phosphorylation aberrante de la protéine ainsi qu'une ubiquitination.⁹⁵

2.6 Le cas des isopeptides : vers une étiopathogénèse commune des protéinopathies?

Les isopeptides sont des liaisons covalentes intra ou inter-protéiques catalysées par une enzyme présente dans le cerveau : la transglutaminase (TG). Cette enzyme, dont plusieurs isoformes sont connues, va opérer un pont isopeptidique γ -glutamyl- ϵ -lysine ou bis- γ -glutamylpolyamine entre ces deux acides aminés contribuant à la formation de polymères solubles et insolubles, ces liaisons covalentes étant stables et résistantes à la majorité des protéases. Bien que l'activité des TGs soit présente dans le cerveau sain, cette enzyme est impliquée dans bon nombre de processus pathologiques tels que l'inflammation, la fibrose, le diabète, les métastases cancéreuses, les maladies auto-immunes ou encore le psoriasis.³¹⁶ Il a ainsi été suggéré que les liaisons isopeptidiques pouvaient contribuer à la formation d'agrégats spécifiques de maladies et représenter un des *primum movens* des maladies neurodégénératives.³¹⁷⁻³¹⁹ Ceci d'autant plus que les protéines impliquées dans les différentes maladies neurodégénératives telles que la protéine tau, l'A β , l' α -Syn ou encore l'huntingtine apparaissent comme un bon substrat des TGs *in vitro*.³²⁰⁻³²²

L'activité, l'expression et la quantité des TGs est augmentée dans bon nombre de maladies neurodégénératives. Ainsi, l'activité des TGs est augmentée dans les régions cérébrales affectées par la MA mais aussi la maladie de Huntington, de la PSP ou encore la MP.^{318, 319, 323} Les isopeptides, produits des TGs, sont eux même retrouvés de façon importante dans le cerveau des patients atteints par ces maladies. Cependant ces liaisons sont également retrouvées de façon physiologique dans le SNC d'adultes jeunes, suggérant un rôle physiologique des isopeptides.³²⁴

De nombreuses études se sont intéressées à la formation des PHF *via* les isopeptides. Ils ont ainsi pu être mis en évidence au sein des PHF dans la MA.³²⁵ De plus, cette présence dans ces lésions est augmentée dans le cortex frontal et pariétal à des stades précoces de la maladie alors que les changements neuropathologiques détectables ne sont pas observables à ce stade, suggérant un rôle précoce de ces liaisons isopeptidiques dans l'établissement des lésions cérébrales.³²⁶ Les PHF issus de cerveaux de patients atteints par la MA présentent des

isopeptides, néanmoins ces liaisons semblent intéresser d'autres protéines.³²⁵ Finalement, les protéines tau elles même ne seraient pas liées par des isopeptides mais se serait l'ubiquitine des DNF, liés à d'autres protéines telles que la parkine ou encore l' α -Syn notamment, qui subiraient ces modifications par la TG. Ce mécanisme, véritable coiffe protectrice des DNF, permettrait de stabiliser ces agrégats, les rendant résistants à la dégradation.³²⁴

De la même manière et puisque le peptide A β semble un bon substrat de la TG, le rôle de cette enzyme dans l'établissement des dépôts amyloïdes a été étudié.³²¹ Le peptide A β ayant subi une substitution d'un acide aminé (Glu²²→Gln) et responsable de la maladie héréditaire de type Dutch avec amylose* est un très bon substrat de la TG. Ce phénomène serait à l'origine des dépôts d'A β dans cette pathologie et pourrait possiblement expliquer la formation des PS dans la MA.³²⁷

Comme nous l'avons vu plus haut, l' α -Syn ne paraît pas épargnée par la TG. Une étude immunohistochimique *postmortem* conduite sur des patients atteints par la MP ainsi que la DCL révèle la présence de ces ponts covalents dans le halo des CL.³²⁸ Ces liaisons isopeptidiques semblent co-localiser avec l' α -Syn dans les CL, tendant à prouver que l' α -Syn s'agrège en CL par une modification conduite, du moins en partie, par la TG. De plus, ces modifications seraient initiées précocement puisqu'une augmentation de la quantité de liaisons isopeptidiques intramoléculaires au sein de l' α -Syn a été retrouvée dans les cerveaux de patients atteints par la MP.³²⁹ Ces résultats indiquent que ces processus ont lieu avant l'agrégation des protéines d' α -Syn entre elles pour former les CL ou les neurites de Lewy.

2.7 Synthèse

Les démences neurodégénératives répondent, comme nous venons de le voir, d'une nosologie complexe où concepts protéiques, anatomiques, histologiques mais aussi syndromiques[†] se confrontent. Il n'est donc pas aisé dans ces conditions de dresser une carte nosographique fiable permettant une classification nette. Il existe en effet autant de cadres nosologiques que de disciplines (cliniques, anatomiques, histologiques, protéiques). La synthèse présentée dans la figure 19 reprend les classifications protéiques et histologiques des démences vues au sein des chapitres I et II.

* Cf. Chapitre II – 1: Phénomène d'agregation – Tableau 4

† Cf. Chapitre I : les démences neurodégénératives.

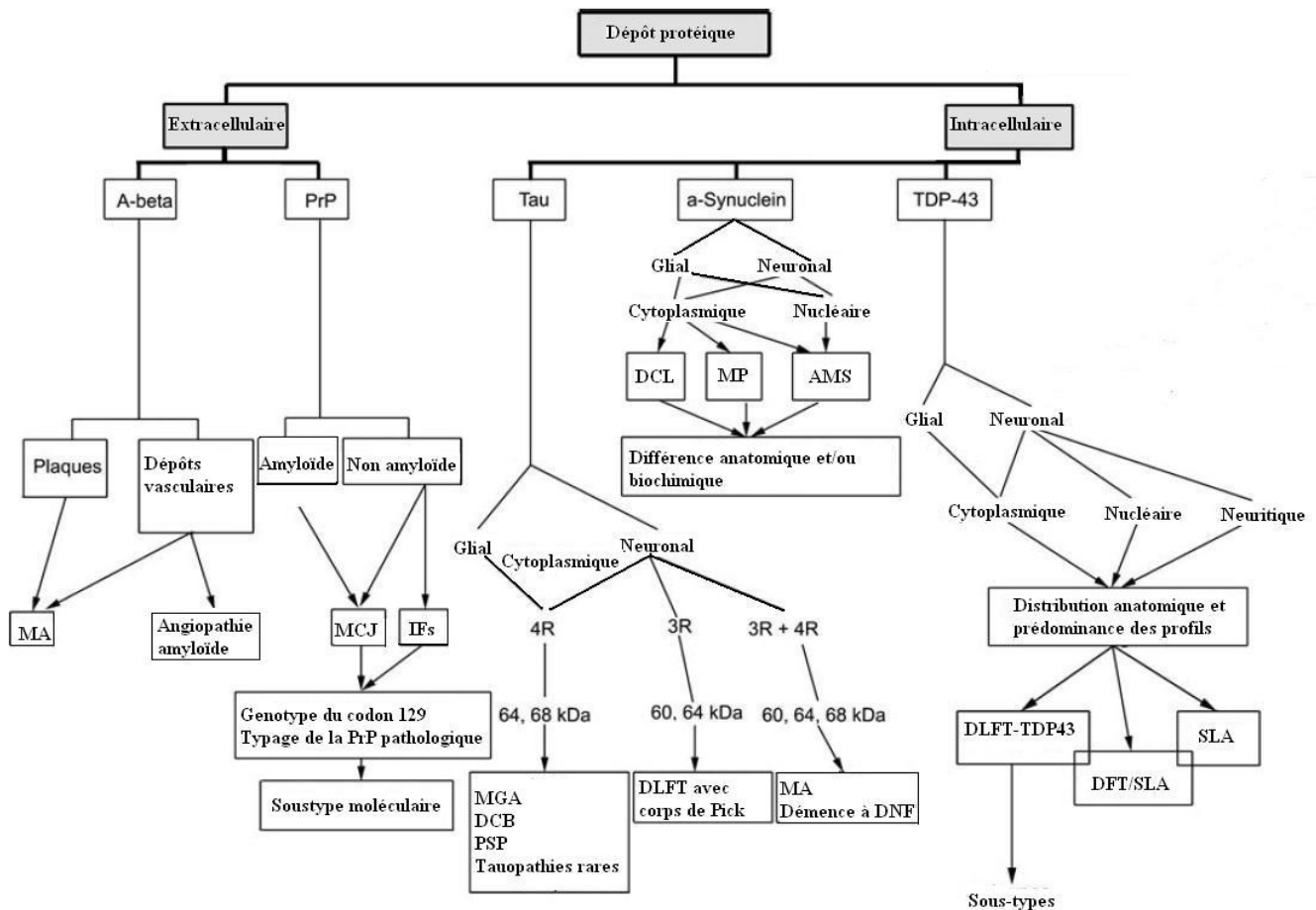


Figure 19. Classification histologique et protéique des démences neurodégénératives sporadiques. MA : maladie d’Alzheimer ; MCJ : maladie de Creutzfeldt-Jakob ; Ifs : insomnie fatale sporadique ; MGA : maladie des grains argyrophiles ; DCB : dégénérescence corticobasale ; PSP : paralysie supranucléaire progressive ; DLFT : dégénérescences lobaires frontotemporales ; DNF : dégénérescences neurofibrillaires ; DCL : démence à corps de Lewy ; MP : maladie de Parkinson ; AMS : atrophies multisystématisées ; SLA : sclérose latérale amyotrophique ; A-beta : amyloïde β ; PrP : protéine Prion (modifié d’après Kovacs et al., 2010¹⁷³).

3 PERSPECTIVES POUR UNE THÉRAPEUTIQUE ÉTIOLOGIQUE

L’agrégation protéique est l’élément physiopathologique central des maladies neurodégénératives. L’une des pistes thérapeutiques prometteuses et privilégiées depuis plusieurs années est la recherche de molécules pouvant inhiber voire stopper cette agrégation et donc la formation de dépôts délétères pour le cerveau. Un grand nombre de ces molécules permettant d’inhiber la fibrillation de l’A β en PS, la formation de DNF, des CL ou encore les lésions occasionnées par la PrP ont été décrite à ce jour.³³⁰⁻³³⁴ Il existe plusieurs stratégies thérapeutiques ayant pour cibles les différents intervenants (dont les protéines mères des

lésions elles mêmes) permettant la maturation de ces protéines en protéines pathologiques mal conformées et hautement agglomérantes. Ainsi, le control des enzymes intervenant dans les coupures protéolytiques de la protéine « APP » ou de la protéine tau ou encore de certains régulateurs responsables de modifications post-traductionnelles potentiellement délétères est une des nombreuses voies de recherche de cette thérapeutique émergente. De même l'immunothérapie, dont l'immunisation active au peptide A β ₄₂, apparaît comme une voie thérapeutique particulièrement intéressante.^{335, 336} Bien que les essais thérapeutiques concernant ce protocole d'immunisation aient induit des complications sérieuses telles que des méningo-encéphalites subaiguës,³³⁷ une récente étude autopsique conduite sur 8 patients atteints de MA ayant reçu le vaccin révèle que l'immunisation a permis une diminution de la quantité de PS intracérébrales ainsi que de la charge de protéines tau. Néanmoins, il n'a pas été observé de bénéfices sur la densité synaptique et des effets iatrogènes tels qu'une activation microgliale, une accélération de l'angiopathie amyloïde ainsi qu'une augmentation de la charge en oligomères solubles d'A β ont été rapportés.³³⁸ Malgré ces effets secondaires chez l'Homme, les essais thérapeutiques se sont prolongés en études cliniques de phases II pour le gantenerumab* et le bapineuzumab.³³⁹

Tous ces traitements potentiels seraient d'autant plus efficaces qu'ils doivent être initiés aux stades précoces de la maladie, avant que les atteintes cérébrales puissent envahir le cerveau. Cependant, à l'heure actuelle, un diagnostic clinique de démence et notamment de MA ne peut être fait qu'à un stade avancé de la maladie. Il apparaît donc urgent d'avoir de nouveaux outils diagnostiques à disposition, tels que les dosages biologiques du LCR, afin de rendre ce diagnostic le plus précoce possible. A ce titre, de nouveaux critères diagnostics de la MA révisés pour la recherche ont récemment été proposés, incluant les biomarqueurs du liquide céphalorachidien (LCR)[†] permettant d'étayer le diagnostic étiologique d'une démence³⁴⁰ en vue de thérapeutiques à visées étiopathogéniques qui pourraient être disponibles dans un avenir proche.

* Voir le site internet <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01224106> concernant cette étude de phase II chez l'Homme.

† Cf. **Chapitre III : Biologie des démences.**

CHAPITRE III : BIOLOGIE DES DÉMENCES

Comme nous venons de voir précédemment, le diagnostic *in vivo* d'une démence neurodégénérative est à l'heure actuelle étayée par un faisceau d'arguments cliniques, neuropsychologiques, neuroradiologiques et comme nous le développerons au sein de ce chapitre, biologiques. Même les critères diagnostiques de la MA sont en train d'être révisés afin d'inclure notamment les formes prodromales,* le diagnostic clinique actuel reste fondé sur des critères de consensus impliquant une perte d'autonomie, donnant le côté tardif à ce diagnostic. La recherche se concentre donc actuellement sur de nouveaux marqueurs objectifs, et notamment différentes molécules présentes au sein du LCR, susceptibles d'aider le diagnostic différentiel de même que le diagnostic précoce.

Du fait du rapport étroit entre le système nerveux central et le LCR, l'étude de différents composants de ce liquide biologique est une fenêtre permettant d'analyser *in vivo* certaines modifications neurochimiques induites par les maladies neurodégénératives.³⁴¹ Ainsi les recherches se sont particulièrement concentrées sur les composants du LCR et notamment ce que nous appelleront les marqueurs étiologiques des démences neurodégénératives dans ce fluide biologique. Ces marqueurs étiologiques semblent être le reflet de la physiopathologie entraînant les lésions cérébrales observées. Elles sont ainsi des protéines solubles dans le LCR constituants principales des lésions agrégées. Néanmoins et comme nous le verrons tout au long de ce chapitre, le LCR ne semble pas le seul liquide susceptible d'abriter des molécules pouvant avoir un rôle de marqueurs dans le diagnostic de ces démences. Bien que nous nous concentrerons particulièrement sur l'étude du LCR, le sang mais aussi les urines apparaissent intéressants pour rechercher des marqueurs permettant d'objectiver une pathologie neurodégénérative. En effet, bien que la pratique de la ponction lombaire ne présente pas un risque élevé de complications, les céphalées n'étant rapportées que chez 2% des patients,³⁴² ce geste reste relativement invasif et les recherches se concentrent sur des marqueurs périphériques permettant de se soustraire de la ponction lombaire lors de cette recherche diagnostique, cet acte étant vécu difficilement par les patients.

1 MARQUEURS ÉTIOLOGIQUES

Nous traiterons au sein de ce chapitre les marqueurs biologiques étiologiques d'une démence neurodégénérative, c'est-à-dire ceux directement liés aux lésions cérébrales observées

* Cf. Chapitre I – 1.2.3.4 : Evolution des critères diagnostiques de la maladie d'Alzheimer.

neuropathologiquement et que l'on peut particulièrement retrouver dans le LCR: les protéines tau responsables des DNF, le peptide A β à l'origine des PS, l' α -Syn retrouvée dans les CL responsables des synucléopathies et la PrP agent pathogène des EST. Nous traiterons des aides et avancées diagnostiques *via* ces biomarqueurs principalement dans le LCR mais aussi des perspectives dans d'autres fluides biologiques.

Les trois marqueurs du LCR sollicités lors d'un diagnostic de MA sont les protéines tau (totales et phosphorylées) ainsi que le peptide A β ₄₂. Les critères diagnostiques de la MA ont d'ailleurs été révisés dans le cadre de la recherche en 2007 et incluent ces trois marqueurs dans le LCR puisqu'ils apportent des arguments intéressants pour le diagnostic.³⁴⁰ De plus les changements biologiques observés dans le LCR sembleraient apparaître avant que les premières anomalies morphologiques ne soient objectivables à l'IRM.³⁴³ Comme nous le verrons plus loin, les concentrations intrathécales de ces marqueurs ont donc été étudiées et permettent aujourd'hui de constituer de forts arguments en faveur ou non d'une MA plus particulièrement. Puisque les changements observés de ces 3 biomarqueurs dans le LCR sont liés à l'histologie sous-jacente et spécifique de la MA, le dosage de leurs concentrations intrathécales améliorent considérablement la précision du diagnostic *in vivo* d'une démence.^{344, 345} Il convient tout de même de noter que les valeurs seuils de ces concentrations sont fonction des laboratoires effectuant ces examens biologiques.³⁴⁶ C'est la raison pour laquelle nous présenterons dans ce qui suit des échelles de valeurs seuils.

1.1 Protéines tau

1.1.1 Protéines tau totales

Une augmentation de la concentration intrathécale des protéines tau totales (T-tau) est observée chez les patients atteints de MA.³⁴⁷⁻³⁴⁹ Ainsi le dosage ELISA* (Innotest[®] hTau Ag, Innogenetics) de cette protéine dans le LCR révèle des concentrations comprises entre 150 et 450 pg/mL chez les sujets sains et entre 300 et 1100 pg/mL chez les patients atteints de MA.³⁵⁰⁻³⁵² La concentration de cette protéine dans le LCR serait corrélée avec la quantité de DNF intracérébrales.^{353, 354} Cependant cette augmentation de la protéine T-tau dans le LCR n'est pas spécifique de la MA puisqu'elle est aussi observée à des concentrations différentes

* Enzyme-linked immunosorbent assay : dosage immunoenzymatique sur support solide.

dans la MCJ^{355, 356} ou encore après un accident vasculaire cérébral.³⁵⁷ La protéine T-tau serait ainsi un marqueur non spécifique de la lyse neuronale. De plus, la concentration de cette protéine est augmentée dans le LCR de patients au stade MCI qui évolueront plus tard vers une démence de type Alzheimer.^{350, 358, 359}

La concentration dans le LCR des protéines T-tau dans les MCJ sporadiques est très supérieure à la concentration retrouvée dans les autres démences.^{355, 360} Le seuil permettant de donner un argument biologique positif en faveur d'un diagnostic de MCJ est de 1300 pg/mL et a été déterminé en 2002 lors d'une étude conduite sur un peu moins de 300 patients MCJ, dont 109 cas confirmés neuropathologiquement.³⁶⁰ Selon cette dernière étude, les concentrations intrathécales de T-tau comprises entre 300 et 800 pg/mL ne permettent pas de discriminer les différentes démences, cependant et même si le seuil de 1300 pg/mL n'est pas atteint, la concentration de T-tau dans le LCR est généralement supérieure à 800 pg/mL. En ce qui concerne les autres formes de MCJ, les concentrations en T-tau dans le LCR s'avèrent plus faibles que pour les formes sporadiques de la maladie.³⁶¹ Le seuil de 500 pg/mL en T-tau intrathécale pour le vMCJ permet d'obtenir une sensibilité de 86% dans la détection de cette forme. De manière tout à fait intéressante d'un point de vue diagnostique, une très récente étude a permis de mettre en évidence en WB un profil spécifique de la protéine tau dans le LCR de patients atteints de MCJ sporadique.³⁶² Cette nouvelle voie pourrait permettre d'affiner considérablement le diagnostic *in vivo* de la MCJ grâce à la combinaison des autres outils disponibles.

D'autres pathologies mettent en cause les protéines tau telles que certaines formes de DFT ou encore d'autres tauopathies comme la PSP et la DCB. De nombreuses études se sont intéressées aux T-tau dans le LCR de patients atteints par la DFT. Cependant les résultats semblent en accord avec la variabilité étiologique et lésionnelle des DFT retrouvée après l'examen anatomopathologique puisque certaines études ont permis de mettre en évidence une augmentation de la concentration de la T-tau dans le LCR de patients atteints par cette pathologie par rapport aux sujets indemnes de pathologies dégénératives alors que d'autres rapportent des concentrations intrathécales normales voire même diminuées.^{352, 363, 364} Il n'existe donc pas actuellement d'argument biologique, mettant en jeu la T-tau, en faveur d'une DFT de même que pour les PSP et les DCB.³⁶⁵

Les protéines T-tau sont constituées par le pattern complet de ces protéines dans le LCR avec toutes les modifications possiblement rencontrées (phosphorylations et coupures protéolytiques par exemple) au sein de ces dernières. Une très récente étude a permis de mettre en évidence des différences dans les coupures protéolytiques de la protéine tau chez les patients atteints d'une PSP comparativement aux patients atteints par une autre maladie neurodégénérative (DFT, DCB, MA, DCL et MP) ainsi que chez les sujets contrôles. La concentration d'une protéine tau tronquée de 33kDa serait en effet très diminuée dans le LCR des patients atteints par la PSP.³⁶⁶ Il paraît vraisemblable que d'autres coupures protéolytiques spécifiques de la protéine tau pourraient être mise en évidence dans le LCR et permettre un diagnostic plus fiable de la MA par exemple. Nous savons par ailleurs que ces coupures jouent un rôle prédominant dans la formation des DNF intracérébrales.* Nous pourrions imaginer, *via* la formation des DNF, une libération intrathécale des peptides néoformés et ainsi une identification de la maladie aux stades les plus précoces. Cependant et à notre connaissance, aucune étude n'a encore rapporté la présence de tels dérivés de la protéine tau dans le LCR.

1.1.2 Protéines tau phosphorylées

Dans la MA, les lésions étant constituées par des protéines tau anormalement phosphorylées, des outils immunologiques de type ELISA ont été récemment développés afin de pouvoir doser dans le LCR ces protéines tau phosphorylées en différents sites et pouvoir potentiellement étayer le diagnostic de MA. Les protéines tau phosphorylées (p-tau) ne sont pas de simples marqueurs de la mort cellulaire puisque leurs concentrations sont diminuées dans certaines pathologies neurodégénératives telle que certaines DFT notamment. De même, leurs concentrations dans le LCR sont diminuées dans les encéphalopathies vasculaires par rapport aux patients atteints de MA mais aussi chez les sujets sains ou atteints de DFT.³⁶⁷ En ce qui concerne la DCL, les résultats concernant la concentration des p-tau sont contradictoires, certaines études rapportant une élévation de leurs concentrations n'étant pas retrouvée par d'autres.^{368, 369} Une augmentation de la concentration intrathécale des p-tau dans le LCR est observée dans la MA de même qu'au stade prodromal de la maladie.³⁷⁰⁻³⁷³ De plus le déclin cognitif serait corrélé à l'augmentation intrathécale des p-tau qui signerait donc particulièrement un processus dégénératif.³⁷⁴⁻³⁷⁶ Le dosage des p-tau dans le LCR a ainsi

* Cf. Chapitre II – 2.1.2 : Physiopathologie de la protéine tau.

permis un gain de spécificité comparativement aux dosages des protéines tau totales et du peptide amyloïde.* Certains epitopes de phosphorylation seraient plus spécifiques de la MA. Ainsi la concentration de la protéine tau phosphorylée sur l'acide aminé 181 (p-tau₁₈₁) augmente de façon significative dans le LCR des patients atteints pas la MA par rapport aux sujets sans processus neurodégénératifs mais aussi par rapport aux patients atteints par d'autres démences neurodégénératives.^{368, 377} Ce site de phosphorylation est à l'heure actuelle recherché et dosé en routine dans le LCR au sein des laboratoires spécialisés en neurobiologie lors d'un diagnostic de MA. Le dosage ELISA de cette protéine phosphorylée (Innotest[®] phospho-tau_(181P), Innogenetics) révèle des valeurs comprises entre 30 et 50 pg/mL chez les sujets sains ou sans processus dégénératifs et entre 75 et 100 pg/mL chez les patients atteints de MA.²¹⁶ La p-tau₁₈₁ permet de discriminer les patients atteint d'une MA de ceux atteints d'une DFT avec une sensibilité de 85% et une spécificité de plus de 80%.³⁷⁸ Ces résultats sont tout à fait comparables pour discriminer une MA de l'ensemble des autres démences dégénératives.³⁶⁷ De plus, la distinction entre les patients atteints par la MA et ceux ayant une DCL est optimisée si l'on utilise la p-tau₁₈₁.^{369, 377}

La phosphorylation sur la thréonine 231 de la protéine tau (p-tau₂₃₁) s'effectue précocement au cours de la pathogenèse de la MA comme l'indique certaines études immunohistologiques.³⁷⁹ Il apparaît donc important d'évaluer son intérêt pour le diagnostic biologique de la MA. La p-tau₂₃₁ distingue les patients ayant une MA des sujets contrôles sans maladie neurodégénérative avec une sensibilité de presque 90% et une spécificité de 93% selon une récente méta-analyse.³⁸⁰ Son intérêt pour le diagnostic différentiel semble plus modeste puisque sa sensibilité dans la discrimination de la MA par rapport aux autres démences est de 90% avec une spécificité de moins de 67%. Cependant cette spécificité est supérieure à 90% dans la distinction d'une MA et d'une DFT avec une sensibilité de 85%.³⁶⁷ Cette epitope de phosphorylation semble être un reflet fiable de la neuropathologie puisque la concentration intrathécale de la p-tau₂₃₁ est corrélée à la quantité de DNF intracérébrale observée dans la MA.³⁸¹ La p-tau₂₃₁ paraît particulièrement intéressante aux stades précoces de la maladie puisque qu'elle permet de prédire le déclin cognitif chez les patients MCI et ainsi de présager d'une conversion du stade MCI vers la MA.³⁷⁴ Cette phosphorylation apparaît comme le marqueur le plus précis pour la conversion des patients MCI en MA avec une sensibilité et une spécificité de 80%.³⁸² Il est à noter que la concentration intrathécale de

* Cf. 1.2 : Peptide A β au sein de ce chapitre.

cette protéine diminue au cours de la progression de la MA et ceci de façon inversement proportionnelle à la sévérité de la démence.³⁸³ Ce marqueur paraît donc important non seulement du point de vue diagnostic aux stades précoces mais aussi pour présager de la progression de la maladie, cependant cette diminution de la concentration au cours du temps rend l'utilisation de ce marqueur moins aisé qu'un marqueur plus stable.

Une autre phosphorylation s'avère intéressante pour le diagnostic biologique de la MA avec la protéine tau phosphorylée en serine 199 (p-tau₁₉₉). La p-tau₁₉₉, qui semblerait elle aussi intervenir de façon précoce dans la genèse des DNF,³⁸⁴ discrimine les patients atteints d'une MA des patients atteints par une autre démence avec une sensibilité de 85% et une spécificité de près de 80%.³⁷⁰

Des hyperphosphorylations de la protéine tau sur certains acides aminés, tels que la thréonine 231 et la serine 235, ont aussi pu être observés dans le LCR de patients MCI qui évolueront par la suite vers une MA. Ainsi la concentration de la protéine tau phosphorylée sur les 2 acides aminés 231 et 235 serait prédictive de la conversion du stade MCI vers la MA.³⁸⁵ De la même manière, et grâce à une méthode immunoenzymatique très sensible, les phosphorylations de la protéine tau sur les deux sérines 396 et 404 ont pu être mise en évidence dans le LCR de patients atteints par la MA, la démence vasculaire, des patients sans processus dégénératifs ainsi que des contrôles sans atteintes neurologiques.³⁸⁶ Mais l'élévation de la concentration de ce marqueur a été trouvé uniquement chez les patients ayant une MA. Il s'agit donc ici d'un marqueur prometteur pour le diagnostic différentiel, il reste néanmoins à confirmer ces résultats avec des patients atteints par d'autres démences neurodégénératives.

Il n'y a, à notre connaissance, pas de données concernant la protéine tau et ses dérivés dans le sang pour le diagnostic des démences. Une étude a néanmoins rapporté des résultats concernant la concentration de la T-tau dans le sérum de patients ayant subi un accident vasculaire cérébral.³⁸⁷ La concentration en T-tau périphérique serait transitoirement augmentée chez de tels patients.

1.2 Peptide A β

Chez les patients atteints de MA, on observe une diminution de la concentration intrathécale d'A β ₄₂ également observée dans d'autres démences comme la DCL ou encore la MCJ, pathologies dans lesquelles sont parfois observées des PS.^{347, 388, 389} Ces résultats semblent en accord avec le recouvrement lésionnel observé dans ces pathologies.* Tout comme pour les protéines tau, les concentrations d'A β ₄₂ dans le LCR sont déterminées grâce à un test ELISA (Innotest[®] β -Amyloid₍₁₋₄₂₎, Innogenetics). Les concentrations intrathécales d'A β ₄₂ sont comprises entre 600 et 1230 pg/mL chez les sujets sans processus neurodégénératifs et entre 260 et 500 pg/mL chez les patients atteints de MA.^{350, 351, 364} Ainsi le dosage de l'A β ₄₂ dans le LCR permettrait de discriminer les patients atteints par une MA des sujets ne souffrant pas de maladie neurodégénérative avec une sensibilité de 86% et une spécificité de près de 90%.³⁹⁰

Une corrélation entre la diminution de la concentration intrathécale d'A β ₄₂ et le nombre de PS au sein du cortex cérébral a été rapportée lors d'une étude autopsique.³⁹¹ De même, une étude combinant la TEP[†] et la biologie du LCR a aussi permis de montrer *in vivo* une diminution intrathécale de la concentration en A β ₄₂ inversement proportionnelle à la quantité de dépôts amyloïdes intracérébraux.³⁹² Ces dernières études suggèrent ainsi que la diminution de cette concentration en A β ₄₂ dans le LCR reflète la séquestration cérébrale du peptide dans les PS. Elle est aussi détectée au stade MCI de la maladie 2 à 3 ans avant l'installation de la démence.^{345, 393} Néanmoins, la diminution de la concentration d'A β ₄₂ dans le LCR n'indique pas le stade évolutif de la démence.³⁹⁴ Il est intéressant de noter que la concentration de l'A β ₄₂ dans le LCR est influencée par le génotype ApoE.[‡] La présence d'un allèle ϵ 4 du gène de l'ApoE est associée à une concentration intrathécale en A β ₄₂ plus basse que pour les autres allèles et ceci d'autant plus en cas d'homozygotie ϵ 4/ ϵ 4 du gène de l'ApoE.³⁹⁵

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les formes oligomériques d'A β joueraient un rôle toxique crucial dans la perte synaptique observé dans la MA.[§] Des techniques extrêmement sensibles (comme la spectroscopie de corrélation de fluorescence) ont permis de détecter la présence de ces oligomères dans le LCR de malades ayant une MA.³⁹⁶ De même,

* Cf. Chapitre I – 1.2.3.3 : Maladie d'Alzheimer et démences mixtes.

† Cf. Chapitre I - 1.2.2 : Imagerie.

‡ Cf. Chapitre I – 1.3 : Facteurs de risques et maladie d'Alzheimer.

§ Cf. Chapitre II – 2.2.2 : Physiopathologie du peptide A β .

une très récente étude a montré que les oligomères d'A β étaient significativement augmentés chez les patients atteints par une MA ainsi que chez les patients au stade prodromal comparativement aux patients indemnes de maladies neurodégénératives mais présentant d'autres troubles neurologiques (tels qu'une épilepsie ou des neuropathies périphériques).³⁹⁷ De plus cette étude a rapporté une corrélation inverse avec les capacités cognitives des patients, les oligomères d'A β reflétant l'altération cognitive dans la MA. En effet, les scores obtenus avec le MMS* sont plus bas chez les patients avec une concentration oligomérique plus importante dans le LCR. Néanmoins, et alors que la détection de ces formes pathologiques agrégées promet un véritable intérêt diagnostique, la détection de ces oligomères dans le LCR n'est pas aisée et leurs faibles quantités dans ce fluide ne permet pas encore d'envisager cette méthode pour le diagnostic biologique de routine.

Les peptides A β les plus abondants dans ce liquide sont, par ordre de concentrations décroissantes, l'A β_{40} , A β_{38} et l'A β_{42} ³⁹⁸ (figure 20). Le dosage du peptide A β majoritaire dans le LCR (A β_{40}) est très informatif puisqu'il permet de refléter la charge totale en peptide A β produite et libérée dans ce fluide biologique.³⁹⁹ Ainsi, de par le métabolisme de la protéine « APP » et la voie amyloïdogène,[†] les forts producteurs d'A β ont des concentrations intrathécales en A β_{42} plus importantes que les faibles producteurs, posant un problème lors du diagnostic de la MA puisque certains forts producteurs atteints par une MA peuvent se trouver au dessus du seuil pathologique (et inversement pour les faibles producteurs). L'utilisation du ratio A β_{42} /A β_{40} permet de corriger cette variation biologique interindividuelle et d'éviter les erreurs d'interprétations pour la concentration de l'A β_{42} dans le LCR.³⁹⁹

* Cf. Chapitre I – 1.2.1 : Evaluation clinique et neuropsychologique.

† Cf. Chapitre II – 2.2.1 : Le peptide A β .

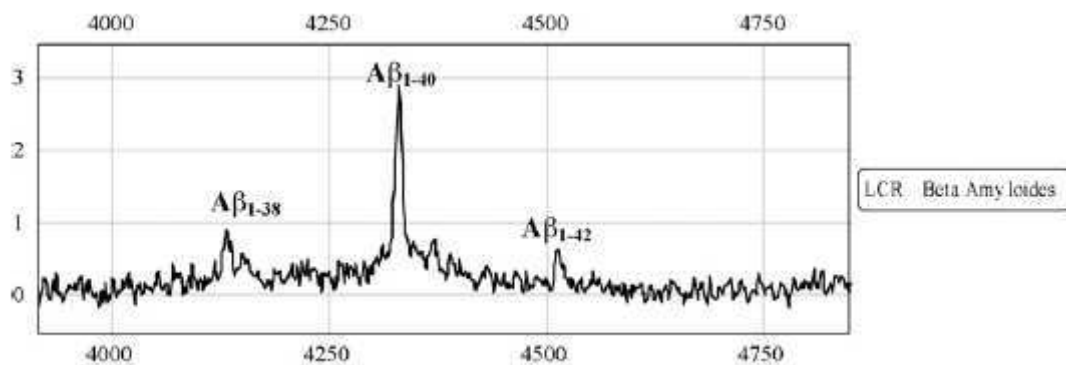


Figure 20. Formes majoritaires d'Aβ retrouvées dans le LCR. Spectre de masse réalisé *via* la technologie SELDI-TOF. L'axe des abscisses est relatif au poids moléculaire exprimé en daltons et l'intensité du signal, représenté par l'axe des ordonnées, est exprimée en unité normalisée (données personnelles obtenus au laboratoire de Neurobiologie du Groupement Hospitalier Est de Lyon ; Krolak-Salmon et al., 2008⁴⁰⁰).

Outre les formes de 40, 42 et 38 acides aminés,^{*} il existe d'autres formes d'Aβ dans le LCR. Ces formes sont produites en parallèle suivant une co-régulation physiologique orchestré par les γ -secretases.⁴⁰¹ De nombreuses formes tronquées de l'Aβ ont été identifiées grâce à des techniques de séparation électrophorétiques en conditions dénaturantes (WB) mais aussi grâce à de nouvelles technologies telles que la spectrométrie de masse (SELDI-TOF[†] notamment), que se soit au niveau cérébral ou dans le LCR de patients atteints par une MA mais aussi chez des patients MCI.^{279, 280, 402} C'est pourquoi une partie de la recherche se concentre sur la mise en évidence de nouvelles formes plus spécifiques du peptide Aβ qui pourrait permettre d'améliorer le pouvoir prédictif et discriminatif du diagnostic biologique.⁴⁰³ Des formes d'Aβ tronquées telles Aβ₁₃, Aβ₁₄, ou encore Aβ₁₆ ont été décrites dans le LCR des patients atteints par la MA.⁴⁰⁴ De façon surprenante, la concentration de l'Aβ₁₆ est d'ailleurs retrouvée augmenté dans le LCR des patients atteints par la MA. Ces fragments peptidiques apparaissent très intéressants pour le diagnostic différentiel des démences neurodégénératives puisqu'il semblerait exister un profil spécifique des peptides Aβ dans le LCR entre la MA, la DCL et la DFT par exemple. Ces patterns différents refléteraient des processus

* Cf. **Chapitre II – 2.2 : Amyloïdopathies.**

[†] « *Surface Enhanced Laser Desorption and Ionization - Time of Flight* »: technologie combinant la chromatographie d'affinité et la spectrométrie de masses grâce à l'ionisation par désorption de surface induite au laser couplé à un temps de vol. Cette technologie permet d'analyser des traces de composés de l'ordre du femtomolaire à partir de sources complexes tels que les fluides biologiques (LCR, sang, urine, salive). De plus cette technologie permet d'identifier des modifications post-traductionnelles ou des isoformes particulières pouvant constituer des biomarqueurs potentiels.

physiopathologiques distincts, faisant intervenir le peptide A β , à l'origine de ces pathologies.⁴⁰³

Un peptide A β_{40} oxydé a été mis en évidence en WB dans le LCR des patients atteints par la MA, la DCL, la MP mais aussi chez les patients contrôles sans processus neurodégénératif.⁴⁰⁵ La quantité de ce peptide est significativement augmentée chez les patients atteints par une DCL par rapport aux autres patients de l'étude, signifiant un rôle diagnostic intéressant avec cette modification post-traductionnelle pour la discrimination des patients ayant une DCL. De plus l'utilisation d'un ratio A β_{42} /A β_{37} distingue les sujets contrôles de cette étude des patients avec une MA, une DCL ou une MP. Les patients atteints par la MA sont de même distingués des patients atteints par une synucléopathie grâce à l'utilisation de ce ratio.

Une étude a récemment rapporté une augmentation de la concentration d'A β_{40} dans les plaquettes de patients atteints par la MA, de même qu'une augmentation de l'activité enzymatique de l' α -secretase.^{*406} Cette observation va dans le sens d'un dérèglement de la balance enzymatique des sécrétases dans la formation des dépôts amyloïdes dans la MA. Une évaluation de la concentration plasmatique d'A β_{40} associée à une faible concentration plasmatique d'A β_{42} multiplierait le risque de contracter une MA par 10.⁴⁰⁷ Selon une étude de suivis, la diminution de la concentration plasmatique d'A β_{42} semblerait associée au déclin cognitif des patients atteint par une MA.⁴⁰⁸ Enfin, une association entre la concentration plasmatique d'A β_{40} et des lésions de la substance blanche objectivées par l'IRM encéphalique, en particulier certains aspects évocateurs d'angiopathies amyloïde, a été retrouvé chez des sujets MCI ou atteints par une MA.⁴⁰⁹ Cette observation tendrait à montrer un rôle important de l'A β périphérique dans l'établissement des lésions vasculaires d'angiopathie amyloïde. Des formes tronquées d'A β pouvant jouer un rôle diagnostic ont également été mises en évidence dans le plasma de sujets sains et de patients atteints par la MA.⁴¹⁰

* Cf. Chapitre II – 2.2.1 : Le peptide A β .

Tableau 5. Récapitulatif des variations de concentrations dans le LCR des marqueurs étiologiques dans les principales démences. MA : maladie d'Alzheimer ; DCL : démence à corps de Lewy ; DFT : démence frontotemporale ; MCJ : maladie de Creutzfeldt-Jakob ; N : valeurs normales.

	T-tau	p-tau ₁₈₁	A β ₄₂
MA	↑	↑	↓
DCL	N parfois ↑	N	N parfois ↓
DFT	N parfois ↓ ou ↑	N parfois ↑	N parfois ↓
MCJ	↑↑	N parfois ↑	↓

1.3 α -Synucléine

L' α -Syn représente environ 1% des protéines cérébrales totales et moins de 0.001% des protéines retrouvées dans le LCR.⁴¹¹ Néanmoins cette protéine reste détectable puisque sa présence dans le LCR, ainsi que dans le sang, a été démontrée chez les sujets sains.^{412, 413} Toutefois les études explorant l' α -Syn dans le LCR sont rares et suggèrent que la libération de l' α -Syn hors de la cellule et sa circulation dans le LCR, puis dans les liquides périphériques, est physiologique.

Une diminution de la concentration intrathécale de l' α -Syn monomérique a été retrouvée chez les patients atteints par la MP ainsi que la DCL par rapport aux autres démences comprenant la MA, la DFT, la PSP, la démence vasculaire mais aussi l'hydrocéphalie à pression normale ou encore des démences non étiquetées.^{414, 415} De façon intéressante, la concentration en oligomère d' α -Syn semble être accrue dans le LCR et le sang des patients atteints par la MP,⁴¹⁶ pouvant expliquer la diminution de la concentration intrathécale de l' α -Syn monomérique observée chez ces malades. A ce titre, il a été montré que les LCR de patients atteints par la MA et la DLC étaient un environnement biologique favorisant l'oligomérisation de l' α -Syn *in vitro*.⁴¹⁷

Bien que ces résultats semblent démontrer une tendance à la diminution de la concentration de l' α -Syn intrathécale chez les patients atteints par une synucléopathie, ils restent encore contradictoires puisque des élévations, des concentrations normales de même que des diminutions de la charge en α -Syn ont été rapportés chez les patients atteints par une DCL.⁴¹⁸⁻

⁴²⁰ Cependant et alors que la détection de l' α -Syn dans le LCR ne permette pas toujours de différencier la DCL de la MA ou d'autres démences (DFT et démences vasculaires) selon certaines études,⁴¹⁹ la concentration intrathécale de l' α -Syn semble corrélée à la progression de la maladie dans la DCL, ce qui n'est pas retrouvé chez les patients atteints par une MA.⁴²¹ Mais de façon opposée, une étude tout aussi récente parue un mois plus tard la même année (2009) a rapporté une corrélation entre la durée de la maladie et la concentration d' α -Syn dans le LCR de patients ayant la MA.⁴²² Ces patients auraient d'ailleurs une charge intrathécale en cette protéine significativement moins élevée que les sujets sans atteintes neurologiques. De plus, il apparaît important de noter qu'il n'a pas été observé dans cette dernière étude de diminution de la concentration d' α -Syn dans le LCR des patients atteints par une synucléopathie (MP et DCL) contrairement à d'autres précédemment citées. Quoiqu'il en soit, et de par la localisation synaptique de l' α -Syn,^{*} ces résultats sembleraient être le reflet de la perte synaptique qui se produit lors d'une MA.

Tous ces résultats contradictoires concernant l' α -Syn dans le LCR de patients atteints par différentes pathologies pourraient prendre leurs sources dans la variabilité des méthodes de détections utilisées. En effet, les études citées plus haut, rapportant ces résultats conflictuels, n'utilisent pas les mêmes outils ni les mêmes façons de procéder pour la détection de l' α -Syn, qu'il s'agisse des temps d'incubation des LCR (pouvant potentiellement agréger les protéines d'intérêts) ou encore des méthodes permettant de concentrer les échantillons afin d'augmenter l'intensité du signal.⁴²² Suivant ces différents modes opératoires, les résultats ne peuvent plus être comparables du fait de possibles modifications (telles que l'agrégation pouvant diminuer la quantité de monomères détectables par exemple) des protéines d'intérêts.

1.4 Protéine Prion

1.4.1 Protéine Prion et diagnostic de certitude

Afin de comprendre les enjeux biologiques pour une aide diagnostic de la PrP, il convient de s'intéresser aux propriétés et différences de la PrP pathologique par rapport à la protéine native, propriétés notamment recherchées au cours du diagnostic *post-mortem* de la MCJ comme nous le verrons un peu plus loin. La PrP pathologique présente des caractéristiques

* Cf. Chapitre II – 2.3.1 : α -synucléine.

physicochimiques différentes de la PrP normalement retrouvée chez les sujets sains, bien que leurs structures primaires soient identiques. La PrP pathologique présente notamment une insolubilité en milieu détergeant ainsi qu'une résistance partielle à l'action d'une enzyme, la Protéinase K (PK).⁴²³ Ces propriétés semblent directement liées aux modifications des structures secondaires et tertiaires de la protéine.* Elles permettent ainsi d'aider à la mise en évidence de la PrP pathologique dans le tissu cérébral *via* des méthodes immuno-biochimiques au cours du diagnostic de certitude de la MCJ. Ce diagnostic biologique *post-mortem* est fondé sur la différenciation des formes pathologique et native de la PrP. Les différences de sensibilités vis-à-vis de la PK[†] et l'insolubilité de la PrP pathologique en milieu détergeant[‡] sont couramment exploitées dans ce but. Des techniques ELISA ou encore WB permettent alors de détecter les formes pathologiques cérébrales.^{163, 424} La mise en évidence par WB permet de distinguer les souches de PrP pathologiques selon leurs profils moléculaires.[§] Ces données spécifiques de typage, combinées au polymorphisme du codon 129** ainsi qu'à la neuropathologie, permettent d'élaborer des classifications afin de mieux comprendre la diversité phénotypique des MCJ.

1.4.2 La PrP dans les tissus périphériques : une aide au diagnostic *ante-mortem*

Bien que les EST soient des maladies affectant le système nerveux central, l'agent infectieux a été montré dans de nombreux autres tissus. Afin d'aider au diagnostic du vivant du patient, la PrP a été recherché dans certains tissus candidats aux biopsies. Ainsi la présence de PrP pathologique a pu être mise en évidence chez des patients atteints de vMCJ dans les tissus lymphoïdes tels que la rate, les amygdales et les ganglions lymphoïdes, l'appendice mais aussi les yeux, le système nerveux périphérique et le rectum.⁴²⁵⁻⁴²⁸ De même, chez les cas sporadiques de MCJ, des études récentes rapportent la présence de cette protéine pathologique dans la rate, les muscles squelettiques, l'épithélium olfactif ou encore les nerfs périphériques.⁴²⁹⁻⁴³¹

* Cf. **Chapitre II – 2.4.2 : Physiopathologie de la protéine Prion.**

† La forme native est entièrement dégradée par la PK, contrairement à la forme pathologique dont il reste un fragment résistant.

‡ La forme native restant soluble, elle ne précipite pas lors d'une ultracentrifugation, contrairement à la forme pathologique que l'on peut de fait récupérer de cette manière.

§ Le fragment résistant à la PK de la PrP pathologique se présente sous la forme de 3 bandes en WB : non glycosylée, monoglycosylée et biglycosylée dont les ratios respectifs semblent spécifiques de chaque souches.

** Cf. **Chapitre II – 2.4 : Maladies à Prion.**

1.4.3 La PrP dans le liquide céphalorachidien

Bien que la présence de la PrP dans le LCR ait déjà été montrée *in vivo*, il existe très peu d'études concernant la protéine pathologique dans ce fluide biologique.⁴³² Des agrégats pathologiques de PrP ont été détectés chez environ 20% des patients atteints de MCJ sporadique et aucuns des témoins.⁴³³ Cependant ces résultats restent encore contestés puisqu'une autre étude n'a pas permis de mettre en évidence cette différence entre les 2 populations sur des profils WB, les protéines présentes dans les 2 types de populations semblant non seulement présentes en très faible quantité mais aussi très sensibles à la PK.⁴³⁴ Certaines équipes s'intéressent alors à l'augmentation de la sensibilité de cette détection de la PrP pathologique via des techniques d'amplifications de celle-ci. La PrP pathologique a ainsi pu être récemment détectée dans le LCR de moutons atteints de scrapie,^{*} laissant présager, de part les caractéristiques communes de cette pathologie animale avec la vMCJ humaine, un diagnostic biologique *in vivo* de la vMCJ.⁴³⁵

Par ailleurs, la concentration de la PrP dans le LCR a été étudié dans d'autres maladies neurologiques telles que différentes maladies neurodégénératives (MA, DCL, MP) mais aussi la sclérose multiple, l'ischémie cérébrale, les crises épileptiques généralisées ou encore les méningo-encéphalites. Une étude récente a pu mettre en évidence une diminution significative de la concentration intrathécale de la PrP dans le LCR de patients atteints de maladies neurodégénératives (MCJ, MA, DCL, MP) par rapport aux patients atteints d'autres affections neurologiques ainsi que les sujets contrôles.⁴³⁶ De plus, cette diminution semblerait corrélée avec la sévérité de la maladie chez les patients atteints de MCJ, MA mais aussi DCL. La PrP ne semble pas exclusivement intéresser les affections neurologiques primaires puisqu'une équipe américaine a mis en évidence une augmentation de la protéine dans le LCR de patients atteints par le VIH[†] de type 1 présentant des atteintes neurocognitives de même que chez les macaques atteints par le VIS[‡] et présentant des encéphalites.⁴³⁷

* Cf. Chapitre I – 6 : Maladies à Prion : encéphalopathies spongiformes transmissibles.

† Virus de l'Immunodéficience Humaine.

‡ Virus de l'Immunodéficience Simienne.

1.4.4 La PrP dans les fluides biologiques périphériques

En 2004, une équipe Britannique révèle un premier cas de vMCJ possiblement lié à une transfusion d'un concentré globulaire non déleukocyté* d'un donneur en phase préclinique de vMCJ.⁴³⁸ La survenue de 3 autres cas quelques temps après conforte l'hypothèse d'une contamination transfusionnelle de la vMCJ.⁴³⁹ À ce jour, une estimation de 66 patients ayant reçus des produits dérivés du sang de 18 donneurs ayant développé plus tard un vMCJ a été faite au Royaume Uni. Si le caractère infectieux du sang dans la vMCJ est maintenant avéré, cette question reste encore en suspend pour les autres formes de MCJ.⁴⁴⁰ Quoiqu'il en soit, ce contexte a permis l'émergence, quelques années plus tard, de techniques permettant une détection de la PrP pathologique dans le sang chez les patients atteints de vMCJ.⁴⁴¹ Néanmoins, il n'existe encore pas à l'heure actuelle de diagnostic sanguin permettant de détecter cette protéine chez les patients atteints d'autres formes de MCJ.

La présence de PrP pathologique dans l'urine a été rapportée pour la première fois en 2001 chez des patients atteints de formes génétiques de la MCJ.⁴⁴² Néanmoins cette détection rapportée comme spécifique a été par la suite contestée par d'autres études ne retrouvant pas, jusqu'à très récemment, ces résultats.^{443, 444} Un signal spécifique en WB a été détecté dans les urines de patients atteints par la MCJ, cependant ce signal était extrêmement tardif et ne permettait pas un diagnostic de la maladie (données non publiées, Laboratoire de Neurobiologie du Groupement Hospitalier Est de Lyon). Il semblerait que le fragment résistant à la PK soit aussi retrouvé dans l'urine de patients atteints par d'autres maladies neurodégénératives et soit constitué de PrP urinaire complexée à des immunoglobulines. De nombreux modèles animaux ont tout de même permis d'obtenir de bons résultats concernant la détection de la PrP pathologique dans les urines, notamment chez les hamsters, où cette protéine infectieuse a pu être mise en évidence dans 80% des urines d'animaux contaminés par une souche de scrapie.⁴⁴⁵ Enfin il faut noter que la salive par voie orale s'est avérée être infectieuse chez les cervidés.⁴⁴⁶

* La fraction du sang la plus infectieuse correspondrait aux leucocytes.

1.5 Combinaisons de marqueurs

L'utilisation de combinaisons de marqueurs du LCR (les trois principaux biomarqueurs étiologiques : $A\beta_{42}$, T-tau et p-tau₁₈₁) permet de augmenter la performance du diagnostic biologique des démences, que se soit en terme de diagnostic différentiel ou en terme de précocité.^{347, 363, 364} Ces protéines dans le LCR sont aussi des marqueurs pronostics puisqu'une très récente étude prospective conduite sur 5 ans et incluant près de 150 patients atteints par la MA a révélé que des concentrations intrathécales extrêmes de ces biomarqueurs (T-tau et p-tau₁₈₁ très élevées et $A\beta_{42}$ très basses) étaient associées à une maladie plus sévère et plus agressive conduisant à un décès plus rapide.⁴⁴⁷ De plus, ces patients aux fortes modifications dans la concentration de ces biomarqueurs répondent beaucoup moins bien aux traitements médicamenteux que les autres avec les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase.

L'un des enjeux les plus prégnants dans l'utilisation des 3 marqueurs principaux du LCR pour le diagnostic de la MA réside dans les formes à présentation focale de la maladie.* Ces présentations cliniques atypiques de la MA suscitent d'autant plus les biomarqueurs du LCR qu'elles retardent parfois l'instauration d'un traitement spécifique, puisque le syndrome observé ne permet pas toujours d'évoquer une MA lors des premiers stades de la maladie. Ainsi les combinaisons de marqueurs (comprenant aussi les ratios) améliorent le diagnostic étiologique de ces formes focales.

La combinaison de la protéine T-tau et du peptide $A\beta_{42}$ permet de distinguer les patients atteints d'une MA des patients ayant une DFT avec une sensibilité et une spécificité de 85%.³⁶⁴ L'utilisation de cette combinaison permet d'obtenir une sensibilité de 95% et une spécificité de 83% pour la détection des patients MCI avec une MA sous-jacente.³⁵⁹ Le risque pour un patient MCI de développer une MA est environ multiplié par 18 dans cette dernière étude lorsque ses concentrations en protéines T-tau et $A\beta_{42}$ dans le LCR atteignent les valeurs seuil. La combinaison des 3 marqueurs (T-tau, p-tau₁₈₁ et $A\beta_{42}$) permet de prédire une MA sous-jacente avec une sensibilité supérieure à 90% et une spécificité de plus de 85% dans une population de patients MCI.³⁴⁵ Le pouvoir prédictif de la p-tau₁₈₁ est d'ailleurs supérieur à la T-tau pour prédire la conversion en MA dans patients MCI. Ces 3 marqueurs du LCR apparaissent comme étant un bon outil permettant d'objectiver un processus dégénératif de

* Cf. **Chapitre I – 2 : Les atrophies focales.**

type MA chez des patients présentant des syndromes tels que le syndrome de Benson dont la forte prévalence de l'étiologie MA est connue grâce à des études avec vérifications neuropathologiques.* Ainsi, une étude comprenant 9 patients présentant une ACP révèle des concentrations en ces 3 biomarqueurs du LCR similaires à celles observées dans la MA.⁴⁴⁸ De la même façon, nous avons réalisé une étude prospective regroupant un plus grand nombre de patients présentant une ACP (22 patients) et pour lesquels ont été dosés ces 3 biomarqueurs du LCR. Nous avons montré sur cette cohorte que plus de 90% des patients de l'étude avec un syndrome de Benson avaient des concentrations intrathécales suggérant une MA sous-jacente.⁴⁴⁹

Le ratio des protéines T-tau/A β ₄₂ augmente la spécificité du diagnostic de MA par rapport à une population indemne de maladie neurodégénératives.^{450, 451} Ce ratio permet également d'augmenter la spécificité du diagnostic de MA par rapport aux autres démences neurodégénératives.⁴⁵¹ De plus, la spécificité de ce ratio pour discriminer une MA d'une démence vasculaire est supérieure à 80%, cependant ce ratio serait moins performant dans la discrimination d'une MA et d'une DCL.⁴⁵⁰ Ces résultats sont certainement en rapport avec la coexistence fréquente des lésions caractéristiques de la MA et des CL. En ce qui concerne les DFT, ce ratio permet de différencier cette pathologie de la MA avec une bonne sensibilité d'environ 80% et une excellente spécificité de 97%.⁴⁵² Enfin, le ratio T-tau/A β ₄₂ pourrait être précocement informatif puisqu'il semble prédictif d'une altération cognitive chez les sujets asymptomatiques, le risque de développer une démence à 8 ans étant multiplié par 5 chez les sujets avec un tel ratio élevé.⁴⁵³

De la même manière, le ratio p-tau₁₈₁/A β ₄₂ apparaît comme étant un élément biologique important pour le diagnostic différentiel de la MA. Il permet notamment de très bien distinguer les patients ayant une MA de ceux atteints par une DFT avec une sensibilité et une spécificité de plus de 90%.⁴⁵⁴ De plus, il est aussi capable de discriminer les patients atteints par une démence sémantique de ceux ayant une MA avec une excellente sensibilité de plus de 98% et une sensibilité de 84%. Ce ratio permet donc de bien présager de la pathologie sous-jacente entre une MA et une DFT ou une démence sémantique.⁴⁵⁴ Cependant il apparaît relativement faible dans la distinction d'une MA et d'une ACP ou encore d'une aphasie logopénique. Ce manque de précision pourrait être due à l'hétérogénéité neuropathologique

* Cf. Chapitre I – 2.2 : Les atrophies corticales postérieures ou syndrome de Benson.

de ces syndromes et particulièrement de l'étiologie principalement MA de ces deux derniers.* Ainsi ce ratio permet surtout de détecter biologiquement dans le LCR un processus physiopathologique compatible avec une MA chez de tels patients et laisserait présager de la neuropathologie.

Comme nous l'avons mentionné plus haut en traitant l'intérêt diagnostique du peptide A β dans le LCR,† des ratios spécifiques aux formes tronquées du peptide A β s'avèrent particulièrement intéressant pour distinguer des démences neurodégénératives entre elles. Mais l'utilisation de certains ratios couplés aux dosages des T-tau dans le LCR augmente considérablement la précision de cette aide diagnostic. Ainsi les ratios A β_{42} /A β_{38} et A β_{42} /A β_{37} combinés à la concentration de la T-tau dans le LCR allient une excellente de sensibilité de 100% à une très bonne spécificité de 92% pour différencier les patients atteints par la MA de ceux ayant une DCL.⁴⁵⁵

Puisque la concentration intrathécale en T-tau dans la MCJ est en moyenne plus élevée que dans les autres démences (et notamment la MA) et que la concentration en p-tau₁₈₁ est significativement plus basse dans cette pathologie comparativement aux autres démences, l'utilisation du rapport de la p-tau₁₈₁ sur la T-tau s'avère intéressant dans la distinction des MCJ par rapport aux autres démences.⁴⁵⁶ Ce rapport est inférieur à 0.05 dans la MCJ alors qu'il est supérieur à 1.25 dans la MA ainsi que chez les patients aux stades prodromaux. De même, l'efficacité de ce ratio dans la distinction de la MCJ par rapport aux autres démences est tout à fait comparable lorsqu'il est effectué avec la p-tau₂₃₁ (à la place de la p-tau₁₈₁).⁴⁵⁷ Il convient d'ajouter que les concentrations en p-tau₁₈₁ dans le LCR sont plus élevées dans les vMCJ que dans les formes sporadiques, et ceci inversement aux concentrations moyennes en T-tau dans le LCR plus élevées dans les formes sporadiques de la MCJ par rapport au variant.⁴⁵⁸ Ce rapport permet de différencier au sein des MCJ les patients atteints de la forme sporadique de ceux atteints par le variant avec un ratio plus élevé. Néanmoins, les recouvrements biologiques, notamment entre les MCJ non sporadiques et la MA, ne permettent pas toujours à ces combinaisons de présenter un intérêt dans le diagnostic différentiel.

* Cf. **Chapitre I – 2 : Les atrophies focales.**

† Cf. **1.2 : Peptide A β** au sein de ce chapitre.

D'autres combinaisons de marqueurs ont permis d'augmenter la qualité du diagnostic biologique, en utilisant notamment différentes p-tau. Ainsi, la combinaison des protéines p-tau₁₈₁ et p-tau₂₃₁ permettrait de diagnostiquer 94% des patients atteints de MA avec une spécificité de 66% par rapport aux autres démences neurodégénératives.³⁶⁷ De manière plus intéressante, le ratio de la protéine tau phosphorylée sur les acides aminés 396 et 404 (site de reconnaissance de l'anticorps PHF-1) et de la protéine T-tau permet de discriminer la MA des autres démences avec une sensibilité et une spécificité respectives de 96 et 86%.³⁸⁶ Ce ratio permettrait de distinguer avec une excellente spécificité (100%) les patients atteints par la MA de ceux atteints par une démence vasculaire.

La combinaison de l'imagerie et de la biologie pourrait permettre d'augmenter la sensibilité et la spécificité du diagnostic précoce de la MA par rapport aux autres démences.^{459, 460} Une relation inversement proportionnelle entre la concentration de la p-tau₂₃₁ dans le LCR et le volume de l'hippocampe a ainsi été démontrée dans la MA, faisant de la p-tau₂₃₁ un indicateur de la progression anatomique de la maladie.⁴⁶¹ Il existe également une forte corrélation entre la progression de l'atrophie hippocampique et l'augmentation de la concentration de la p-tau₂₃₁ ainsi que la diminution de l'A β ₄₂ dans le LCR des sujets présentant un MCI. De façon similaire, une étude longitudinale a observé une corrélation positive entre la concentration intrathécale en protéines T-tau, p-tau et la progression l'élargissement ventriculaire dans la MA.⁴⁶² Une étude récente a permis de mettre en évidence dans les DLFT une augmentation de la concentration intrathécale en protéines T-tau plus importante chez les patients présentant une atrophie temporale prédominante par rapport aux patients atteints de la variante frontale de la maladie.⁴⁶³

De même des combinaisons ont été étudiées entre la biologie du LCR et les nouvelles techniques d'imageries métaboliques.* Ainsi une association entre la diminution de la concentration de l'A β ₄₂ dans le LCR et une diminution du métabolisme glucidique intracérébral a notamment été rapportée.⁴⁶⁴

* Cf. Chapitre I – 1.2.2 : Imagerie.

2 AUTRES MARQUEURS BIOLOGIQUES

2.1 Marqueurs biologiques pour le diagnostic de la MA et des syndromes apparentés

D'autres marqueurs biologiques seraient susceptibles de participer au diagnostic étiologique d'une démence et il a été décrit de nombreuses molécules à ce jour pouvant jouer ce rôle de biomarqueur. Nous traiterons ici brièvement de quelques unes d'entre elles qui semblent apporter un bénéfice au diagnostic biologique différentiel et précoce.

L'hypothèse de l'implication du stress oxydatif et de l'inflammation dans la MA et les syndromes apparentés a ouvert certaines voies de recherche. Il est connu que l'inflammation est associée à une accumulation d'A β intracérébrale dans les démences.⁴⁶⁵ Des marqueurs de l'inflammation ont donc été recherchés dans le LCR afin de révéler un potentiel processus inflammatoire lié à ces accumulations pathologiques. Les concentrations des médiateurs de l'inflammation tels que certaines chémokines seraient augmentées dans le LCR de patients atteints de MA.^{466, 467} Les concentrations de la protéine de reconnaissance du complément C1q est diminué dans le LCR de patients atteints de MA corrélativement à la sévérité de la démence.⁴⁶⁸ Quoiqu'il en soit, cette molécule intrathécale témoigne seulement de la réaction microgliale rencontrée dans la MA⁴⁶⁹ et pouvant intervenir au cours du vieillissement cérébral physiologique.⁴⁷⁰ De même, la concentration de l'isoprostane, un marqueur du stress oxydatif, augmente nettement dans certains liquides biologiques (LCR mais aussi sang et urine) des patients atteints de MA proportionnellement au déficit cognitif.⁴⁷¹ Chez les patients ayant un MCI, cette augmentation suggérerait l'existence d'une MA sous-jacente.⁴⁷² Si ces molécules sont intéressantes pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques intervenant au cours de la maladie (stress oxydatif et activation microgliale notamment), ces marqueurs ne peuvent prétendre à intervenir de manière plus fine dans le diagnostic du fait de leurs spécificités médiocres vis-à-vis des pathologies fréquemment rencontrées au cours du vieillissement cérébral.⁴⁷³

Enfin certaines molécules rentrant en jeu dans le catabolisme protéique sont présentes dans le LCR, leurs concentrations reflétant une agression cérébrale. Les augmentations de l'activité intrathécales de la neprilyline* et de la concentration en T-tau serait corrélée à l'intensité du

* Endopeptidase participant au catabolisme de l'A β .

déclin cognitif chez les patients atteints par la MA à un stade démentiel ou prodromal.⁴⁷⁴ Cependant, le taux de cette enzyme n'est que très modestement prédictif d'une conversion du stade MCI vers la démence. L'ubiquitine, une autre protéine de signalisation impliquée dans le catabolisme protéique, se lierait aux protéines tau agrégées dans le cortex cérébral et sa concentration augmenterait dans le LCR de patients atteints de MA.⁴⁷⁵ La quantité d'ubiquitine associée aux agrégats de protéines tau dans le cortex serait corrélée à sa concentration intrathécale dans cette pathologie.⁴⁷⁶ Néanmoins, les concentrations dans le LCR de l'ubiquitine comme de la protéine tau se sont révélées élevées dans d'autres pathologies neurodégénératives non Alzheimer.⁴⁷⁷

La transthyréine (préalbumine), protéine très présente dans tous les liquides biologiques dont le sang et le LCR, voit sa concentration augmenter de manière significative dans le LCR de patients atteints par la MA même à des stades prodromaux. Son dosage dans le LCR permet de distinguer les sujets atteints par la MA des sujets contrôles avec une sensibilité de 100% et une spécificité de 93%.⁴⁷⁸ Une autre protéine, mitochondriale cette fois avec le cytochrome c que l'on retrouve augmenté dans le LCR de patients atteints par la MA, permet de différencier les patients avec un MCI stable de ceux évoluant vers la MA avec une sensibilité de 100% pour une spécificité de 75%.⁴⁷⁹ En revanche, il réside un problème de spécificité pour ces marqueurs vis à vis d'autres pathologies neurodégénératives et notamment pour la DFT.⁴⁸⁰ La concentration intrathécale d'une enzyme participant à la voie amyloïdogène, la β -secretase, est augmentée chez les patients atteints par la MA ainsi que chez les patients présentant un MCI.⁴⁸¹ L'activité de cette enzyme est d'ailleurs liée au génotype de l'ApoE puisqu'elle est plus élevée chez les patients présentant les allèles $\epsilon 4$,⁴⁸² ce qui présente un intérêt physiopathologique mais semble plus difficile à introduire en tant qu'outil diagnostique (lié au génotypage) du fait de l'hétérogénéité des génotypes de l'ApoE et de la gestion déontologique et éthique des analyses génétiques peu réalisées dans notre expérience (prescriptions d'analyses inférieures à 5% sur 3500 prélèvements de routines).

La concentration du neuropeptide anorexigène « Cocaine and Amphetamine-Regulated Transcript », exprimé dans les neurones hypothalamiques et intervenant au sein du système dopaminergique, est significativement diminuée dans le LCR des patients atteints par la DCL par rapport aux patients avec une MA ou encore aux sujets contrôles.⁴⁸³ Cette diminution est directement liée à l'atteinte du système dopaminergique observée dans la DCL. Enfin, des protéines du cytosquelette, matérialisant l'architecture intracellulaire, sont aussi libérées lors

de la mort cellulaire due aux lésions cérébrales dans les pathologies neurodégénératives. Ainsi une augmentation de la concentration des neurofilaments dans le LCR a été rapportée dans la DFT par rapport à la MA débutante,⁴⁸⁴ permettant potentiellement de différencier les présentations frontales de la MA des DFT.

2.2 Dans le cadre d'une MCJ

2.2.1 Protéine 14.3.3

La protéine 14.3.3 est présente dans un grand nombre de tissus (cerveau, foie, cœur et testicules notamment) avec 7 isoformes dont 5 neuronales. Elle est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, la transduction du signal, la protection de la cellule contre l'apoptose en régulant les kinases et les phosphatases.⁴⁸⁵ Sa mise en évidence dans le LCR semble liée à une lyse neuronale et signer une maladie agressive, c'est pourquoi on la retrouve au cours d'une MCJ. Cependant, et du fait de la localisation préalablement décrite, cette protéine n'est pas spécifique de la MCJ puisqu'on la retrouve de façon quasi-systématique au cours d'encéphalite herpétique, d'ischémie cérébrale, de lymphome malin non Hodgkinien et de façon moins systématique lors de syndrome paranéoplasique, d'encéphalopathies métaboliques, d'encéphalites d'Hashimoto ou d'autres démences neurodégénératives de formes agressives ou rapidement évolutives.⁴⁸⁶⁻⁴⁸⁸

Néanmoins, seule la recherche de la protéine 14-3-3 dans le LCR fait partie des critères diagnostic internationaux. De fait, un cas de MCJ possible deviendra probable en cas de 14.3.3 positive dans le LCR.^{*154} Il convient de noter que dans certains cas la recherche de la protéine 14.3.3 dans le LCR peut s'avérer négative lors des stades initiaux de la maladie. La recherche de cette protéine dans le LCR de patients atteints par la MCJ reste à ce jour le meilleur outil biologique à disposition pour le diagnostic des cas de MCJ sporadiques.⁴⁸⁹ La spécificité de cette protéine dans la distinction de la MCJ par rapport aux autres démences est supérieure à 95%.⁴⁸⁷ La sensibilité de cette aide diagnostic chez les patients atteints de MCJ sporadiques montre une hétérogénéité en fonction du polymorphisme du codon 129. La sensibilité de la protéine 14.3.3 serait plus faible pour les hétérozygotes M/V (77%) par rapport aux homozygotes M/M (89%) et V/V (94%).³¹⁰ De plus, la concentration de cette

* Cf. Détection de la protéine 14-3-3 dans le LCR. Rapport de la Haute Autorité de Santé, janvier 2007. Dossier téléchargeable sur www.has-sante.fr

protéine dans le LCR serait moins grande lors d'une MCJ atypique et/ou d'évolution plus lente.⁴⁹⁰ En ce qui concerne les autres formes de MCJ, la sensibilité de la protéine 14.3.3 dans le LCR s'avère très variable et est généralement plus faible que pour les cas sporadiques. La sensibilité de cette protéine dans le LCR pour la détection d'une MCJ pour l'ensemble des formes génétiques a été évaluée à un peu plus de 75%.¹⁵⁷ De façon plus détaillée, cette sensibilité est de moins de 20% pour les IFF, 50% pour les GSS et atteint 90% pour les mutations E200K. De même, la sensibilité s'avère très modeste dans les cas de vMCJ puisqu'elle est de l'ordre de 40%.³⁶¹ Les formes iatrogènes quant à elles sont dépendantes de l'origine de la contamination en ce qui concerne la sensibilité de la protéine 14.3.3 dans le LCR dans la détection de cette pathologie. Ainsi elle s'élève à 77% en moyenne mais tout de même à plus de 85% dans les greffes de dure-mère avec seulement 70% de sensibilité pour les formes liées à l'administration d'hormone de croissance contaminée.^{491, 492}

2.2.2 Autres marqueurs

D'autres marqueurs tels que l'isoforme neuronale spécifique de l'enolase et la protéine S100 β ont été étudiés. L'isoforme neuronale spécifique de l'enolase est une protéine impliquée dans la glycolyse et on la retrouve au sein du LCR dans de nombreuses pathologies dont les pathologies cérébro-vasculaires (ischémie cérébrales, hémorragie méningées) mais aussi les traumatismes crâniens ou encore les tumeurs cérébrales. Sa spécificité ainsi que sa sensibilité ont été évaluées à 85% dans les cas de MCJ sporadique.⁴⁸⁶ La protéine S100 β , protéine cytosolique qui fixe le calcium et qu'on l'on retrouve dans les cellules gliales, est utilisée comme marqueur pronostique après une ischémie cérébrale ou des traumatismes crâniens mais aussi comme marqueur tumoral.⁴⁹³ Sa spécificité dans la MCJ est de 90% avec néanmoins une sensibilité modeste de 65%.⁴⁸⁹

TRAVAIL DE THÈSE

PARTIE 1 :

**PERFORMANCE DIAGNOSTIQUE DES BIOMARQUEURS DU LCR POUR LE
DIAGNOSTIC DE LA MALADIE D'ALZHEIMER ET DES SYNDROMES
APPARENTÉS :**

**APPLICATION POUR L'IDENTIFICATION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER
LORS DE PRÉSENTATIONS CLINIQUES FOCALES DE LA MALADIE.**

Du fait de certaines présentations cliniques atypiques et de formes inaugurales focales,¹⁶ la MA reste difficile à diagnostiquer pour le clinicien. Le dosage des marqueurs dans le LCR que sont les protéines T-tau et p-tau₁₈₁ ainsi que le peptide A β ₄₂, a permis une amélioration de la précision du diagnostic étiologique.³⁴¹ Une augmentation intrathécale de la concentration des protéines T-tau et p-tau₁₈₁ associée à une diminution de la concentration du peptide A β ₄₂ dans le LCR est classiquement retrouvée dans la MA. Ces modifications biologiques observées dans le LCR des patients atteints par la MA sont en lien avec les lésions cérébrales qui ont lieu dans cette pathologie : la formation des DNF ainsi que des PS constituées respectivement de protéines tau hyperphosphorylées et de peptides A β . Le LCR est alors le reflet de la neuropathologie et permet de présager de la pathologie sous-jacente du vivant du patient.³⁴⁴

En fait, la concentration mesurée de peptide A β ₄₂ dans le LCR a été pendant longtemps interprétée comme étant le témoin de la voie catabolique de ce peptide en occultant l'importance de la voie anabolique. Comme pour tout marqueur biologique, cette concentration est la résultante de la production et de l'élimination. La production est liée à la quantité totale de peptides A β produite cérébralement dans ce fluide biologique.³⁹⁹ Une sous- ou une sur- production de ce peptide peut aboutir à des erreurs d'interprétation de ces dosages biologiques et pourrait expliquer certains profils biologiques atypiques retrouvés dans le cadre d'un diagnostic biologique de MA.⁴⁴⁹ Le dosage du peptide A β ₄₀ dans le LCR permet d'apprécier la quantité totale de peptides A β au sein de ce liquide et de reconsidérer certaines atypies biologiques en lien avec la concentration intrathécale de l'A β ₄₂.³⁹⁹

Nous validerons dans cette partie l'intérêt des dosages des biomarqueurs du LCR utilisés en routine au sein du laboratoire de Neurobiologie du Groupement Hospitalier Est de Lyon (T-tau, p-tau₁₈₁ et A β ₄₂) dans le diagnostic de la MA. De plus, nous évaluerons l'intérêt diagnostique du ratio A β ₄₂/A β ₄₀ pour le diagnostic différentiel de la MA. Enfin, nous évaluerons la performance diagnostique de ces biomarqueurs du LCR (T-tau, p-tau₁₈₁ et ratio A β ₄₂/A β ₄₀) au cours de présentations focales couramment rencontrées dans les démences dégénératives afin de déterminer plus précisément la pathologie sous-jacente responsable de tels syndromes.

1 PATIENTS ET MÉTHODES

1.1 Sélection des patients

Les patients ont été diagnostiqués sur la base des critères diagnostiques de consensus par des neurologues dans les centres spécialisés avec des consultations mémoires. Pour la majorité d'entre eux, ils ont un statut diagnostique de cas « probable ». Pour ceux qui présentaient un statut de cas « possible », les résultats des marqueurs ne sont présentés qu'à titre illustratif.

Tous les patients ont reçu une évaluation neuropsychologique ainsi qu'un examen neuroradiologique. Les patients atteints par une MA ont été diagnostiqués sur la base des critères diagnostiques de consensus de McKhann.¹¹ Les patients atteints d'une DCL suivent les critères cliniques de McKeith,¹²⁹ ceux atteints par une DFT suivent les critères de Neary,⁸⁸ et ceux atteints d'une MCJ suivent les critères internationaux du Réseau.¹⁵⁴ Les patients atteints par une DCB et une PSP ont été diagnostiqués sur la base de l'examen clinique neurologique ainsi que des examens paracliniques.*

Tous les patients ont fait l'objet d'une ponction lombaire et les analyses biologiques du LCR ont été réalisées dans le laboratoire de Neurobiologie du Groupement Hospitalier Est (Centre de Biologie et de Pathologie Est).

1.1.1 Patients pour l'évaluation de la performance du dosage des marqueurs du LCR utilisés en routine

Pour l'évaluation des marqueurs du LCR de routine (T-tau, p-tau₁₈₁ et A β ₄₂) et l'établissement des seuils de décision diagnostique (seuils), nous avons recruté 143 patients (60 h, 83 f) atteints par une MA, 170 patients (75 h, 95 f) atteints par une autre démence neurodégénérative (57 DCL, 76 DFT, 11 PSP, 13 DCB, 13 MCJ) constituant le groupe des autres démences non-Alzheimer appelé « Autres démences » (OD) et 64 patients (31 h, 33 f) sans processus neurodégénératif (ND) (épilepsies, syndromes psychiatriques tels que dépression ou psychoses, méningo-encéphalites, démences d'origine alcoolique, neuroborréliose de Lyme, polyradiculonévrite, hydrocéphalies chroniques de l'adulte et encéphalopathies vasculaires). Le recrutement de ces patients s'est effectué au sein de

* Cf. Chapitre I – 5.1 Dégénérescence corticobasale, 5.2 Paralyse supranucléaire progressive

différents centres spécialisés dans les consultations mémoires de Lyon, Dijon, Saint-Etienne, Grenoble, Vienne, Montbéliard, Villefranche sur Saône, Macon, Bourg en Bresse et Roanne entre 2005 et 2010. Les patients ont été inclus au sein du Projet Hospitalier de Recherche Clinique 2004 D50353 ainsi que du projet européen EU FP6 LSHB-CZ-2006-037719 contrat N° 037719. L'étude a été approuvée par le comité d'éthique local (CPP) et tous les patients ont été informés et ont signé un consentement éclairé (Annexe 5) ainsi qu'une notice d'explication (Annexe 6).

1.1.2 Patients pour l'évaluation de la performance du dosage du peptide A β ₄₀ dans le LCR et du ratio A β ₄₂/A β ₄₀ associé aux protéines T-tau et p-tau₁₈₁

La quantité de LCR disponible étant insuffisante pour la majorité des patients inclus dans la population précédente, nous avons décidé de constituer une autre cohorte pour laquelle le dosage de l'A β ₄₀ dans le LCR était envisageable et/ou disponible. Dans un cadre diagnostique, 99 patients (47 h, 52 f) atteints d'une MA ont été inclus pour l'évaluation de la performance diagnostique du dosage du peptide A β ₄₀ et du calcul du ratio A β ₄₂/A β ₄₀ dans le LCR. De plus, 29 patients (19 h, 10 f) atteints par une DCL, 40 patients (13 h, 27 f) atteints par une DFT, 7 patients (4 h, 3 f) avec une PSP, 14 patients (4 h, 10 f) ayant une DCB, 3 patients (1 h, 2 f) atteints d'une MCJ et 49 patients ND (19 h, 30 f) ont été inclus pour cette évaluation. Les patients ont fait l'objet d'un dosage du peptide A β ₄₀ dans le LCR suite à des discordances biologiques dans les 3 biomarqueurs du LCR utilisés en routine.

1.1.3 Patients pour l'évaluation de la performance du dosage des marqueurs du LCR lors de présentations focales de démences neurodégénératives

Un total de 272 patients a été sélectionné selon leurs troubles inauguraux : 124 syndromes amnésiques, 68 syndromes frontaux, 34 syndromes aphasiques, 23 ACP, 16 syndromes corticobasals (SCB) et 7 syndromes de paralysie supranucléaire progressive (SPSP). Tous les patients ont bénéficié d'un suivi d'au moins 2 ans ayant permis de poser un diagnostic étiologique de probabilité dans la majorité des cas ; 17 % des patients à présentation frontale et 9% de ceux présentant un syndrome aphasique restent au statut de cas possible après les 2 ans d'évaluation.

1.1.3.1 Classification clinique

Les patients ont été sélectionnés et classés en fonction des troubles inaugurant la pathologie. Nous avons dégagé 5 syndromes corticaux prédominants et correspondant à certaines formes de présentations cliniques focales des démences neurodégénératives et nous y avons rajouté le SPSP pouvant avoir des troubles cognitifs variés :

- Syndrome amnésique : déficit de la mémoire épisodique témoignant de lésions au niveau des régions temporales internes
- Syndrome frontal : troubles dysexécutifs associés à des troubles du comportement (agressivité, désinhibition, persévérance notamment) témoignant de lésions dans le lobe frontal
- Syndrome aphasique progressive primaire: troubles de la parole, de la fluence verbale ainsi que de la compréhension dans certains cas. Ce syndrome a été divisé en 3 sous syndromes : * aphasie primaire non fluente (APNF) dans lequel on retrouve un déficit de la fluence verbale et un manque du mot ** aphasie logopénique avec un manque du mot mais une fluence verbale conservée *** démence sémantique qui se caractérise par une fluence verbale normale avec des troubles de la compréhension et une perte des concepts
- Syndrome de Benson ou ACP : troubles visuels et visuo-spatiaux liés à une atteinte occipitale pouvant être associée à une atteinte pariétale postérieure
- Syndrome corticobasal (SCB) : troubles praxiques ou dystoniques et syndrome parkinsonien asymétrique ou unilatéral, liés à une atteinte pariétale et sous-corticale
- Syndrome de PSP (SPSP) : paralysie supranucléaire et instabilité posturale associé à des troubles cognitifs

1.1.3.2 Classification biologique

Le dosage des concentrations intrathécales des biomarqueurs (T-tau, p-tau₁₈₁, A β ₄₂ et A β ₄₀) ont été effectués sur tous ces patients. Les ratios des concentrations des peptides A β ₄₂/ A β ₄₀ ont été calculés. Les patients ont ensuite été classés en fonction des profils biologiques observés et de l'évolution de la maladie. Les seuils validés au sein du laboratoire de

Neurobiologie du Groupement Hospitalier Est et utilisés pour l'identification biologique de ces patients sont : T-tau > 350 pg/mL, p-tau₁₈₁ > 60 pg/mL, et ratio Aβ₄₂/Aβ₄₀ < 0.05.

Nous avons dégagé 3 profils biologiques faisant intervenir les protéines T-tau et p-tau₁₈₁ et le ratio Aβ₄₂/Aβ₄₀ au sein desquels les patients seront classés par les biologistes du laboratoire sans connaissance du diagnostic final clinique:

- MA biologique : T-tau > 350 pg/mL, p-tau₁₈₁ > 60 pg/mL et ratio Aβ₄₂/Aβ₄₀ < 0.05
- Biologie atypique : présence de 1 ou de 2 éléments pathologiques au sein des 3 marqueurs biologiques
- Biologie normale : T-tau < 350 pg/mL, p-tau₁₈₁ < 60 pg/mL et ratio Aβ₄₂/Aβ₄₀ > 0.05

1.2 Analyses biologiques du liquide céphalorachidien

1.2.1 Récolte des échantillons biologiques et conservation

Les LCR ont été obtenus par ponction lombaire entre la région L4/L5 ou L5/L6. Dix millilitres de LCR ont été récupérés dans des tubes en polypropylène (VWR, Pennsylvanie, USA) puis centrifugés (10 min à 4000g) dans les 2 heures suivant la ponction lombaire. Le surnageant est ensuite réparti en volume de 500 µl dans des tubes en polypropylène puis congelé à -80°C dans les 4 heures suivant la centrifugation pour une conservation jusqu'à l'analyse biologique. Les LCR sont exclus de cette étude s'ils ne répondent pas à certains critères cytologiques et chimiques : pour cette étude, la numération de globules blancs doit être inférieure à 5 cellules/mm³, le taux d'érythrocytes inférieur à 2000 cellules/mm³ et la protéinorachie inférieure à 1.5 g/L.

1.2.2 Dosage des biomarqueurs du liquide céphalorachidien

Les concentrations intrathécales des protéines T-tau, p-tau₁₈₁ et des peptides Aβ₄₂ et Aβ₄₀ ont été déterminées grâce à l'utilisation de kits ELISA commerciaux (INNOTEST httau-Ag, INNOTEST Phospho-Tau₍₁₈₁₎, INNOTEST β-amyloid₍₁₋₄₂₎, Innogenetics[®], Ghent, Belgique et Human Amyloid β (1-40) (N) Assay Kit, IBL, Hamburg, Allemagne) en suivant les procédures techniques fournis dans les kits. Tous les dosages ont été réalisés en double et

chaque série de dosages comprenait un contrôle qualité provenant d'un pool de LCR avec des concentrations connues de T-tau (550 ± 45 pg/mL), p-tau₁₈₁ (60 ± 3.3 pg/mL), A β ₄₂ (500 ± 47 pg/mL) et A β ₄₀ (10000 ± 1208 pg/mL). Pour un échantillon présentant un écart type à la moyenne du duplicat supérieur à 10% et/ou présentant une concentration hors gamme de linéarité, celui-ci était dosé une deuxième fois. Les ratios des concentrations des peptides A β ₄₂/A β ₄₀ ainsi que des concentrations des protéines T-tau/p-tau₁₈₁ ont été calculés.

1.3 Analyses statistiques

Une analyse de variance à 1 facteur (ANOVA 1) a été effectuée afin de comparer l'âge des groupes de patients. Un test Chi² a permis de comparer la proportion d'hommes et de femmes dans les différents groupes. Les MMS des patients ont été comparés par le test de Kruskal-Wallis puis de Mann-Whitney, tests utilisés par ailleurs pour comparer les concentrations des biomarqueurs entre les différents groupes de patients. L'apport de ces biomarqueurs pour le diagnostic différentiel a ensuite été évalué grâce aux courbes ROC. Ces analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Medcalc software (Medcalc®, V11.1.1.0). La valeur définissant la significativité statistique est $p < 0.05$.

2 RÉSULTATS

2.1 Évaluation de la performance du dosage des biomarqueurs du LCR utilisés en routine pour le diagnostic différentiel de la maladie d'Alzheimer : T-tau, p-tau₁₈₁ et A β ₄₂

Aucune différence d'âge ($p = 0.06$) ou de répartition de sexe ($p = 0.91$) n'a été observée entre les différents groupes de patients étudiés (tableau 6). En utilisant le test de Kruskal-Wallis nous avons observé des différences significatives des scores des MMS entre différents groupes : les MA sont plus bas chez les patients atteints par la MA par rapport aux patients ND, avec une OD, une DCL ou une DFT ($p < 0.05$).

Tableau 6. Moyennes des MMS et des concentrations des protéines T-tau, p-tau₁₈₁ et du peptide A β ₄₂ dans le LCR selon les différents groupes de patients. MA : maladie d'Alzheimer ; OD : autres démences non Alzheimer ; ND : non dégénératif ; DCL : démence à corps de Lewy ; DFT : démence frontotemporale ; PSP : paralysie supranucléaire progressive ; DCB : dégénérescence corticobasale ; MCJ ; maladie de Creutzfeldt-Jakob.

	Sexe (F/M)	Age	MMS	T-tau (pg/ml)	p-tau ₁₈₁ (pg/ml)	A β ₄₂ (pg/ml)
MA	83 / 60	69,1 ± 9,1	18,6 ± 5,4	779 ± 537	103 ± 44	338 ± 164
OD	95 / 75	68,5 ± 10,1	20,9 ± 5,8	816 ± 2634	50 ± 22	526 ± 236
ND	33 / 31	65,2 ± 13,1	18,2 ± 5,9	254 ± 253	37 ± 14	584 ± 220
DCL	32 / 25	68,3 ± 10,0	20,8 ± 5,1	276 ± 152	49 ± 19	468 ± 212
DFT	45 / 31	64,7 ± 10,2	21,4 ± 6,4	309 ± 250	47 ± 24	546 ± 266
PSP	6 / 5	67,8 ± 11,3	17,5 ± 3,7	232 ± 59	38 ± 8	721 ± 188
DCB	7 / 6	69,1 ± 10,7	20,9 ± 6,8	415 ± 288	59 ± 31	459 ± 162
MCJ	5 / 8	66,3 ± 8,6	20,0 ± 4,7	7007 ± 7182	58 ± 22	523 ± 186

2.1.1 Présentation des résultats globaux

Les patients MA ont des concentrations intrathécales de protéines T-tau et p-tau₁₈₁ significativement plus élevées que les patients des groupes OD et ND ($p < 0.0001$) (figure 21). En revanche, bien que les concentrations des protéines T-tau et p-tau₁₈₁ soient plus élevées dans le groupe OD par rapport aux patients du groupe ND ($p < 0.01$), il existe un chevauchement important des valeurs entre ces deux groupes. La concentration du peptide A β ₄₂ est significativement plus basse chez les patients souffrant d'une MA que chez les patients appartenant aux deux autres groupes, OD et ND ($p < 0.01$ et $p < 0.0001$ respectivement). Il n'a pas été observé de différence statistique dans la concentration intrathécale de ce peptide entre les patients atteints par une autre démence et les patients sans processus dégénératif.

A l'aide de la construction des courbes ROC, le dosage de la p-tau₁₈₁ dans le LCR présente le meilleur pouvoir discriminant pour le diagnostic différentiel de la MA par rapport aux ND ainsi qu'aux OD (figure 22). Le dosage du peptide A β ₄₂ dans le LCR dispose quant à lui d'un pouvoir plus restreint par rapport à la T-tau et la p-tau₁₈₁.

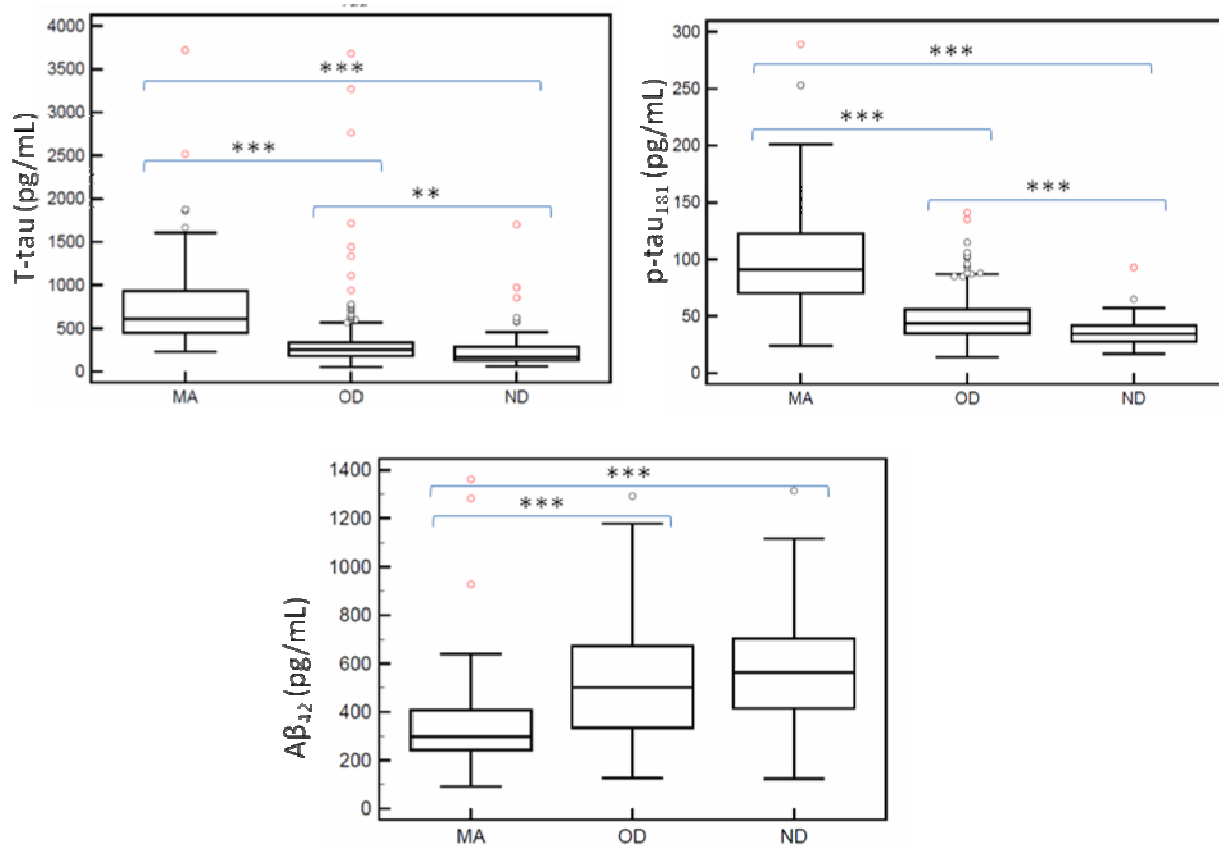


Figure 21. Comparaison des concentrations des protéines T-tau, p-tau₁₈₁ et du peptide Aβ₄₂ dans le LCR entre les patients souffrant d'une maladie d'Alzheimer, ceux atteints par une autre démence et les patients sans processus dégénératif. Boîtes à moustaches montrant les concentrations (médianes et percentiles) dans le LCR des 3 biomarqueurs utilisés en routine. MA : maladie d'Alzheimer ; OD : démences non Alzheimer ; ND : non dégénératifs ; *** : $p < 0.0001$; ** : $p < 0.01$.

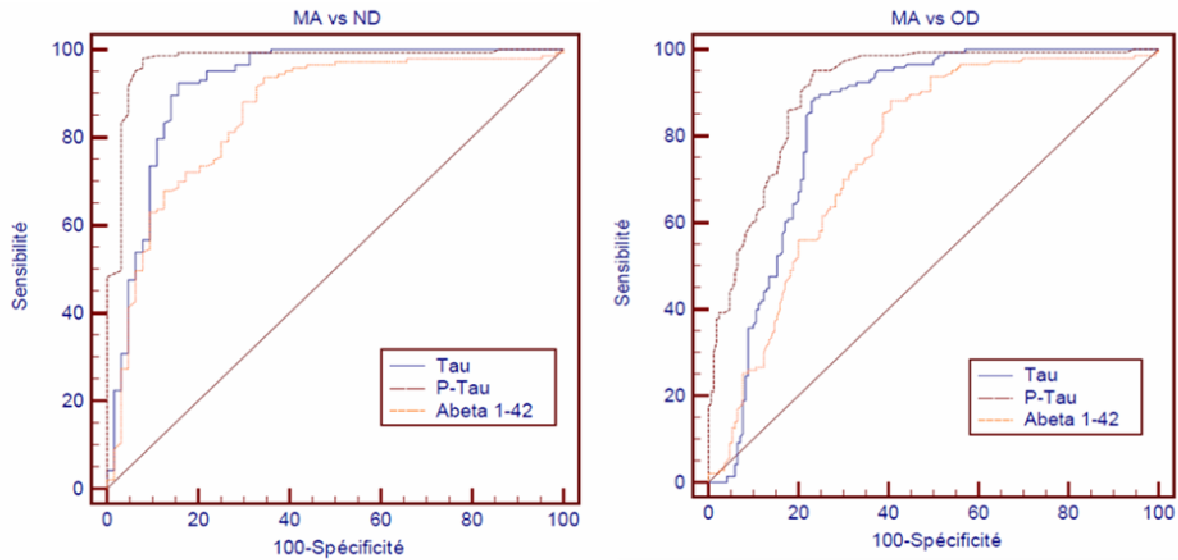


Figure 22. Courbes ROC des 3 biomarqueurs du LCR dans le diagnostic différentiel de la maladie d’Alzheimer par rapport aux atteintes neurologiques non dégénératives et aux autres démences neurodégénératives. MA : maladie d’Alzheimer ; ND : non dégénératif ; OD : autres démences neurodégénératives ; Tau : T-tau ; P-Tau : p-tau₁₈₁ ; Abeta 1-42 : Aβ₄₂.

2.1.2 Présentation des résultats dans un contexte de diagnostic différentiel

Les concentrations de la T-tau dans le LCR des patients atteints par une MCJ sont significativement plus élevées ($p < 0.0001$) que dans toutes les pathologies neurodégénératives étudiées, atteignant des taux monstrueux (tableau 6). Elles sont également significativement augmentées dans le LCR des patients atteints par une MA par rapport aux patients atteints par une DCL, une DFT, une DCB et une PSP ($p < 0.0001$). En revanche, il n’a pas été observé de différence dans les concentrations de la T-tau chez les différents groupes de patients atteints de DCL, DFT, DCB et PSP.

La concentration de la p-tau₁₈₁ dans le LCR est significativement augmentée dans la MA par rapport à toutes les pathologies neurodégénératives étudiées : par rapport à la DCL, la DFT et la PSP ($p < 0.0001$) et par rapport à la MCJ et la DCB ($p < 0.01$) (figure 23). Cette concentration est aussi significativement augmentée dans la DCL et la MCJ par rapport aux patients ND ($p < 0.0001$) (données non montrées) et atteints par une PSP ($p < 0.05$) mais le chevauchement des valeurs est important entre ces deux populations (figure 23). Il n’a pas été retrouvé de différence dans la concentration intrathécale de la p-tau₁₈₁ entre les DCB, DFT et

PSP. Enfin, même si nous avons trouvé des concentrations en p-tau₁₈₁ dans le LCR significativement plus élevées chez les patients ayant une DFT que les patients ND ($p < 0.05$), un important chevauchement des valeurs est constaté entre les 2 groupes (tableau 6).

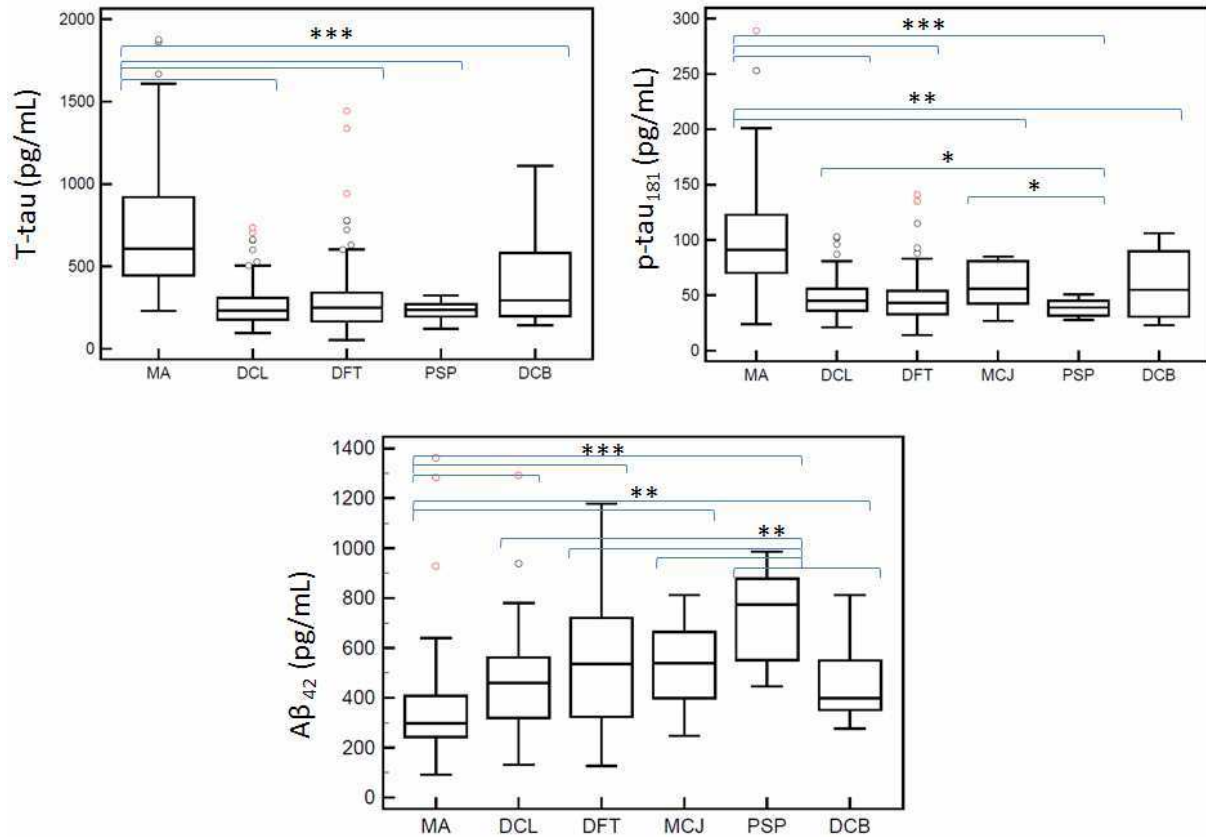


Figure 23. Comparaison des concentrations des protéines T-tau, p-tau₁₈₁ et du peptide A β ₄₂ dans le LCR dans les différentes démences neurodégénératives. Boîtes à moustaches montrant les concentrations (médianes et percentiles) dans le LCR des 3 biomarqueurs utilisés en routine. MA : maladie d’Alzheimer ; DCL : démence à corps de Lewy ; DFT : démence frontotemporale ; PSP : paralysie supranucléaire progressive ; DCB : dégénérescence corticobasale ; MCJ ; maladie de Creutzfeldt-Jakob ; *** : $p < 0.0001$; ** : $p < 0.01$; * : $p < 0.05$.

Bien que la concentration du peptide A β ₄₂ dans le LCR soit retrouvée significativement diminuée dans la MA par rapport aux groupes DCL ($p < 0.0001$), DFT ($p < 0.0001$), DCB ($p < 0.01$), MCJ ($p < 0.01$) et PSP ($p < 0.0001$), il existe un chevauchement des valeurs pouvant être important selon les groupes sauf entre MA et PSP (figure 23). Enfin, à titre indicatif, les patients avec une DCL et une DCB ont une concentration d’A β ₄₂ dans le LCR diminuée par rapport aux patients ND ($p < 0.01$; $p < 0.05$) (tableau 6).

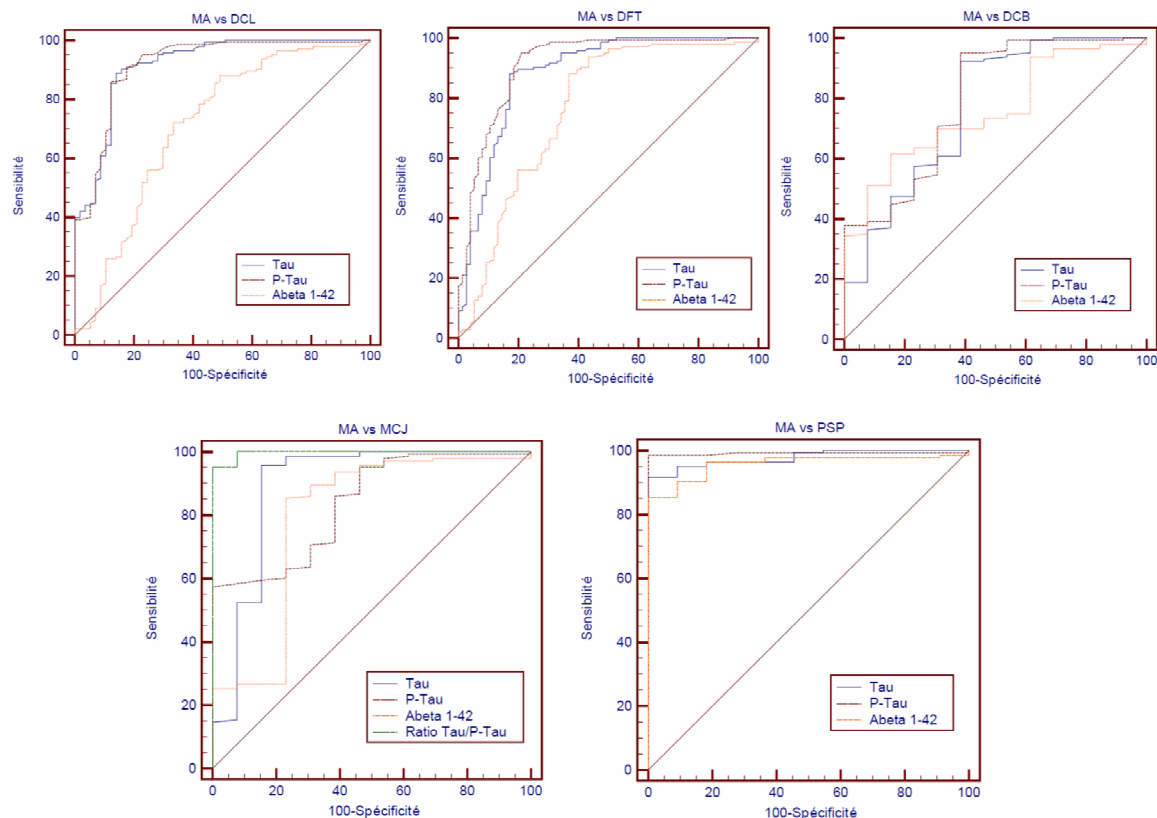


Figure 24. Courbes ROC des 3 biomarqueurs du LCR dans le diagnostic différentiel de la maladie d'Alzheimer par rapport à toutes les démences neurodégénératives étudiées.

MA : maladie d'Alzheimer ; DCL : démence à corps de Lewy ; DFT : démence frontotemporale ; DCB : dégénérescence corticobasale ; MCJ ; maladie de Creutzfeldt-Jakob ; PSP : paralysie supranucléaire progressive ; Tau : T-tau ; P-Tau : p-tau₁₈₁ ; Abeta 1-42 : A β ₄₂.

En utilisant une analyse ROC, le dosage des T-tau et des p-tau₁₈₁ dans le LCR présentent des pouvoirs discriminants sensiblement équivalents pour discriminer une MA d'une DCL, alors que le dosage du peptide A β ₄₂ dans ce fluide biologique ne permet pas d'obtenir un diagnostic différentiel intéressant avec des sensibilités et spécificités ne dépassant pas 70% (figure 24). Dans la distinction d'une MA et d'une DFT, le dosage de la p-tau₁₈₁ dans le LCR a le meilleur pouvoir discriminant par rapport à la T-tau et au peptide A β ₄₂. Le diagnostic différentiel de la MA et de la DCB ne semble pas être amélioré par les biomarqueurs du LCR avec des pouvoirs discriminatifs faibles pour les 3 marqueurs. En ce qui concerne la MA et la MCJ, les dosages de la T-tau et l'utilisation du ratio T-tau/p-tau₁₈₁ ont un excellent pouvoir discriminant entre ces deux pathologies. Enfin, les 3 biomarqueurs du LCR ont un excellent pouvoir discriminant pour distinguer la MA de la PSP.

Tableau 7. Détermination des seuils optimaux des concentrations des 3 biomarqueurs pour le diagnostic différentiel de la maladie d'Alzheimer. MA : maladie d'Alzheimer ; ND : dégénératif ; OD : autres démences non Alzheimer ; DCL : démence à corps de Lewy ; DFT : démence frontotemporale ; PSP : paralysie supranucléaire progressive ; DCB : dégénérescence corticobasale ; MCJ ; maladie de Creutzfeldt-Jakob ; Se : sensibilité ; Sp : spécificité ; AUC : aire sous la courbe ; > : supérieure ; < = : inférieure ou égale.

	T-tau				p-tau ₁₈₁				Aβ ₄₂				Ratio T-tau/p-tau ₁₈₁			
	Cut-off	Se	Sp	AUC	Cut-off	Se	Sp	AUC	Cut-off	Se	Sp	AUC	Cut-off	Se	Sp	AUC
MA vs ND	>319	92,3	84,4	0,919	>55	95,1	93,8	0,974	<=498	93,7	65,6	0,856				
MA vs OD	>352	89,5	75,3	0,833	>63	86	82,4	0,906	<=482	90,2	52,9	0,761				
MA vs DCL	>359	88,8	86	0,918	>63	86	87,7	0,918	<=455	88,1	50,9	0,711				
MA vs DFT	>378	88,1	82,9	0,884	>63	86	82,9	0,915	<=455	88,1	63,2	0,765				
MA vs PSP	>324	91,6	100	0,978	>51	98,6	100	0,991	<=443	85,3	100	0,959				
MA vs DCB	>305	92,3	61,5	0,77	>56	95,1	61,5	0,796	<=333	61,5	84,6	0,755				
MA vs MCJ	<=1667	95,8	84,6	0,892	>85	57,3	100	0,836	<=443	85,3	76,9	0,792	<=10.1	95,1	100	0,996

Les courbes ROC permettent de déterminer le seuil de concentration donnant les meilleures sensibilités et spécificités pour chaque biomarqueur du LCR (tableau 7). Pour différencier les patients atteints par une MA de ceux sans processus dégénératif, la sensibilité et la spécificité sont de 92% et 84% respectivement pour des concentrations intrathécales en T-tau supérieures à 319 pg/mL, de plus de 90 % pour des valeurs de p-tau₁₈₁ dans le LCR supérieures à 55 pg/mL. En revanche en ce qui concerne le peptide Aβ₄₂, il n'existe aucun seuil correct (sensibilité et spécificité supérieures à 80 %) permettant cette discrimination entre une population MA et la population non neurodégénérative ; en privilégiant la sensibilité (93%), on aboutit à un seuil de 498 pg/mL avec une spécificité de 65%.

En ce qui concerne la distinction de la MA et des autres démences non Alzheimer, l'efficacité diagnostique de la p-tau₁₈₁ surpasse celle des deux autres biomarqueurs avec une sensibilité de 86% et une spécificité de 82% au seuil de 63 pg/mL. Pour les deux autres marqueurs, il n'existe pas de valeur seuil permettant d'obtenir une spécificité suffisante, surtout en ce qui concerne le peptide Aβ₄₂ (tableau 7).

Le dosage des protéines T-tau et p-tau₁₈₁ dans le LCR permet de distinguer une MA d'une DCL avec des sensibilités de 88% et 86% et des spécificités de 86% et 87% à des seuils de 359 pg/mL et 63 pg/mL respectivement. En revanche, il n'existe pas de seuil pour le peptide Aβ₄₂ permettant d'avoir une spécificité supérieure à 50% pour distinguer ces deux pathologies (tableau 7).

De même, on obtient des résultats comparables en terme de sensibilité et de spécificité pour la distinction de la MA et de la DFT aux seuils de 378 pg/mL pour la T-tau, 86 pg/mL pour la p-tau₁₈₁ alors que pour l'Aβ₄₂ il n'existe pas non plus de valeur seuil permettant d'obtenir une spécificité supérieure à 60 %.

Les 3 biomarqueurs du LCR obtiennent de très bonnes sensibilités et excellentes spécificités pour distinguer une MA d'une PSP à des seuils de 324 pg/mL pour la T-tau (Se : 91% ; Sp : 100%), 51 pg/mL pour la p-tau₁₈₁ (Se : 98% ; Sp : 100%) et 443 pg/mL pour l'Aβ₄₂ (Se : 85% ; Sp : 100%).

Enfin, si le dosage de la T-tau permet d'orienter vers une MCJ plutôt qu'une MA avec une sensibilité de 95% et une spécificité de 84% au seuil de 1667 pg/mL, une valeur seuil de 10.1, du ratio des concentrations T-tau/p-tau₁₈₁ permet avec une très bonne sensibilité de 95% et une excellente spécificité de 100% de distinguer une MCJ d'une MA (tableau 7).

Ces résultats permettent d'identifier les seuils les plus performants pour le diagnostic différentiel de la MA : T-tau > 350 pg/mL, p-tau₁₈₁ > 60 pg/mL. Pour le peptide Aβ₄₂, une valeur seuil Aβ₄₂ < 500 pg/mL a été choisie d'une part sur la base de ces données et d'autre part en fonction de la littérature. L'association des 3 biomarqueurs de LCR (T-tau, p-tau₁₈₁ et Aβ₄₂) à ces seuils permet une amélioration de la spécificité dans tous les diagnostics différentiels de la MA mis à part pour les DCB (tableau 8), pathologie pour laquelle la spécificité était de 84% pour l'Aβ₄₂ dans la distinction de la MA (tableau 7).

Tableau 8. Apport des 3 biomarqueurs du LCR pour le diagnostic différentiel de la maladie d'Alzheimer. MA : maladie d'Alzheimer ; ND : dégénératif ; OD : autres démences non Alzheimer ; DCL : démence à corps de Lewy ; DFT : démence frontotemporale ; PSP : paralysie supranucléaire progressive ; DCB : dégénérescence corticobasale ; MCJ ; maladie de Creutzfeldt-Jakob ; Se : sensibilité ; Sp : spécificité.

	Se	Sp
MA vs ND	81,1	100
MA vs OD	81,1	86,5
MA vs DCL	81,1	87,7
MA vs DFT	81,1	88,2
MA vs PSP	81,1	100
MA vs DCB	81,1	61,5
MA vs MCJ	81,1	84,6

Au final, avec une sensibilité de plus de 80%, l'utilisation des 3 biomarqueurs du LCR permet d'améliorer le diagnostic différentiel de la MA avec d'excellentes spécificités pour distinguer la MA des ND (Sp : 100%) ou de la PSP (Sp : 100%) et de très bonnes spécificités pour distinguer la MA de la DCL (Sp : 87%), de la DFT (Sp : 88%) ou encore de la MCJ (Sp : 84%) (Tableau 8).

2.2 Évaluation de la performance du dosage du peptide A β ₄₀ dans le LCR et du ratio A β ₄₂/A β ₄₀ associés aux protéines T-tau et p-tau₁₈₁ pour le diagnostic différentiel de la maladie d'Alzheimer

Aucune différence d'âge ($p = 0.28$) ou de répartition de sexe ($p = 0.18$) n'a été observée entre ces différents groupes. De même, aucune différences du score du MMS n'a été observé entre ces différents groupes de patients ($p = 0.09$).

Tableau 9. Moyenne des âges, scores du MMS et concentrations des biomarqueurs du LCR avec le ratio A β ₄₂/A β ₄₀ obtenus selon les différents groupes de patients étudiés.

MA : maladie d'Alzheimer ; OD : autres démences non Alzheimer ; ND : non dégénératif ; DCL : démence à corps de Lewy ; DFT : démence frontotemporale ; PSP : paralysie supranucléaire progressive ; DCB : dégénérescence corticobasale ; MCJ : maladie de Creutzfeldt-Jakob.

	Sexe (F/M)	Age	MMS	T-tau (pg/ml)	p-tau ₁₈₁ (pg/ml)	A β ₄₂ (pg/ml)	A β ₄₀ (pg/ml)	Ratio A β ₄₂ /A β ₄₀
MA	52 / 47	68,3 ± 11,9	20,1 ± 5,4	759 ± 381	106 ± 37	381 ± 173	14045 ± 6365	0,030 ± 0,011
OD	57 / 46	69,0 ± 10,2	22,6 ± 4,5	421 ± 778	53 ± 23	573 ± 253	10786 ± 5040	0,060 ± 0,030
ND	30 / 19	67,9 ± 12,8	22,1 ± 4,9	188 ± 65	37 ± 10	509 ± 251	7501 ± 4147	0,072 ± 0,020
DCL	10 / 19	72,8 ± 9,4	22,3 ± 4,6	339 ± 145	58 ± 23	543 ± 186	12219 ± 4062	0,049 ± 0,024
DFT	27 / 13	66,9 ± 11,7	22,0 ± 4,6	271 ± 139	48 ± 20	575 ± 235	9298 ± 4205	0,071 ± 0,035
PSP	3 / 4	68,4 ± 6,4	25,4 ± 5,3	194 ± 102	36 ± 13	692 ± 274	10258 ± 4319	0,069 ± 0,015
DCB	10 / 4	69,5 ± 7,3	24,1 ± 2,9	311 ± 151	58 ± 19	588 ± 348	12150 ± 8169	0,054 ± 0,031
MCJ	2 / 1	57,4 ± 5,6	19 ± 7,1	4704 ± 1211	100 ± 24	855 ± 87	14041 ± 2084	0,062 ± 0,009

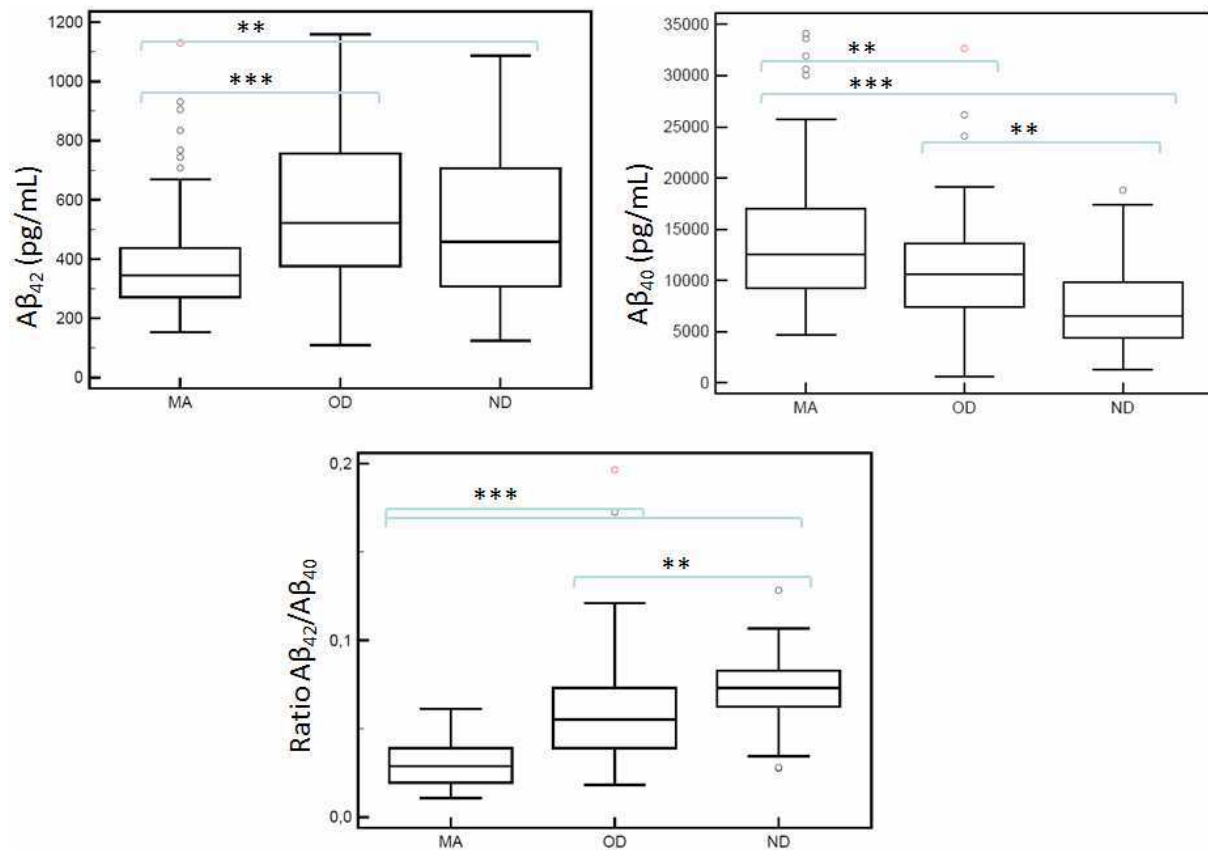


Figure 25. Comparaison des concentrations des peptides $A\beta_{42}$ et $A\beta_{40}$ dans le LCR ainsi que du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ entre les patients atteints par une maladie d'Alzheimer et ceux atteints par une autre démence. Boites à moustaches montrant les concentrations (médianes et percentiles) dans le LCR des peptides $A\beta_{42}$ et $A\beta_{40}$ et des ratios $A\beta_{42}/A\beta_{40}$. MA : maladie d'Alzheimer ; DCL : démence à corps de Lewy ; DFT : démence frontotemporale ; DCB : dégénérescence corticobasale ; MCJ ; maladie de Creutzfeldt-Jakob ; PSP : paralysie supranucléaire progressive ; *** : $p < 0.0001$; ** : $p < 0.01$.

Une augmentation de la concentration du peptide $A\beta_{40}$ à été observée dans la MA par rapport aux OD ($p < 0.01$) et ND ($p < 0.0001$) (Figure 25). Le ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ est plus bas chez les patients atteints par la MA que chez les patients ND ($p < 0.0001$) et OD ($p < 0.0001$). De plus, ce ratio est légèrement diminué chez les patients OD par rapport aux ND ($p < 0.01$).

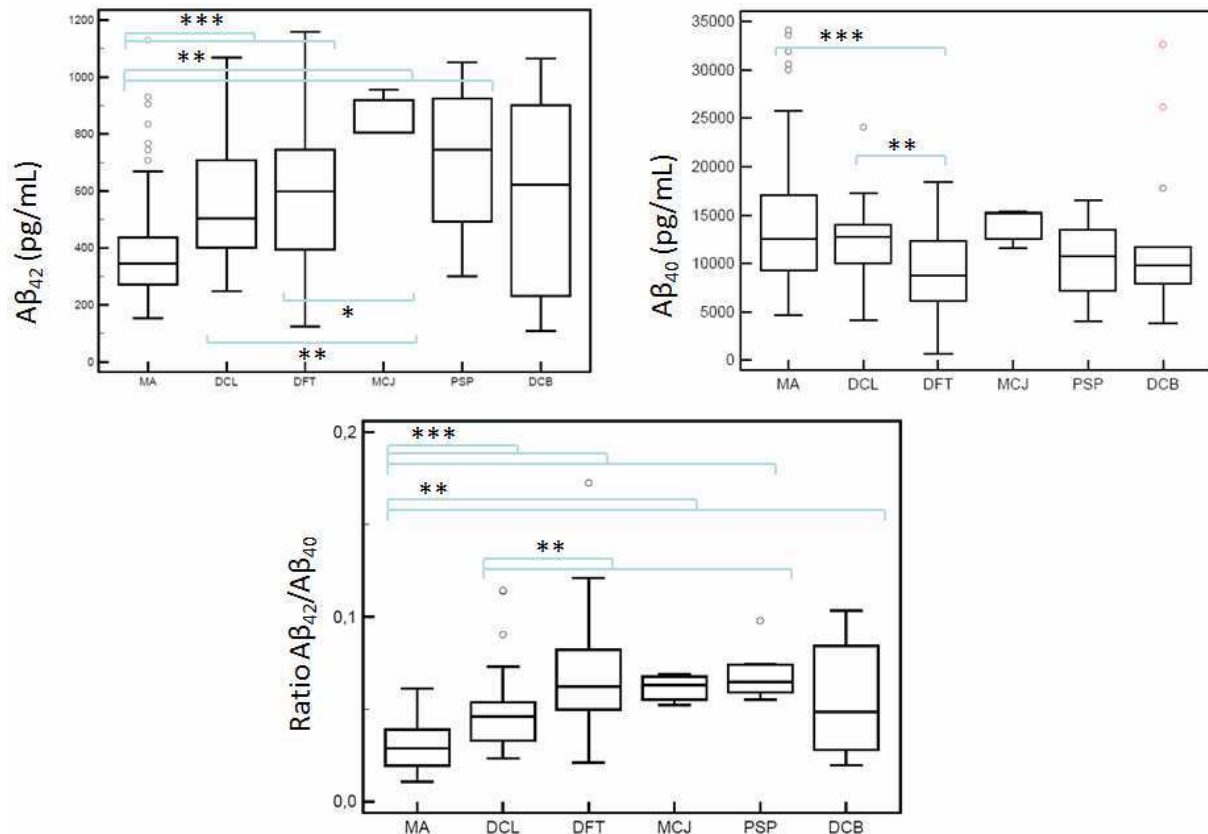


Figure 26. Comparaison des concentrations des peptides $A\beta_{42}$ et $A\beta_{40}$ dans le LCR ainsi que du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ entre les patients atteints par une MA et ceux atteints par une autre démence. Boîtes à moustaches montrant les concentrations médianes dans le LCR des peptides $A\beta_{42}$ et $A\beta_{40}$ et des ratios $A\beta_{42}/A\beta_{40}$. MA : maladie d'Alzheimer ; OD : autres démences non Alzheimer ; ND : non dégénératifs ; *** : $p < 0.0001$; ** : $p < 0.01$.

Il n'a pas été retrouvé de différence dans la concentration du peptide $A\beta_{40}$ dans le LCR entre MA, DCL, MCJ, DCB et PSP. En revanche, malgré une augmentation significative de ce peptide dans la MA par rapport à la DFT ($p < 0.0001$) ou encore dans la DCL par rapport à la DFT ($p < 0.01$), il existe un chevauchement important des valeurs entre les groupes de patients. (figure 26).

Le ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ est significativement diminué dans la MA par rapport à la DCL ($p < 0.0001$), la DFT ($p < 0.0001$), la MCJ ($p < 0.01$), la DCB ($p < 0.01$) et la PSP ($p < 0.0001$) (figure 26). Ce ratio est aussi plus bas dans la DCL par rapport à la DFT ($p < 0.01$), la PSP ($p < 0.01$) et les ND ($p < 0.0001$). Il n'a pas été observé d'autre différence significative dans le ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$.

En utilisant les courbes ROC, les protéines T-tau et p-tau₁₈₁ dans le LCR ont le meilleur pouvoir discriminant pour le diagnostic différentiel de la MA par rapport aux ND et OD (figure 27), confirmant ainsi les résultats de la première étude. En revanche le ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ permet d'améliorer considérablement le pouvoir diagnostique des peptides $A\beta_{42}$ et $A\beta_{40}$ dans le LCR. Ce ratio obtient des sensibilités et spécificités se rapprochant le plus de celles obtenues avec les protéines T-tau et p-tau₁₈₁.

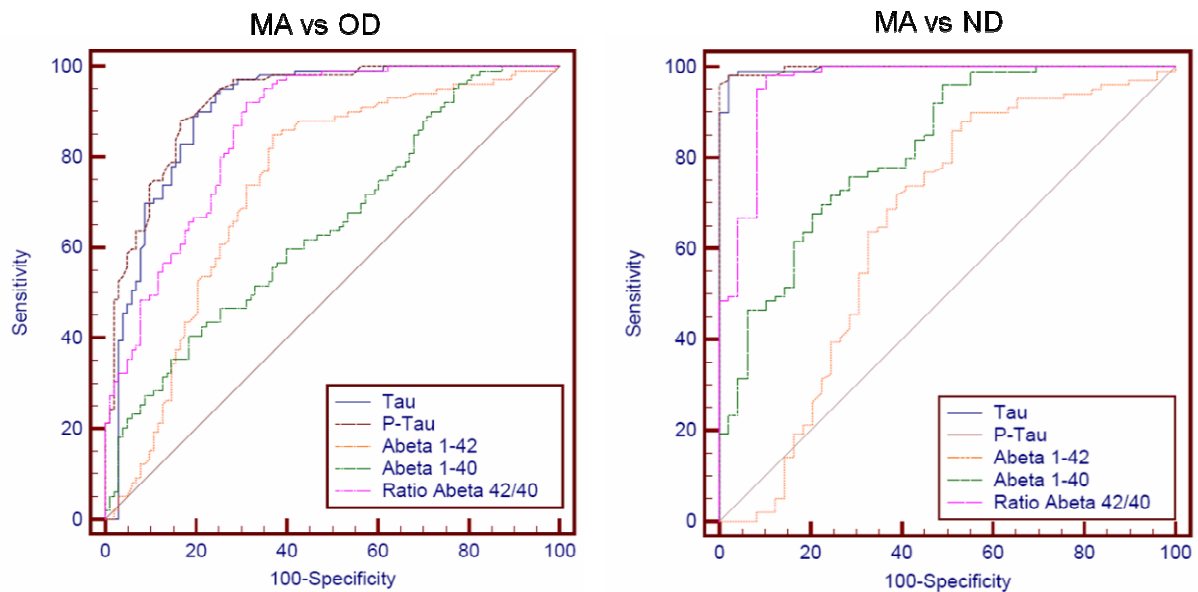


Figure 27. Courbes ROC des T-tau, p-tau₁₈₁, $A\beta_{42}$ et $A\beta_{40}$ dans le LCR ainsi que du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ dans le diagnostic différentiel de la maladie d'Alzheimer par rapport aux atteintes neurologiques non dégénérative et aux autres démences neurodégénératives.
 MA : maladie d'Alzheimer ; ND : non dégénératif ; OD : autres démences neurodégénératives ; Tau : T-tau ; P-Tau : p-tau₁₈₁ ; Abeta 1-42 : $A\beta_{42}$; Abeta 1-40 : $A\beta_{40}$; Ratio Abeta 42/40 : ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$.

Le ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ permet de distinguer une MA d'une DFT où il présente des résultats en sensibilité et spécificité équivalentes aux protéines T-tau et p-tau₁₈₁ et il permet de distinguer une MA d'une PSP et enfin de distinguer une MA d'une MCJ. En revanche, le ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ n'est pas spécifique dans la discrimination d'une MA et d'une DCL ni d'une MA et d'une DCB (figure 28).

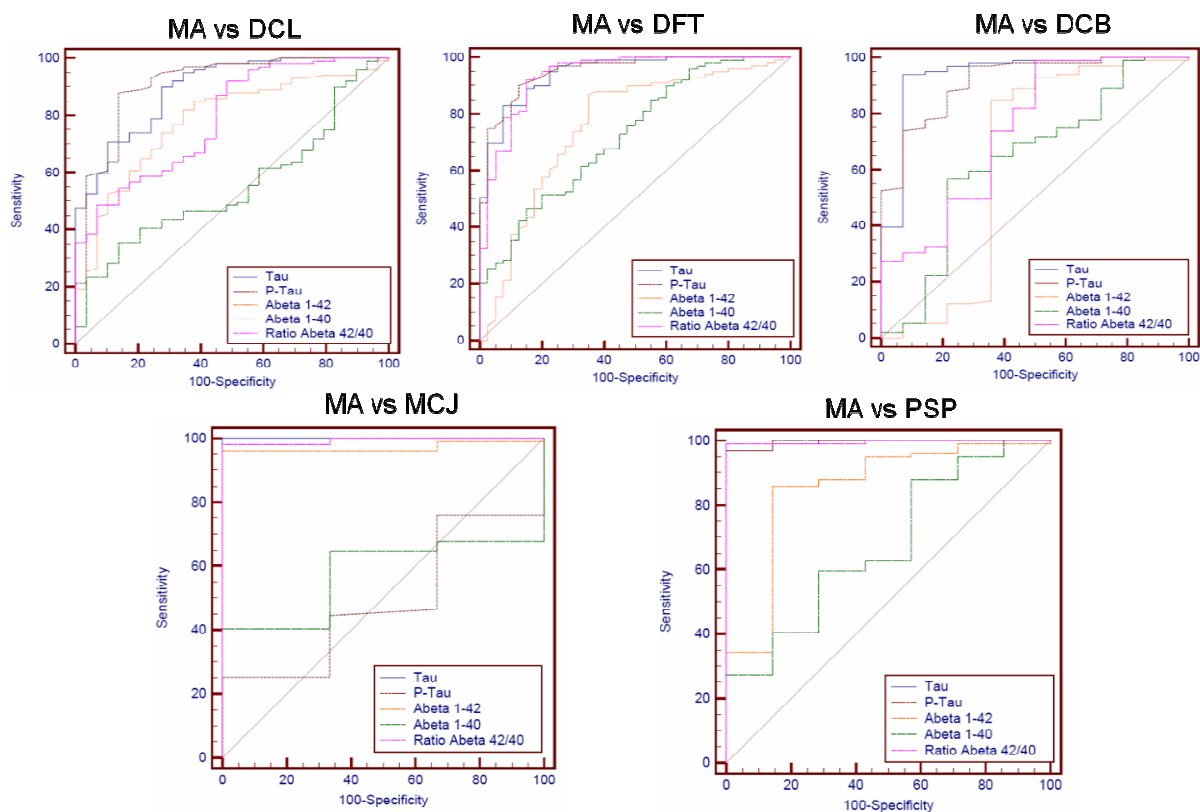


Figure 28. Courbes ROC des T-tau, p-tau₁₈₁, A β ₄₂ et A β ₄₀ dans le LCR ainsi que du ratio A β ₄₂/A β ₄₀ dans le diagnostic différentiel de la maladie d'Alzheimer par rapport à toutes les démences neurodégénératives étudiées. MA : maladie d'Alzheimer ; DCL : démence à corps de Lewy ; DFT : démence frontotemporale ; DCB : dégénérescence corticobasale ; MCJ ; maladie de Creutzfeldt-Jakob ; PSP : paralysie supranucléaire progressive ; Tau : T-tau ; P-Tau : p-tau₁₈₁ ; Abeta 1-42 : A β ₄₂ ; Abeta 1-40 : A β ₄₀ ; Ratio Abeta 42/40 : ratio A β ₄₂/A β ₄₀.

Le ratio A β ₄₂/A β ₄₀ permet avec un seuil de 0.05 de distinguer les patients MA des patients ND avec une excellente sensibilité de 98% et une spécificité de 89.8% (tableau 10). Cependant, la spécificité de ce ratio avec un seuil de 0.05 est de 60.2% dans la distinction de la MA et des OD. La discrimination de la MA et de la DFT est nettement améliorée par le ratio A β ₄₂/A β ₄₀ comparativement au peptide A β ₄₂ seul avec une sensibilité de 92 % et une spécificité de 85% avec un seuil de 0.046. De même, la distinction de la MA et de la PSP est aussi améliorée par ce ratio avec une excellente sensibilité de 99% et une spécificité de 100% au seuil de 0.054. En revanche, nous n'avons pas trouvé de seuil permettant une spécificité supérieure à 50 % pour distinguer un patient MA d'un patient DCB ou un patient DCL malgré des sensibilités élevées (99 % et 92 % respectivement à un seuil de 0.056).

Tableau 10. Meilleurs seuils des concentrations des peptides $A\beta_{42}$ et $A\beta_{40}$ dans le LCR ainsi que du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ pour le diagnostic différentiel de la maladie d'Alzheimer.

MA : maladie d'Alzheimer ; ND : dégénératif ; OD : autres démences non Alzheimer ; DCL : démence à corps de Lewy ; DFT : démence frontotemporale ; PSP : paralysie supranucléaire progressive ; DCB : dégénérescence corticobasale ; MCJ ; maladie de Creutzfeldt-Jakob ; Se : sensibilité ; Sp : spécificité ; AUC : aire sous la courbe ; > : supérieure ; < = : inférieure ou égale.

	$A\beta_{42}$				$A\beta_{40}$				Ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$			
	Cut-off	Se	Sp	AUC	Cut-off	Se	Sp	AUC	Cut-off	Se	Sp	AUC
MA vs ND	<=479	85,9	49	0,652	>10038	67,7	79,6	0,818	<=0,05	98	89,8	0,963
MA vs OD	<=476	84,8	63,1	0,736	>14152	40,4	81,6	0,647	<=0,05	98	60,2	0,86
MA vs DCL	<=464	81,8	65,5	0,781	>15097	35,4	86,2	0,551	<=0,0457	91,9	51,7	0,786
MA vs DFT	<=497	86,9	65	0,758	>12436	51,5	80	0,724	<=0,0457	91,9	85	0,937
MA vs PSP	<=479	85,9	85,7	0,853	>11486	59,6	71,4	0,675	<=0,0541	99	100	0,996
MA vs DCB	<=476	84,8	64,3	0,633	>11759	56,6	78,6	0,637	<=0,0559	99	50	0,744
MA vs MCJ	<=768	96	100	0,97	<11426	44	100	0,576	<=0,05	98	100	0,993

Ces résultats permettent de proposer le seuil le plus performant pour le ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ lors du diagnostic différentiel de la MA : $A\beta_{42}/A\beta_{40} < 0.05$. Nous conservons les seuils déterminés plus haut pour les marqueurs utilisés en routine : T-tau > 350 pg/mL, p-tau₁₈₁ > 60 pg/mL et $A\beta_{42} < 500$ pg/mL.

L'utilisation du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ augmente considérablement le pouvoir du diagnostic biologique dans cette population avec une sensibilité de 96% dans la distinction de la MA des autres démences neurodégénératives ainsi que des pathologies ND (tableau 11). La spécificité de cette association de marqueurs biologiques dans la distinction de la MA et des ND, de la PSP ou encore de la MCJ est de 100%. Cette association obtient une spécificité de 88.3% dans la distinction de la MA et des OD. De même elle permet des spécificités de 82.8%, 92.5% et 85.7% pour la discrimination de la MA de pathologies comme la DCL, la DFT et la DCB respectivement.

Tableau 11. Performance diagnostique de l'association des protéines T-tau, p-tau₁₈₁ et du ratio A β ₄₂/A β ₄₀ pour le diagnostic différentiel de la maladie d'Alzheimer. MA : maladie d'Alzheimer ; ND : dégénératif ; OD : autres démences non Alzheimer ; DCL : démence à corps de Lewy ; DFT : démence frontotemporale ; PSP : paralysie supranucléaire progressive ; DCB : dégénérescence corticobasale ; MCJ ; maladie de Creutzfeldt-Jakob ; Se : sensibilité ; Sp : spécificité.

	Association de T-tau, p-tau ₁₈₁ , ratio A β ₄₂ /A β ₄₀	
	Se	Sp
MA vs ND	96	100
MA vs OD	96	88,3
MA vs DCL	96	82,8
MA vs DFT	96	92,5
MA vs PSP	96	100
MA vs DCB	96	85,7
MA vs MCJ	96	100

2.3 Évaluation de la performance du dosage des biomarqueurs du LCR lors de présentations cliniques focales de démences neurodégénératives

L'évolution de la performance diagnostique est présentée par syndromes cliniques sur la population de 272 patients décrite précédemment et sélectionnée en fonction de leurs troubles inauguraux.*

2.3.1 Syndrome Amnésique

Les patients présentant un syndrome amnésique ont été cliniquement diagnostiqués atteints d'une MA probable dans 75% des cas et d'une MA possible dans 8% des cas (figure 29). Neuf pour cents des patients ayant ce syndrome ont été diagnostiqués ND et 1% des patients amnésiques ont été étiquetés comme atteints d'une démence vasculaire ou d'une MCJ. On retrouve 67% de ces patients amnésiques avec une biologie du LCR compatible avec une MA et 23% avec une biologie atypique. Enfin, 10 % de ces patients ont une biologie du LCR normale.

* Cf. 1.1.3 Patients pour l'évaluation de la performance du dosage des marqueurs du LCR lors de présentations focales de démences neurodégénératives au sein de cette partie.

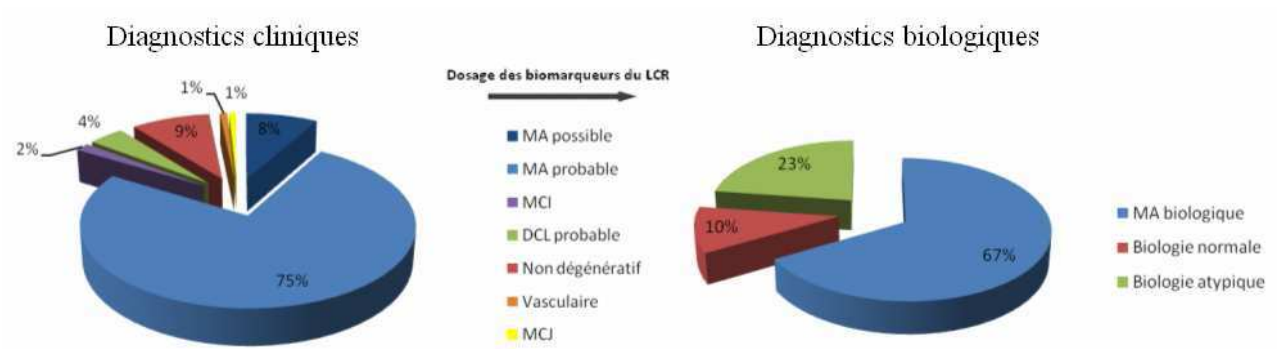


Figure 29. Distributions des diagnostics cliniques et biologiques des patients présentant un syndrome amnésique. MA : maladie d'Alzheimer ; MCI : trouble cognitif léger ; DCL : démence à corps de Lewy ; MCJ : maladie de Creutzfeldt-Jakob ; LCR : liquide céphalorachidien.

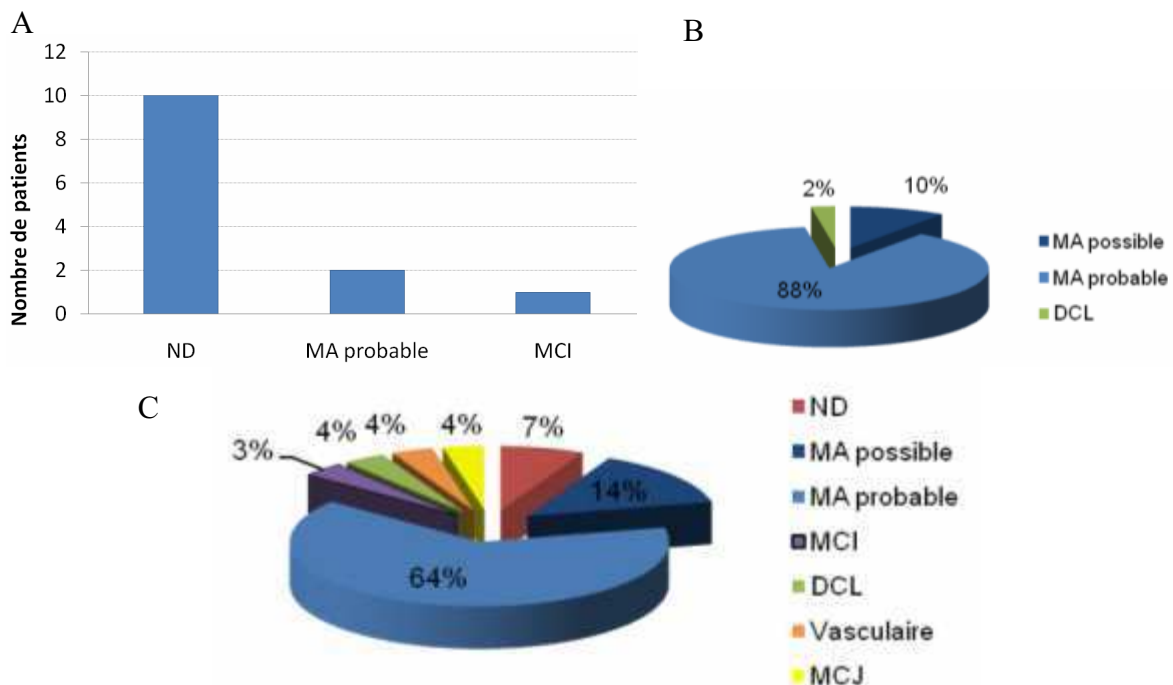


Figure 30. Répartition des diagnostics cliniques des patients amnésiques avec une biologie du LCR normale (A), typique de la maladie d'Alzheimer (B) ou atypique (C). ND : non dégénératif ; MA : maladie d'Alzheimer ; MCI : troubles cognitifs légers ; DCL : démence à corps de Lewy ; MCJ : maladie de Creutzfeldt-Jakob.

En ce qui concerne les diagnostics cliniques corrélés aux 3 statuts biologiques, nous constatons que 88% des patients avec une biologie du LCR typique de la MA ont été diagnostiqués atteints par une MA probable et 10% par une MA possible (figure 30 B). Les patients avec une biologie du LCR normale sont une majorité (10 patients sur 13) à avoir eu

un diagnostic de pathologie ND (figure 30 A). Les patients avec une biologie atypique quant à eux restent une majorité à avoir eu un diagnostic de MA avec 78% de MA probables et possibles (figure 30 C).

2.3.2 Syndrome frontal

Le diagnostic des patients présentant un syndrome frontal est une MA probable dans 31% des cas et une MA possible dans 4% des cas (figure 31). De même, 32% de ces patients avec un syndrome frontal ont été diagnostiqués souffrant d'une DFT probable et 13% d'une DFT possible. Le diagnostic d'une pathologie mixte DFT-SLA a été porté dans 9% des cas et 4% sont atteints d'une DCL. On retrouve une MA biologique dans 31% des cas et 44% des patients frontaux ont une biologie du LCR atypique. De plus, 25% des patients avec ce syndrome ont une biologie du LCR normale.

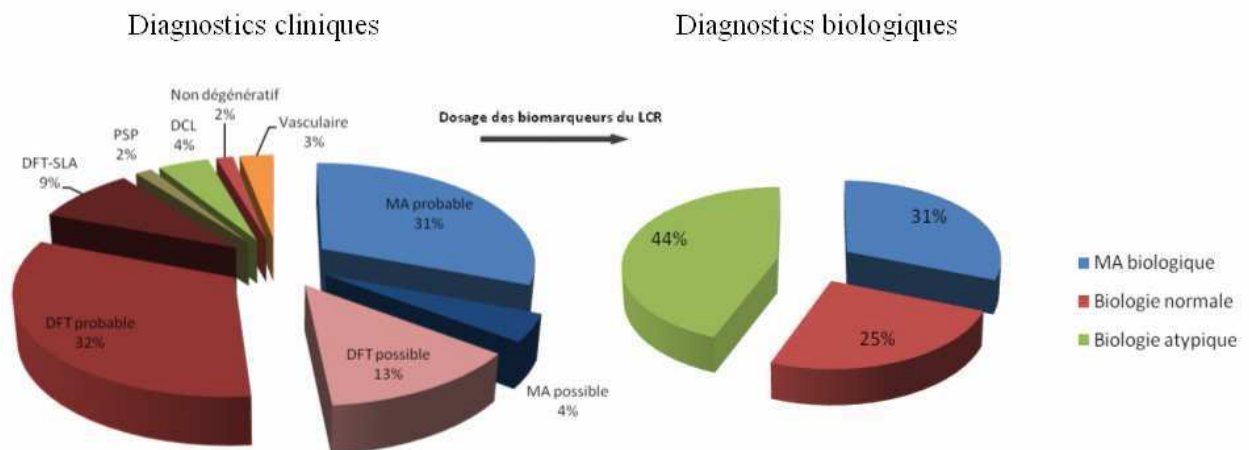


Figure 31. Distributions des diagnostics cliniques et biologiques des patients présentant un syndrome frontal. MA : maladie d'Alzheimer ; DFT : démence frontotemporale ; DFT-SLA : démence frontotemporale associée à une sclérose latérale amyotrophique ; PSP : paralysie surpanucléaire progressive ; DCL : démence à corps de Lewy ; LCR : liquide céphalorachidien.

D'un point de vu clinique, les patients diagnostiqués comme souffrant d'une DFT probable ont majoritairement une biologie du LCR atypique (14 patients sur 28) ou normale (12 patients sur 28) (figure 32). De plus les patients diagnostiqués atteint d'une MA ont une biologie du LCR typique de la MA chez 19 patients sur 21.

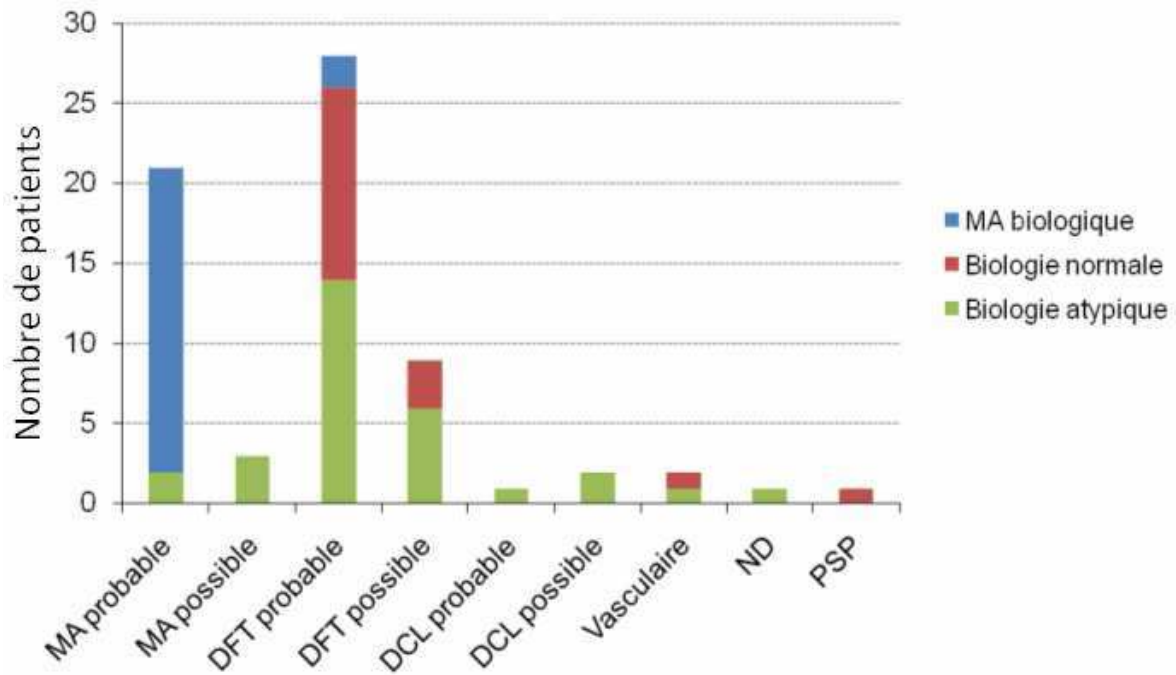


Figure 32. Confrontation des diagnostics cliniques et biologiques chez les patients présentant un syndrome frontal. MA : maladie d’Alzheimer ; DFT : démence frontotemporale ; DCL : démence à corps de Lewy ; ND : non dégénératif ; PSP : paralysie supranucléaire progressive.

2.3.3 Syndrome aphasique

Les patients présentant une aphasie ont été diagnostiqués cliniquement comme atteints par une MA probable dans la moitié des cas et par une MA possible dans 6% des cas (figure 33). Trente cinq pour cents des patients avec un syndrome aphasique ont été diagnostiqués atteints par une DLFT. De plus, 3% des patients aphasiques ont une DCL possible, une démence vasculaire ou n’ont pas de processus dégénératifs.

Au sein des syndromes aphasiques on retrouve une majorité de patients atteints par une APP (76%), les démences sémantiques et aphasies logopéniques représentant 15% et 9% respectivement (figure 34). Les patients avec une APP ont une biologie du LCR compatible avec la MA dans 50% des cas et des marqueurs du LCR atypiques dans 38% des cas. Une biologie normale est retrouvée dans 12% des cas. Quatre patients sur les 5 présentant une démence sémantique ont une biologie typique de la MA et 1 patient a des marqueurs du LCR normaux. En ce qui concerne les aphasies logopéniques, 1 patient a les marqueurs du LCR positifs pour la MA, 1 patient a une biologie atypique et 1 patient ne présente pas d’anomalie biologique des marqueurs du LCR.

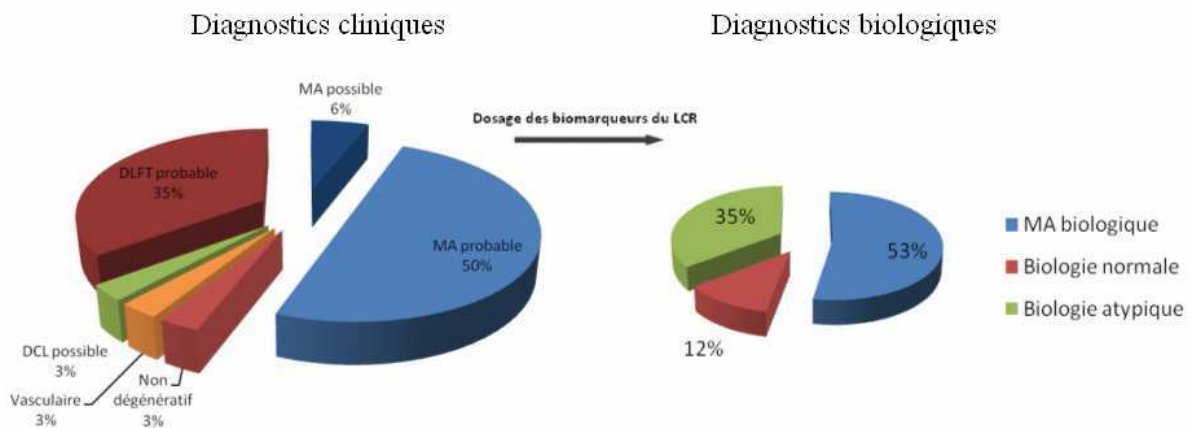


Figure 33. Distributions des diagnostics cliniques et biologiques des patients présentant une aphasie primaire progressive. MA : maladie d’Alzheimer ; DLFT : dégénérescence lobaire frontotemporale ; DCL : démence à corps de Lewy ; LCR : liquide céphalorachidien.

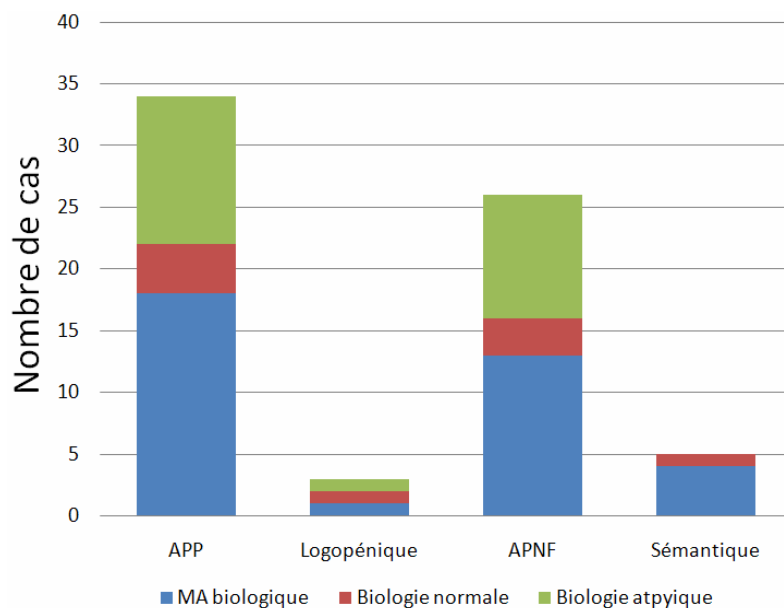


Figure 34. Répartition des profils biologiques au sein des différentes populations aphasiques. MA : maladie d’Alzheimer ; APP : aphasie primaire progressive ; Logopénique : aphasie logopénique ; APNF : aphasie progressive non fluente ; Sémantique : démence sémantique.

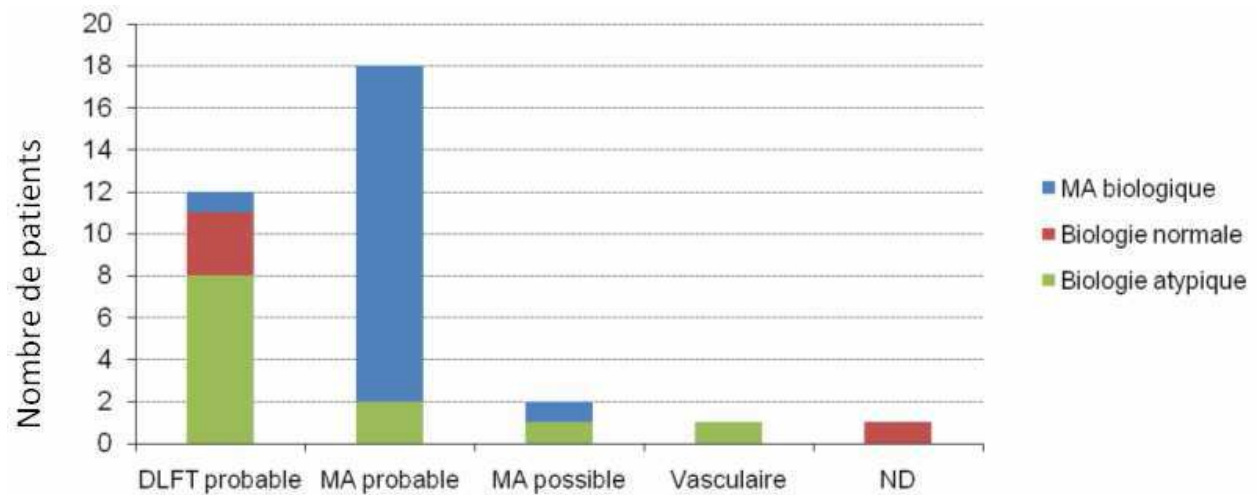


Figure 35. Confrontation des diagnostics cliniques et biologiques chez les patients présentant un syndrome aphasique. DLFT : dégénérescence lobaire frontotemporale ; MA : maladie d’Alzheimer ; ND : non dégénératif.

Une biologie du LCR typique de la MA est retrouvée pour 16 patients sur 18 diagnostiqués atteints par une MA probable. (figure 35). De plus, une majorité des patients diagnostiqués souffrant d’une DLFT sont retrouvés atypiques pour les biomarqueurs du LCR.

2.3.4 Syndrome corticobasal

Le diagnostic de DCB a été porté chez 63% des patients présentant un SCB et 37% ont été diagnostiqués atteints de MA (figure 36). On retrouve 37% des patients avec un SCB ayant une biologie du LCR typique de la MA et 44% avec des biomarqueurs atypiques. Dix-neuf pour cent des patients inaugurant leurs troubles avec un SCB ont une biologie du LCR normale.

Une biologie typique de la MA dans le LCR est retrouvée chez la totalité des patients diagnostiqués atteints d’une MA chez les patients présentant un SCB (figure 37). Les patients diagnostiqués atteints d’une DCB ont des biomarqueurs atypiques pour la plupart d’entre eux (7 patients sur 10).

Diagnosics cliniques

Diagnosics biologiques



Figure 36. Distributions des diagnostics cliniques et biologiques des patients présentant un syndrome corticobasal. MA : maladie d'Alzheimer, DCB : dégénérescence corticobasale ; LCR : liquide céphalorachidien.

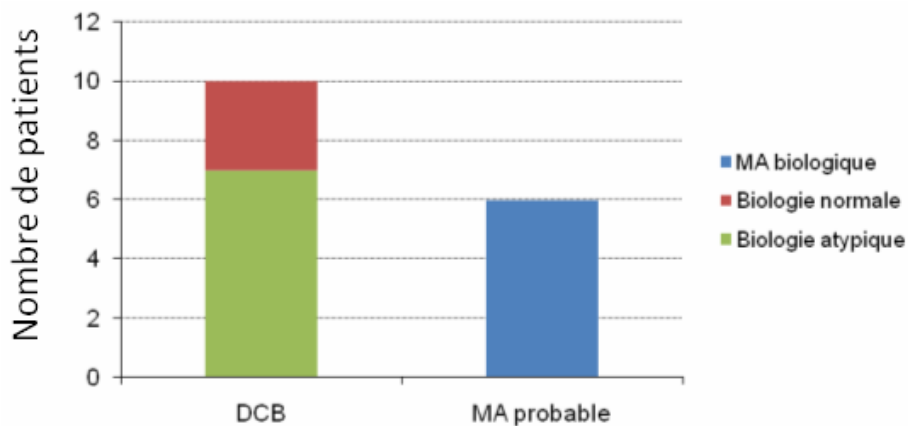


Figure 37. Confrontation des diagnostics cliniques et biologiques chez les patients présentant un syndrome corticobasal. MA : maladie d'Alzheimer ; DCB : dégénérescence corticobasale.

2.3.5 Syndrome de Benson

Les patients présentant une ACP ont été cliniquement diagnostiqués comme atteints d'une MA dans 83% des cas, d'une DCB dans 13% des cas et d'une DCL dans 4% dans cas (figure 38). Soixante quatorze pour cents des patients présentant ce syndrome ont des concentrations des biomarqueurs du LCR compatibles avec une MA. De plus, 22% de ces patients ont une biologie du LCR atypique et 4% d'entre eux présentent une biologie du LCR normale.

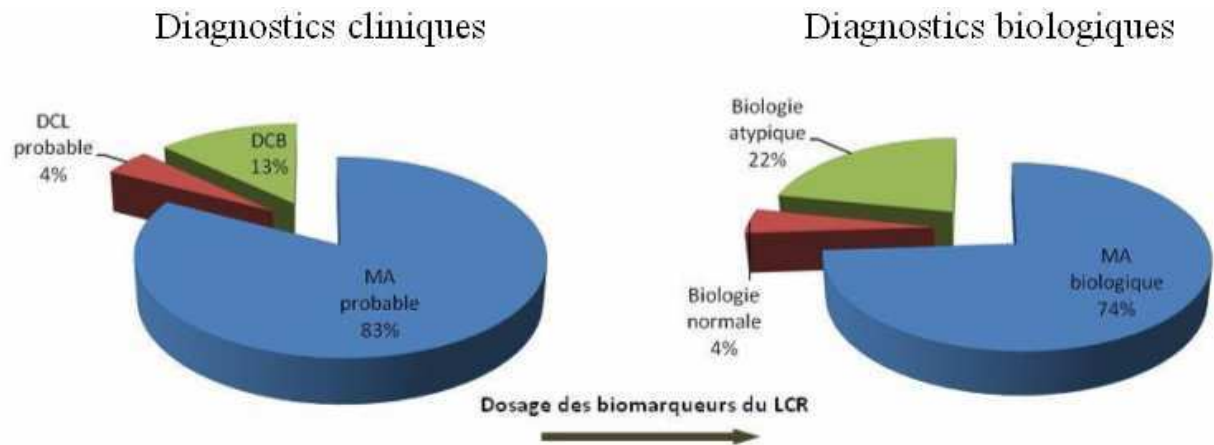


Figure 38. Distributions des diagnostics cliniques et biologiques des patients présentant une atrophie corticale postérieure. MA : maladie d’Alzheimer ; DCL : démence à corps de Lewy ; DCB : dégénérescence corticobasale ; LCR : liquide céphalorachidien.

Une biologie typique de la MA est retrouvée dans une majorité des patients ayant reçu le diagnostic clinique de MA chez les patients avec une ACP (figure 39). Un patient sur les 3 qui ont été diagnostiqués atteints par une DCB a une biologie du LCR typique de la MA.

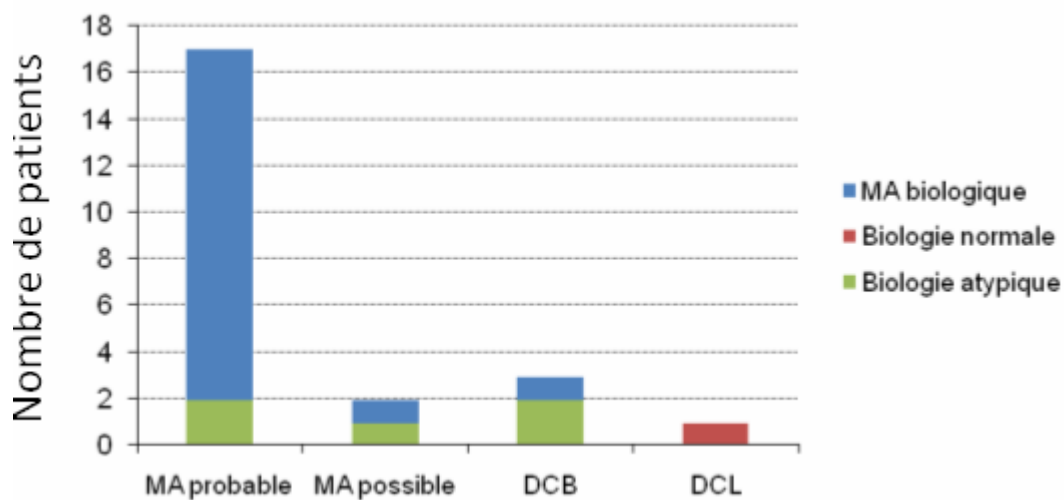


Figure 39. Confrontation des diagnostics cliniques et biologiques chez les patients présentant une atrophie corticale postérieure. MA : maladie d’Alzheimer ; DCB : dégénérescence corticobasale ; DCL : démence à corps de Lewy.

2.3.6 Syndrome de PSP

La totalité des patients présentant un SPSP ont été diagnostiqués atteints d'une PSP (données non montrées). On retrouve 72 % des patients avec une biologie normale et 14% avec des biomarqueurs atypiques ou une biologie du LCR typique de la MA (figure 40).

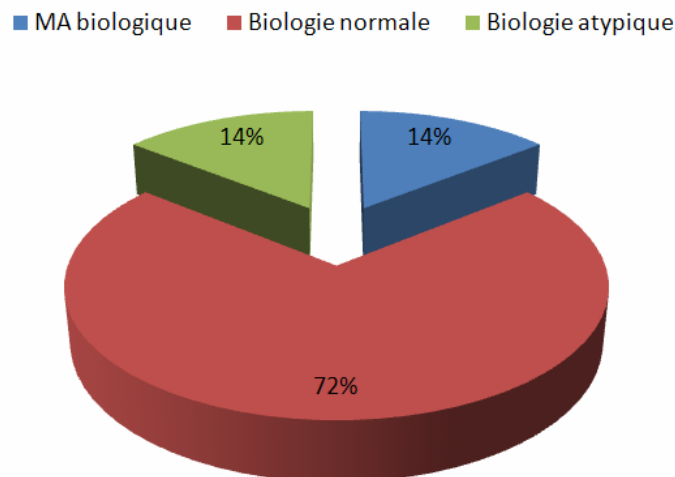


Figure 40. Distributions des diagnostics biologiques des patients présentant un syndrome de paralysie supranucléaire progressive. MA : maladie d'Alzheimer.

3 DISCUSSION

3.1 Validation des seuils des biomarqueurs du LCR utilisés en routine pour le diagnostic différentiel de la maladie d'Alzheimer

Nous avons évalué l'intérêt diagnostique des marqueurs biologiques utilisés en routine au sein du Laboratoire de Neurobiologie du Groupement Hospitalier Est. Au sein de la population de patients étudiée, des différences significatives ont été observées dans les concentrations intrathécales de ces biomarqueurs du LCR : concentrations des protéines T-tau et p-tau₁₈₁ augmentées et du peptide A β ₄₂ diminuée dans la MA par rapport aux OD ainsi qu'aux patients sans atteinte neurodégénérative. Ces résultats sont en accords avec les études précédentes étudiant la concentration de ces biomarqueurs dans le LCR.^{347, 350, 363} En utilisant les seuils que nous avons établis, les marqueurs biologiques du LCR utilisés en routine (T-tau, p-tau₁₈₁ et A β ₄₂) permettent de diagnostiquer une MA avec une sensibilité et 81% et une excellente

spécificité (100%) face à des patients sans processus neurodégénératifs ou atteints de PSP (tableau 8).

Il est à noter que la spécificité des marqueurs biologiques est égale ou dépasse les 85% quand il s'agit de distinguer un patient avec une MA de patients atteints de DFT, de DCL et même de MCJ. En revanche, la distinction des patients atteints par une MA de ceux atteints par la DCB obtient une spécificité modeste de 61.5%.

Le diagnostic clinique de la MA obtient une sensibilité de 80% et une spécificité de 70%.⁸ Ces faibles performances sont en partie inhérentes à la prévalence de présentations cliniques et la variabilité interindividuelle dans la traduction clinique des lésions cérébrales.⁵⁹ L'examen morphologique (IRM) contribue à améliorer considérablement cette performance diagnostique.¹⁸ De même, les résultats obtenus avec les biomarqueurs du LCR utilisés en routine permettent donc d'augmenter considérablement la précision du diagnostic de la MA (tableau 8). La modeste performance des biomarqueurs du LCR de routine obtenus dans la distinction de la MA et de la DCB s'explique essentiellement par l'hétérogénéité neuropathologique d'une entité clinique plus proche d'un syndrome que d'une maladie. Nous en discuterons plus loin dans la partie concernant les syndromes.

De façon générale, les performances du dosage du peptide $A\beta_{42}$ seul pour le diagnostic différentiel de la MA restent très modestes par rapport aux protéines T-tau et p-tau₁₈₁ évaluées isolément (tableau 7). Les spécificités du dosage de ce peptide pour distinguer une MA d'une DCL ou d'une DFT sont de 50.9% et 63.2% respectivement. De même, sa spécificité pour la distinction biologique d'une MA et d'une OD ou d'une ND ne dépasse pas 53% et 65% respectivement. Ces mauvaises spécificités pourraient être en rapport avec la coexistence fréquentes de dépôts amyloïdes et d' α -Syn retrouvés chez les patients atteints par une DCL³⁷ ou encore la présence de PS chez les sujets âgés sans atteintes neurologiques pouvant expliquer ces résultats chez les ND.²⁸⁸ De la même façon, la mauvaise spécificité du peptide $A\beta_{42}$ pour distinguer une MA d'une DFT pourrait être en rapport avec l'hétérogénéité neuropathologique de la DFT puisque près de 20% des patients cliniquement diagnostiqués atteints d'une DFT sont des MA confirmées neuropathologiquement.⁹⁸

Pour différencier MCJ et MA, en prenant un seuil de 60-63 pg/ml, pour une sensibilité à 85%, la spécificité est très médiocre (60 %) (figure 24). Au sein de la population de patients

atteints par une MCJ, certains patients (6) présentaient des concentrations intrathécales en protéine p-tau₁₈₁ élevées (au dessus du seuil de 60 pg/mL). Ces résultats pourraient s'expliquer par des lésions faisant intervenir les protéines tau hyperphosphorylées, telles que les DNF notamment. En effet de telles lésions tauopathiques ont été retrouvées neuropathologiquement dans certains cas génétiques de MCJ.^{173, 494} Une concentration élevée dans le LCR de p-tau₁₈₁ chez des patients MCJ pourrait témoigner de la présence de ces lésions. Néanmoins, il n'a jamais été rapporté de tauopathies dans des cas de MCJ sporadiques à notre connaissance. Quoiqu'il en soit, l'utilisation du ratio T-tau/p-tau₁₈₁ permet de distinguer les patients atteints par une MA de ceux atteints par une MCJ avec d'excellentes sensibilités et spécificités surpassant les 3 marqueurs du LCR. Ces résultats sont en accord avec les premières observations effectuées sur ce ratio qui s'avère une aide diagnostique intéressante pour distinguer biologiquement une MA d'une MCJ.⁴⁵⁶

Enfin, l'utilisation de l'association de ces marqueurs du LCR permet une aide importante pour le diagnostic de la MA. Néanmoins, la modeste performance diagnostique du dosage du peptide A β ₄₂ dans le LCR pour la majorité des diagnostics différentiels est une limite. Un marqueur biologique plus fiable pouvant témoigner d'une pathologie amyloïde a donc été évalué.

3.2 Analyse de la performance diagnostic du dosage du peptide A β ₄₀ dans le LCR et du ratio A β ₄₂/A β ₄₀ associé au dosage des protéines T-tau et p-tau₁₈₁

La charge totale en peptide A β dans le LCR est consécutive à la production cérébrale de ce peptide. Selon certaines études, il n'y a pas d'altération de cette charge totale dans la MA ou les autres maladies neurodégénératives.³⁵¹ Chez les patients hautement producteurs de ce peptide, la concentration intrathécale en A β ₄₂ est augmentée par rapport à la moyenne des concentrations retrouvées dans la population générale. De tels patients atteints de MA auront donc une concentration en A β ₄₂ dans le LCR normale par rapport au seuil choisi. De la même façon, les sujets hypoproducteurs de ce peptide auront des concentrations en A β ₄₂ plus basses dans le LCR. Ces variations interindividuelles peuvent favoriser des erreurs d'interprétation diagnostique, une diminution de la concentration du peptide A β ₄₂ pouvant témoigner d'une pathologie amyloïde mais aussi d'une hypoproduction constitutive de ce peptide.

Le peptide $A\beta_{40}$ est la forme majoritairement produite par la voie amyloïdogène et consécutivement la plus représentée dans le LCR. Sa concentration intathéciale surpasse très largement celles des peptides $A\beta_{42}$ et $A\beta_{38}$ et il a été considéré qu'elle était une approche fiable de la charge totale en peptide $A\beta$ dans ce fluide biologique.³⁹⁹ Le dosage du peptide $A\beta_{40}$ dans le LCR permet de palier à cette limite en considérant la charge totale d' $A\beta$ dans le LCR, et donc l'activité de production cérébrale de ce peptide.

Au sein de la population de patients étudiée, la performance du dosage de l' $A\beta_{42}$ est faible pour tous les diagnostics différentiels (tableau 10). Aux vues des très modestes performances diagnostiques de l' $A\beta_{40}$, en terme de sensibilité mais aussi de spécificité (tableau 10), ce dosage considéré isolément ne semble pas montrer d'intérêt pour le diagnostic différentiel de la MA. L'intérêt du ratio des concentrations des peptides $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ a donc été évalué. Il permet d'identifier les patients atteints de MA par rapport aux patients sans maladie neurodégénérative avec une excellente sensibilité de 98% et une spécificité d'environ 90%. De même il montre de bonnes performances dans la distinction de la MA et de la DFT. Les bons résultats obtenus avec la PSP et la MCJ sont à confirmer avec un nombre plus important de patients du fait de notre faible effectif dans cette population (7 patients atteints de PSP et 3 patients avec une MCJ) (tableau 9). L'amélioration de l'efficacité diagnostique entre MA et ND ou DFT du fait de l'utilisation du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ par rapport au dosage seul du peptide $A\beta_{42}$ s'explique par la détection dans la population MA de quelques patients ayant une charge amyloïde importante et à l'inverse, de la présence de quelques patients ayant une charge amyloïde faible dans les populations ND et DFT

Le ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ obtient de mauvaises spécificités dans la discrimination de la MA et de la DCL ainsi que de la MA et de la DCB (spécificités d'environ 50%), faisant chuter la spécificité de ce ratio pour la distinction de la MA et des OD (tableau 10). Dans notre étude, la population DCL est fortement productrice de peptides amyloïdes ce qui explique le manque de spécificité obtenue entre MA et DCL. Comme cela avait été évoqué avec les résultats obtenus avec le dosage du peptide amyloïde $A\beta_{42}$, cette baisse de spécificité du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ s'expliquerait volontiers par la présence fréquente de dépôts amyloïdes intracérébraux chez les patients atteints par une DCL.³⁷ Enfin, l'hétérogénéité neuropathologique vue dans les DCB expliquerait principalement la mauvaise spécificité du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ obtenue entre MA et DCB, confirmant les résultats obtenus avec le seul dosage du peptide $A\beta_{42}$.⁴⁹⁵

Nous avons déterminé le seuil du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ (<0.05) et montré son intérêt en association avec les protéines T-tau et p-tau₁₈₁. La performance de ces marqueurs biologiques du LCR est considérablement améliorée comparativement à la population précédente (avec le dosage des protéines T-tau et p-tau₁₈₁ et $A\beta_{42}$). La sensibilité passant de 81% (tableau 8) pour les biomarqueurs de routine à 96% (tableau 11) pour l'association des T-tau, p-tau₁₈₁ et du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$. De même, les spécificités sont considérablement améliorées pour tous les diagnostics différentiels étudiés hormis pour la discrimination de la MA et de la DCL qui conserve tout de même une spécificité acceptable de 82.8% (tableau 11). L'utilisation du dosage des protéines T-tau, p-tau₁₈₁ et du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ dans le LCR augmente donc la performance du diagnostic différentiel de la MA et permet de donner des arguments biologiques plus fiables en faveur d'une MA. Ces dosages apparaissent particulièrement intéressants afin d'identifier les patients atteints de MA, notamment pour le diagnostic des formes cliniques atypiques. Ainsi, nos résultats nous ont conduit à étudier ces biomarqueurs lors de présentations cliniques focales, puisqu'ils permettraient de présager de la neuropathologie sous-jacente.³⁴⁴

3.3 Évaluation de la performance des biomarqueurs du LCR lors de présentations focales de démences neurodégénératives

La MA se caractérise typiquement par des troubles mnésiques au premier plan du tableau clinique. Cette présentation clinique, est rencontrée majoritairement chez les patients atteints. Néanmoins d'autres modes d'entrées dans la maladie sont rencontrés et un certain recouvrement clinique existe avec les DLFT, la DCB, la PSP ou encore la DCL.^{98, 100, 138, 148} Ces recouvrements cliniques peuvent être dus à des co-pathologies neurodégénératives mais aussi à des profils lésionnels de la MA débutant dans d'autres territoires cérébraux.¹⁶ On peut ainsi définir 5 grands syndromes par lesquelles la MA peut débiter : le syndrome amnésique typiquement rencontré au début de la maladie, le syndrome frontal, le syndrome aphasique, l'ACP, le SCB. Les patients que nous avons étudiés ont été classés en fonction du syndrome par lequel ont débuté leurs pathologies. Nous y avons adjoint une petite cohorte de patients présentant un SPSP, sachant qu'il existe plusieurs types de lésions neuropathologiques responsables de cette symptomatologie. Le dosage des concentrations intrathécales des protéines T-tau, p-tau₁₈₁ et du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ nous ont ensuite permis d'identifier les patients

atteints présentant un profil biologique MA et de confronter ces résultats avec les diagnostics cliniques obtenus au cours du suivi de ces patients.

Le syndrome amnésique est le syndrome inaugural le plus couramment rencontré dans la MA. Il est dû à l'apparition de lésions cérébrales au niveau du lobe temporal interne et plus particulièrement de l'hippocampe. Seuls 10% des patients ont des biomarqueurs du LCR normaux ne donnant pas d'argument pour une MA (figure 29). Une majorité des patients (67%) ont des biomarqueurs du LCR typiques de la MA. De façon intéressante, 83% des patients atteints par ce syndrome ont été cliniquement diagnostiqués atteints d'une MA probable ou possible. Néanmoins 23% des patients amnésiques ont une biologie du LCR atypique pour la MA. Ces atypies biologiques sont dues à 3 causes majeures : 1) une diminution isolée du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ sans élévation des concentrations intrathécales des protéines T-tau, p-tau₁₈₁ 2) une élévation des protéines T-tau, p-tau₁₈₁ dans le LCR avec un ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ normal 3) un ou deux des trois éléments à la limite des seuils utilisés. Une diminution isolée du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ au sein des biomarqueurs signe une pathologie amyloïde. Une diminution de la concentration du peptide $A\beta_{42}$ dans le LCR a été décrite chez les patients atteints par une angiopathie amyloïde, une MCJ, ou encore une DCL.^{388, 389, 496}

Ces profils biologiques atypiques pourraient être dus à ces pathologies. De plus, des variations dans les profils biologiques de MA ont été rapportés. Une étude anatomo-clinico-biologique a permis de mettre en évidence un groupe de patients atteint de MA sans diminution intrathécale du peptide $A\beta_{42}$.⁴⁷⁵ Cette observation pourrait permettre d'expliquer une élévation des protéines T-tau et p-tau₁₈₁ dans le LCR sans diminution du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$. Des concentrations à la limite des seuils utilisés ont été retrouvées chez 32% des patients avec un profil biologique atypique. Il s'agit typiquement de cas où l'utilisation des marqueurs biologiques classiques aux seuils de décision choisis, n'est pas informative pour le diagnostic.

Un tiers des patients présentant un syndrome frontal ont été diagnostiqués atteints d'une MA probable ou possible. Une plus grosse proportion (54%) a été cliniquement diagnostiquée atteint de DFT probable ou possible comprenant les formes mixtes (DFT-SLA) (figure 31). Nous avons retrouvé biologiquement un tiers des patients qui présentaient une biologie du LCR typique de la MA. Une plus grosse proportion (44%) présentent une biologie atypique pour la MA. De même, les patients avec un SCB ont été majoritairement diagnostiqués atteints d'une DCB (63%) à l'examen neurologique ainsi qu'au cours du suivi, les 37% restant

étant diagnostiqués atteints de MA (figure 36). De façon intéressante, 37% des patients présentant un SCB ont une biologie du LCR typique de la MA. Néanmoins une forte proportion (44%) de patients avec un SCB a des dosages du LCR atypiques pour la MA.

Cette hétérogénéité des profils biologiques vus dans ces deux syndromes pourrait refléter l'hétérogénéité neuropathologique des DFT et des SCB. Les pathologies neurodégénératives sous-jacentes responsables du syndrome corticobasal sont nombreuses.¹⁰¹ Une étude clinico-pathologique conduite sur 28 patients atteints par une DFT et 12 patients atteints de SCB révèle que moins de 10% de ces patients avec une DFT et la moitié des patients avec un SCB présentent une MA.¹⁶ Une tauopathie (DCB et maladie de Pick notamment) a été mise en évidence dans environ 60% des patients atteints par une DFT et 50% des patients avec un SCB.

Dans les profils dits atypiques, nous avons retrouvé des anomalies concernant les peptides amyloïdes et concernant les protéines Tau. Pour la diminution de la concentration intrathécale du peptide $A\beta_{42}$, celle-ci a déjà été rapportée chez des patients atteints par une DCB,⁴⁹⁷ diminution confirmée la plupart du temps par un résultat diminué du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$. Cette diminution pourrait être liée aux dépôts amyloïdes retrouvés neuropathologiquement dans certaines DCB confirmées.⁴⁹⁵ Une grande partie (43%) des patients biologiquement atypiques de ces populations présente une élévation des protéines T-tau et p-tau₁₈₁ dans le LCR sans diminution du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$. Certaines études ont rapporté une augmentation de la concentration intrathécale des protéines T-tau et p-tau₁₈₁ dans la DCB sans diminution de la concentration du peptide $A\beta_{42}$ dans les gammes de la MA.^{365, 497, 498} Cette atypie pourrait donc provenir d'une modification biologique inhérente aux tauopathies non Alzheimer. Cependant, une étude s'intéressant à la variation de ces biomarqueurs du LCR chez des patients atteints de DFT ou DCB confirmées neuropathologiquement paraît nécessaire afin de comprendre ce phénomène.

Enfin, un pourcentage important de ces patients, notamment les SCB, présentaient un profil typique biologique MA. Comme parfois la pathologie responsable d'un SCB est la MA.^{147, 499} ceci conforte l'hypothèse que le SCB présenté par ces patients ayant une biologie caractéristique de la MA rentre dans le cadre d'une MA sous-jacente.

La totalité des patients avec un SPSP ont été diagnostiqués atteints de PSP. Une grande proportion de ces patients (72%) ont une biologie du LCR normale, cependant les marqueurs du LCR sont typiquement MA chez 14% d'entre eux (figure 40). La proportion importante de patients avec des concentrations des biomarqueurs du LCR normales dans ce groupe semble indiquer que les lésions tauopathiques rencontrées dans la PSP (DNF et inclusions gliales) ne seraient pas responsables de changements biologiques intrathécaux. Néanmoins, aux vues de notre effectif (7 patients), ces résultats sont à confirmer sur une plus large cohorte de patients avec confirmations neuropathologiques.

Le syndrome d'APP est typiquement rencontré dans les DLFT et signe anatomiquement une atrophie temporale. On retrouve 53% de profils biologiques compatibles avec une MA au sein de la population touchée par ce syndrome (figure 33). Une majorité des patients aphasiques (56%) ont été diagnostiqués atteints d'une MA probable ou possible et 35% atteints par une DLFT. Les résultats biologiques semblent conforter le diagnostic clinique. La majorité de ces patients aphasiques avaient une présentation clinique d'APNF (figure 34). Nous avons observé une forte proportion de profils biologiques du LCR typiques de MA au sein de cette population, ce qui est en accord avec les résultats anatomopathologiques retrouvés par plusieurs études précédentes.^{16, 109, 112} Le faible effectif des variants logopénique et sémantique ne nous permet pas de conclure quant à une influence du profil biologique, et donc de la neuropathologie, sur le syndrome d'APP observé. Néanmoins, nous avons observé qu'une grande majorité des patients avec une démence sémantique (4/5) avait un profil biologique du LCR typique de la MA. Cependant, 3 patients au sein des 4 patients atypiques d'un point de vue biologique avaient une présentation clinique ne remplissant pas tout les critères pour une démence sémantique typique, avec l'apparition de légers troubles mnésiques hippocampiques notamment.⁵⁰⁰ Des études autopsiques ont rapporté une pathologie Alzheimer chez 10% à 30% des patients atteints par une démence sémantique.^{16, 109} Une étude avec confirmations neuropathologiques effectuée sur 24 patients atteints d'une démence sémantique a récemment montré la forte proportion de pathologie ubiquitine (18 patients sur 24) dans ce syndrome. Seul 3 patients avaient neuropathologiquement une MA sous jacente.⁵⁰¹ Notre proportion de biologie du LCR en faveur d'une MA chez les patients atteints du variant sémantique se doit d'être confirmée avec un plus grand nombre de patients.

Les résultats observés pour les patients avec une ACP nous indique qu'une forte proportion de ces patients ont une biologie du LCR typique de la MA (figure 38). De plus, sur les 23

patients atteints d'une ACP inclus dans l'étude, 22% ont des marqueurs du LCR atypiques. Nous avons évalué les biomarqueurs du LCR chez 22 des 23 atteints d'ACP.⁴⁴⁹ Nous remarquons que la proportion de patients atypiques est plus élevée ici avec le dosage des T-tau p-tau₁₈₁ et du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ dans le LCR. Le ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ a permis de mettre en évidence une anomalie dans les biomarqueurs du LCR que le dosage de l' $A\beta_{42}$ seul n'objectivait pas.

4 ARTICLE 1 :

Jérémie Seguin, Maité Formaglio, Armand Perret-Liaudet, Isabelle Quadrio, Yannick Tholance, Olivier Rouaud, Catherine Thomas-Anterion, Bernard Croisile, Hélène Mollion, Olivier Moreaud, Martin Salzmann, Aline Dorey, Marc Bataillard, Marie-Hélène Coste, Alain Vighetto, Pierre Krolak-Salmon

Cerebrospinal fluid biomarkers in posterior cortical atrophy.

Neurology, 2011

Résumé de l'article :

L'atrophie corticale postérieure (ACP) induit des déficits visuels au premier plan du tableau clinique par une atteinte corticale des régions cérébrales postérieures. L'ACP est un syndrome d'étiologie neurodégénérative. Plusieurs études ont révélé la présence des lésions neuropathologiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (MA) dans une proportion importante de patients atteints par une ACP. Il a été clairement démontré qu'un bilan caractéristique de la MA dans le liquide céphalorachidien (LCR) était hautement prédictif de la détection neuropathologique des lésions cérébrales rencontrées dans cette pathologie. Nous avons donc proposé de les étudier afin d'évaluer la proportion de patients atteints par une ACP avec une étiologie MA au sein de notre cohorte. Vingt deux patients présentant une ACP ont fait l'objet d'une analyse des protéines T-tau, p-tau₁₈₁ et Aβ₄₂ dans le LCR. Les profils de ces biomarqueurs du LCR ont été comparés à ceux de patients atteints par une MA ainsi que par d'autres démences neurodégénératives (OD). De plus, les présentations cliniques de chaque patient avec une ACP ont été comparées à leurs profils biologiques du LCR afin d'évaluer la prédictibilité du diagnostic clinique pour présager d'une MA sous-jacente. Il n'a pas été observé de différences dans les concentrations des 3 biomarqueurs entre les patients ACP et MA alors que les concentrations de ces biomarqueurs entre les patients ACP et OD ($p < 0.001$) sont significativement très différentes. Soixante dix sept pour cent des patients avec une ACP ont des biomarqueurs du LCR compatibles avec une MA et 14% des patients de cette cohorte ont un profil biologique du LCR atypique. Tous les patients avec des troubles visuels isolés ($n=8$) ou associés avec des troubles mnésiques ($n=11$) ont des marqueurs du LCR signant une pathologie neurodégénérative avec une très forte proportion de ces patients

pour lesquels une biologie du LCR typique de la MA a été retrouvée. De façon intéressante, seul 1 patient sur les 3 présentant des mouvements anormaux asymétriques a une biologie du LCR typiquement rencontrée dans la MA. Finalement, l'ACP est la plupart du temps associée à des biomarqueurs du LCR suggérant une MA sauf en cas de mouvements anormaux associant un syndrome corticobasal. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment décrits d'un point de vue neuropathologique. Notre étude permet de confirmer que la MA ne se résume pas forcément à une atteinte mnésique lors des stades initiaux de la maladie ou même à un déclin progressif d'une autre fonction cognitive. Ceci pose la question plus générale, que nous avons abordé en nous intéressant aux formes de présentations cliniques focales de la MA, de la différence entre « maladies » ou présentations cliniques et étiologies. Quoi qu'il en soit, les biomarqueurs du LCR nous aident à discriminer la MA des autres maladies neurodégénératives au sein des ACP et ainsi préciser l'étiologie sous-jacente du vivant du patient atteint par un tel syndrome. La connaissance d'une telle étiologie s'avère importante pour la mise en place d'un traitement, indépendamment du fait qu'il n'existe pas à notre connaissance, d'essais cliniques validant les thérapeutiques instaurées lors d'une MA dans les formes de présentations cliniques atypiques de la maladie.

CSF biomarkers in posterior cortical atrophy



J. Seguin*
M. Formaglio, MD*
A. Perret-Liaudet, MD
I. Quadrio, MD, PhD
Y. Tholance
O. Rouaud, MD
C. Thomas-Anterion,
MD, PhD
B. Croisile, MD, PhD
H. Mollion, MD
O. Moreaud, MD, PhD
M. Salzman, MD
A. Dorey, PhD
M. Bataillard, MD
M.-H. Coste, MD
A. Vighetto, MD
P. Krolak-Salmon, MD,
PhD

Address correspondence and reprint requests to Dr. Pierre Krolak-Salmon, Hôpital des Charpennes, 27 Rue Gabriel Péri, 69100 Villeurbanne, France pierre.krolak-salmon@chu-lyon.fr

Editorial, page XXX

See page XXX

Supplemental data at
www.neurology.org

ABSTRACT

Objective: To describe CSF biomarker profiles in posterior cortical atrophy (PCA), which induces high-order visual deficits often associated with Alzheimer disease (AD) pathology, and relate these findings to clinical and neuropsychological assessment.

Methods: This prospective observational study included 22 patients with PCA who underwent CSF biomarker analysis of total tau (t-tau), phosphorylated tau on amino acid 181 (p-tau181), and amyloid β ($A\beta_{42}$). At group level, the CSF profiles of patients with PCA were compared to those of patients with typical AD and patients with other dementia (OD). Individually, the clinical presentation of patients with PCA was correlated to their CSF profile to assess the predictability of clinical features for diagnosis of underlying AD pathology.

Results: At group level, the PCA biomarker profile was not different from that of the AD group, but very different from that of the OD group ($p < 0.001$). More than 90% of patients with PCA had CSF profiles consistent with AD. All patients with PCA with either isolated higher-order visual deficit ($n = 8$) or visual deficit associated with memory impairment ($n = 11$) had CSF profiles consistent with AD. Only one of the 3 patients with PCA with asymmetric motor signs fulfilled biological CSF criteria for AD.

Conclusions: PCA syndrome is usually associated with CSF biomarkers suggestive of AD, as shown by previous neuropathologic studies. This does not apply in case of motor signs suggesting associated corticobasal syndrome. CSF biomarkers help to discriminate AD from non-AD processes associated with this condition. *Neurology*® 2011;76:1-1

GLOSSARY

A β = amyloid β peptide; **AD** = Alzheimer disease; **CBS** = corticobasal syndrome; **CJD** = Creutzfeldt-Jakob disease; **CVLT** = California Verbal Learning Test; **DLB** = dementia with Lewy bodies; **FTD** = frontotemporal dementia; **MMSE** = Mini-Mental State Examination; **OD** = other dementias; **p-PCA** = pure posterior cortical atrophy; **p-tau** = phosphorylated tau protein; **PCA** = posterior cortical atrophy; **t-tau** = total tau proteins.

Posterior cortical atrophy (PCA) is a rare syndrome characterized by predominant progressive higher-order visuoperceptual deficits associated with occipito-parieto-temporal brain dysfunction.¹ Visual symptoms include simultanagnosia, hemispatial neglect, optic ataxia, and visual agnosia. Neuroimaging usually shows atrophic or metabolic changes in posterior brain regions.² Evolution generally leads to dementia.

e-Pub ahead of print on April 27, 2011, at www.neurology.org.

*These authors contributed equally to this work.

From the Department of Biochemistry (J.S., A.P.-L., I.Q., Y.T., A.D.), Neurobiology Laboratory, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon; Department of Neurology (M.F., A.V., P.K.-S.), Department of Neuropsychology (B.C., H.M.), and Inserm Unit 864, Space and Action (A.V.), Hôpital Neurologique, Hospices Civils de Lyon; Department of Neurology (O.R.), Center for Memory Resources and Research, Centre Hospitalier Universitaire de Dijon-Bourgogne; Neuropsychology Unit (C.T.-A.), Center for Memory Resources and Research, Centre Hospitalier Universitaire de Saint Etienne; Department of Neurology (O.M.), Center for Memory Resources and Research, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble; Department of Neurology (M.S.), Centre Hospitalier de Roanne; Department of Neurology (M.B.), Centre Hospitalier de Belfort-Montbéliard; Department of Geriatrics (M.-H.C.), Hôpital Pierre Garraud, Hospices Civils de Lyon; Department of Geriatrics (P.K.-S.), Hôpital des Charpennes, Hospices Civils de Lyon; Center for Memory Resources and Research (J.S., M.F., A.P.-L., I.Q., Y.T., B.C., H.M., A.D., M.-H.C., A.V., P.K.-S.), Hospices Civils de Lyon; Claude Bernard Lyon I University (J.S., M.F., I.Q., Y.T., A.V., P.K.-S.); and INSERM, U1028 (J.S., P.K.-S.); CNRS, UMR5292; Lyon Neuroscience Research Center, Brain Dynamics and Cognition Team, Lyon, France.

Study funding: Supported by the "Programme Hospitalier de Recherche Clinique Régional 2004 D50353" and "EU FP6 Project Neuroscreen LSHB-CZ-2006-037719 contract no. 037719."

Disclosure: Author disclosures are provided at the end of the article.

This syndrome is usually related to Alzheimer disease (AD) but can also result from cortico-basal degeneration, Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), dementia with Lewy bodies (DLB), or subcortical gliosis.³⁻⁸ Etiologic diagnosis remains uncertain until postmortem examination.

CSF biomarkers have become a significant help for in vivo AD diagnosis.⁹ In AD they are characterized by a combination of increased total tau proteins (t-tau) and phosphorylated tau on amino acid 181 (p-tau181) and decreased 42 amino acid amyloid β peptide ($A\beta_{42}$).⁹⁻¹² These tau and $A\beta$ profiles are related to elementary AD lesions: respectively, neurofibrillary tangles and amyloid plaques. Thus, CSF biomarker examination appears relevant to etiologic diagnosis of PCA, since the prevalence of AD pathology is high in this condition.

The objective of the present study was to describe the CSF biomarker profile in a pro-

spective series of well-defined patients with PCA. The PCA CSF profile was compared to that of typical AD and other dementia groups. The interest for clinicians of CSF determination in PCA was assessed by comparison between clinically based and CSF-based classifications of etiologic diagnosis.

METHODS PCA subjects. Twenty-two patients with PCA (14 men, 8 women; 65 ± 7.7 years) were recruited from the memory clinics of Lyon, Dijon, Saint-Etienne, Grenoble, Montbéliard, and Roanne (France) between 2005 and 2010. All underwent lumbar puncture. CSF biomarker analysis was performed in the neurobiology department of Lyon.

Diagnostic criteria. PCA diagnosis was based on medical history, caregiver interview, neurologic examination, a neuropsychological test battery, and brain imaging (table 1). The following diagnostic criteria for PCA⁴ were applied: 1) history of progressive visual impairment not explained by ophthalmologic abnormality; 2) demonstration of complex visual disorder such as visual agnosia, prosopagnosia, visuospatial neglect, Balint syndrome (ocular apraxia, optic ataxia, and simultanagnosia), often

Table 1 Clinical and neuropsychological features of patients with PCA^a

Case no.	MMSE score (/30)	Elements of Balint syndrome	Elements of Gerstmann syndrome	Ideomotor apraxia	Parkinsonism	Limb dystonia	Visual hallucinations	Memory
1	21	+	-	+	-	-	+	↓
2	20	+	+	+	-	-	-	↓
3	19	+	+	+	-	-	-	↓
4	26	+	+	-	-	-	-	X
5	22	+	-	-	-	-	-	X
6	10	+	-	+	-	-	-	↓
7	19	+	+	+R	+	-	-	X
8	29	+	-	+	+	-	-	X
9	19	+	+	+R	+R	+R	-	X
10	18	-	+	+	+	-	-	↓
11	15	+	-	-	-	-	-	↓
12	22	+	-	+	-	-	-	X
13	27	+	-	+L	+L	+L	-	X
14	23	+	-	+	-	-	-	X
15	21	+	+	+	+	-	-	X
16	28	+	+	+	-	-	-	↓
17	13	-	+	+	-	-	-	X
18	12	-	-	-	-	-	-	↓
19	14	+	-	-	-	-	-	↓
20	24	+	-	+	-	-	-	X
21	17	+	+	+	-	-	+	↓
22	20	+	-	+	-	-	-	↓

Abbreviations: + = Clinical signs present; - = clinical sign absent; ↓ = low performance; L = lateralized on the left side; MMSE = Mini-Mental State Examination; NT = not testable; PCA = posterior cortical atrophy; R = lateralized on the right side; X = not affected.

^a Clinical assessment of PCA for each case.

associated with Gerstmann syndrome (alexia, agraphia, finger agnosia, and right-left disorientation) or visuoconstructional apraxia; 3) no or minor memory impairment, executive dysfunction, or language deficit; 4) posterior atrophic or metabolic alteration on MRI or metabolic imaging.

Neuropsychological examination. The Mini-Mental State Examination (MMSE)¹³ was systematically carried out to rate global cognitive ability. Episodic verbal memory was assessed by the Free and Cued Selective Recall Reminding Test,¹⁴ California Verbal Learning Test (CVLT, French version),¹⁵ or MEM-III.¹⁶ Visuospatial and visuo-perceptive abilities were explored by the Visual Object and Space Perception battery,¹⁷ the Benton Facial Recognition test,¹⁸ or the Judgment of Line Orientation test.¹⁸ Neglect and constructional praxis were explored by the Crossing-out and Clock Drawing tests.

Clinically based classification. Patients with PCA were classified into 3 groups according to initial clinical presentation and neuropsychological profile, by neurologists blind to the biological results:

1. Pure PCA (p-PCA): isolated visual complaint with visual impairment and no episodic verbal memory impairment.
2. PCA-AD: predominant visual complaint and visual impairment with mild episodic verbal memory impairment.
3. PCA-corticobasal syndrome (CBS): predominant visual complaint and visual impairment with no verbal memory impairment, associated with asymmetric or unilateral parkinsonism and ipsilateral gestural apraxia or dystonia.

Some minor attention, executive, or language deficits could be present in all 3 groups.

Control groups. One population with clinical diagnosis of AD and another with clinical diagnosis of other dementia (OD, comprising DLB and frontotemporal dementia [FTD]) were selected on both consensus clinical criteria and CSF biomarker analysis, for comparison with the PCA group. These patients from our laboratory cohort were matched with the PCA groups for gender, for age at lumbar puncture (± 5 years), and for duration of illness (± 2 years). The AD control group comprised 160 patients with AD (83 men, 77 women), all meeting National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association criteria for probable AD.¹⁹ The OD group comprised 138 patients (81 men, 57 women) with a clinical diagnosis of possible ($n = 31$) or probable ($n = 38$) DLB based on the consensus diagnostic criteria²⁰ and possible ($n = 23$) or probable ($n = 45$) FTD based on the Lund and Manchester criteria.²¹ There was no significant difference in sex ratio (M/F) between PCA (14/8) and AD (83/77) and OD control (81/57) patients (χ^2 test, $n = 318$, $p = 0.34$).

Standard protocol approval, registration, and patient consent. The study was conducted under the "Programme Hospitalier de Recherche Clinique Régional 2004 D50353" and "EU FP6 Project Neuroscreen LSHB-CZ-2006-037719 contract No. 037719." It was approved by the local Ethics Committee (CPP). All patients (PCA and controls) gave written informed consent to participate.

CSF biomarker assessment. CSF sampling and storage. CSF was obtained from inpatients by lumbar puncture. CSF sampling was performed according to a standard protocol with tracking sheets to prevent technical problems. In total, 10 mL were collected in polypropylene vials (VWR, PA) and then cen-

trifuged within 2 hours (10 minutes at $4,000 \times g$). Supernatants were distributed in polypropylene vials and aliquots were directly stored at -80°C until analysis.

Since preanalytical steps were critical to the interpretation of results, the following strict CSF exclusion criteria were applied: freezing later than 4 hours after sampling, freezing at -20°C , CSF white cell count $>5/\text{mm}^3$, CSF red cell count $>2,000/\text{mm}^3$, or CSF protein level >1.5 g/L.

CSF analysis. CSF levels of t-tau, p-tau181, and $A\beta_{42}$ were prospectively determined using a commercially available ELISA kit (INNOTEST httau-Ag, INNOTEST Phospho-Tau₍₁₈₁₎, INNOTEST β -amyloid₍₁₋₄₂₎, Innogenetics[®], Gent, Belgium) according to the manufacturer's instructions.

All biomarker levels were measured in duplicate. Furthermore, all series included quality control using an aliquot of frozen ventricular CSF containing t-tau, p-tau181, and $A\beta_{42}$ at mean concentrations of 550 pg/mL, 60 pg/mL, and 500 pg/mL, respectively. Since the intra-assay coefficient of variation was less than 10% and the concentrations obtained were in the linear range, samples were not retested.

Cutoff values for AD reported in the literature were adopted by the department of biochemistry, as follows: t-tau >350 pg/mL, p-tau181 >60 pg/mL, and $A\beta_{42} <500$ pg/mL.²²⁻²⁴

Western blot immunoassay for 14-3-3 protein was routinely performed. Both positive and doubtful (weakly positive) standard samples were used in all experiments. Immunostaining used anti-14.3.3 β polyclonal rabbit antibody (Santa Cruz Biotechnology Sc-629, Santa Cruz, CA) and then alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G antibody (Santa Cruz Biotechnology Sc-2057, Santa Cruz, CA). The antigen was detected by colorimetric reaction and scored for presence or absence of the majority band and compared to positive and doubtful control bands.

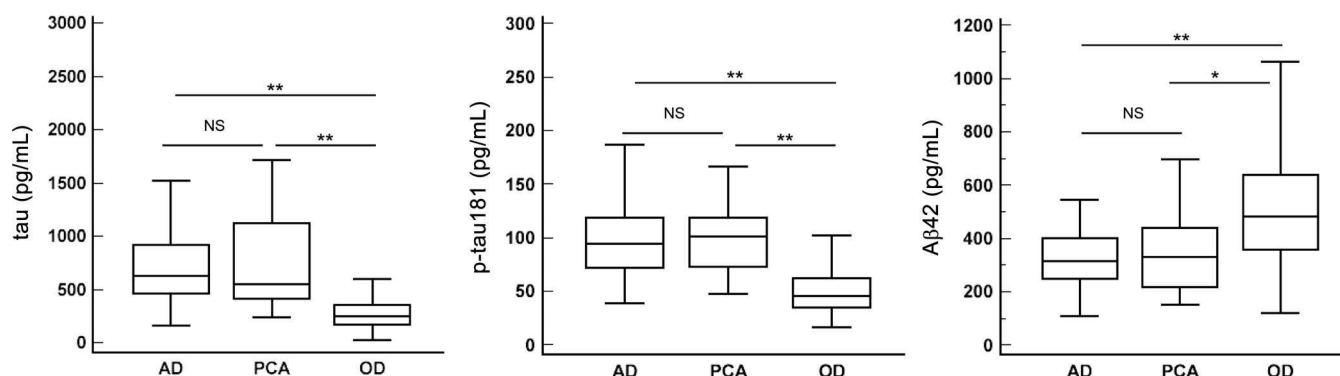
CSF-based classification. Patients with PCA were classified into 3 groups according to t-tau, p-tau, and $A\beta_{42}$ CSF levels, by biologists blind to the clinical results:

1. Typical AD: both t-tau >350 pg/mL, p-tau181 >60 pg/mL and $A\beta_{42} <500$ pg/mL.
2. Atypical AD: either t-tau >350 pg/mL and p-tau181 >60 pg/mL, or $A\beta_{42} <500$ pg/mL.
3. Non-AD: t-tau <350 pg/mL, p-tau181 <60 pg/mL, and $A\beta_{42} >500$ pg/mL.

Statistical analyses. Age differences among PCA, AD, and OD groups were assessed on one-way analysis of variance and sex differences on 2×3 contingency analysis (χ^2 test). Differences in CSF biomarkers among the 3 groups were analyzed on the Mann-Whitney test. p Values below 0.05 and 0.001 were considered to be significant and highly significant, respectively. Analysis was performed on MedCalc[®] version 11.1.1.0 software (Frank Schoonjans, MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

RESULTS Clinical features of patients with PCA. Simultanagnosia, alexia, acalculia, agraphia, and ideomotor and constructional apraxia were the most frequent signs (see tables e-1 and e-2 on the *Neurology*[®] Web site at www.neurology.org). Six patients had mild parkinsonism, which was asymmetric in 3 patients who also presented with unilateral ideomotor apraxia (table 1). Two patients with asymmetric parkinsonism also showed limb dystonia. Two patients reported visual hallucinations. None showed

Figure 1 Comparison of total tau proteins (t-tau), phosphorylated tau on amino acid 181 (p-tau181), and amyloid β peptide ($A\beta_{42}$) CSF patterns among patients with Alzheimer disease (AD), patients with posterior cortical atrophy (PCA), and patients with other dementias (OD)



Box plot showing median CSF levels of t-tau, p-tau181, and $A\beta_{42}$ in AD, PCA, and OD subgroups (** $p < 0.0001$; * $p < 0.0016$; NS = nonsignificant).

fluctuation of cognitive or motor symptoms. Cognitive functions were variably affected, with a mean MMSE of 20/30 (± 5.14), ranging from 10 to 29. Visuosperceptive and visuospatial abilities were affected in all patients, and attention and executive functions in most. Patients with PCA symptoms had been progressing for 1 to 6 years at the first clinical assessment. Eight patients without memory impairment were clinically classified as pure PCA (patients 4, 5, 8, 12, 14, 15, 17, and 20), 11 as PCA-AD (patients 1, 2, 3, 6, 10, 11, 16, 18, 19, 21, and 22), and the remaining 3 as PCA-CBS due to their motor symptoms (patients 7, 9, and 13). MRI showed asymmetric cortical or subcortical atrophy in the parietal and occipital regions in 17/22 and symmetric atrophy in 5/22 patients with PCA. There were no visible differences in MRI abnormality profiles among the 3 clinical subgroups.

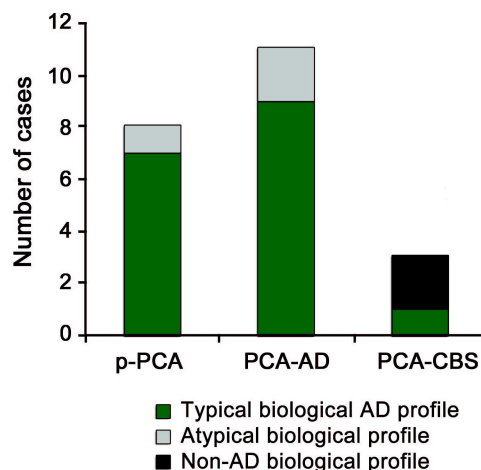
CSF biomarker profiles in the PCA compared to the AD and OD groups. Mean t-tau, p-tau₁₈₁, and $A\beta_{42}$ CSF levels in the PCA group were 742 ± 247 , 102 ± 43 , and 369 ± 187 pg/mL, respectively. Mean CSF levels in the control groups were t-tau (AD: 749 ± 412 ; OD: 309 ± 230 pg/mL), p-tau₁₈₁ (AD: 102 ± 41 ; OD: 52 ± 25 pg/mL), and $A\beta_{42}$ (AD: 334 ± 127 ; OD: 508 ± 216 pg/mL). Median CSF t-tau, p-tau₁₈₁, and $A\beta_{42}$ levels (figure 1) were highly significantly different between the PCA and OD groups ($p < 0.0001$, < 0.0001 , and 0.0016 , respectively) and did not significantly differ between the PCA and AD groups ($p = 0.7$, 0.8 , and 0.7 , respectively).

CSF biomarker profiles in individual patients with PCA. Seventeen of the 22 patients with PCA (77%) (table e-3) fulfilled the biological criteria for typical AD, with abnormal levels of the 3 CSF markers. Three PCA patient profiles (14%) were classified as atypical AD due to abnormalities in either tau or $A\beta$

protein levels. Two patients (9%) had normal CSF biomarkers. Thus 20 out of 22 patients showed a biological profile consistent with either typical or atypical AD. Although 4 patients had CSF t-tau levels higher than 1,200 pg/mL, none showed positive CSF 14.3.3 protein.

Comparison between clinically and biologically based diagnostic classifications. Seven of the 8 patients with p-PCA had a typical and one an atypical AD CSF profile (figure 2). Nine of the 11 patients with PCA-AD had a typical and 2 an atypical AD CSF profile. Finally, one of the 3 patients with PCA-CBS met biological criteria for AD and 2 had a CSF profile classified as non-AD.

Figure 2 Number of cases with the 3 different CSF patterns in each posterior cortical atrophy (PCA) clinical subgroup



AD = Alzheimer disease; CBS = corticobasal syndrome; p-PCA = pure posterior cortical atrophy.

DISCUSSION CSF analysis in the present PCA cohort was consistent with the high prevalence of underlying AD pathology. At group level, $A\beta_{42}$, t-tau, and p-tau181 levels in patients with PCA differed significantly from those for other dementias and were indistinguishable from those for typical AD. Individually, 17 of the 22 patients presented a typical and 3 an atypical AD CSF profile. These results indicate a high proportion (77%) of patients with PCA with underlying AD pathology with both amyloid and tau pathologies. The 3 atypical AD CSF profiles were consistent with the presence of amyloid plaques or neurofibrillary tangles.²⁵ More than 90% of the PCA cases thus exhibited a CSF profile consistent with AD and were likely to have underlying AD pathology.

It is now well-established that CSF biomarkers improve the accuracy of in vivo AD diagnosis.^{25,26} CSF biomarker changes are related to underlying histologic lesions specific to AD.²⁵ The combination of the 3 abnormal CSF biomarkers predicts AD neuropathology with sensitivity and specificity exceeding 90% and 85%, respectively.²⁶ Based on these data, determination of CSF biomarkers may be of diagnostic interest for identifying AD in patients with atypical focal dementia. In PCA, the present study clearly identified a dominant AD-type biological profile. To our knowledge, only 3 studies have been published on this condition. Decreased CSF $A\beta_{42}$ and elevated levels of phosphorylated tau at threonine 199 were reported in a single case of PCA.²⁷ Elevated t-tau and p-tau181 and low $A\beta_{42}$ CSF levels, similar to those of typical AD, were reported in a cohort of 9 patients with PCA.²⁸ Elevated CSF p-tau181 levels, although significantly lower than in AD, were also reported in a sample of 15 patients with PCA.²⁹ The present study likewise showed, in a larger well-defined PCA population, that an overwhelming majority of patients with PCA display CSF profiles suggestive of AD.

These findings are in accordance with the few neuropathologic studies, reporting a high but variable prevalence of underlying AD pathology in PCA syndrome. The largest study reported AD pathology in 62% of 21 autopsied PCA cases.⁴ AD lesions were also reported in 7 out of 9 patients in one study,³ and in all 7 cases of a study with a smaller sample of patients.⁷ Other reported etiologies include CBD, AD associated with PD or DLB, CJD, and subcortical gliosis.

In the present cohort, patients were diagnosed with PCA based on a clinical aspect of progressive posterior cortical dysfunction. Rather broad diagnostic criteria were used in order to avoid a priori exclusion of non-AD PCA syndrome.⁴ To take the analysis further, patients with PCA were classified in 3 clinically distinct subgroups (pure PCA, PCA-AD,

or PCA-CBS) according to clinical status, degree of memory deficit, and presence of motor signs, in order to compare biological profile with episodic memory deficit and motor signs. Although the diagnostic criteria considered in the present study did not exclude patients with parkinsonism, fluctuations, or hallucinations, none of our patients developed more than one of these symptoms so as to be listed as PCA-DLB. None of them, including the 4 cases with elevated t-tau levels above 1,200 pg/mL, showed positive CSF 14.3.3 protein level³⁰ or symptoms consistent with CJD. Although both elevated t-tau and p-tau181 are associated with AD severity in the AD literature, these patients with PCA were not different from the others in terms of global cognitive ability as rated by MMSE: their cognitive deficits were not more impaired than the others.³¹ Interestingly, despite the broad diagnostic criteria used, most patients with PCA still tended to have AD lesions.

All patients with pure PCA presented a CSF profile consistent with either typical (7/8) or atypical AD (1/8). Likewise, all patients with PCA-AD also had a CSF profile consistent with either typical (9/11) or atypical AD (2/11). Atypical profiles were defined by either increased t-tau and p-tau181 and normal $A\beta_{42}$ CSF levels or decreased $A\beta_{42}$ and normal t-tau and p-tau181 CSF concentrations. Such CSF patterns have already been described in patients with autopsy-based diagnosis of AD²⁵ and remain consistent with underlying AD pathology. However, these CSF profiles are less specific to AD and can be found in other neurodegenerative diseases, sometimes associated with AD. CSF profiles with low $A\beta_{42}$ and normal t-tau levels in particular have been found in patients showing AD lesions associated with diffuse Lewy bodies,³² PD with dementia, or vascular dementia.²⁵ Similarly, CSF profiles with normal $A\beta_{42}$ and elevated t-tau and p-tau181 levels have been described in autopsy cases of vascular dementia or DLB.²⁵ None of the patients in the present study fulfilled diagnostic criteria for probable DLB in our study, and elevated CSF p-tau181 is more specific in AD than in DLB pathology; DLB, however, appears to be the main differential diagnosis.^{33,34}

In the present study, a normal CSF profile was observed in only 2 out of 22 cases of PCA, in the small subgroup of 3 PCA-CBS. The third patient with PCA-CBS presented a typical AD CSF profile. The clinical presentation of these 3 PCA-CBS cases was similar at the time of lumbar puncture, in that they all had asymmetric parkinsonism and gestural apraxia, elements of Balint and Gerstmann syndrome, and higher-order visual and attention deficits without memory impairment. None had cortical somatosensory impairment. Mild focal limb dystonia ipsilateral to the

side with predominant parkinsonism clinically differentiated the 2 patients with normal CSF profiles from patients with an AD CSF profile. It has recently been shown that CBS can reveal AD pathology.^{35,36} One of the 3 patients with PCA-CBS in the present study is thus likely to have had underlying AD pathology. The normal CSF profiles of the other 2 patients with PCA-CBS were consistent with the hypothesis of underlying corticobasal degeneration pathology or other tauopathy such as progressive supranuclear palsy or even non-tau pathologies, which are also possible in this clinical condition.³⁶

Although histologic data were not available in the present study, the CSF results are consistent with those of previous neuropathologic studies in PCA. CSF biomarker analysis suggests prominent underlying AD pathology in PCA and enables in vivo AD diagnosis in this condition. On CSF analysis, only the clinical PCA-CBS subtype seemed to be predominantly related to non-AD pathology. Further studies with CSF analysis and postmortem examination in larger cohorts of PCA with motor signs are needed to describe the underlying pathology in this clinical subtype.

DISCLOSURE

J. Seguin was funded by EU FP6 Project Neuroscreen LSHB-CZ-2006-037719 contract no. 037719. Dr. Formaglio reports no disclosures. Dr. Perret-Liaudet has served on scientific advisory boards for Innogenetics and ExonHit Therapeutics and has received speaker honoraria from the Eisai Inc. and Lundbeck Inc. Dr. Quadrio was funded by EU FP6 Project Neuroscreen LSHB-CZ-2006-037719 contract no. 037719. Y. Tholance reports no disclosures. Dr. Rouaud has served on a scientific advisory board for Eisai Inc. and has received speaker honoraria from Eisai Inc. and Novartis. Dr. Thomas-Anterion reports no disclosures. Dr. Croisile has served on scientific advisory boards for Eisai Inc. and Lundbeck Inc.; has received speaker honoraria from Eisai Inc., Janssen, Novartis, and Lundbeck Inc.; serves on the editorial board of *Neurologies Mémoire Actualités Revue de Gériatrie*; receives publishing royalties for *Votre Mémoire* (Larousse, 2004), *Alzheimer et les Maladies Apparentées* (Larousse, 2007), *Tout sur la Mémoire* (Odile Jacob, 2009), and *Maladie d'Alzheimer* (Larousse, 2010); and has contractual rights in Scientific Brain Training for receipt of future royalty payments. Dr. Mollion serves on a scientific advisory board for Novartis. Dr. Moreaud served on the editorial board of *Psychologie et Neuropsychiatrie du Vieillessement* and has received speaker honoraria from Eisai Inc., Novartis, and Janssen. Dr. Salzmann, Dr. Dorey, Dr. Bataillard, Dr. Coste, and Dr. Vighetto report no disclosures. Dr. Krolak-Salmon serves on scientific advisory boards for Eisai Inc. and Novartis; has received speaker honoraria from Eisai Inc., Novartis, Janssen, and Lundbeck Inc.; and receives research support from Janssen and Programme Hospitalier de Recherche Clinique.

Received September 1, 2010. Accepted in final form November 23, 2010.

REFERENCES

- Benson DF, Davis RJ, Snyder BD. Posterior cortical atrophy. *Arch Neurol* 1988;45:789–793.
- Nestor PJ, Caine D, Fryer TD, Clarke J, Hodges JR. The topography of metabolic deficits in posterior cortical atrophy (the visual variant of Alzheimer's disease) with FDG-PET. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:1521–1529.

- Tang-Wai DF, Graff-Radford NR, Boeve BF, et al. Clinical, genetic, and neuropathologic characteristics of posterior cortical atrophy. *Neurology* 2004;63:1168–1174.
- Renner JA, Burns JM, Hou CE, McKeel DW Jr, Storandt M, Morris JC. Progressive posterior cortical dysfunction: a clinicopathologic series. *Neurology* 2004;63:1175–1180.
- Hof PR, Archin N, Osmand AP, et al. Posterior cortical atrophy in Alzheimer's disease: analysis of a new case and re-evaluation of a historical report. *Acta Neuropathol* 1993;86:215–223.
- Berthier ML, Leiguarda R, Starkstein SE, Sevlever G, Taratuto AL. Alzheimer's disease in a patient with posterior cortical atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991; 54:1110–1111.
- Alladi S, Xuereb J, Bak T, et al. Focal cortical presentations of Alzheimer's disease. *Brain* 2007;130:2636–2645.
- Tang-Wai DF, Josephs KA, Boeve BF, Dickson DW, Parisi JE, Petersen RC. Pathologically confirmed corticobasal degeneration presenting with visuospatial dysfunction. *Neurology* 2003;61:1134–1135.
- Wiltfang J, Lewczuk P, Riederer P, et al. Consensus paper of the WFSBP Task Force on Biological Markers of Dementia: the role of CSF and blood analysis in the early and differential diagnosis of dementia. *World J Biol Psychiatry* 2005;6:69–84.
- Andreasen N, Sjogren M, Blennow K. CSF markers for Alzheimer's disease: total tau, phospho-tau and Abeta42. *World J Biol Psychiatry* 2003;4:147–155.
- Knopman DS, DeKosky ST, Cummings JL, et al. Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2001; 56:1143–1153.
- Consensus report of the Working Group on Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease: The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group. *Neurobiol Aging* 1998;19:109–116.
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state": a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975;12:189–198.
- der Linder V, Coyette F, Poitrenaud J, et al. L'Épreuve de Rappel Libre/Rappel Indiqué à 16 Items (RL/RI-16): l'Évaluation des Troubles de la Mémoire. Marseille, France: Solal; 2004.
- Delis DC, Freeland J, Kramer JH, Kaplan E. Integrating clinical assessment with cognitive neuroscience: construct validation of the California Verbal Learning Test. *J Consult Clin Psychol* 1988;56:123–130.
- Wechsler D. *Echelle Clinique de Mémoire de Wechsler*, 3ed ed. Paris: ECPA; 2001.
- Rappaport LJ, Millis SR, Bonello PJ. Validation of the Warrington theory of visual processing and the Visual Object and Space Perception Battery. *J Clin Exp Neuropsychol* 1998;20:211–220.
- Benton AL, Hamsher KD, Varney NR, Spreen O. Contributions to Neuropsychological Assessment: A Clinical Manual. New York: Oxford University Press; 1983.
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services

- Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984;34:939–944.
20. McKeith IG, Dickson DW, Lowe J, et al. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. *Neurology* 2005;65:1863–1872.
 21. Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia: The Lund and Manchester Groups. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57:416–418.
 22. Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Londos E, Blennow K, Minthon L. Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *Lancet Neurol* 2006;5:228–234.
 23. Tapiola T, Alafuzoff I, Herukka SK, et al. Cerebrospinal fluid β -amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain. *Arch Neurol* 2009;66:382–389.
 24. Mattsson N, Zetterberg H, Hansson O, et al. CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA* 2009;302:385–393.
 25. Engelborghs S, De Vreese K, Van de Castele T, et al. Diagnostic performance of a CSF-biomarker panel in autopsy-confirmed dementia. *Neurobiol Aging* 2008;29:1143–1159.
 26. Parnetti L, Lanari A, Silvestrelli G, Saggese E, Reboldi P. Diagnosing prodromal Alzheimer's disease: role of CSF biochemical markers. *Mech Ageing Dev* 2006;127:129–132.
 27. Kambe T, Motoi Y, Ishii K, Hattori N. Posterior cortical atrophy with [(11)C] Pittsburgh compound B accumulation in the primary visual cortex. *J Neurol* 2010;257:469–471.
 28. Baumann TP, Duyar H, Sollberger M, et al. CSF-tau and CSF-Abeta(1–42) in posterior cortical atrophy. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2010;29:530–533.
 29. de Souza LC, Lamari F, Belliard S, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in the differential diagnosis of Alzheimer's disease from other cortical dementias. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* Epub 2010.
 30. Sanchez-Juan P, Green A, Ladogana A, et al. CSF tests in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 2006;67:637–643.
 31. van der Vlies AE, Verwey NA, Bouwman FH, et al. CSF biomarkers in relationship to cognitive profiles in Alzheimer disease. *Neurology* 2009;72:1056–1061.
 32. Iqbal K, Flory M, Khatoon S, et al. Subgroups of Alzheimer's disease based on cerebrospinal fluid molecular markers. *Ann Neurol* 2005;58:748–757.
 33. Koopman K, Le Bastard N, Martin JJ, Nagels G, De Deyn PP, Engelborghs S. Improved discrimination of autopsy-confirmed Alzheimer's disease (AD) from non-AD dementias using CSF P-tau(181P). *Neurochem Int* 2009;55:214–218.
 34. Hampel H, Blennow K, Shaw LM, Hoessler YC, Zetterberg H, Trojanowski JQ. Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 2010;45:30–40.
 35. Boeve BF, Maraganore DM, Parisi JE, et al. Pathologic heterogeneity in clinically diagnosed corticobasal degeneration. *Neurology* 1999;53:795–800.
 36. Ling H, O'Sullivan SS, Holton JL, et al. Does corticobasal degeneration exist? A clinicopathological re-evaluation. *Brain* 2010;133:2045–2057.

PARTIE 2 :

**EXTRACTION DES PROTÉINES TAU PATHOLOGIQUES CÉRÉBRALES ET
DIAGNOSTIC BIOCHIMIQUE DE CERTITUDE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER
ET DES AUTRES TAUOPATHIES :**

**APPLICATION POUR L'AIDE À LA CARACTÉRISATION DE PATHOLOGIES
TAU DANS LA MUTATION E200K DE LA MALADIE DE CREUTZFELDT-JAKOB**

Les lésions rencontrées lors de l'examen neuropathologique du cerveau révèlent notamment des agrégats de protéines tau dans la MA ainsi que dans les autres tauopathies.* Ces lésions trouvent leur origine dans des changements conformationnels, des coupures protéolytiques ainsi qu'une hyperphosphorylation anormale de la protéine tau aboutissant de façon synergique à une agrégation protéique et l'obtention des PHF, véritables unités pathologiques des lésions tauopathiques.† Ces organisations de protéines tau pathologiques agrégées, insolubles et partiellement résistantes aux protéases que sont les PHF forment les DNF qui investissent le cortex cérébral dans la MA. Ainsi avec la progression de la maladie, ces lésions se disséminent dans l'ensemble du néocortex en suivant un trajet stéréotypé. Des études biochimiques, s'intéressant à la nature même des lésions, ont permis d'isoler puis de caractériser les PHF.²²⁴ La séparation électrophorétique des PHF en WB a permis d'apporter des éléments nouveaux dans la compréhension des processus physiopathologiques de la MA d'une part et de permettre une aide complémentaire à la confirmation du diagnostic neuropathologique d'autre part. En effet, l'immunoempreinte des fractions de PHF est caractérisée par d'un triplet majeur (à 55, 64 et 69kDa) et d'un variant mineur de 74kDa qui signe biochimiquement une MA.‡ Pour d'autres tauopathies telles que la DCB, la PSP ou encore certaines DFT, des profils distincts de la MA sont caractérisables par cette séparation en WB.

De nombreuses techniques permettent à ce jour d'extraire les PHF à partir d'homogénats de cerveaux de patients atteints par la MA. Nous avons choisi de nous baser sur une méthode faisant intervenir une élimination séquentielle des lipides et débris cellulaires contenus dans l'homogénat de cerveau puis une incubation dans une solution contenant un détergent, le lauryl sarkosinate de sodium ou sarkosyl. Les PHF, contrairement à la majorité des autres protéines contenues dans de tels homogénats, restent insolubles dans les détergents et le sarkosyl en particulier.

Dans un contexte de caractérisation de lésions d'une part et d'outils développés au sein d'un consortium d'autre part afin d'améliorer les outils biologiques préexistants, il s'avère indispensable de travailler sur des pièces anatomiques cérébrales avant de projeter les

* Cf. **Chapitre 1 – 1.2.3.2 : Lésions tauopathiques.**

† Cf. **Chapitre II – 2.1.2 : Physiopathologie de la protéine tau.**

‡ Cf. **Chapitre II – Physiopathologie de la protéine tau.**

applications potentielles de ces outils dans les fluides biologiques. Pour caractériser ces outils et pour l'étude de co-pathologies, il m'a été confié la mise en place d'une technique biochimique d'extraction des PHF en vue de leur caractérisation en WB et de leurs dosages ultérieurs en ELISA.

1 PATIENTS ET METHODES

1.1 Patients

Les cerveaux proviennent de patients autopsiés à l'hôpital Neurologique de Lyon (France) ainsi que dans les Hôpitaux de Wien (Autriche) et Budapest (Hongrie). Nous avons sélectionné un total de 5 patients : 2 patients dont un diagnostic neuropathologique de MA à différents stades de Braak (stades de Braak 1 et 5) a été porté, un patient atteint par une maladie de Pick confirmée histo-pathologiquement, un patient atteint par une mutation S305I* sur le gène de la protéine tau et enfin un patient contrôle asymptomatique et sans lésions cérébrales constatées à l'examen neuropathologique. Les familles de tous les patients ont donné leur accord et consentement éclairé pour une utilisation des tissus à des fins de recherche.

1.2 Extraction des PHF intracérébrales

La méthode d'extraction sur laquelle nous nous sommes basés et que nous avons modifiée pour concentrer les PHF intracérébrales, a été décrite en 2003.²⁶⁰ Nous avons réalisé des homogénats de substance grise à partir des tissus cérébraux congelés des patients. Plusieurs zones cérébrales correspondant à la diffusion des DNF dans la classification neuropathologique de Braak ont été sélectionnées sur chaque patient: hippocampe, cortex frontal, cortex pariétal, cortex occipital et cervelet. Les homogénats sont réalisés à 20% (m/vol) dans un tampon de broyage (50mM Tris, pH 7.4, 0.8M NaCl et 10mM EGTA) et obtenus grâce à l'impact de billes plastiques sur le tissu au sein du broyeur mécanique d'échantillons biologiques (BioRad Laboratories, Inc, Hercules, CA, USA). Après ajout d'inhibiteurs de phosphatases à 1% en concentration finale (phosphatase inhibitor cocktail 2,

* Il s'agit ici d'une des nombreuses mutations (plus de 30 connus à ce jour) touchant le gène de la protéine tau sur le chromosome 17. Cette mutation rentre dans la classe pathologique des DFTP-17. Cf. **Chapitre II - 2.1.2 : Physiopathologie de la protéine tau.**

Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) pour éviter une perte de signal pour les phosphorylations,⁵⁰² les homogénats sont ensuite ultracentrifugés à 100 000g pendant 25 min (Sorvall® Discovery™ M150 SE, Thermo scientific) puis les culots sont repris dans un tampon glucosé (10mM Tris, pH 7.4, 0.85M NaCl, 1mM EDTA, 20mM NaF et 10% de glucose). Les homogénats sont centrifugés pendant 25 min à 20 000g, du sarkosyl est ajouté dans le surnageant à hauteur de 1% (vol/vol) en concentration finale. Le surnageant est incubé pendant 2 heures à température ambiante puis centrifugé 45 min à 100 000g. Le culot ainsi formé est la fraction de PHF insolubles dans le sarkosyl.

1.3 Western Blot

Les culots formés sont repris dans un tampon de charge dénaturant (TD4215) puis chauffés pendant 10 min à 100°C. Les échantillons sont déposés sur un gel SDS polyacrylamide de gradient 4-12% (NuPAGE, Invitrogen) pour une migration de 1h30 à 150V (200mA). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane Immobilon-P (taille des pores: 0.45µm, Millipore) pendant 1 h à 60mA par gel (4V) puis les membranes sont saturées dans un tampon PBS contenant du lait à 5% (m/vol) pendant 12 heures à 4°C. Les membranes sont ensuite incubées 2 heures avec l'anticorps monoclonal T46 (Signet, Dedham, MA, USA ; 1/2000 dans un tampon PBS contenant du lait à 0.5% [m/vol] et du Tween-20 à 0.5% [vol/vol]), dirigé contre les résidus 404-441 de la protéine tau et reconnaissant les 6 isoformes de la protéine humaine. Après lavage de la membrane, elle est incubée 1h avec un anticorps de révélation dirigé contre les IgG de souris couplé à la peroxydase (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) à une concentration de 1/10 000. La révélation est par la suite réalisée par une technique de chimioluminescence (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA).

2 RÉSULTATS

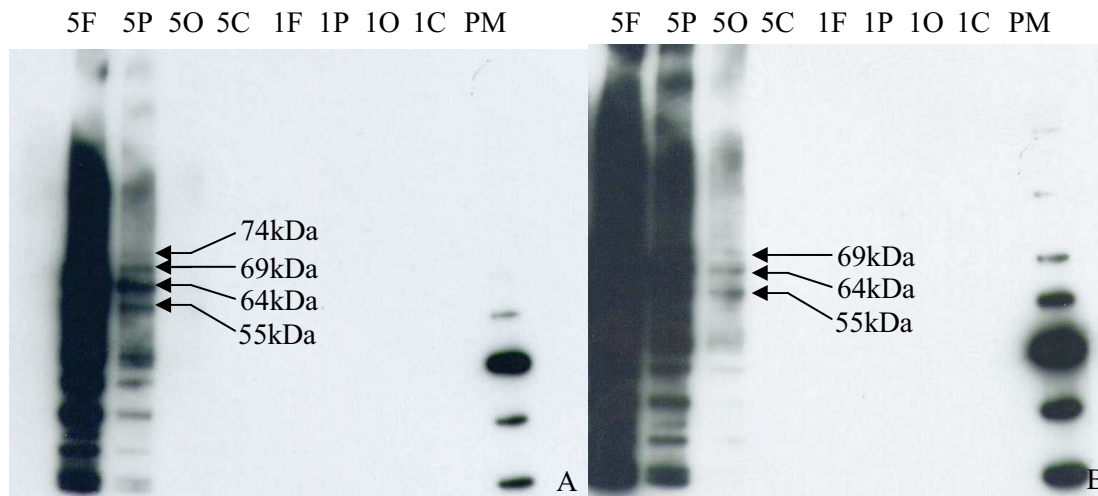


Figure 41. Western Blots de PHF extraites de différentes zones cérébrales de deux patients atteints par une maladie d'Alzheimer à des stades de Braak 5 et 1 révélés avec l'anticorps T46. F : cortex frontal ; P : cortex pariétal ; O : cortex occipital ; C : cervelet ; PM : poids moléculaires ; 5 : stade de Braak 5 ; 1 : stade de Braak 1 (Expositions : A : 5 secondes ; B : 1 minute).

L'anticorps T46 permet de marquer les PHF issus de zones cérébrales normalement atteintes (cortex frontal, pariétal et occipital) au stade de Braak 5 (figure 42). Cette révélation nécessite un temps d'exposition plus long pour le cortex occipital. Cette détection est spécifique car elle ne marque ni le cervelet aux 2 stades de Braak ni le cortex frontal, pariétal et occipital au stade de Braak 1

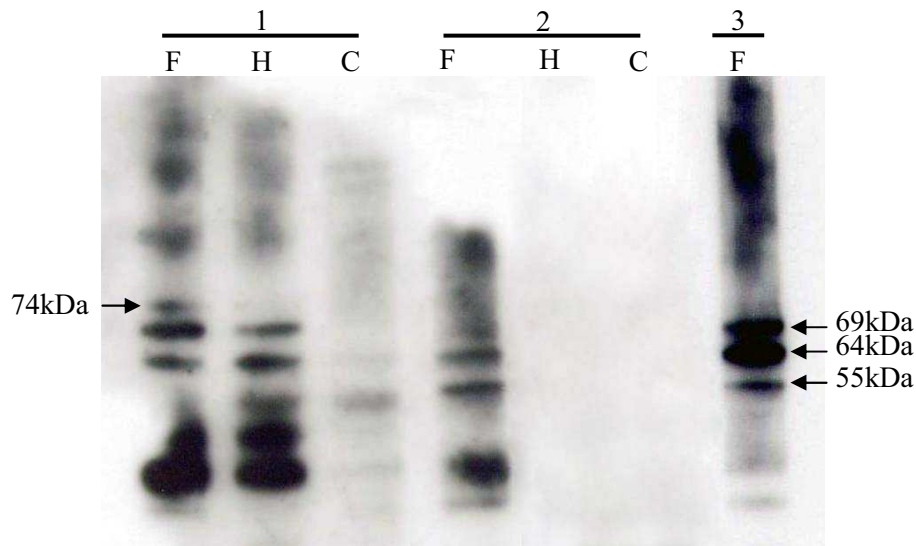


Figure 42. Western Blot des PHF dans le cadre d'une mutation S305I et d'une maladie de Pick révélés avec l'anticorps monoclonal T46. 1 : PHF extraites d'un cerveau de patient atteint par une mutation S305I du gène de la protéine tau ; 2 : PHF extraites d'un cerveau de patient atteint par une maladie de Pick ; 3 : PHF issues d'un patient atteint par une maladie d'Alzheimer ; F : cortex frontal ; H : hippocampe ; C : cervelet.

Les PHF issues de cerveaux de patients atteints par une mutation S305I du gène de la protéine tau et d'une maladie de Pick montrent des profils électrophorétiques différents de ceux observés dans la MA (figure 42). Nous pouvons noter des bandes de 69kDa et 64kDa ainsi que la bande minoritaire de 74kDa révélées dans le cortex frontal ainsi que dans l'hippocampe du patient atteint par une mutation S305I en l'absence de la bande de 55kDa. De plus, nous remarquons un léger marquage au niveau du cervelet (figure 42, ligne 3). Nous constatons des bandes de 64kDa et 55kDa dans le cortex frontal du patient atteint par une maladie de Pick en l'absence de la bande de 69kDa. De plus, aucun marquage n'est constaté au niveau de l'hippocampe ou du cervelet pour ce patient.

3 DISCUSSION

Nous venons de décrire une technique biochimique en complément de l'examen neuropathologique pour caractériser une tauopathie de même que pour évaluer son stade évolutif et la progression des lésions au sein du cortex dans la MA (figure 41). De plus, cette technique apparaît tout à fait intéressante pour le diagnostic post-mortem de patients atteints d'autres tauopathies telles que la maladie de Pick ou des mutations du gène de la protéine tau retrouvées dans les DFTP-17 (figure 42).

La maladie de Pick est une pathologie caractérisée par une accumulation préférentielle de protéines tau d'isoformes 3R. Le profil électrophorétique des protéines tau pathologiques retrouvées dans les lésions cérébrales *via* l'extraction des PHF nous permet de confirmer ce diagnostic neuropathologique. De même, il existe de nombreuses mutations du gène de la protéine tau conférant un phénotype de DFTP-17.^{269, 270} La plupart de ces mutations résident en une accumulation préférentielle en protéines tau d'isoformes 4R. Nous avons observé ces PHF constituées de protéines tau d'isoformes 4R dans une mutation S305I du gène de la protéine tau (figure 42).

Le cas de mutation que nous avons étudié était un patient suivi à l'Institut National de Psychiatrie et de Neurologie de Budapest ayant développé une symptomatologie comportementale d'origine frontale à l'âge de 39 ans.⁵⁰³ Il a développé par la suite un syndrome parkinsonien asymétrique associé à une ophthalmoplégie verticale, un syndrome bulbaire et l'apparition d'une démence. Le décès est survenu 1 an et demi après l'apparition des premiers troubles. L'examen neuropathologique a révélé un profil lésionnel tauopathique singulier avec des grains argyrophiles et des lésions gliales en l'absence de DNF et de plaques neuritiques. De plus, un léger marquage glial de la protéine tau a été observé au sein de la substance blanche cérébelleuse chez ce patient. De façon intéressante, nous retrouvons en WB un léger signal avec l'anticorps T46 dans le cervelet (figure 42) témoignant des lésions observées anatomopathologiquement.

L'extraction des PHF intracérébrales et l'étude de son profil électrophorétique nous paraît donc une analyse informative et très complémentaire à l'analyse immunohistochimique. En effet, dans certaines pathologies, par exemple le syndrome parkinsonien post-encéphalitique, il reste difficile de conclure neuropathologiquement quant à l'étiologie. Les lésions cérébrales retrouvées dans cette maladie sont très similaires à celles observées dans la PSP par exemple. Seule la signature biochimique des PHF séparées électrophorétiquement est différente. Les PHF retrouvées dans la PSP montrent un doublet à 69 et 64 kDa alors que celles retrouvées dans le cerveau des patients atteints par un syndrome parkinsonien post-encéphalitique montrent le triplet caractéristique de la MA (55, 64 et 69kDa).⁵⁰⁴ Cette analyse confère donc une meilleure performance du diagnostic de certitude pour le diagnostic différentiel des maladies neurodégénératives.

Comme nous l'avons évoqué précédemment* les démences neurodégénératives répondent à une nosographie qui se complexifie avec le temps et les cas rapportés, et bons nombres d'observations tendent à prouver que ces maladies s'intriquent dans un continuum pathologique faisant intervenir toutes les protéines impliquées dans ces différentes démences neurodégénératives. Cette méthode d'analyse biochimique, centrée sur la protéine tau, peut donc permettre de mieux décrire, en rapport avec la neuropathologie, des phénomènes lésionnels concomitants.⁵⁰⁵

Comme nous l'avons vu, les maladies neurodégénératives sont classées en protéinopathies par leurs types de dépôts protéiques. Ces pathologies montrent pourtant, d'un point de vue neuropathologique, une coexistence fréquente des différentes lésions caractérisant ces groupes pathologiques.^{65, 70} La MCJ n'échappe pas à ce phénomène et des accumulations d' α -Syn, d'A β et de protéines tau sont parfois retrouvées dans la vMCJ ainsi que certains cas sporadiques.^{506, 507} La mutation E200K du gène de la PrP est la plus fréquemment rencontrée dans les formes génétiques de MCJ. Afin d'étudier plus précisément ce phénomène lésionnel coexistant dans cette pathologie, nous avons caractérisé sur les tissus cérébraux disponibles une analyse patho-biochimique des tauopathies chez les patients atteints par une MCJ due à la mutation E200K.

* Cf. Chapitre I – 1.2.3.3 Maladie d'Alzheimer et démences mixtes.

4 ARTICLE 2 :

Gabor G. Kovacs, **Jérémie Seguin**, Isabelle Quadrio, Romana Höftberger, István Kapás, Nathalie Streichenberger, Anne Gaëlle Biacabe, David Meyronet, Raf Sciot, Rik Vandenberghe, Katalin Majtenyi, Lajos László, Thomas Ströbel, Herbert Budka, Armand Perret-Liaudet

Genetic Creutzfeldt-Jakob disease associated with the E200K mutation: characterization of a complex proteinopathy.

Acta Neuropathol, 2010

Résumé de l'article:

La mutation E200K du gène de la protéine Prion (PrP) est la mutation associée à la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) la plus fréquemment rencontrée dans le monde. En plus des dépôts de PrP, des dépôts de protéines tau, d' α -synucléine (α -Syn) et d'amyloïde β (A β) ont été décrits dans les maladies à Prion humaines. Afin de décrire ces altérations neuropathologiques concomitantes, nous avons effectué une étude clinique, neuropathologique et biochimique sur 39 patients atteints d'une mutation E200K provenant de différents pays européens. Les symptomatologies les plus fréquemment rencontrées étaient une démence et une ataxie suivie par des myoclonies et plusieurs troubles associés tels qu'une ophtalmoplégie verticale et une polyneuropathie. L'examen neuropathologique a révélé un profil lésionnel uniforme prédominant au niveau des ganglions de la base, du thalamus ainsi que de la substance noire. Plusieurs types de PrP^{res}, ainsi que des formes mixtes, ont été observés en western blot. Un dépôt de PrP intraneuronal au sein des noyaux gris centraux a aussi été observé. L'examen des dépôts protéiques a permis de révéler de l'A β parenchymateuse dans 53.8% des cas ainsi qu'une angiopathie amyloïde dans 23.1% des cas. Des neurites immunoreactives pour les protéines tau phosphorylées (92.3%) ainsi que des dégénérescences neurofibrillaires (38.4%) ont été observées. De plus, de nouvelles formes de lésions tauopathiques ont été révélées (33.3%) ainsi que des corps de Lewy (15.4%). Aucun dépôt de TDP-43 ou de FUS n'a été observé. La présence de pathologies intercurrentes associées aux dépôts de PrP est plus la règle que l'exception et ces différents dépôts protéiques (protéines tau, α -Syn et A β) sont présents au niveau des aires cérébrales investies par les dépôts pathologiques de PrP. Au sein

de notre cohorte de patients, différents phénotypes cliniques ont été décrits avec certaines présentations atypiques telles que des troubles mnésiques précoces ou encore un syndrome Parkinsonien survenant des années avant l'altération rapidement progressive. Ces présentations cliniques atypiques lors d'une MCJ ayant pour origine une mutation E200K sont fréquemment associées à des pathologies intercurrentes dans notre cohorte et laisseraient présager de l'importance de ces co-pathologies en tant que substrat pathologique de ces présentations cliniques atypiques. Des suspicions cliniques de maladies neurodégénératives (telle qu'une maladie de Parkinson par exemple) avec un âge de survenu précoce (50-60 ans) prenant la forme de démences avec ataxies de manière rapidement progressive devraient aussi faire évoquer une MCJ génétique pour le clinicien. Des interactions entre la PrP et les protéines tau, α -Syn et A β ont été observées et nos résultats suggèrent des interférences entre la PrP mutée *via* la mutation E200K et ces 3 autres protéines conduisant à leurs dépôts pathologiques. Au final, il s'agit de la première démonstration de la coexistence fréquente de différents processus neurodégénératifs dans une MCJ génétique. Ces résultats ouvrent un champ nouveau de recherche afin de mieux comprendre les interactions entre ces protéines avec une possible synergie favorisant l'expression clinique de cette maladie. En effet, cette synergie serait une hypothèse très séduisante pour expliquer l'hétérogénéité de cette expression clinique existant parfois au sein d'une même famille portant la mutation en position 200 du gène de la PrP. Au-delà de cette forme génétique de MCJ, ce nouvel axe de recherche devrait nous faire progresser sur la connaissance d'un substrat pathologique pouvant expliquer en partie les phénotypes cliniques atypiques.

Genetic Creutzfeldt-Jakob disease associated with the E200K mutation: characterization of a complex proteinopathy

Gabor G. Kovacs · Jérémie Seguin · Isabelle Quadrio · Romana Höftberger · István Kapás · Nathalie Streichenberger · Anne Gaëlle Biacabe · David Meyronet · Raf Sciot · Rik Vandenberghe · Katalin Majtenyi · Lajos László · Thomas Ströbel · Herbert Budka · Armand Perret-Liaudet

Received: 1 April 2010/Revised: 10 June 2010/Accepted: 20 June 2010/Published online: 1 July 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract The E200K mutation is the most frequent prion protein gene (*PRNP*) mutation detected worldwide that is associated with Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and thought to have overlapping features with sporadic CJD, yet detailed neuropathological studies have not been reported. In addition to the prion protein, deposition of tau, α -synuclein, and amyloid- β has been reported in human prion disease. To describe the salient and concomitant neuropathological alterations, we performed a systematic clinical, neuropathological, and biochemical study of 39 individuals carrying the E200K *PRNP* mutation originating from different European countries. The most frequent clinical symptoms were dementia and ataxia followed by myoclonus and various combinations of further symptoms, including vertical gaze palsy and polyneuropathy. Neuropathological examination revealed relatively uniform anatomical pattern of tissue lesioning, predominating in the

basal ganglia and thalamus, and also substantia nigra, while the deposition of disease-associated PrP was more influenced by the codon 129 constellation, including different or mixed types of PrP^{res} detected by immunoblotting. Unique and prominent intraneuronal PrP deposition involving brainstem nuclei was also noted. Systematic examination of protein depositions revealed parenchymal amyloid- β in 53.8%, amyloid angiopathy (A β) in 23.1%, phospho-tau immunoreactive neuritic profiles in 92.3%, neurofibrillary degeneration in 38.4%, new types of tau pathology in 33.3%, and Lewy-type α -synuclein pathology in 15.4%. TDP-43 and FUS immunoreactive protein deposits were not observed. This is the first demonstration of intensified and combined neurodegeneration in a genetic prion disease due to a single point mutation, which might become an important model to decipher the molecular interplay between neurodegeneration-associated proteins.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00401-010-0713-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

G. G. Kovacs (✉) · R. Höftberger · T. Ströbel · H. Budka
Institute of Neurology, Medical University of Vienna,
and Austrian Reference Center for Human Prion Diseases,
AKH 4J, Währinger Gürtel 18-20, 1097 Vienna, Austria
e-mail: gabor.kovacs@meduniwien.ac.at

G. G. Kovacs · I. Kapás · K. Majtenyi
Neuropathology and Prion Disease Reference Center, Hungarian
Reference Center for Human Prion Diseases, Semmelweis
University, Budapest, Hungary

J. Seguin · I. Quadrio · N. Streichenberger · D. Meyronet ·
A. Perret-Liaudet
Prion Disease Laboratory, Pathology and Biochemistry,
Groupement Hospitalier Est, Hospices Civils de Lyon/Claude
Bernard University, Lyon, France

Keywords Alpha-synuclein · Amyloid-beta ·
Prion protein · Tau · Neurodegeneration

A. G. Biacabe
Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments Lyon,
Unité ATNC, Lyon Cedex 07, France

R. Sciot
Department of Pathology, University Hospital, Catholic
University of Leuven, Leuven, Belgium

R. Vandenberghe
Neurology Department, University Hospital Gasthuisberg,
Leuven, Belgium

L. László
Department of Anatomy, Cell and Developmental Biology,
Eotvos Lorand University of Sciences, Budapest, Hungary

Introduction

Prion diseases are acquired, sporadic or genetic in origin. Mutations in the prion protein (PrP) gene (*PRNP*) are associated with spongiform encephalopathy (Creutzfeldt-Jakob disease, CJD) or PrP amyloidosis (Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease, or cerebral amyloid angiopathy) [37]. In addition to the mutation, the constellation at codon 129 (methionine/methionine, MM, or valine/valine, VV, homozygosity, MV heterozygosity) seems to influence phenotypes also in genetic prion diseases [42, 46]. The E200K mutation is the most frequent *PRNP* mutation detected worldwide that is associated with CJD [5, 21, 22, 41, 42, 49], with increased incidence among Libyan Jews and in Slovakia and Hungary [29, 33, 35, 40, 47, 49]. Examination of microsatellite markers indicated at least four different ancestral origins, with cases in Hungary or Slovakia differing in origin from those in Austria, France, or Belgium and other parts of the world [44]. Clinical presentations overlap with those described in sporadic CJD, furthermore, insomnia, vertical gaze palsy, and polyneuropathy were described as well [1, 2, 8, 42, 47, 50, 64].

Prion diseases are representatives of neurodegenerative diseases, which are classified by protein depositions such as α -synucleinopathies, tauopathies, TDP-43, or FUS proteinopathies, or diseases associated with the deposition of amyloid- β (A β). These proteinopathies show considerable overlap [36] and were described as concomitant pathologies in prion diseases as well. α -Synucleinopathies like Parkinson's disease (PD) are characterized by deposition in the brain of α -synuclein protein in the form of Lewy bodies and neurites that may be also detected in about 10% of subjects above 60 years, most likely representing pre-symptomatic PD [12]. An increased prevalence of Lewy bodies was found in elderly sporadic CJD (23.5%) and also in the acquired variant CJD [66]. Phospho-tau immunoreactive neuritic profiles around amyloid plaques are features of variant CJD [19]. Neurofibrillary tangle pathology, morphologically similar to Alzheimer's disease (AD), is associated with PrP gene (*PRNP*) mutations with prominent PrP amyloid deposition [17]. Moreover, abundant A β deposits may be detected in sporadic CJD with higher age and a specific clinicopathological profile [11]. Codistribution of A β and disease-associated PrP was recently demonstrated in three cases of E200K mutation of Hungarian origin [18].

There are studies summarizing clinical features [47, 63], furthermore, case reports on neuropathological alterations [8, 9, 26, 30, 45, 64] or evaluation of certain regions (e.g. cerebellum) [32, 49], and biochemical evaluations of protease-resistant PrP (PrP^{res}) [7, 27, 57] of individuals with CJD associated with E200K mutation. However, there is a paucity of systematic neuropathological evaluation of

cases. Thus, in the present paper we report the results of a comprehensive and systematic clinical, neuropathological, and biochemical study of 39 individuals carrying the E200K *PRNP* mutation originating from different European countries. In addition to various types of PrP immunoreactivity, we found surprisingly high proportion of cases with various depositions of neurodegeneration-associated proteins (A β , phospho-tau, α -synuclein).

Materials and methods

Selection of cases

Within the European surveillance for human prion diseases, we systematically examined 39 patients (4 Austrian, 3 Belgian, 6 French, and 26 Hungarian) with confirmed E200K mutation in *PRNP*. Clinical and neuroradiological data were obtained retrospectively. These patients were notified as suspected CJD patients to the national surveillance network, using the current clinical criteria for CJD, and verified at postmortem. When a sign was indicated as absent, it means that it was checked and found negative. Genetic analysis was performed using genomic DNA isolated from blood samples or frozen brain tissue as published before, after informed consent to the patient or one of his relatives in the frame of CJD Surveillance [16, 35, 56].

Neuropathology

Formalin fixed, paraffin-embedded tissue blocks (2.5 \times 2.0 cm) were evaluated. Post mortem delay was generally within 24 h except for three cases (48 h). The latter were not included in our biochemical studies. In addition to hematoxylin and eosin staining, the following monoclonal antibodies were used for immunohistochemistry: anti-tau AT8 (pS202, 1:200) AT100 (pS212, 1:200), AT180 (pT231, 1:200), HT7 (tau 169-163, 1:100; all from Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA), anti-phospho-TDP-43 (pS409/410, 1:2,000, Cosmo Bio, Tokyo, Japan), anti- α -synuclein (1:10,000, clone 4D6, Signet, Dedham, MA, USA), anti-A β (1:50, clone 6F/3D, Dako, Glostrup, Denmark), anti-PrP (1:1,000, 12F10, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), anti-4R tau (RD4, 1:200, Upstate, Charlottesville, VA, USA), and anti-3R tau (RD3, 1:2,000, Upstate). In addition, we used the following polyclonal antibodies: anti-A β -40 (1:200) and anti-A β -42 (1:50; both Signet, Dedham, MA, USA), and anti-FUS (1:1000, Sigma, St. Louis, MO, USA). The DAKO EnVision[®] detection kit, peroxidase/DAB, rabbit/mouse (Dako, Glostrup, Denmark) was used for visualization of antibody reactions. Examined anatomical regions are summarized in Table 1. Neuropathological alterations (spongiform

Table 1 Summary of anatomical regions examined using different antibodies for immunostaining

Anatomical region/antibody	PrP	pTau	α -Syn	A β	pTDP-43	FUS	Ubi
Frontal cortex	+	+	+	+	+	+	+
Cingular cortex	+	+	+	-	-	-	-
Parietal cortex	+	-	-	-	-	-	-
Temporal cortex	+	+	+	+	-	-	-
Occipital cortex	+	+	-	+	-	-	-
Hippocampus CA subregions	+	+	+	+	+	+	+
Dentate gyrus	+	+	+	+	+	+	+
Subiculum	+	+	+	+	+	+	+
Entorhinal cortex	+	+	+	+	+	+	+
Caudate nucleus	+	+	+	+	-	-	-
Putamen	+	+	+	+	-	-	-
Globus pallidus	+	+	+	+	-	-	-
Thalamus medial nuclei	+	+	-	-	-	-	-
Thalamus lateral nuclei	+	+	-	-	-	-	-
Substantia nigra	+	+	+	-	+	+	+
Dorsal raphe nucleus	+	+	+	-	-	-	-
Locus coeruleus	+	+	+	-	-	-	-
Pontine base nuclei	+	+	+	-	-	-	-
Inferior olives	+	+	+	-	-	-	-
Hypoglossus nucleus	+	+	+	-	-	-	-
Dorsal vagus nucleus	+	+	+	-	-	-	-
Dentate nucleus	+	+	+	+	+	+	+
Cerebellar cortex	+	+	+	+	+	+	+

change, astrogliosis, neuronal loss, and degree of various protein depositions) were semiquantitatively (none, mild, moderate, severe) evaluated in all examined anatomical regions.

Double immunolabeling was performed using monoclonal PrP (12F10, 1:300), A β (1:20, Dako), Tau AT8 (1:100), SMI-31 (1:2000, Covance, Berkeley, CA), Map-2 (1:250, Millipore Corp., Billerica, MA), HLA-DR (1:50, Dako), and polyclonal GFAP (1:1500, Dako). The fluorescence-labeled secondary antibodies were Alexa Fluor (AF) 555 donkey anti-mouse IgG (1:200; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA), AF 488 goat anti-rabbit (1:200; Molecular Probes, Inc.), and Zenon AF 488 Mouse IgG₁ (Molecular Probes, Inc.). The following combinations were applied: PrP (AF 555)/Tau (Zenon 488); PrP (AF 555)/A β (Zenon 488); HLA-DR, SMI-31, and Map-2 (AF 555)/Tau (Zenon 488), and Tau (AF 555)/GFAP (AF 488). Double immunolabeling involving anti-PrP antibody was performed after pretreatment of the section with 20 min heat-induced epitope retrieval with citrate buffer (pH 6) followed by 2 min formic acid (96%); for all others

20 min heat-induced epitope retrieval with citrate buffer was used. We evaluated double immunofluorescent labeling with a Zeiss LSM 510 confocal laser microscope.

Immunoblotting

Prion protein

Western blot analysis was performed as previously described with minor modification [58]. Briefly, 20% cortical gray matter homogenates were obtained using buffer containing 5% glucose in ultra pure grade water. Homogenates were diluted twofold in buffer [100 mM Tris (pH 7.4), 0.5% glucose, 0.9% NaCl] and digested with proteinase K (25 μ g/ml) for 1 h at 37°C before stopping digestion by 1 mM PMSF. Digested homogenates were further ultracentrifuged (Sorvall Discovery M150 SE, Thermo, USA) in *N*-lauryl-sarcosyl (final concentration of 10%) for 75 min at 140,000 rpm. Pellets were resuspended with a denaturing buffer (125 mM Tris, 4% SDS, 20% glycerol), heated for 5 min at 100°C and centrifuged at 12,000g for 10 min. The supernatant was collected for western blot analysis. Samples and biotinylated molecular mass marker (SIGMA, range 14.3–97.0 kDa) were run on 16% SDS-PAGE gels. In addition, selected samples were also run on a 12% gel. All immunoblots were incubated with the monoclonal antibody 3F4 (recognizing the epitope at PrP residues 108–111) at a concentration of 0.1 μ g/ml (Proteinogenics, USA), followed by incubation with a goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP) conjugated antibody and detection using a chemiluminescent substrate (Supersignal Dura, Pierce, USA).

Tau

Frozen brain tissue from four neuropathologically confirmed E200K genetic CJD patients (3 French and 1 Hungarian), one confirmed AD patient and one control brain from an individual lacking tau pathology was obtained. Insoluble tau fraction was extracted as described [28] with some modifications. Briefly, 20% cortical gray matter homogenates were prepared using a buffer containing 50 mM Tris (pH 7.4), 0.8 M NaCl, and 10 mM EGTA. Homogenates were centrifuged at 100,000g for 25 min and the resulting pellets were homogenized in 1 mL of buffer containing 10 mM Tris (pH 7.4), 0.85 M NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM NaF and 10% sucrose. Following centrifugation for 25 min at 20,000 rpm, sarkosyl was added to supernatants to a final concentration of 1%. After incubation at RT for 2 h, the supernatants were centrifuged at 100,000 rpm for 45 min. The sarkosyl-insoluble pellets were suspended in 50 μ L Laemmli buffer and heated for 10 min at 100°C.

Table 2 Summary of clinical and demographic data

Features	PRNP codon 129			All**
	MM	MV	VV	
Number of cases	21 (58.3%)	14 (38.9%)	1 (2.8%)	36/39
Women	14 (35.8%)	5 (12.8%)	1 (2.5%)	22 (56.4%)
Men	7 (17.9%)	9 (23%)	0	17 (43.6%)
Age at death (mean ± SE)	59.76 ± 2.27	60.64 ± 1.81	66.0	60.28 ± 1.49
Duration of illness (mean ± SE)	4.20 ± 0.60	5.77 ± 0.84	4.0	4.79 ± 0.48
Age range	33–76	46–74	66.0	33–76
Duration of illness range	2–12	1–13	4	1–13
Dementia	17 (81%)	14 (100%)	1	35 (89.7%)
Ataxia	16 (76.2%)	12 (85.7%)	1	32 (82.1%)
Myoclonus	13 (61.9%)	5 (35.7%)	1	20 (51.3%)
Pyramidal signs	10 (47.6%)	5 (35.7%)	0	15 (38.5%)
Rigidity/Parkinsonism	2 (9.5%)	3 (21.4%)	0	6 (15.4%)
Chorea/Dystonia	9 (42.9%)	4 (28.6%)	0	14 (35.9%)
Gaze palsy	3 (14.3%)	1 (7.1%)	0	4 (10.3%)
Insomnia*	2 (9.5%)	1 (7.1%)	0	3 (7.7%)
Early psychiatric symptoms	5 (23.8%)	2 (14.3%)	0	7 (17.9%)
Early behavioral change	5 (23.8%)	1 (7.1%)	1	7 (17.9%)
Polyneuropathy	2 (9.5%)	3 (21.4%)	0	6 (15.4%)
EEG: PSWC	10/19 (52.6%)	4/13 (30.8%)	0	15/35 (42.9%)
MRI: high signal in striatum	6/12 (50%)	2/6 (33.3%)	1	9/19 (47.3%)
MRI: high signal in thalamus	2/12 (16.7%)	2/6 (33.3%)	0	4/19 (21%)

Duration of illness is given in months, age at death in years
 From the 39 cases involved in the study, clinical information in one case and in three data on codon 129 were not available
 PSWC periodic sharp wave complexes with triphasic morphology
 * Reported prominent insomnia without polysomnography
 ** Including cases where there was a lack of data on codon 129

Samples were run on 4–12% gradient SDS-polyacrylamide gels (NuPAGE, Invitrogen). Proteins then were transferred onto Immobilon-P membranes (0.45 µm pore size, Millipore) and blocked overnight at 4°C. Afterwards, the membranes were incubated using the following primary antibodies: Anti-tau T46 (Signet, Dedham, MA, USA; 1:2,000 in PBS containing 0.5% Tween-20 and 0.5% dry milk) is a monoclonal antibody [34] raised against all six isoforms of human tau recognizing both recombinant human tau and PHF-tau on immunoblots; the phospho-dependent anti-Tau AT8 (Innogenetics, Gent, Belgium; 1:1,000 in PBS containing 0.1% Tween-20 and 0.5% dry milk) is a monoclonal antibody [20] directed against both Ser202 and Thr205 phospho-epitopes of tau; for the analysis of repeat isoforms in insoluble tau we used clone 8E6/C11 for the detection of three-repeat isoform RD3 of tau [10] (Millipore, Temecula, CA, USA; 1:1,000 in TBS containing 0.05% Tween-20 and 0.5% dry milk) and clone 1E1/A6 for the detection of four-repeat isoform RD4 of tau [65] (Millipore, Temecula, CA, USA; 1:1,000 in TBS containing 0.05% Tween-20 and 0.5% BSA). After incubation with a goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP) conjugated antibody (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) at a final dilution of 1/10,000, immunological detection was performed using chemiluminescence technology according to the manufacturer's instructions (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA).

Statistical analysis

Duration of illness, age at death, scores of neuropathological variables in different groups were compared using one-way ANOVA test or χ^2 test.

Results

Summary of clinical and genetic data

Clinical data were available for 38 (out of 39) patients (Table 2). Analysis of PRNP codon 129 was available for 36 patients. Age at death did not differ between constellations of codon 129, while the duration of illness was longer in patients with MV at codon 129, although in our cohort it did not reach the level of significance ($p > 0.05$). The most frequent clinical symptoms were dementia and ataxia followed by myoclonus and various combinations of further symptoms. Prominent vertical gaze palsy was described in 10.3% of patients, and polyneuropathy (axonal and rarely demyelinating) was noted in 15.4%, while early psychiatric symptoms or behavioral change was also noted in approximately one-fifth of individuals. Cranial MRI images were available for one-third of the patients; high signal in the basal ganglia was noted in approximately half of the patients, while high signal in the thalamus was seen

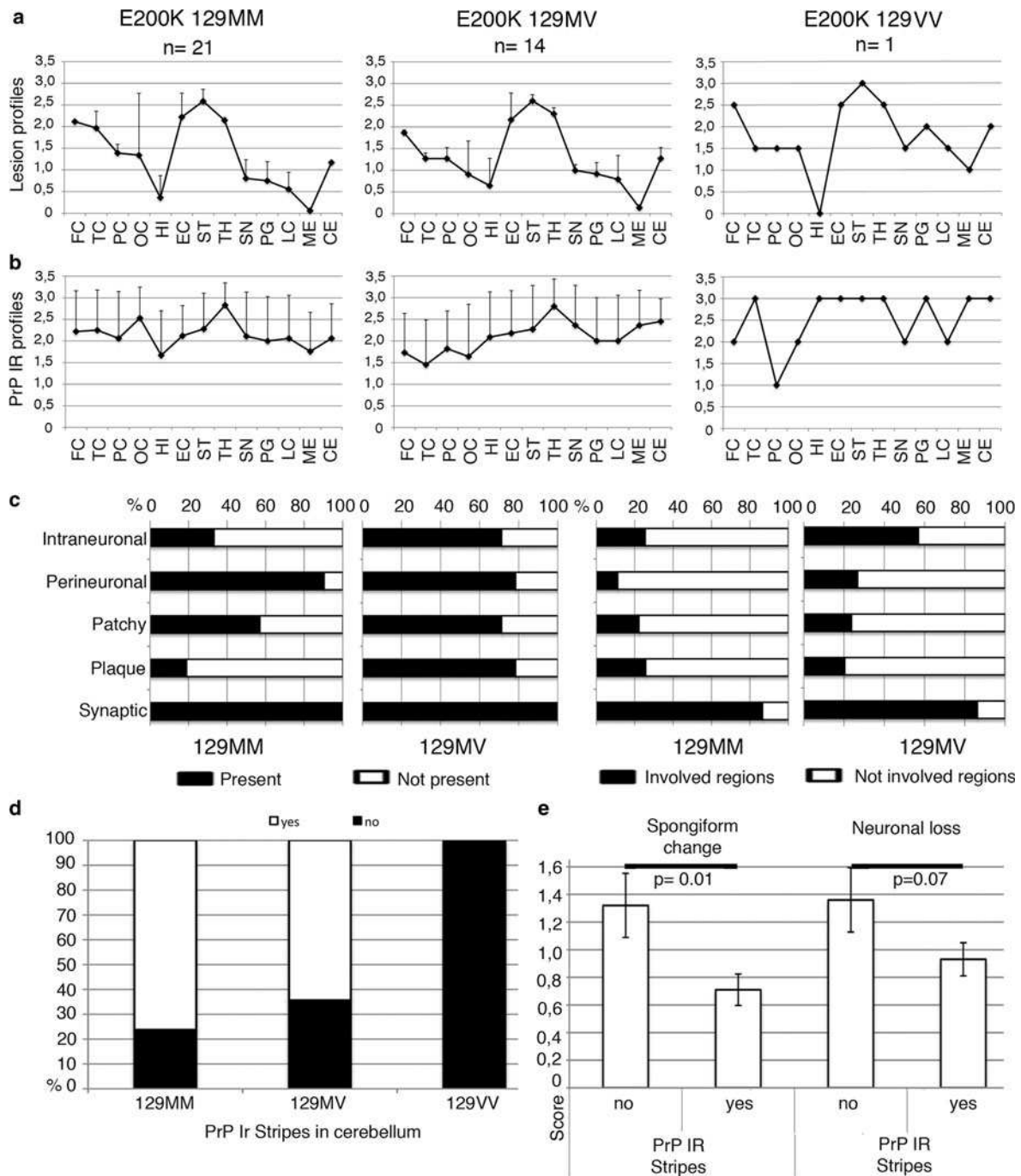
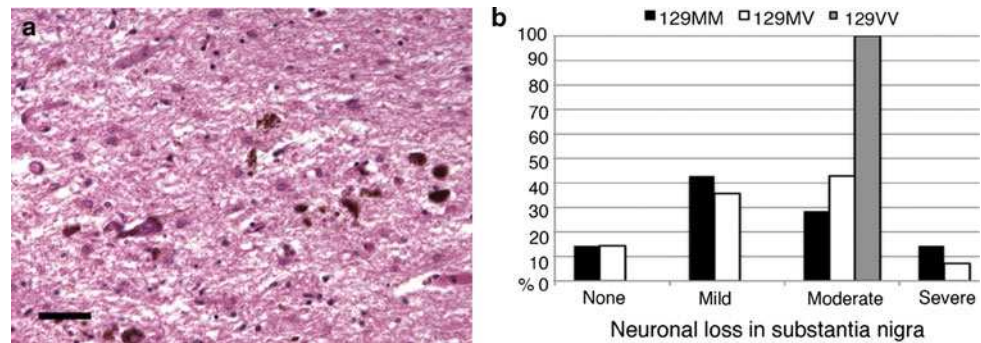


Fig. 1 Lesion and PrP immunoreactivity profiles and anatomical correlations of PrP immunoreactivities in E200K genetic CJD cases grouped according to the codon 129 polymorphism. **a** Lesion profiles [53] obtained by averaging the three scores (see text) for spongiform change, neuronal loss, and gliosis in the following gray matter regions: frontal cortex (FC), temporal cortex (TC), parietal cortex (PC), occipital cortex (OC), hippocampus CA1 subregion (HI), entorhinal cortex (EC), neostriatum (ST), medial thalamus (TH), substantia nigra (SN), midbrain periaqueductal gray (PG), locus coeruleus (LC), medulla oblongata (ME), cerebellum (CE). **b** PrP immunoreactivity profiles obtained by averaging the scores of different PrP immunoreactivities in the same regions indicated in **a**.

c Percentage of cases with E200K genetic CJD grouped according to the polymorphism at codon 129 with or without different kinds of PrP immunoreactivities (two graphs on the left side) and the percentage of involved regions showing different PrP immunopositive patterns (two graphs on the right side). **d** Distribution of cases showing stripe-like PrP deposition in the molecular layer of the cerebellum in different groups (according to codon 129 polymorphism) of E200K genetic CJD cases. **e** Comparison of scores of spongiform change and neuronal loss in the cerebellar molecular layer and granular layer, respectively, in E200K genetic CJD cases with or without stripe-like pattern of PrP immunoreactivity

Fig. 2 Neuropathological alterations in the substantia nigra. **a** Neuronal loss and extracellular pigment in the substantia nigra in a representative case (*bar graph* indicates 30 μ m). **b** Distribution of cases with none, mild, moderate or severe lesioning in the substantia nigra



in four patients, two of them with thalamic signal that was higher than in the basal ganglia, and was reminiscent of the pulvinar sign described in variant CJD [39]. Periodic sharp wave complexes with triphasic morphology were described in 43% of the patients' EEGs.

Neuropathological alterations

Spongiform change, neuronal loss and reactive astrogliosis of variable degree were observed in all cases. Vascular pathology with infarctions was seen in two cases. The distribution of spongiform change was relatively uniform in all patients irrespective of the constellation at codon 129 (Fig. 1a). In addition to neocortical regions, caudate nucleus, putamen and thalamic nuclei were most severely affected. In the cortex the deeper layers were frequently more involved, while in the hippocampal region, subiculum and entorhinal cortex had most tissue lesioning. Interestingly, the cerebellar cortex was relatively preserved in many cases. Gliosis and neuronal loss followed the degree of spongiform change, but predominated over spongiform change in the thalamus, particularly in brainstem nuclei (see supplemental Fig. 1a). Neuronal loss with extracellular pigment was frequently seen not only in the substantia nigra (Fig. 2a) but also in the locus coeruleus and dorsal raphe nucleus. Indeed, many cases with MM or MV at codon 129 showed moderate (28% MM, 42% MV) or severe (14% MM, 7% MV) lesioning in the substantia nigra, and only 15% of the cases in each group exhibited preserved neurons (0 score) (Fig. 2b). One case showed severe damage of the cortex with myelin loss and gliosis in the white matter compatible with a panencephalopathic form of CJD (62-year-old Belgian patient with 14 months duration of disease).

Characterization of proteinopathies

Prion protein

Immunohistochemistry Immunostaining for PrP revealed diffuse/synaptic deposits, patchy aggregates in the neuropil

or around vacuoles, plaques without amyloid characteristics, fine perineuronal immunodeposits, and prominent intraneuronal dots (Fig. 3a–e). In cortical areas, laminar accentuation of PrP immunoreactivity was evident in many cases (Fig. 3f); synaptic or absence of PrP immunoreactivity frequently alternated with small foci showing prominent patchy aggregates of PrP (Fig. 3g). Of note was the frequent coarse deposition in medial thalamus (Fig. 3h). Prominent immunodeposition (synaptic and intraneuronal type) was noted in brainstem nuclei (Fig. 3i) and other subcortical areas (Fig. 3j). Although the involvement of regions was not significantly different between cases (Fig. 1b) and synaptic PrP immunoreactivity was seen in all cases, plaque-like structures and intraneuronal PrP immunodeposition predominated in cases with MV at codon 129 (Fig. 1c, supplemental Fig. 1b), particularly in the cortex. Plaque-like structures were more frequent in the hippocampus (Fig. 3k). When present, intraneuronal immunoreactivity always involved brainstem nuclei and showed prominent layer difference (deep layers > upper layers) in the cortex (see supplemental Fig. 1c). In the cerebellum, majority of the cases showed prominent PrP immunoreactivity restricted to the molecular layer in a stripe-like pattern [32] (Fig. 1d). Interestingly, these cases showed less prominent spongiform change in the molecular layer and less neuronal loss in the granular layer in comparison to cases with diffuse/synaptic PrP immunoreactivity involving all layers (Figs. 3l–o, 1e).

Western blot analysis of PrP^{res} Six French and four Hungarian subjects with confirmed prion diseases associated with E200K mutation on the *PRNP* gene were examined. Six individuals were methionine (MM) homozygous at codon 129 and 4 were heterozygous (methionine/valine, MV). E200K mutation was coupled with methionine at codon 129 in all cases. One further Austrian case homozygous for valine (VV) at codon 129 was published before [26].

The molecular type of PrP^{res} was determined by comparison with PrP^{res} type 1 and type 2 from the prefrontal cortex of two patients with sporadic CJD as reference

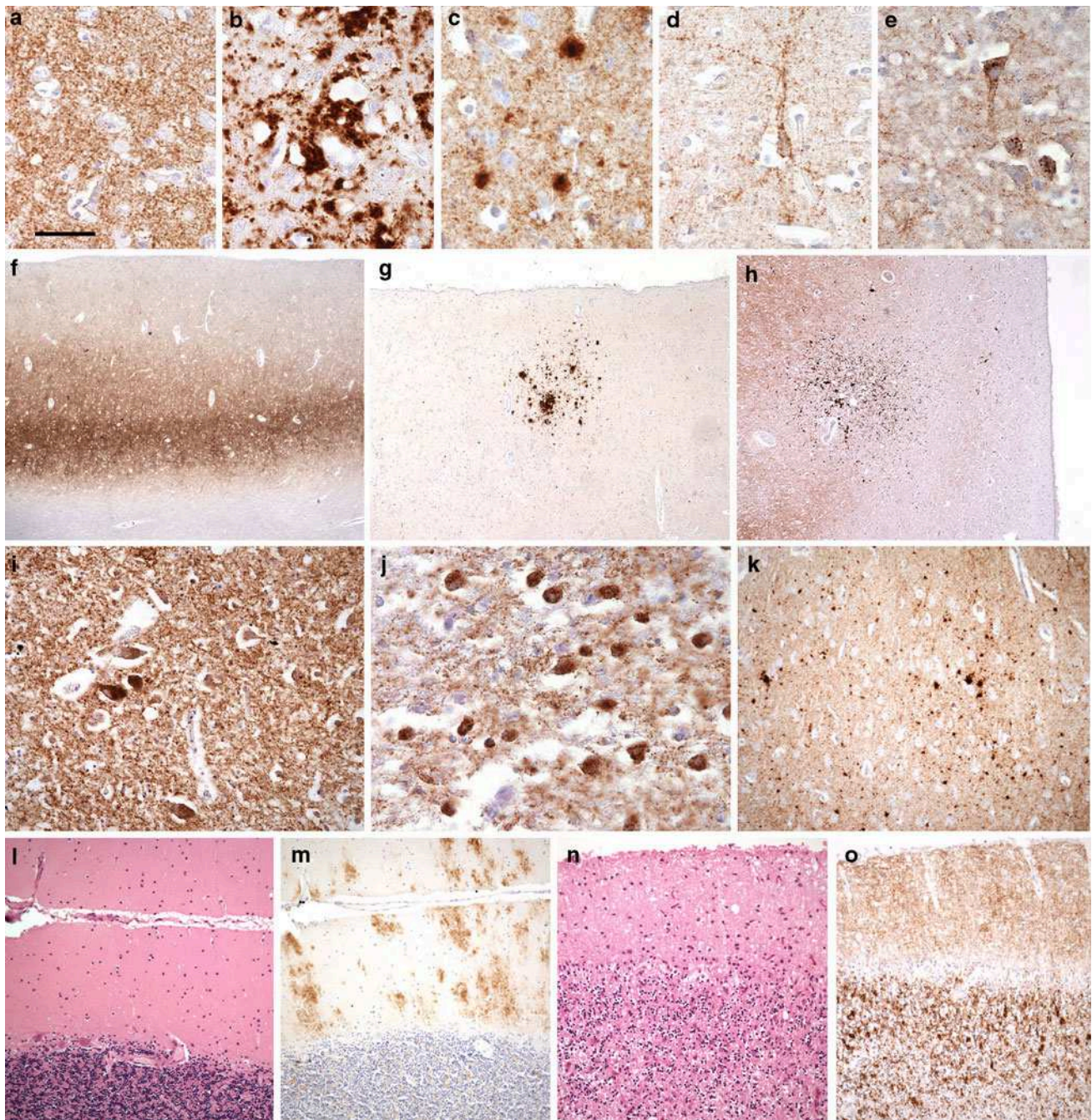


Fig. 3 Immunostaining for disease-associated prion protein. Immunostaining for PrP reveals diffuse/synaptic deposits (**a**), patchy/perivacuolar aggregates in the neuropil (**b**), plaque-like structures without amyloid characteristics (**c**), fine perineuronal immunodeposits (**d**), and prominent intraneuronal dots (**e**). In cortical areas laminar accentuation of PrP immunoreactivity is evident in many cases (**f**). In circumscribed cortical areas prominent patchy aggregates of PrP are seen (**g**). Coarse aggregates are frequent in the medial thalamus (**h**). Prominent immunodeposition (synaptic and intraneuronal type) in the

locus coeruleus (**i**) and the lateral geniculate body (**j**). Plaque-like structures are frequent in the hippocampus (**k**). In the cerebellum less prominent spongiform change and neuronal loss (**l**, H&E) are associated with a stripe-like pattern of PrP immunoreactivity in the molecular layer of the cerebellum (**m**), contrasting those with obvious spongiform change and neuronal loss (**n**, H&E) and diffuse/synaptic PrP immunoreactivity (**o**). *Bar graph* in **a** indicates 60 μ m for **a–e** and **i–k**, 500 μ m for **g**, **h**, 1,000 μ m for **f**, and 150 μ m for **l–o**

standard (MM type 1 and VV type 2) [53]. The PrP^{res} patterns observed in these patients with the E200K mutation appeared distinct from the PrP^{res} pattern of patients

with sporadic CJD PrP^{res} type 1 and type 2. These atypical patterns were apparently linked to an increase in the amounts of diglycosylated bands and a lower representation

of the unglycosylated one, associated with a discrete closeness between the di- and the monoglycosylated bands (Fig. 4).

The measurement of molecular masses in comparison to a molecular mass standard ladder loaded on SDS-PAGE in three wells clearly showed no difference between PrP^{res} type 1 in sporadic CJD and the PrP^{res} from E200K mutation. The difference of molecular masses calculated between the PrP^{res} type 1 and type 2 was 1.27 ± 0.06 kDa when samples were run in 16% gels. Interestingly, for three patients (2 MV and one MM at codon 129), we found a PrP^{res} with a type halfway between type 1 and type 2 of Parchi's classification [53], the difference between PrP^{res} type 1 and PrP^{res} from these patients (arbitrarily termed type 1* here) was 0.7 kDa (Fig. 4a). Running electrophoresis on 12% gels of these samples, this type 1* PrP^{res} was similar to type 1 of that described by Parchi et al. [53] in sporadic CJD (Fig. 4b).

Most genetic cases studied here presented a PrP^{res} type similar to type 1 (7/10 patients E200K) whereas one presented a type 2 (MV at codon 129) in the cerebellum, thalamus, frontal, and occipital cortex, and two cases showed mixed PrP types: one case (MV at codon 129) exhibited type 2 PrP^{res} in occipital, frontal, and temporal cortex, but type 1 in the cerebellum, thalamus, striatum, and cingulate gyrus (Fig. 4c); another case (MM at codon 129) showed mainly type 1 PrP^{res} but with co-occurrence of types 1 and 2 in frontal cortex. These patterns correlated well with coarse and fine immunodeposits seen in immunohistochemistry.

Tau pathology

Immunoreactivity for phosphorylated tau: three patterns of tau pathology as seen by immunostaining for AT8 (summarized in Fig. 5)

1. In 36 cases (93.3%), neuritic profiles were immunostained, mainly in areas with more prominent tissue pathology, neuronal loss and spongiform change (Fig. 6a), including the posterior horn of the spinal cord in the single case where spinal cord was available.
2. In addition, in 15 cases (38.4%) neurofibrillary degeneration (Fig. 6b) following Braak and Braak stages were observed. Three further cases showed neurofibrillary tangles restricted to the dorsal raphe nucleus and locus coeruleus.
3. Furthermore, 13 cases (33.3%) showed features of a tauopathy that does not fulfill criteria of established sporadic tauopathy entities. This could be further subdivided as follows:
 - (a) Six cases with neurofibrillary tangles, diffuse cytoplasmic tau immunoreactivity (pretangle-like),

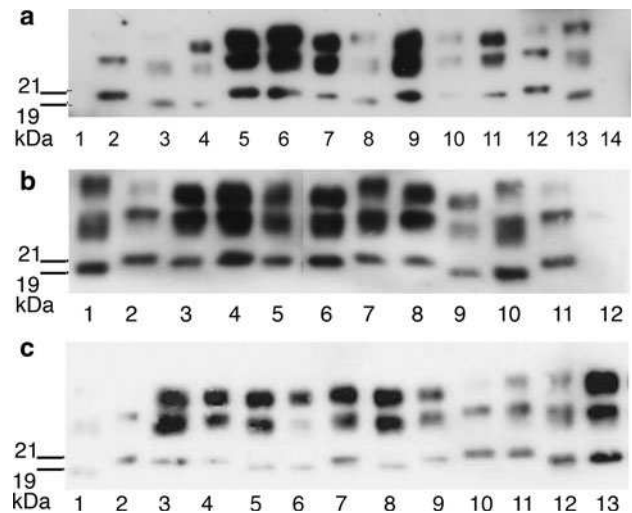
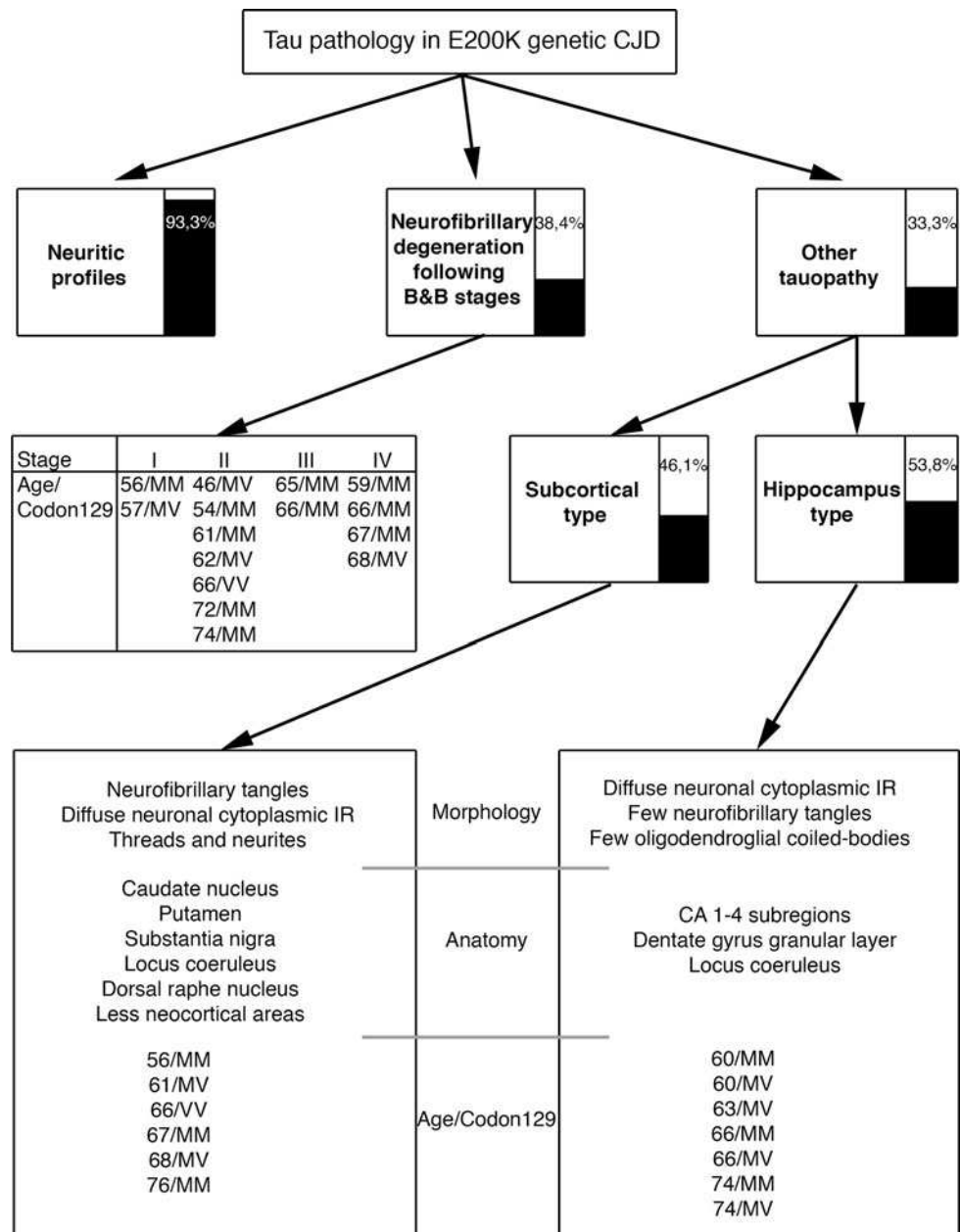


Fig. 4 Immunoblotting for disease-associated prion protein in representative cases. **a** PrP^{res} was extracted from different brain areas; after separation in 16% gels in denaturated conditions, PK resistant fragment of PrP were labeled by 3F4 anti prion antibody. Lanes 1 and 14 negative control from non CJD patient, Lanes 2 and 12 type 1 PrP^{res} control from sporadic CJD, Lanes 3 and 13 type 2 PrP^{res} control from sporadic CJD, Lane 4 50 µg of thalamus from a French E200K CJD patient (MV at codon 129), Lane 5 0.7 mg of frontal from a Hungarian E200K CJD patient (MM at codon 129), Lane 6 1 mg of cerebellum from a Hungarian E200K CJD patient (MM at codon 129), Lanes 7 and 11 type 1-like PrP^{res} (see text) from a French E200K patient (MV at codon 129), Lane 8 type 2 PrP^{res} control from sporadic CJD, Lane 9 type 1-like PrP^{res} from 100 µg of cerebellum from a Hungarian E200K CJD patient (MV at codon 129), Lane 10 type 1-like PrP^{res} (250 µg) from a Hungarian E200K CJD patient (MM at codon 129). **b** After initial running in 16% gels, some PrP^{res} types were confirmed after separation in 12% gels in denaturated conditions; PK resistant fragment of PrP were labeled by 3F4 anti prion antibody. Lanes 1 and 10 type 2 PrP^{res} control from sporadic CJD, Lanes 2 and 11 type 1 PrP^{res} control from sporadic CJD, Lane 3 50 µg of thalamus from a French E200K CJD patient (MV at codon 129), Lane 4 250 µg of frontal cortex from a Hungarian E200K CJD patient (MM at codon 129), Lane 5 100 µg of cerebellum from a Hungarian E200K CJD patient (MV at codon 129), Lane 6 type 1 PrP^{res} control from a French E200K patient, Lane 7 1 mg of cerebellum from a Hungarian E200K CJD patient (MM at codon 129), Lane 8 0.7 mg of frontal cortex from a Hungarian E200K CJD patient (MM at codon 129), Lane 9 50 µg of thalamus from a French E200K CJD patient (MV at codon 129), Lane 12 negative control from non CJD patient. **c** Western blot analysis of seven different brain areas from one E200K M129V CJD patient (lanes 3–9), probed with 3F4 anti-PrP mAb. Controls: lanes 1 and 12 PrP^{res} type 2a (sporadic CJD), lane 2 control PrP^{res} type 1 (sporadic CJD), lane 10 control PrP^{res} type 1 (genetic CJD-E200K), lane 13 control PrP^{res} type 2b (variant CJD), lane 3 type 1 PrP^{res} from cerebellum (1 mg), lane 4 type 1 PrP^{res} from striatum (100 µg), lane 5 type 2a PrP^{res} from frontal (250 µg), lane 6 type 2a PrP^{res} from occipital cortex (16 µg), lane 7 type 1 PrP^{res} from thalamus (16 µg), lane 8 type 2a PrP^{res} from temporal (250 µg), lane 9 type 1 PrP^{res} from cingulate (50 µg)

and threads in the caudate nucleus, putamen (Fig. 6c), brainstem (substantia nigra, dorsal raphe nucleus, and locus coeruleus) (Fig. 6d, e), and less in the thalamus, including one with

Fig. 5 Stratification of tau pathology in E200K genetic CJD according to cytopathology, regional distribution, age, and codon 129 polymorphism

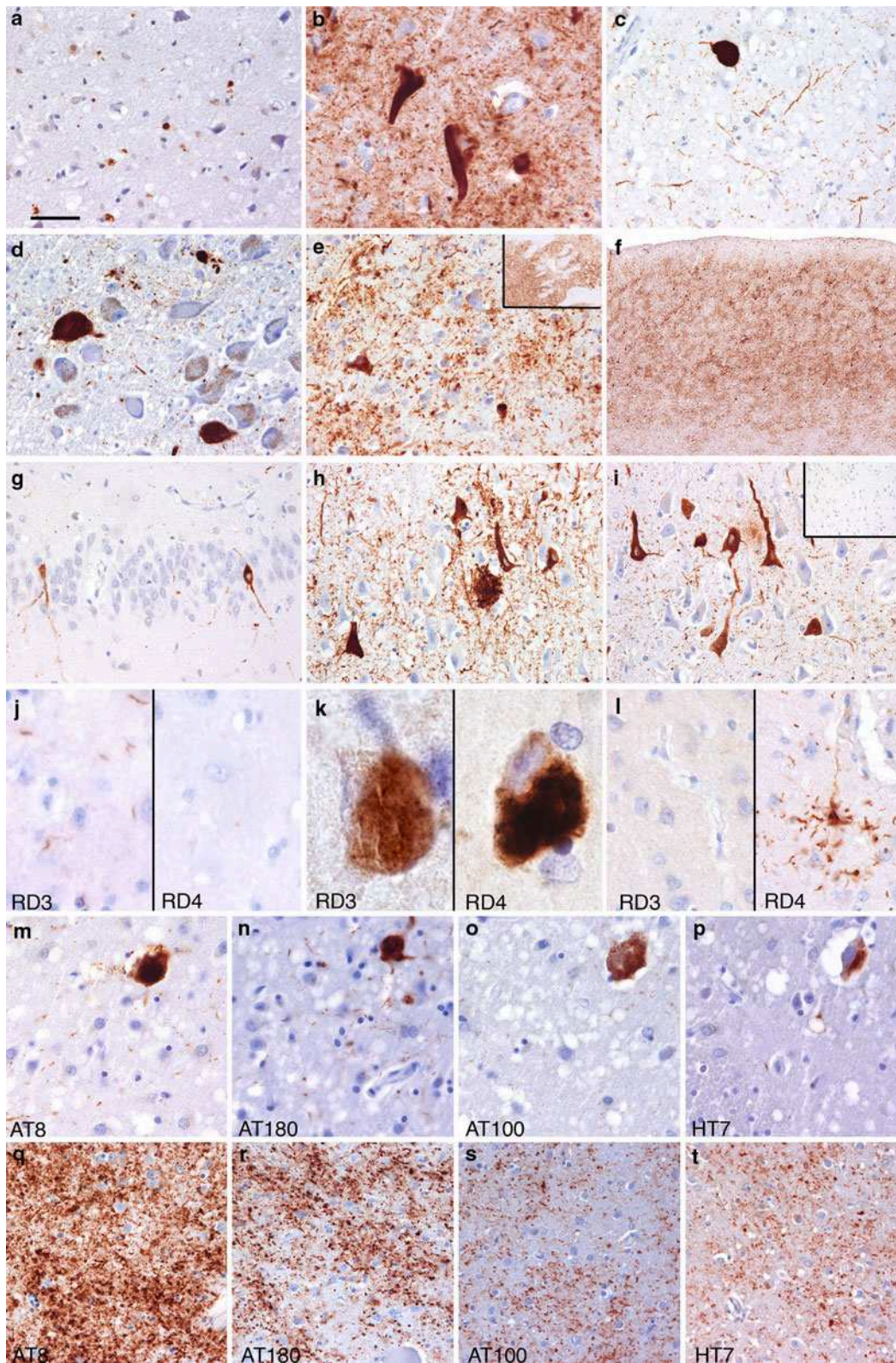


prominent involvement of neocortical regions (Fig. 6f). There was lack of astrocytic plaques or tufted astrocytes, although some dot-like immunostaining of astrocytic processes were noted. Oligodendroglial coiled bodies were only occasionally seen.

- (b) Seven further cases had an unusual distribution of neuronal and glial tau deposition in the hippocampus, which included neurofibrillary tangles and prominent diffuse neuronal granular cytoplasmic immunoreactivity not only in CA4, CA3, and CA2 subregions and dentate gyrus, but also in the CA1 subregion and subiculum, without or with scant neurofibrillary degeneration in the

entorhinal cortex (Fig. 6g–i). In these cases argyrophilic grains were not seen, but some oligodendroglial tau immunopositivity and dot-like immunolabeling of astrocytic processes were observed. Interestingly, these cases also showed neurofibrillary tangles in the locus coeruleus.

Immunostaining for different anti-tau antibodies and co-localization studies Neuritic profiles were detected using immunostaining for 3R tau and less for 4R (Fig. 6j). Tau immunoreactive neurites occasionally co-localized with disease-associated PrP (Fig. 7a). Globose tangles in subcortical areas were only rarely immunoreactive for 3R



tau, but many were prominently 4R immunoreactive (Fig. 6k). In neocortical areas and hippocampus, both 3R and 4R immunopositivities were noted in neurofibrillary

tangles. Thread-like structures were mainly 4R immunopositive (Fig. 6l) and were associated with neurofilaments but not astrocytic processes (Fig. 7b, c). In such areas, PrP

◀ **Fig. 6** Immunoreactivity for phosphorylated tau. **a** Neuritic profiles in the neuropil in areas with spongiform change (AT8, thalamus). **b** Neurofibrillary tangles in the temporal cortex (AT8). **c** Globose neurofibrillary tangles and threads in the putamen (AT8) and in the locus coeruleus (**d**). Prominent thread pathology and neuronal cytoplasmic immunoreactivity in the caudate nucleus (**e**, right upper inset shows overview) and in the frontal cortex (**f**) in a representative case (AT8). Diffuse neuronal cytoplasmic immunoreactivity in the granular layer of the dentate gyrus (**g**), in the CA2/3 subregion (**h**), and in the CA1 subregion (**i**) with thin thread and dots in the neuropil, and a relative sparing of the entorhinal cortex (**i**, right upper inset, all AT8). Neuritic profiles are immunoreactive mainly for 3R tau (**j**, left side), globose tangles in subcortical areas are immunoreactive for both 3R (**k**, left side) and 4R tau (**k**, right side of image), while cases with prominent thread-like pathology show mainly 4R immunoreactivity (**l**, right side of image). Representative images of a case with subcortical tauopathy (**m–p**) and one with prominent threads (**q–t**) immunostained with AT8 (**m**, **q**), AT180 (**n**, **r**), AT100 (**o**, **s**), and HT7 (**p**, **t**) antibodies. Bar graph indicates in **a** indicates 60 μm for **a–e**, **g–i**, and **m–t**, 1,000 μm for **f** and **e** upper inset; and 20 μm for **j–l**

deposition was also noted (Fig. 7d). We immunolabeled all these structures with anti-AT180, AT100, and HT7 antibodies (Fig. 6m–t), although neuritic profiles were less seen with HT7. AT8 and AT180 produced the most extensive immunoreactivity.

Immunoblotting for tau Four cases were examined: three cases (MM at codon 129) with only mild to moderate neuritic tau pathology, and one further case (MV at codon 129) with tau pathology in the cortex. In one case with mild dot-like neuritic immunoreactivity detected by the AT8 antibody in immunohistochemistry, western blotting of sarkosyl-insoluble tau using anti-tau AT8 antibody did not reveal immunopositivity. However, anti-tau antibody T46 showed immunoreactivity at 60 and 64 kDa in the frontal cortex and hippocampus (Fig. 8a, b). This was confirmed by the lack of labeling with RD4 and immunopositivity with the RD3 antibody (Fig. 8c, d) supporting our immunohistochemical observations with anti-RD3 and RD4. Both antibodies detected further small molecular weight bands. In one case with neurofibrillary tangles and glial tau immunoreactivity (MV at codon 129), AT8 and T46 showed patterns similar to AD (Fig. 8e) in the medial temporal lobe (hippocampus) sample, while 3R tau was detected in several regions examined (Fig. 8f). Unfortunately, frozen material was not available in cases with the unusual immunohistochemical patterns, predominated by 4R immunopositivity, of tau described above.

α -Synuclein pathology

Three types of α -synuclein pathology were observed: (1) typical Lewy bodies and Lewy neurites following Braak stages in six cases (15.4%) [4]; this consisted of three cases (aged 53, 66, and 66) with neocortical involvement (Braak V–VI) (Fig. 9a), two cases (aged 67 and 68) with limbic

involvement (Braak IV), and one with brainstem involvement (aged 60) (Fig. 9b). (2) Prominent neuronal granular diffuse cytoplasmic immunoreactivity restricted to neurons of medullary raphe nuclei, dorsal vagus nucleus (Fig. 9c), locus coeruleus and substantia nigra; this was observed in 13 cases (including 4 with immunoreactivity only in the medulla oblongata) lacking Lewy bodies or Lewy neurites. Lower raphe nuclei and the dorsal vagus nucleus always showed the most prominent neuronal immunoreactivity, but scattered cortical neurons also showed this immunoreactivity. (3) Some areas showed small aggregates of α -synuclein in the neuropil reminiscent of that described in sporadic CJD [25]. However, this was not consistent and showed no region preference or relation to PrP deposition.

Deposition of A β

This included mainly diffuse deposits, some with multiple small cores, subpial and vascular deposition (Fig. 9d–f). Parenchymal deposits were mainly A β -42 and less A β -40 immunoreactive (Fig. 9h–i). Parenchymal A β was observed in 21 cases (53.8%) that involved frontal, temporal, and occipital regions in all, basal ganglia in five, and cerebellum in two. Cerebral amyloid angiopathy (A β -CAA) was noted in nine individuals (23.07%); this involved leptomeningeal and cortical vessels but not capillaries. Cored neuritic plaques were only occasionally seen and none of the cases fulfilled the criteria of AD according to CERAD [48]. The youngest patient with parenchymal A β deposition was 51 years old and the youngest individual with A β -CAA was 54.

Phosphorylated TDP-43, FUS, and ubiquitin immunohistochemistry

Immunostaining for FUS revealed variably strong staining of neuronal nuclei. We did not observe neuritic profiles or intracellular deposits in any case in the examined regions (Table 1). Similarly, in all cases there was a lack of phosphorylated TDP-43 pathology. Immunostaining for ubiquitin showed variable amount of granular immunoreactivity in the neuropil in severely affected areas along with neuritic profiles. Of note were the prominent perisomatic granules surrounding pyramidal neurons in the hippocampal CA1 subregion in 13 cases (33%).

Summary of proteinopathies

In addition to PrP, 36 cases (92.3%) showed some kind of concomitant protein deposition. Excluding the presence of neuritic tau pathology, co-pathology was seen in 32 cases (82%) (summarized in Table 3). Age at death and duration of illness did not differ between cases with and without

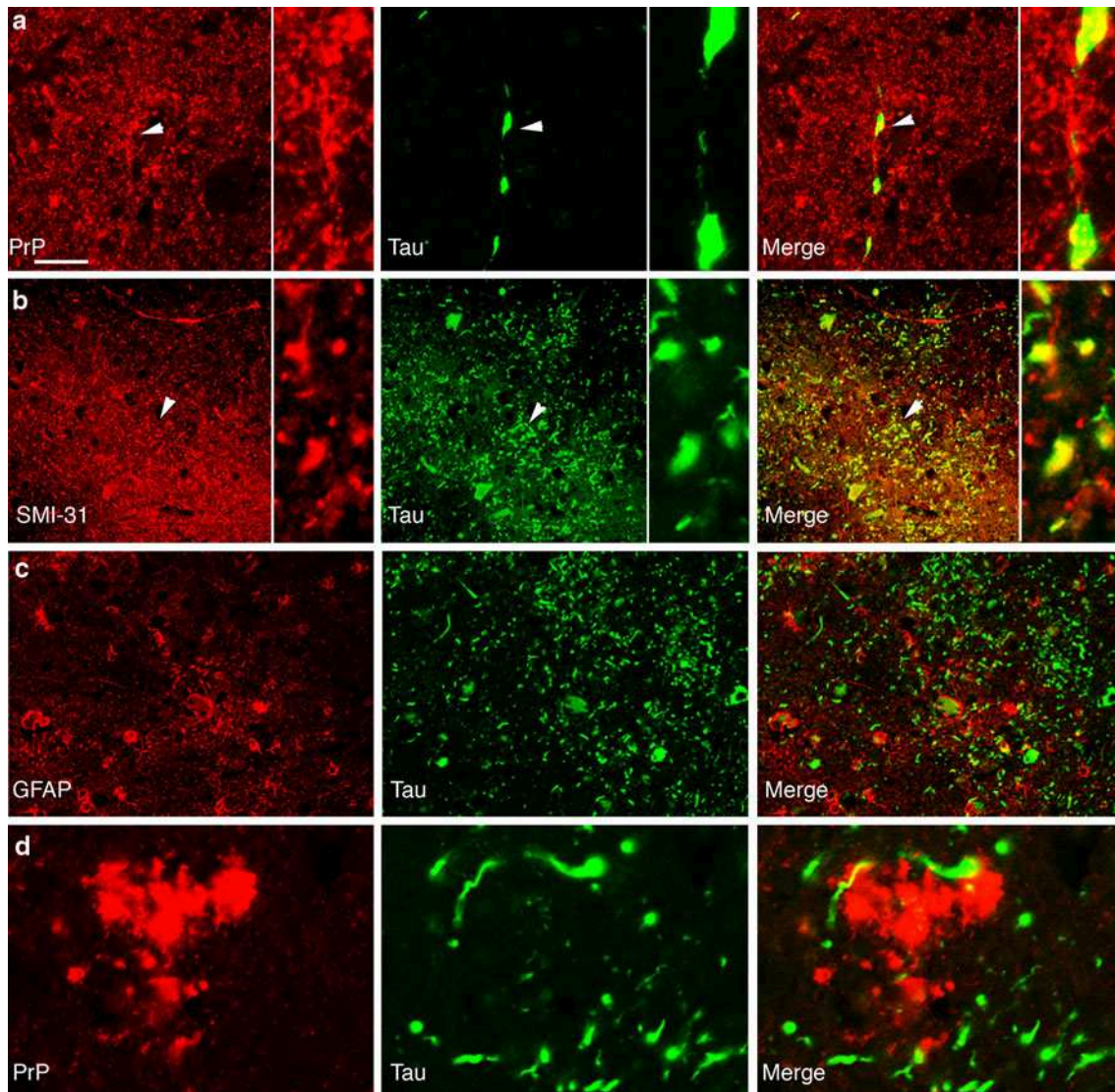


Fig. 7 Double immunolabeling in cases with tau pathology. Tau immunoreactive neurites occasionally co-localize with disease-associated PrP (**a**, AT8 green, PrP red, $\times 400$; arrowhead indicates enlarged part in the right side of the images). Thread-like pathology associates with neurofilaments (**b**, AT8 green, SMI-31 red, $\times 400$;

arrowhead indicates enlarged part in the right side of the images) and not with astrocytic processes (**c**, AT8 green, GFAP red, $\times 400$). In these areas PrP deposition is also noted (**d**, AT8 green, PrP red, $\times 1000$). Bar graph in **a** indicates 60 μm in **a–c** and 15 μm in **d** and in enlarged insets of **a–c**

co-depositions, except for older age at death in cases with unclassifiable tauopathy (mean age \pm standard error: 64.9 ± 1.7 versus 57.7 ± 1.7 ; $p = 0.016$). In cases with α -synucleinopathy, the patients already had neurological examination prior to rapidly progressive dementia, because of e.g. tremor of tongue, behavioral change, or typical Parkinsonism responding to L-Dopa therapy. In cases with tau pathology in the basal ganglia, dystonia, chorea or rigidity was noted, and in two cases supranuclear gaze palsy. In cases where memory impairment was indicated as a presenting symptom, neurofibrillary degeneration was noted. Otherwise the rapidly progressive clinical phase did not differ between cases with different protein depositions.

There was no significant influence of the *PRNP* codon 129 polymorphism on concomitant proteinopathy. Protein co-depositions were noted in individuals from all countries included in our study.

Discussion

This study has the following implications: (1) genetic CJD with the E200K mutation is clinically characterized mostly by progressive dementia and ataxia and further symptoms, however, prominent supranuclear palsy, insomnia, and polyneuropathy may also be present. (2) E200K CJD

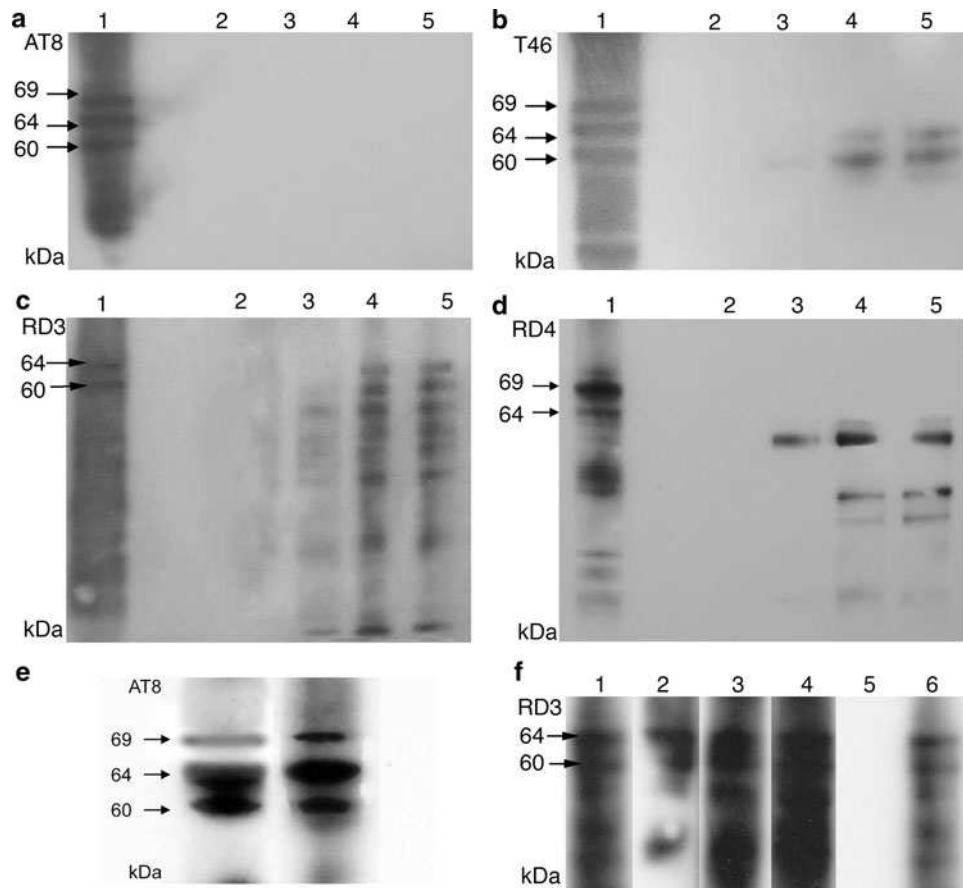


Fig. 8 Immunoblotting of sarkosyl-insoluble tau using different antibodies. **a** Immunostaining using AT8 anti-tau antibody did not reveal positive bands in a case with focal dot-like neuritic immunoreactivity observed in immunohistochemistry. **b** The same sample examined by T46 anti-tau antibody showed bands at 60 and 64 kDa molecular weight characteristic for 3R tau. Anti-RD3 (**c**) and anti-RD4 antibodies (**d**) showed different fragments of tau, and RD3 confirms the presence of 60 and 64 kDa bands. (*Lane 1* medial temporal cortex sample from a patient with Alzheimer's disease; *lane 2* medial temporal cortex sample from a non-diseased individual (examined by neuropathology); *lanes 3–5* Hungarian patient (MV at codon 129) with dot-like neuritic tau pathology detected in

immunohistochemistry. *3* cerebellum, *4* frontal cortex, *5* temporal cortex. **e** Typical PHF-like pattern like in E200K CJD case detected by AT8 in medial temporal cortex (*Lane 1* medial temporal cortex including hippocampus from E200K CJD patient, *lane 2* Alzheimer's disease sample). **f** 3R tau were detected in several regions examined in case with neurofibrillary tangles restricted to the medial temporal lobe and neuritic tau pathology in the frontal and temporal cortices and striatum (*Lane 1* frontal cortex, *lane 2*: striatum, *lane 3*: medial temporal lobe including hippocampus, *lane 4*: temporal cortex, *lane 5* medial temporal cortex sample from a non-diseased individual, examined by neuropathology, *lane 6*: Alzheimer's disease sample)

presents with various PrP deposition patterns that frequently overlap between MM homozygotes and MV heterozygotes at *PRNP* codon 129. This is also reflected by a mixture of type 2 and type 1 PrP^{res} in these brains. (3) Lesion profiles do not differ significantly between MM and MV cases. (4) Some PrP deposition patterns are not seen in sporadic CJD or other genetic forms (e.g. stripe-like pattern in the cerebellum or distinct intraneuronal PrP aggregates involving prominently brainstem nuclei). Moreover, immunoblotting for PrP^{res} demonstrated distinct ratios of glycosylated to unglycosylated bands as compared to sporadic CJD. (5) Concomitant presence of α -synuclein, phospho-tau pathology or deposition of A β is more the rule

than the exception. These protein deposits are present in areas where disease-associated PrP is also present.

Clinical features of E200K genetic CJD frequently overlap with that of sporadic CJD, including the presence of periodic sharp wave complexes. However, in our cohort myoclonus is less frequently documented. In spite of the less prominent pathology in the cerebellum, ataxia is often observed. Interestingly, the patterns of pathology observed in the cerebellum include either spongiform change and neuronal loss with diffuse/synaptic PrP immunoreactivity, or little lesioning associated with a stripe-like pattern of PrP immunoreactivity restricted to the molecular layer. This suggests that cerebellar ataxia may have a complex

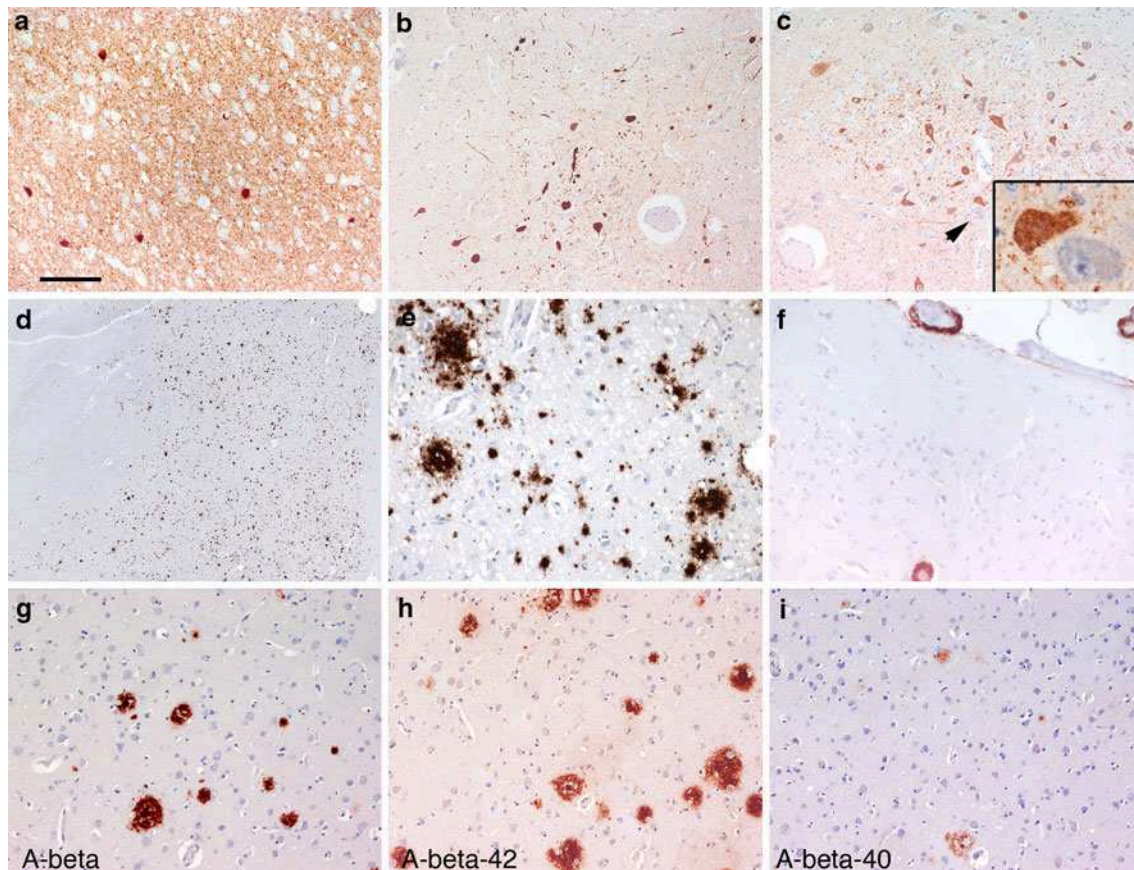


Fig. 9 Immunoreactivity for α -synuclein and amyloid- β (A β) in E200K genetic CJD. Typical α -synuclein immunopositive cortical Lewy bodies and Lewy neurites in the frontal cortex (**a**), and brainstem-type Lewy bodies in the medulla oblongata (**b**) in representative cases showing α -synuclein pathology compatible with Braak staging. Prominent neuronal granular diffuse cytoplasmic immunoreactivity restricted to neurons of medullary raphe nuclei, dorsal vagus nucleus (**c**, cell indicated with arrowhead enlarged in

right lower inset) but lacking Lewy bodies or Lewy neurites. Extensive A β deposition of the form of diffuse plaques and focal deposits in the striatum (**d**, **e**), and in the vessel walls in the frontal cortex (**f**) in representative cases. Parenchymal A β deposition (**g**) was mainly immunoreactive for anti-A β -42 (**h**) and less for anti-A β -40 (**i**) peptide. *Bar graph* in **a** indicates 200 μ m for **a**, **f**, **g**, **h**, **i**, 150 μ m for **e**, 400 μ m for **b**, **c** (60 μ m for inset), and 1,200 μ m for **d**

background by either a more severe tissue damage of cerebellar cortical layers or, since the stripe-like pattern strongly resembles the compartmentalization of the cerebellar cortex and Purkinje cell branching [67], by alterations of synaptic contacts of Purkinje cells. In comparison with other cohorts [47, 63], chorea/dystonia was more frequently reported in our study than Parkinsonism. Similar to other reports, we confirm that supranuclear gaze palsy, insomnia, and polyneuropathy may be prominent in some cases [1, 2, 8, 50, 64]; this is not related to the codon 129 polymorphism. In our cohort, unusual clinical presentations like early memory impairment, supranuclear palsy, premorbid symptoms, or even characteristic Parkinson syndrome, years before the rapid progressive course, were described and frequently suggestive as substrate of concomitant protein deposition. However, due to the retrospective nature of our clinical data collection, it remains to be established how the presence of concomitant

proteinopathies influence the clinical course. This merits further prospective studies, but it is clear that genetic CJD should be considered in less elderly patients (50–60 years) with a clinical suspicion of a pre-existing neurodegenerative disease (including “typical” Parkinson’s disease) that switches into a rapidly progressive phase with dementia and ataxia.

Lesion profiles, defined by spongiform change and neuronal loss/gliosis, were not significantly different between cases with different constellation at codon 129. Of note was the variable involvement of neocortical areas, including frequent laminar accentuation, and the constant lesioning in the striatum and thalamic nuclei. The latter is reflected also in the signal alterations detected in MRI [15]. Sometimes the involvement of the thalamus may predominate, leading to further differential diagnostic issues [39]. In addition, neuronal loss was seen in the substantia nigra with or without α -synuclein inclusions. Nigrostriatal

Table 3 Summary of combinations of proteinopathies

Protein pathology	Unusual tauopathy	Tau-NFD-Braak	a-Synuclein-Braak	A-beta deposits	A-beta CAA	Number of cases	% of proteinopathy	% of all cases
Unusual tauopathy	0	+	–	–	–	4	33.3	10.2
Unusual tauopathy	0	–	+	–	–	5	41.6	12.8
Unusual tauopathy	0	–	–	+	–	6	50	15.3
Unusual tauopathy	0	–	–	–	+	4	33.3	10.2
Unusual tauopathy	0	+	+	–	–	3	25	7.7
Unusual tauopathy	0	+	+	+	–	2	16.6	5.1
Unusual tauopathy	0	+	+	–	+	0	0	0
Unusual tauopathy	0	+	–	–	+	0	0	0
Unusual tauopathy	0	+	+	+	+	1	8.3	2.5
α -Synuclein-Braak	+	–	0	–	–	5	83.3	12.8
α -Synuclein-Braak	–	+	0	–	–	3	50	7.7
α -Synuclein-Braak	–	–	0	+	–	4	66.6	10.2
α -Synuclein-Braak	–	–	0	–	+	2	33.3	5.1
α -Synuclein-Braak	–	+	0	+	–	2	33.3	5.1
α -Synuclein-Braak	–	+	0	–	+	1	16.6	2.5
α -Synuclein-Braak	–	+	0	+	+	1	16.6	2.5
α -Synuclein-Braak	+	+	0	+	+	1	16.6	2.5
A β deposits	–	+	–	0	–	9	40.9	23
A β deposits	–	–	–	0	+	8	36.3	20.5
A β deposits	–	+	–	0	+	1	4.5	2.5
A β deposits	–	+	+	0	+	1	4.5	2.5
A β deposits	+	+	–	0	+	0	0	0
A β deposits	+	+	+	0	+	1	4.5	2.5

The predominant proteinopathy is indicated in the left column and all further types of features that are additionally seen are indicated with a + sign
NFD neurofibrillary degeneration degeneration following Braak and Braak staging, *CAA* cerebral amyloid angiopathy (A β)

damage was demonstrated in a recent study in sporadic CJD [66]. In contrast to the lesion profile, the morphology of PrP deposits showed more variation: more coarse immunodeposits (plaques, patchy/perivacuolar), but also more intraneuronal PrP aggregates were detected in cases with MV at codon 129 as compared to MMs. However, these deposits were frequently in MM cases in a more restricted distribution suggesting presence of different PrP types. Indeed, a mixture of type 1 and 2 PrP^{res} was observed in some cases. Regional variability between cerebral and cerebellar cortex of the PrP^{res} pattern was reported only in a single case [57]. We extend this finding by demonstrating variability in many regions in 2 out of 10 cases. Analysis of further 10 French cases with E200K mutation, not included in the present comprehensive neuropathological survey, revealed 3 cases with regional variability. According to these observations, a rough estimate of approximately 25% of cases with E200K mutation, slightly less than reported in sporadic CJD [54], shows this phenomenon. It was already reported that the western blot pattern of PrP^{res} in E200K genetic CJD differs from

sporadic CJD [7, 27]. In spite of the presence of similar morphological immunodeposits, some PrP immunoreactive patterns were unusual (e.g. intraneuronal PrP immunopositivity) as a potential correlate of the distinct PrP^{res} patterns. Intraneuronal dot-like PrP immunoreactivity was reported in the E200K mutation [43] and V180I mutation also with abnormally glycosylated PrP^{res} [51], while intraneuronal PrP immunoreactivity (albeit morphologically not with dot-like accentuation) was documented in a patient with apparently sporadic CJD and novel glycotype pattern [69]. All together these observations suggest that the E200K mutation induces a relatively uniform anatomical pattern of tissue lesioning (spongiform change, neuronal loss/gliosis), while the deposition of disease-associated PrP is more influenced by the codon 129 constellation, including different types of, also mixed, PrP^{res} forms.

In addition, we detected a range of concomitant protein deposits. Tau pathology was represented either by the presence of small neuritic profiles, neurofibrillary degeneration following stages of Braak and Braak [3], or by

unusual forms that, based on the distinct anatomical distribution, lack of astrocytic plaques or tufted astrocytes, were not compatible with sporadic tauopathies. Interestingly, neurofibrillary tangles frequently occurred in brainstem nuclei (raphe, locus coeruleus) also in relatively young patients, analogously to that described as an early feature not only in AD but also in mild cognitive impairment [24, 62]. Neuritic profiles clustering around plaques are described in the acquired prion disease, variant CJD [19], while neurofibrillary tangles are consistent features of some *PRNP* mutations associated with prominent PrP amyloidosis [17]. Both features are not observed in E200K CJD. Interestingly, an unusual pattern of tauopathy was described in the R208H *PRNP* mutation associated with a CJD phenotype [59]. Double immunolabeling studies suggest that most of the tau pathology is neuronal in origin. Interestingly, AT8 and T46 antibodies showed different results in immunoblotting. Both antibodies were able to detect an AD-like pattern in samples where neurofibrillary degeneration was observed; however, in samples with mild neuritic profiles seen in immunohistochemistry, only T46 and RD3 antibody showed bands characteristic of 3R tau. Whereas post-mortem delay and storage temperature may be a limiting factor for the detection of PHF and phosphorylated forms of tau [14, 60], in our study PHF and 3R tau were clearly detectable by western blot. However, immunoreactivity against specific phosphorylation sites may be reduced due to tau degradation by endogenous phosphatases. Thus, our observation on low molecular bands in a limited number of cases must be interpreted with caution and merits further evaluation on more cases whether a difference in epitopes or other factors might be the basis of this. In cases with unusual presentations of tau pathology, 4R isoform was prominently detected in immunohistochemistry, whereas in these cases no material was available for immunoblotting studies. However, it may be concluded that a spectrum of tau pathology from 3R through mixed and to 4R dominant forms is associated with the E200K mutation. In addition, A β deposition (parenchymal and vascular) frequently occurs in E200K genetic CJD [18]. In addition, we observed Lewy body pathology following Braak stages, and also prominent neuronal granular α -synuclein immunoreactivity in brainstem nuclei without Lewy bodies (together in around half of the patients). This indicates that pathological upregulation and eventual inclusion body formation of α -synuclein is an important feature in E200K genetic CJD, supporting a potential interactive role of PrP and α -synuclein. Interestingly, in spite of the lack of a role of codon 129 polymorphism on the susceptibility for the α -synucleinopathy Parkinson's disease [61], the clinical presentation may be influenced by this [23]. Finally, we

did not detect any protein deposition using anti-FUS and phosphorylated TDP-43 antibodies. The latter is in line with a recent study in various forms of CJD [31]. The presence of various protein depositions, independent of the codon 129 polymorphism or PrP^{res} type, could support a concept of further genetic or epigenetic factors leading to various presentations in significantly different ages (ranging from early 30 to 70 years of age).

The processing of PrP overlaps with that of A β and α -synuclein, since it includes the endosomal–lysosomal system [38, 52]. Mutual interactions between tau, A β , and α -synuclein were documented [36]. Based on our observation of Lewy bodies or neurofibrillary tangles in our diagnostic work-up, we conducted a systematic evaluation of protein deposition and presented the first systematic demonstration of intensified and combined neurodegeneration in a genetic prion disease due to a single point mutation. The spectrum of protein depositions is distinct from that associated with PrP amyloid [17, 19] or sporadic CJD [11, 66]. The observation of A β deposition, neurofibrillary degeneration, and α -synucleinopathy in individuals from different countries, together with the detection of tauopathy forms, not compatible with sporadic tauopathies [6], suggests the interaction of mutated PrP with tau [68], A β [55], and also α -synuclein. Cellular PrP has been shown to regulate the production of A β and forms a complex [55] with full-length tau protein in vitro [68]. Moreover, there is a homologous region in PrP and α -synuclein, and interestingly, homologous peptides corresponding to this sequence can promote fibrillization of α -synuclein [13]. Finally, our observation of the frequent and unusual intraneuronal accumulation of PrP immunoreactivity indicates failed release from the cell and overwhelming of the protein processing system. In sum, our and previous studies suggest an altered metabolism and intracellular trafficking of mutated PrP that interferes with the processing of other proteins and leads to their pathological deposition. Thus, the E200K PrP mutation may become an important model to decipher the molecular interplay among neurodegeneration-associated proteins. Our observations also support a complex pathogenetic interplay in the background of E200K genetic CJD that may lead to differences in penetrance and clinical phenotype. Finally, our study suggests to clinicians the suspicion of genetic CJD when early onset neurological symptoms turn into a rapidly progressive phase.

Acknowledgments This study was performed in the frame of the EU FP6 Project Neuroscreen LSHB-CZ-2006-037719 contract No. 037719. We are grateful for the technical assistance of Irene Leisser, Gerda Ricken, Lenkeine Marianna, Katalin Röss, Rachel Plantier, Françoise Didier, and for the kind cooperation of colleagues and families of patients supporting our Surveillance systems. RV is a senior clinical investigator of the Research Foundation-Flanders. LL

was supported by a grant of the Hungarian Scientific Research Fund (OTKA-NK78012).

Conflict of interest statement None.

References

- Antoine JC, Laplanche JL, Mosnier JF, Beaudry P, Chatelain J, Michel D (1996) Demyelinating peripheral neuropathy with Creutzfeldt-Jakob disease and mutation at codon 200 of the prion protein gene. *Neurology* 46:1123–1127
- Bertoni JM, Brown P, Goldfarb LG, Rubenstein R, Gajdusek DC (1992) Familial Creutzfeldt-Jakob disease (codon 200 mutation) with supranuclear palsy. *JAMA* 268:2413–2415
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239–259
- Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24:197–211
- Brown P, Galvez S, Goldfarb LG, Nieto A, Cartier L, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC (1992) Familial Creutzfeldt-Jakob disease in Chile is associated with the codon 200 mutation of the PRNP amyloid precursor gene on chromosome 20. *J Neurol Sci* 112:65–67
- Cairns NJ, Bigio EH, Mackenzie IR, Neumann M, Lee VM, Hatanpaa KJ, White CL 3rd, Schneider JA, Grinberg LT, Halliday G, Duyckaerts C, Lowe JS, Holm IE, Tolnay M, Okamoto K, Yokoo H, Murayama S, Woulfe J, Munoz DG, Dickson DW, Ince PG, Trojanowski JQ, Mann DM (2007) Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. *Acta Neuropathol* 114:5–22
- Cardone F, Liu QG, Petraroli R, Ladogana A, D'Alessandro M, Arpino C, Di Bari M, Macchi G, Pocchiarini M (1999) Prion protein glycoform analysis in familial and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease patients. *Brain Res Bull* 49:429–433
- Chapman J, Arlazoroff A, Goldfarb LG, Cervenakova L, Neufeld MY, Werber E, Herbert M, Brown P, Gajdusek DC, Korczyn AD (1996) Fatal insomnia in a case of familial Creutzfeldt-Jakob disease with the codon 200 (Lys) mutation. *Neurology* 46:758–761
- Collinge J, Palmer MS, Campbell T, Sidle KC, Carroll D, Harding A (1993) Inherited prion disease (PrP lysine 200) in Britain: two case reports. *BMJ* 306:301–302
- de Silva R, Lashley T, Gibb G, Hanger D, Hope A, Reid A, Bandopadhyay R, Utton M, Strand C, Jowett T, Khan N, Anderton B, Wood N, Holton J, Revesz T, Lees A (2003) Pathological inclusion bodies in tauopathies contain distinct complements of tau with three or four microtubule-binding repeat domains as demonstrated by new specific monoclonal antibodies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 29:288–302
- Debatin L, Streffer J, Geissen M, Matschke J, Aguzzi A, Glatzel M (2008) Association between deposition of beta-amyloid and pathological prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurodegener Dis* 5:347–354
- DelleDonne A, Klos KJ, Fujishiro H, Ahmed Z, Parisi JE, Josephs KA, Frigerio R, Burnett M, Wszolek ZK, Uitti RJ, Ahlskog JE, Dickson DW (2008) Incidental Lewy body disease and preclinical Parkinson disease. *Arch Neurol* 65:1074–1080
- Du HN, Li HT, Zhang F, Lin XJ, Shi JH, Shi YH, Ji LN, Hu J, Lin DH, Hu HY (2006) Acceleration of alpha-synuclein aggregation by homologous peptides. *FEBS Lett* 580:3657–3664
- Ferrer I, Santpere G, Arzberger T, Bell J, Blanco R, Boluda S, Budka H, Carmona M, Giaccone G, Krebs B, Limido L, Parchi P, Puig B, Strammiello R, Strobel T, Kretschmar H (2007) Brain protein preservation largely depends on the postmortem storage temperature: implications for study of proteins in human neurologic diseases and management of brain banks: a BrainNet Europe Study. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:35–46
- Fulbright RK, Hoffmann C, Lee H, Pozamantir A, Chapman J, Prohovnik I (2008) MR imaging of familial Creutzfeldt-Jakob disease: a blinded and controlled study. *AJNR Am J Neuroradiol* 29:1638–1643
- Gelpe E, Heinzl H, Hoftberger R, Unterberger U, Strobel T, Voigtlander T, Drobna E, Jarius C, Lang S, Waldhor T, Bernheimer H, Budka H (2008) Creutzfeldt-Jakob disease in Austria: an autopsy-controlled study. *Neuroepidemiology* 30:215–221
- Ghetti B, Piccardo P, Frangione B, Bugiani O, Giaccone G, Young K, Prelli F, Farlow MR, Dlouhy SR, Tagliavini F (1996) Prion protein amyloidosis. *Brain Pathol* 6:127–145
- Ghoshal N, Cali I, Perrin RJ, Josephson SA, Sun N, Gambetti P, Morris JC (2009) Codistribution of amyloid beta plaques and spongiform degeneration in familial Creutzfeldt-Jakob disease with the E200K–129M haplotype. *Arch Neurol* 66:1240–1246
- Giaccone G, Mangieri M, Capobianco R, Limido L, Hauw JJ, Haik S, Fociani P, Bugiani O, Tagliavini F (2008) Tauopathy in human and experimental variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Aging* 29:1864–1873
- Goedert M, Jakes R, Crowther RA, Cohen P, Vanmechelen E, Vandermeeren M, Cras P (1994) Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease: identification of phosphorylation sites in tau protein. *Biochem J* 301(Pt 3):871–877
- Goldfarb LG, Brown P, Mitrova E, Cervenakova L, Goldin L, Korczyn AD, Chapman J, Galvez S, Cartier L, Rubenstein R et al (1991) Creutzfeldt-Jacob disease associated with the PRNP codon 200Lys mutation: an analysis of 45 families. *Eur J Epidemiol* 7:477–486
- Goldfarb LG, Mitrova E, Brown P, Toh BK, Gajdusek DC (1990) Mutation in codon 200 of scrapie amyloid protein gene in two clusters of Creutzfeldt-Jakob disease in Slovakia. *Lancet* 336:514–515
- Gossrau G, Herting B, Mockel S, Kempe A, Koch R, Reichmann H, Lampe JB (2006) Analysis of the polymorphic prion protein gene codon 129 in idiopathic Parkinson's disease. *J Neural Transm* 113:331–337
- Grodzian A, Shaw P, Weintraub S, Bigio E, Mash DC, Mesulam MM (2007) Locus coeruleus neurofibrillary degeneration in aging, mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 28:327–335
- Haik S, Privat N, Adjou KT, Sazdovitch V, Dormont D, Duyckaerts C, Hauw JJ (2002) Alpha-synuclein-immunoreactive deposits in human and animal prion diseases. *Acta Neuropathol* 103:516–520
- Hainfellner JA, Parchi P, Kitamoto T, Jarius C, Gambetti P, Budka H (1999) A novel phenotype in familial Creutzfeldt-Jakob disease: prion protein gene E200K mutation coupled with valine at codon 129 and type 2 protease-resistant prion protein. *Ann Neurol* 45:812–816
- Hill AF, Joiner S, Beck JA, Campbell TA, Dickinson A, Poulter M, Wadsworth JD, Collinge J (2006) Distinct glycoform ratios of protease resistant prion protein associated with PRNP point mutations. *Brain* 129:676–685
- Horiguchi T, Uryu K, Giasson BI, Ischiropoulos H, Lightfoot R, Bellmann C, Richter-Landsberg C, Lee VM, Trojanowski JQ (2003) Nitration of tau protein is linked to neurodegeneration in tauopathies. *Am J Pathol* 163:1021–1031
- Hsiao K, Meiner Z, Kahana E, Cass C, Kahana I, Avrahami D, Scarlato G, Abramsky O, Prusiner SB, Gabizon R (1991)

- Mutation of the prion protein in Libyan Jews with Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 324:1091–1097
30. Inoue I, Kitamoto T, Doh-ura K, Shii H, Goto I, Tateishi J (1994) Japanese family with Creutzfeldt-Jakob disease with codon 200 point mutation of the prion protein gene. *Neurology* 44:299–301
 31. Isaacs AM, Powell C, Webb TE, Linehan JM, Collinge J, Brandner S (2008) Lack of TAR-DNA binding protein-43 (TDP-43) pathology in human prion diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34:446–456
 32. Jarius C, Kovacs GG, Belay G, Hainfellner JA, Mitrova E, Budka H (2003) Distinctive cerebellar immunoreactivity for the prion protein in familial (E200K) Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol* 105:449–454
 33. Korczyn AD, Chapman J, Goldfarb LG, Brown P, Gajdusek DC (1991) A mutation in the prion protein gene in Creutzfeldt-Jakob disease in Jewish patients of Libyan, Greek, and Tunisian origin. *Ann NY Acad Sci* 640:171–176
 34. Kosik KS, Orecchio LD, Binder L, Trojanowski JQ, Lee VM, Lee G (1988) Epitopes that span the tau molecule are shared with paired helical filaments. *Neuron* 1:817–825
 35. Kovacs GG, Bakos A, Mitrova E, Minarovits J, Laszlo L, Majtenyi K (2007) Human prion diseases: the Hungarian experience. *Ideggyogy Sz* 60:447–452
 36. Kovacs GG, Botond G, Budka H (2010) Protein coding of neurodegenerative dementias: the neuropathological basis of biomarker diagnostics. *Acta Neuropathol* 119:389–408
 37. Kovacs GG, Budka H (2009) Molecular pathology of human prion diseases. *Int J Mol Sci* 10:976–999
 38. Kovacs GG, Gelpi E, Strobel T, Ricken G, Nyengaard JR, Bernheimer H, Budka H (2007) Involvement of the endosomal-lysosomal system correlates with regional pathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:628–636
 39. Kovacs GG, Horvath S, Strobel T, Puskas M, Bakos A, Summers DM, Will RG, Budka H (2009) Genetic Creutzfeldt-Jakob disease mimicking variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80:1410–1411
 40. Kovacs GG, Laszlo L, Bakos A, Minarovits J, Bishop MT, Strobel T, Vajna B, Mitrova E, Majtenyi K (2005) Increased incidence of genetic human prion disease in Hungary. *Neurology* 65:1666–1669
 41. Kovacs GG, Puopolo M, Ladogana A, Pocchiari M, Budka H, van Duijn C, Collins SJ, Boyd A, Giulivi A, Coulthart M, Delasnerie-Laupretre N, Brandel JP, Zerr I, Kretzschmar HA, de Pedro-Cuesta J, Calero-Lara M, Glatzel M, Aguzzi A, Bishop M, Knight R, Belay G, Will R, Mitrova E (2005) Genetic prion disease: the EUROCD experience. *Hum Genet* 118:166–174
 42. Kovacs GG, Trabattini G, Hainfellner JA, Ironside JW, Knight RS, Budka H (2002) Mutations of the prion protein gene phenotypic spectrum. *J Neurol* 249:1567–1582
 43. Kovacs GG, Voigtlander T, Hainfellner JA, Budka H (2002) Distribution of intraneuronal immunoreactivity for the prion protein in human prion diseases. *Acta Neuropathol* 104:320–326
 44. Lee HS, Sambuughin N, Cervenakova L, Chapman J, Pocchiari M, Litvak S, Qi HY, Budka H, del Ser T, Furukawa H, Brown P, Gajdusek DC, Long JC, Korczyn AD, Goldfarb LG (1999) Ancestral origins and worldwide distribution of the PRNP 200K mutation causing familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Am J Hum Genet* 64:1063–1070
 45. Mancuso M, Siciliano G, Capellari S, Orsucci D, Moretti P, Di Fede G, Suardi S, Strammiello R, Parchi P, Tagliavini F, Murri L (2009) Creutzfeldt-Jakob disease with E200K PRNP mutation: a case report and revision of the literature. *Neurol Sci* 30:417–420
 46. Mead S, Webb TE, Campbell TA, Beck J, Linehan JM, Rutherford S, Joiner S, Wadsworth JD, Heckmann J, Wroe S, Doey L, King A, Collinge J (2007) Inherited prion disease with 5-OPRI phenotype modification by repeat length and codon 129. *Neurology* 69:730–738
 47. Meiner Z, Gabizon R, Prusiner SB (1997) Familial Creutzfeldt-Jakob disease. Codon 200 prion disease in Libyan Jews. *Medicine (Baltimore)* 76:227–237
 48. Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, Vogel FS, Hughes JP, van Belle G, Berg L (1991) The consortium to establish a registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 41:479–486
 49. Mitrova E, Belay G (2002) Creutzfeldt-Jakob disease with E200K mutation in Slovakia: characterization and development. *Acta Virol* 46:31–39
 50. Neufeld MY, Josiphov J, Korczyn AD (1992) Demyelinating peripheral neuropathy in Creutzfeldt-Jakob disease. *Muscle Nerve* 15:1234–1239
 51. Nixon R, Camicioli R, Cervenakova L, Mastrianni J (2000) The PRNP-V180I mutation is associated with abnormally glycosylated PrPCJD and intracellular PrP accumulations. In: XIVth International Congress of Neuropathology Brain Pathol Birmingham, UK, p 670
 52. Pan T, Kondo S, Le W, Jankovic J (2008) The role of autophagy-lysosome pathway in neurodegeneration associated with Parkinson's disease. *Brain* 131:1969–1978
 53. Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O, Zerr I, Budka H, Kopp N, Piccardo P, Poser S, Rojiani A, Streichenberger N, Julien J, Vital C, Ghetti B, Gambetti P, Kretzschmar H (1999) Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 46:224–233
 54. Parchi P, Strammiello R, Notari S, Giese A, Langeveld JP, Ladogana A, Zerr I, Roncaroli F, Cras P, Ghetti B, Pocchiari M, Kretzschmar H, Capellari S (2009) Incidence and spectrum of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease variants with mixed phenotype and co-occurrence of PrPSc types: an updated classification. *Acta Neuropathol* 118:659–671
 55. Parkin ET, Watt NT, Hussain I, Eckman EA, Eckman CB, Manson JC, Baybutt HN, Turner AJ, Hooper NM (2007) Cellular prion protein regulates beta-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:11062–11067
 56. Peoc'h K, Manivet P, Beaudry P, Attane F, Besson G, Hannequin D, Delasnerie-Laupretre N, Laplanche JL (2000) Identification of three novel mutations (E196K, V203I, E211Q) in the prion protein gene (PRNP) in inherited prion diseases with Creutzfeldt-Jakob disease phenotype. *Hum Mutat* 15:482
 57. Puoti G, Rossi G, Giaccone G, Awan T, Lievens PM, Defanti CA, Tagliavini F, Bugiani O (2000) Polymorphism at codon 129 of PRNP affects the phenotypic expression of Creutzfeldt-Jakob disease linked to E200K mutation. *Ann Neurol* 48:269–270
 58. Quadrio I, Ugnon-Cafe S, Dupin M, Esposito G, Streichenberger N, Krolak-Salmon P, Vital A, Pellissier JF, Perret-Liaudet A, Perron H (2009) Rapid diagnosis of human prion disease using streptomycin with tonsil and brain tissues. *Lab Invest* 89:406–413
 59. Roeber S, Krebs B, Neumann M, Windl O, Zerr I, Grasbon-Frodl EM, Kretzschmar HA (2005) Creutzfeldt-Jakob disease in a patient with an R208H mutation of the prion protein gene (PRNP) and a 17-kDa prion protein fragment. *Acta Neuropathol* 109:443–448
 60. Santpere G, Puig B, Ferrer I (2006) Low molecular weight species of tau in Alzheimer's disease are dependent on tau phosphorylation sites but not on delayed post-mortem delay in tissue processing. *Neurosci Lett* 399:106–110
 61. Scholz SW, Xiromerisiou G, Fung HC, Eerola J, Hellstrom O, Papadimitriou A, Hadjigeorgiou GM, Tienari PJ, Fernandez HH, Mandel R, Okun MS, Gwinn-Hardy K, Singleton AB (2006) The

- human prion gene M129V polymorphism is not associated with idiopathic Parkinson's disease in three distinct populations. *Neurosci Lett* 395:227–229
62. Simic G, Stanic G, Mladinov M, Jovanov-Milosevic N, Kostovic I, Hof PR (2009) Does Alzheimer's disease begin in the brainstem? *Neuropathol Appl Neurobiol* 35:532–554
 63. Simon ES, Kahana E, Chapman J, Treves TA, Gabizon R, Rosenmann H, Zilber N, Korczyn AD (2000) Creutzfeldt-Jakob disease profile in patients homozygous for the PRNP E200K mutation. *Ann Neurol* 47:257–260
 64. Taratuto AL, Piccardo P, Reich EG, Chen SG, Sevlever G, Schultz M, Luzzi AA, Rugiero M, Abecasis G, Endelman M, Garcia AM, Capellari S, Xie Z, Lugaresi E, Gambetti P, Dlouhy SR, Ghetti B (2002) Insomnia associated with thalamic involvement in E200K Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 58:362–367
 65. Togo T, Sahara N, Yen SH, Cookson N, Ishizawa T, Hutton M, de Silva R, Lees A, Dickson DW (2002) Argyrophilic grain disease is a sporadic 4-repeat tauopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:547–556
 66. Vital A, Fernagut PO, Canron MH, Joux J, Bezard E, Martin-Negrier ML, Vital C, Tison F (2009) The nigrostriatal pathway in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 68:809–815
 67. Voogd J, Glickstein M (1998) The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci* 21:370–375
 68. Wang XF, Dong CF, Zhang J, Wan YZ, Li F, Huang YX, Han L, Shan B, Gao C, Han J, Dong XP (2008) Human tau protein forms complex with PrP and some GSS- and fCJD-related PrP mutants possess stronger binding activities with tau in vitro. *Mol Cell Biochem* 310:49–55
 69. Zanusso G, Polo A, Farinazzo A, Nonno R, Cardone F, Di Bari M, Ferrari S, Principe S, Gelati M, Fasoli E, Fiorini M, Prelli F, Frangione B, Tridente G, Bentivoglio M, Giorgi A, Schinina ME, Maras B, Agrimi U, Rizzuto N, Pocchiari M, Monaco S (2007) Novel prion protein conformation and glycoform in Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* 64:595–599

PARTIE 3 :

**CONCEPTION ET CARACTÉRISATION D'ANTICORPS MONOCLONAUX
DIRIGÉS CONTRE LA PROTÉINE TAU ET SES PHOSPHORYLATIONS**

1 MATÉRIEL ET MÉTHODES

La conception ainsi que la caractérisation de ces anticorps a été effectuée au sein d'un consortium faisant intervenir la société Roboscreen à Liepzig (Allemagne) pour l'immunisation des souris, l'équipe de neuropathologie de l'Hôpital de Wien (Autriche) pour leurs évaluations en immunohistochimie et l'équipe du laboratoire de neurobiologie du groupement hospitalier Est (Lyon) pour leur caractérisation biochimique.

1.1 Conception des anticorps monoclonaux

Des souris Balb/c ont été immunisées avec des peptides de 12 à 15 acides aminés issus de la protéine tau. Ces peptides comprenaient ou non des phosphorylations sur les acides aminés Thr 181, Thr 231 ainsi que Thr 231 / Ser 235. Les peptides ont été conjugués au KLH dans l'adjuvant GERBU LQ (Biotechnik GmbH, Gaiberg, Allemagne) selon la méthode décrite précédemment.⁵⁰⁸ De plus, les souris ont été immunisées avec de la protéine tau recombinante (isoforme la plus longue de 441 acides aminés) ainsi que des PHF extraites de cerveaux de patients atteints par la MA et autopsiés à Lyon (France). Les souris ont été immunisées par 5 injections intra-péritonéales pendant 56 jours suivies par 2 boosters d'antigènes dans PBS en injection intraveineuse. Les cellules de la rate ont été collectées et fusionnées avec des cellules de myélome X36Ag8.653 en utilisant du PEG1500 (Roche, Suisse). Les cellules fusionnées ont été cultivées dans une plaque de 96 puits (Greiner, Allemagne) et sélectionnées dans un milieu d'incubation HAT (Invitrogen, USA). Les surnageants ont été testés en fonction de leur production en IgG. Les clones sélectionnés furent ensuite reclés par dilutions et cultivés dans des plaques 25 puits. Les cellules sont stockées à -190°C dans de l'azote liquide. Les IgG contenus dans les surnageants ont alors été purifiés par chromatographie d'affinité en utilisant la Protéine A. Les anticorps ainsi purifiés ont été sélectionnés en utilisant différents antigènes (peptides phosphorylés et protéine tau non phosphorylée) fixés sur des plaques ELISA et leurs réactivités et spécificités ont été évaluées.

1.2 Caractérisation des anticorps

Les différentes immunisations ont permis l'apparition des premiers clones au bout d'un an et demi. Quatre vingt clones réactifs pour les p-tau₁₈₁, p-tau₂₃₁, p-tau_{231/235} et T-tau ont été sélectionnés puis testés en fonction de leurs sensibilités et spécificités pour les protéines tau phosphorylées ainsi que pour la T-tau au laboratoire de Neurobiologie de Lyon (France). Vingt anticorps montrant une faible sensibilité mais une bonne spécificité ont été reclonés afin d'améliorer leurs performances puis retestés biochimiquement au laboratoire. Les clones montrant de bonnes performances ont alors été purifiés. Les souris immunisées avec les PHF sont mortes des suites de l'immunisation et n'ont donc pas permis d'obtenir d'anticorps. Les premiers anticorps produits avec l'immunisation par la protéine tau recombinante et semblent intéressants du point de vue de leurs spécificités, sont apparus à la fin de l'année 2010. La caractérisation de ces anticorps dirigés contre la T-tau est encore en cours actuellement et de nouveaux clones sont encore isolés.

1.2.1 Patients et échantillons

1.2.1.1 Patients

Les cerveaux proviennent de patients autopsiés à l'hôpital Neurologique de Lyon (France) ainsi qu'à l'Hôpital de Wien (Autriche) et de Budapest (Hongrie). Nous avons sélectionné un total de 6 patients : 2 patients dont un diagnostic neuropathologique de MA à différents stades de Braak (stades de Braak 1 et 5) a été porté, un patient atteint par une maladie de Pick confirmée histo-pathologiquement, un patient atteint par une mutation S305I* sur le gène de la protéine tau, un patient atteint par une DCB et enfin un patient contrôle asymptomatique et sans lésion cérébrale à l'examen neuropathologique. Les familles de tous les patients ont donné leur accord et consentement éclairé pour une utilisation des tissus à des fins de recherche.

* Il s'agit ici d'une des nombreuses mutations (plus de 30 connus à ce jour) touchant le gène de la protéine tau sur le chromosome 17. Cette mutation rentre dans la classe pathologique des DFTP-17. Cf. **Chapitre II - 2.1.2 : Physiopathologie de la protéine tau.**

1.2.1.2 Échantillons

Différents échantillons ont permis d'évaluer la performance des IgG : protéine tau recombinante humaine (Tau-441 [2N4R], r-Peptide, Georgie, USA), 3 LCR de patients avec un diagnostic clinique de MA probable et une biologie du LCR typique de cette pathologie, 3 LCR de patients sans pathologie neurodégénérative et sans anomalie biologique des biomarqueurs ainsi que des PHF reconformées dans leurs formes biologiques natives. De plus, les PHF ont été déphosphorylées afin de tester la spécificité des anticorps pour les phosphorylations.

1.2.1.2.1 Reconformation des PHF dans leurs formes biologiques natives

Les PHF ont été extraites avec la méthode précédemment décrite.¹⁷³ Les culots ont ensuite été repris dans une solution Guanidine-HCl 6M puis chauffés à 100°C pendant 1min. Les PHF dénaturées sont ensuite diluées dans un tampon contenant du Tris (pH 7.4) jusqu'à obtenir une concentration en Guanidine-HCl de 0.2M. Afin de se soustraire des modifications protéiques dues à la méthode d'extraction* les PHF ont été reconformées dans leurs formes natives en utilisant le principe de la dialyse.⁵⁰⁹ Les PHF en solution ont été diluées dans un tampon Tris 50mM (pH 8.2) puis ultrafiltrées (seuil de 5000 Da) pendant 1 heure (12000 g) à température ambiante jusqu'à l'obtention du volume de départ. Les chambres et la membrane filtrante d'ultrafiltration ont été précédemment saturées (Tween 0.5% [vol/vol] dans PBS) pendant 1 h à température ambiante. L'opération de dilution des PHF puis de concentration par l'ultrafiltration a été répétée 5 fois afin d'évacuer la Guanidine.

1.2.1.2.2 Déphosphorylation des protéines tau dans le LCR et des PHF

La déphosphorylation des PHF des patients a été effectuée en utilisant de la phosphatase alcaline (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). La phosphatase alcaline a été utilisée à une activité de 12U/mL pour les réactions. Les PHF ont ensuite été incubées 2h00 à 37°C.

* Cf. Partie 2 : extraction des protéines tau pathologiques et diagnostic biologique de certitude de la maladie d'Alzheimer et des autres tauopathies.

1.2.2.2 Dot Blot

Des Dot Blot ont été effectués de façon systématique avec les 80 clones. Les échantillons (5µL) ont été déposés sur une membrane Immobilon-P (taille des pores: 0.45µm, Millipore) puis les membranes ont été saturées dans un tampon PBS contenant du lait à 5% (m/vol) ou de la BSA à 5% (m/vol) ou de la BSA à 3% (m/vol) et de l'HSA à 1% (vol/vol) pendant 12 heures à 4°C. Les membranes sont ensuite incubées 2 heures avec les IgG dans un tampon PBS Tween-20 à 0.1% (vol/vol) contenant du lait à 0.5% (m/vol) ou de la BSA 0.3% (m/vol) HSA 0.1% (vol/vol) ou de la BSA 0.5% (m/vol). Afin de comparer les résultats obtenus avec les clones sélectionnés dans notre étude, des anticorps contrôles ont été utilisés : l'anticorps monoclonal T46 (Signet, Dedham, MA, USA) dirigé contre les résidus 404-441 de la protéine tau et reconnaissant les 6 isoformes de la protéine humaine, l'anticorps monoclonal AT8 (Thermo Scientific, Pierce, Rockford, USA) dirigé contre les phosphorylations 202 et 205 de la protéine tau ainsi que les anticorps HT7 et AT270. Ces deux dernières IgG interviennent en tant qu'anticorps de détection au sein des 2 kits ELISA commerciaux permettant les dosages de la T-tau et de la p-tau₁₈₁ dans le LCR (INNOTEST htau-Ag, INNOTEST Phospho-Tau₍₁₈₁₎, Innogenetics[®], Gand, Belgique). L'anticorps monoclonal HT7 est dirigé contre les acides aminés 159 à 163 de la protéine tau et l'anticorps monoclonal AT270 reconnaît la phosphorylation située sur l'acide aminé 181 de la protéine. Enfin, l'anticorps monoclonal Syn211 (Thermo Scientific, Pierce, Rockford, USA) reconnaissant les acides aminés 121 à 125 de l' α -Syn humaine a été utilisé comme contrôle négatif. Après lavages, les membranes ont été incubées 1h avec un anticorps de révélation dirigé contre les IgG de souris et couplé à la peroxydase (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) à une concentration de 1/10 000. La révélation est par la suite réalisée par une technique de chimioluminescence (Pierce Biotechnology, Rockford, USA).

1.2.2.3 Western Blot

Les WB ont été effectués avec la méthode précédemment décrite.^{173*} Brièvement, les membranes ont été saturées dans un tampon PBS contenant du lait à 5% (m/vol) ou de la BSA à 5% (m/vol) ou de la BSA à 3% (m/vol) et de l'HSA à 1% (vol/vol) pendant 12 heures à 4°C. Les membranes ont ensuite été incubées 2 heures avec les clones dans un tampon PBS

* Cf. Partie 2 : extraction des protéines tau pathologiques et diagnostic biologique de certitude de la maladie d'Alzheimer et des autres tauopathies.

Tween-20 à 0.1% (vol/vol) contenant du lait à 0.5% (m/vol) ou de la BSA 0.3% (m/vol) HSA 0.1% (vol/vol) ou de la BSA 0.5% (m/vol). Après lavages des membranes, elles ont été incubées 1h avec un anticorps de révélation dirigé contre les IgG de souris et couplé à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) à une concentration de 1/10 000. La révélation est par la suite réalisée par une technique de chimioluminescence (Pierce Biotechnology, Rockford, USA).

1.2.2.4 Immunohistochimie

Les examens neuropathologiques suivant ont été réalisés à l'hôpital de Wien (Autriche) : le cortex enthorinal issu de cerveaux de patients atteints par la MA ainsi que le cortex frontal provenant de patients atteints par une DCB ont été fixés dans du formol tamponné puis inclus en paraffine. Les coupes de tissus ont été incubées dans un tampon citrate (pH 6) chauffé pour démasquer les épitopes. Les coupes de tissus ont ensuite été incubées 1 heure avec les clones (dilution 1/1000) dans un tampon Tris. La révélation a été effectuée avec la technologie Dako EnVision+ System-HRP (Dako, Glostrup, Danemark).

2 RÉSULTATS

2.1 Réactivité des clones

Sept clones ont montré une bonne réactivité pour les PHF en Dot Blot : 4 clones dirigés contre la p-tau₂₃₁ (5G7, 2B11, 9D8 et 4C10), 1 clone dirigé contre la p-tau_{231/235} (3G3) et 2 clones dirigés contre la T-tau (1D8 et 6F4) (figure 43). Les clones 2B11, 9D8 et 6F4 ont montré une légère réactivité pour les PHF déphosphorylées. De même, le clone 3G3 a montré une légère réactivité pour les PHF déphosphorylées ainsi qu'une très légère réactivité pour les LCR de patients atteints par une MA et de patients contrôles natifs et après déphosphorylation. Aucun des anticorps dirigés contre les p-tau₂₃₁ et p-tau_{231/235} ne s'est montré réactif contre la protéine tau recombinante. L'anticorps 1D8 s'est montré réactif pour les PHF déphosphorylées ainsi que les LCR de patients contrôles et atteints par une MA natifs et dephosphorylés. Les anticorps apparaissant les plus sensibles en Dot Blot sont les clones 2B11 et 9D8.

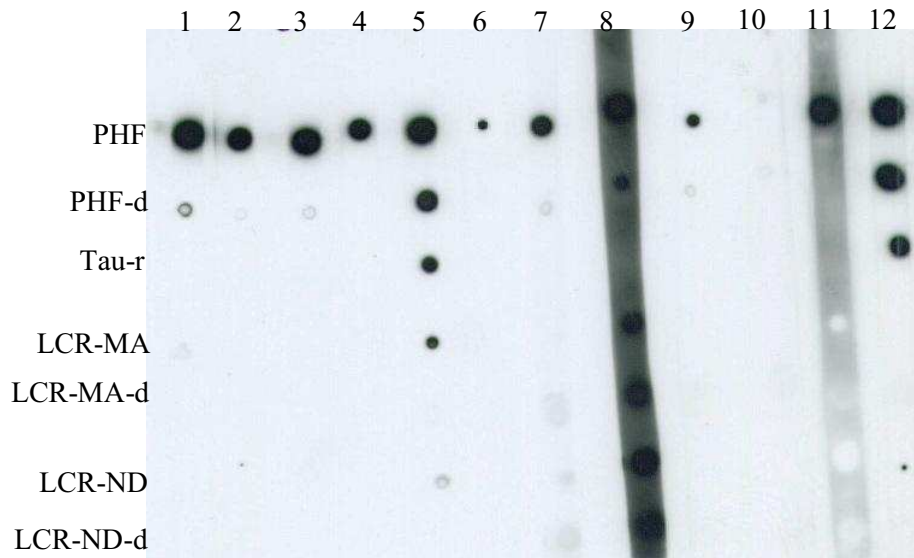


Figure 43. Dot Blot des meilleurs clones sélectionnés parmi les 80 clones testés pour leurs réactivités. Lignes 4-5-10-11-12: anticorps commerciaux AT8, T46, Syn211, AT270 et HT7 respectivement ; ligne 1 : 2B11 ; ligne 2 : 5G7 ; ligne 3 : 9D8 ; ligne 6 : 4C10 ; ligne 7 : 3G3 ; ligne 8 : 1D8 et ligne 9 : 6F4 ; -d : antigène déphosphorylé ; Tau-r : protéine tau recombinante ; LCR-MA : LCR de patient atteint par la maladie d'Alzheimer ; LCR-ND : LCR de patient sans processus neurodégénératif.

2.2 Spécificité des clones

2.2.1 Immunohistochimie

Les clones 4C10, 2B11, 5G7 et 9D8 dirigés contre la p-tau₂₃₁ sont capables de marquer de façon spécifique des pathologies neuronales et gliales constituées de protéines tau pathologiques dans différentes tauopathies (figure 44).

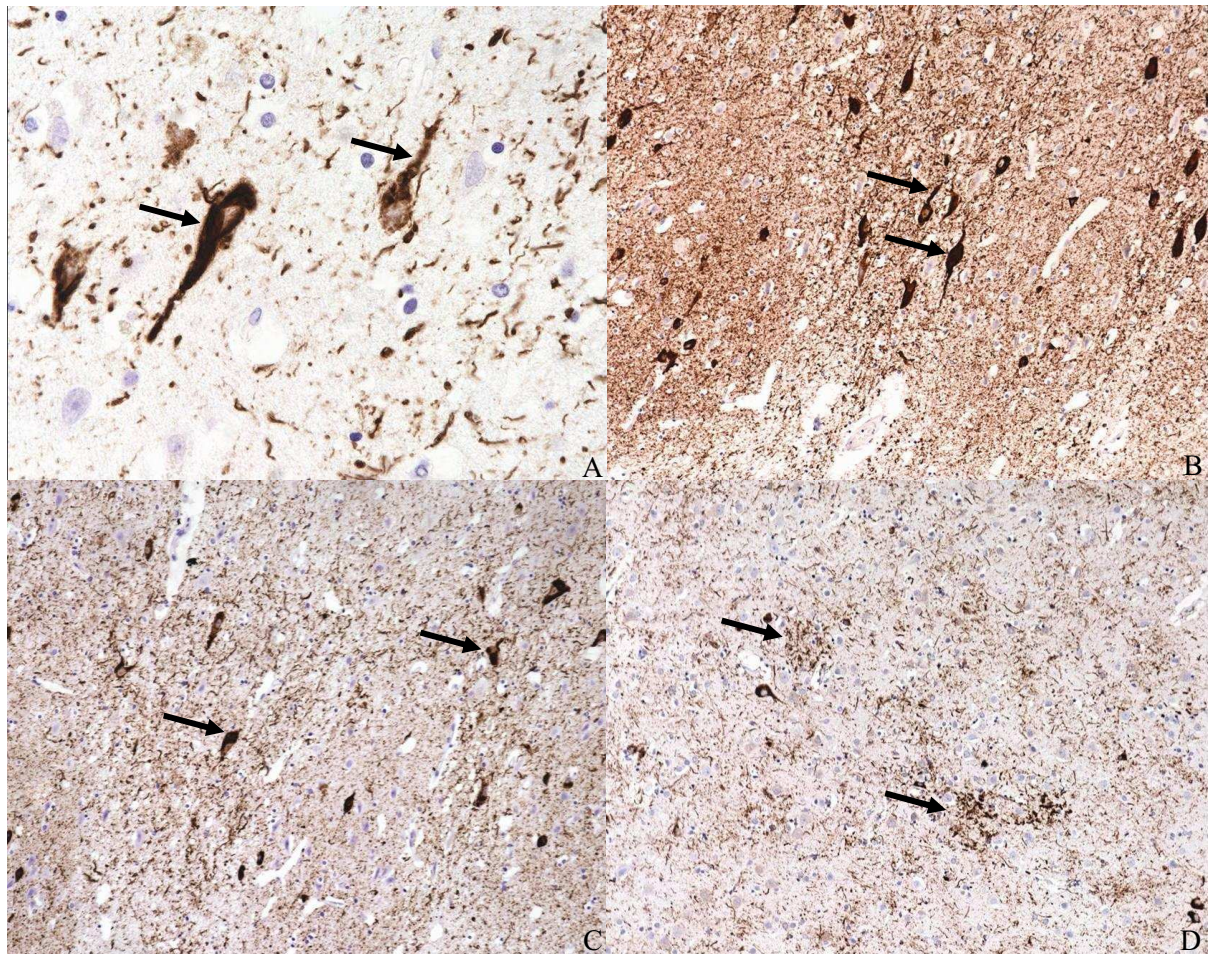


Figure 44. Coupes de tissus cérébraux de patients atteints par différentes tauopathies révélés par les anticorps 4C10, 2B11, 5G7 et 9D8. A, B, C : dégénérescences neurofibrillaires dans le cortex enthorinal d'un patient atteint par la maladie d'Alzheimer révélé par les anticorps monoclonaux 4C10 (image A), 2B11 (image B) et 5G7 (image C) ; D : plaques astrocytaires dans le cortex frontal d'un patient atteint par une dégénérescence corticobasale révélée par l'anticorps 9D8 (les lésions sont marquées par les flèches noires) (résultats fournis par le Dr. Gabor Kovacs avec son autorisation).

2.2.2 Western Blot

Le clone 4C10 révèle des bandes de 69, 64 et 55 kDa correspondant au triplet caractéristique retrouvé dans la MA (figure 45 A). Néanmoins il révèle aussi des bandes de plus petits poids moléculaires apparents situées à 40 et 35 kDa et ne correspondant pas à de la protéine tau pathologique. Ces signaux de plus petits poids moléculaires sont également retrouvés dans le cervelet aux 2 stades de Braak (stade 1 et 5). De même, le clone 6F4 révèle des bandes de 60, 40 et 35 kDa ne correspondant pas à de la tau pathologique dans toutes les zones étudiées aux 2 stades de Braak (figure 45 B). Cependant le signal obtenu en WB est plus important au

stade de Braak 5 pour les 2 clones. Le clone 1D8 s'est avéré trop peu sensible en WB et n'a pas mis en évidence de signal spécifique.

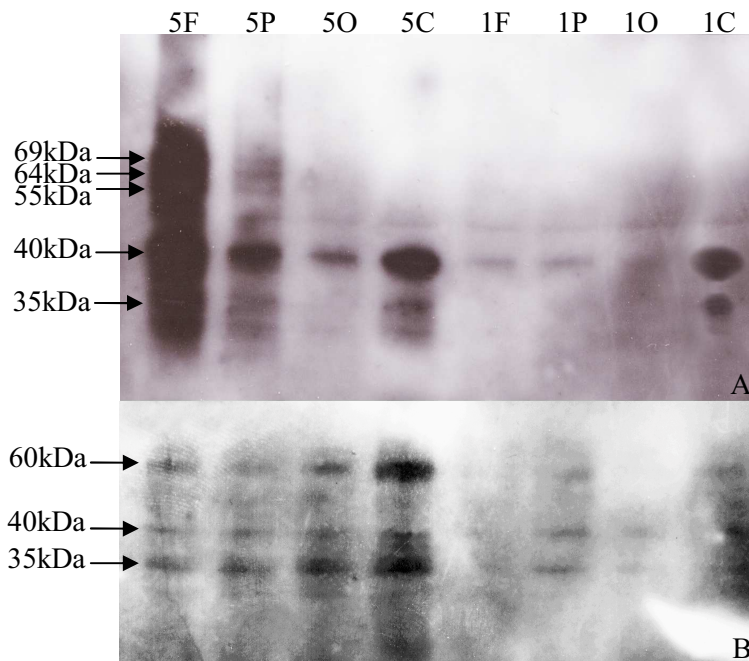


Figure 45. Western Blot de PHF extraits de cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer aux stades de Braak 1 et 5 révélés par les anticorps monoclonaux 4C10 et 6F4. F : cortex frontal ; P : cortex pariétal ; O : cortex occipital ; C : cervelet ; 5 : stade de Braak 5 ; 1 : stade de Braak 1 (image A : anticorps 4C10 ; image B : anticorps 6F4).

Les clones 2B11, 3G3, 5G7 et 9D8 révèlent des bandes à 69, 64 et 55kDa caractéristiques de la MA au stade de Braak 5 dans le cortex frontal de façon massive ainsi que dans le cortex pariétal (figure 46). De plus, les clones 2B11, 3G3 et 9D8 révèlent la bande à 74 kDa plus minoritaire dans la MA (figure 46 A, B et E). Le clone 2B11 paraît le plus sensible avec la présence d'un signal pour les PHF extraites du cortex occipital (figure 46 A). Il n'a pas été observé de signal dans le cervelet avec ces clones. De même, aucun signal n'a été détecté dans les cortex frontal, pariétal, occipital et dans le cervelet du patient atteint par la MA à un stade de Braak 1 pour ces clones.

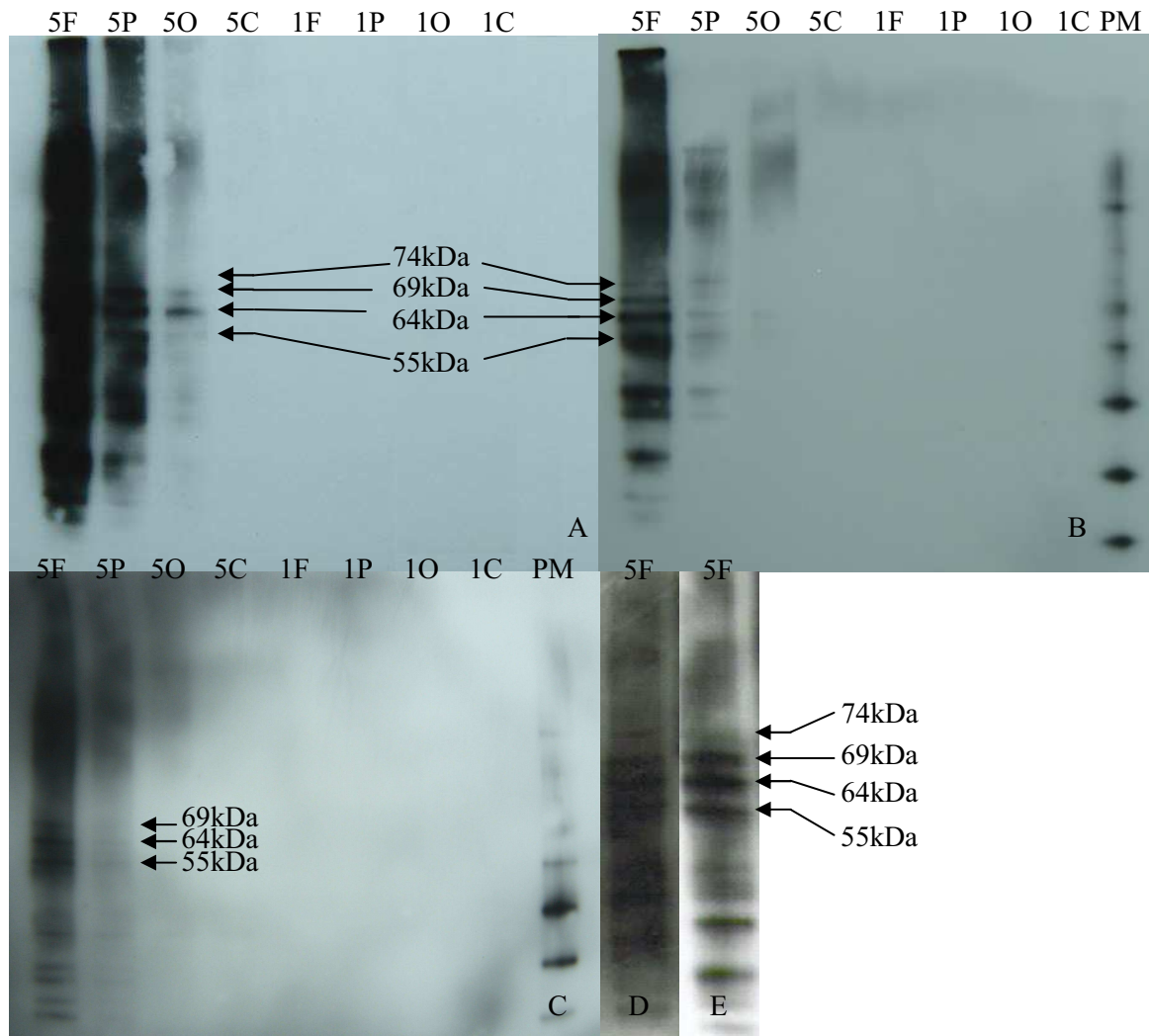


Figure 46. Western Blot de PHF extraites de cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer aux stades de Braak 1 et 5 révélés par les anticorps monoclonaux 2B11, 3G3, 5G7 et 9D8. F : cortex frontal ; P : cortex pariétal ; O : cortex occipital ; C : cervelet ; 5 : stade de Braak 5 ; 1 : stade de Braak 1 (image A : révélation par l'anticorps monoclonal 2B11 ; image B : révélation par l'anticorps monoclonal 3G3 ; image C : révélation par l'anticorps monoclonal 5G7 ; image D : révélation par l'anticorps monoclonal T46 ; image E : révélation par l'anticorps monoclonal 9D8).

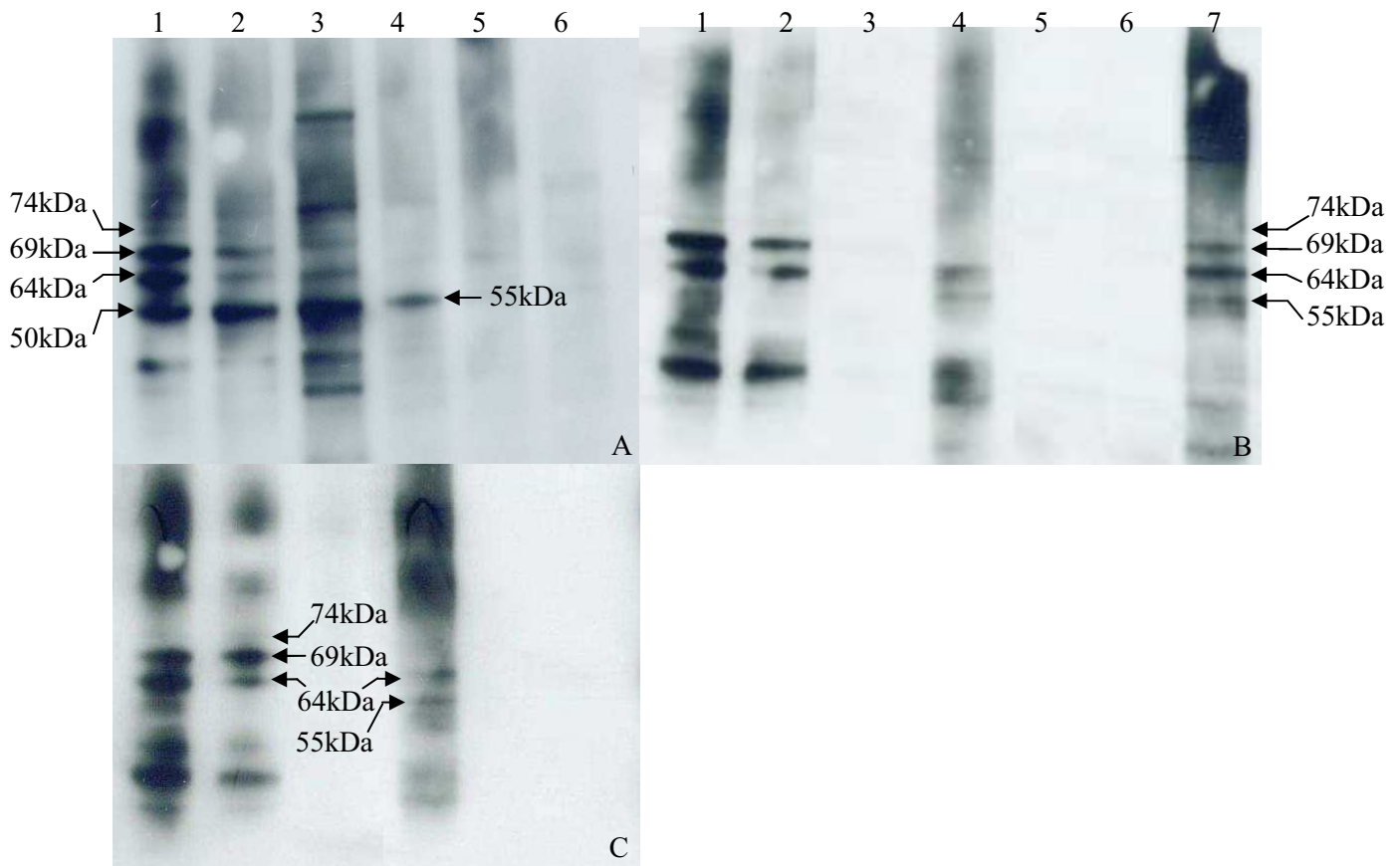


Figure 47. Western Blot des PHF dans le cadre d'une mutation S305I et d'une maladie de Pick révélés avec les anticorps monoclonaux 5G7, 2B11 et 9D8. Lignes 1-2-3 : PHF extraites d'un cerveau de patient atteint par une mutation S305I du gène de la protéine tau ; lignes 4-5-6 : PHF extraites du cerveau d'un patient atteint par une maladie de Pick ; ligne 7 : PHF issues d'un patient atteint par une maladie d'Alzheimer ; lignes 1 et 4 : cortex frontal ; lignes 2 et 5 : hippocampe ; lignes 3 et 6 : cervelet ; ligne 7 : cortex frontal ; image A : révélation par l'anticorps monoclonal 5G7 ; image B : révélation par l'anticorps monoclonal 2B11 ; image C : révélation par l'anticorps monoclonal 9D8.

L'anticorps monoclonal 5G7 révèle des bandes caractéristiques d'une tauopathie 4R (69kDa et 64kDa) avec les PHF extraites du cortex frontal, de l'hippocampe ainsi que du cervelet chez le patient atteint par une mutation S305I du gène de la protéine tau (figure 47 A). De plus il parvient à marquer légèrement la bande minoritaire à 74kDa dans le cortex frontal. Néanmoins, nous constatons avec cet anticorps une bande dont il est difficile de savoir si elle est en 50kDa ou 55kDa dans toutes les zones cérébrales étudiées pour ce patient. L'absence de marquage de la bande à 64kDa dans le cortex frontal du patient atteint par la maladie de Pick par le 5G7 nous indique qu'il s'agirait d'un marquage non spécifique pour la bande à 55kDa chez ce même patient et pourrait correspondre à ce marquage visualisé à 50kDa chez l'autre patient avec la mutation S305I.

Les profils WB des anticorps 2B11 et 9D8 sont sensiblement identiques et permettent de révéler les bandes de 69Kda et 64kDa ainsi que la bande à 74kDa de façon plus légère dans le cortex frontal et l'hippocampe du patient avec la mutation S305I (figure 47 B et C). Il n'a pas été observé de signal dans le cervelet avec ces 2 anticorps pour ce patient. De même, ils permettent de révéler les bandes de 64kDa et 55kDa dans le cortex frontal du patient atteint par la maladie de Pick. Tout comme avec l'anticorps T46 (figure 42), il n'a pas été observé de signal dans l'hippocampe et le cervelet pour ce patient avec les anticorps 2B11 et 9D8 (figure 47 B et C).

3 DISCUSSION

Nous avons testé la réactivité de 80 clones dirigés contre la protéine tau et ses phosphorylations situés sur les acides aminés 181, 231 et 231/235. Nous n'avons pas retenu d'anticorps dirigés contre la p-tau₁₈₁ suffisamment réactifs pour leurs épitopes. Nous avons retenu 2 anticorps dirigés contre la T-tau (1D8 et 6F4), 4 dirigés contre la p-tau₂₃₁ (2B11, 4C10, 5G7 et 9D8) et un dirigé contre la p-tau_{231/235} (3G3) sur des critères de réactivité. Les anticorps 1D8 et 6F4 se sont avérés peu sensibles et spécifiques contre les PHF. De plus, l'anticorps 6F4 révélait des bandes non spécifiques de la MA même au sein du cervelet chez les patients aux deux stades de Braak évolué et débutant (figure 45 B). Le clone 4C10 a montré une sensibilité intéressante en WB de même qu'en immunohistochimie. De plus, il apparaît spécifique pour les lésions incriminant la protéine tau en immunohistochimie (figure 44 A). Néanmoins, et tout comme le 6F4, il semble manquer de spécificité en WB (figure 45 A) puisque ce clone révèle des bandes dans le cervelet des patients à un stade de Braak évolué ainsi qu'à un stade neuropathologique débutant de MA. La plupart des lésions constituées par la protéine tau, dont les DNF retrouvées dans la MA, n'intéressent pas le cervelet. Il s'agit ici d'un signal non spécifique de ces anticorps.

L'anticorps 3G3 dirigé contre la p-tau_{231/235} démontre une bonne spécificité en WB (figure 46 B). Les clones 2B11 et 9D8, dirigés contre la p-tau₂₃₁ ont montré une bonne sensibilité et spécificité en immunohistochimie ainsi qu'en WB (figures 44 B-C-D, 46 A-C-E et 47 B-C). De plus, les anticorps 3G3, 2B11 et 9D8 ont permis de révéler la bande minoritaire de 74kDa retrouvée en WB dans la MA mais aussi dans une DFTP-17 en ce qui concerne les anticorps 2B11 et 9D8. De même, l'anticorps 5G7 permet l'obtention de bons résultats en immunohistochimie et en WB chez le patient atteint par une MA (figures 44 C et 46 C).

Néanmoins, nous obtenons un marquage ne correspondant pas aux profils typiquement retrouvés dans les cas de tauopathies 3R et 4R (figure 47 A).

Nous retenons au final 3 clones (2B11, 9D8 et 5G7) dirigés contre la p-tau₂₃₁ et un clone (3G3) dirigé contre la p-tau_{231/235}. L'anticorps 2B11 apparaît le plus sensible de tous ces clones en Dot Blot mais aussi et surtout en WB, il sera ainsi utilisé prioritairement afin de mettre au point un outil immunologique de détection et de dosage de la p-tau₂₃₁ dans le LCR. En effet, ces anticorps pourraient permettre de détecter ces protéines phosphorylées dans le LCR de patients atteints par la MA du vivant du patient. L'utilisation de ces anticorps au sein d'un outil immunologique de type ELISA reste à évaluer et paraît une bonne alternative aux anticorps dirigés contre la protéine tau phosphorylée en 181 pour le diagnostic biologique de la MA et des syndromes apparentés dans le LCR.

PARTIE 4 :

**MISE AU POINT D'UN OUTIL IMMUNOLOGIQUE DE TYPE ELISA POUR LE
DOSAGE DE LA PROTÉINE TAU PHOSPHORYLÉE SUR L'ACIDE AMINÉ 231**

1 MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1 Échantillons

Les LCR des patients ont été choisis en fonction du diagnostic clinique et des caractéristiques biologiques pour les 3 marqueurs T-tau, p-tau₁₈₁ et A β ₄₂. Les LCR des patients atteints par une MA avec un diagnostic clinique de probabilité avaient les caractéristiques biologiques de cette pathologie (élévation de la concentration des protéines T-tau et p-tau₁₈₁, diminution de la concentration du peptide A β ₄₂). Les LCR de patients atteints par une DFT avec un diagnostic clinique de probabilité ainsi que les patients ND avaient des concentrations normales. Tous les patients ont été inclus soit au sein du Projet Hospitalier de Recherche Clinique 2004 D50353 soit au sein du projet européen EU FP6 LSHB-CZ-2006-037719 contrat N° 037719. L'étude a été approuvée par le comité d'éthique local (CPP) et tous les patients (ou leurs familles) ont été informés et ont signé un consentement éclairé (Annexe 5) ainsi qu'une notice d'explication (Annexe 6). De plus nous avons utilisé des PHF solubilisées par la Guanidine et extraites selon la méthode décrite précédemment.*

1.2 Méthodologie

Nous avons choisi l'anticorps monoclonal T46 (Signet, Dedham, MA, USA) comme anticorps de capture. Cet anticorps, qui reconnaît la T-tau, est sensible et bien maîtrisé au laboratoire de Neurobiologie du Groupement Hospitalier Est (Lyon). De même, nous avons choisi l'anticorps monoclonal 3F4 dirigé contre la PrP et reconnaissant les acides aminés 109 à 112 de la protéine Prion (Signet, Dedham, MA, USA) comme anticorps de capture contrôle. Cet anticorps est lui aussi bien maîtrisé au sein du laboratoire. Le 3F4 a été fixé sur les puits aux mêmes concentrations que le T46. L'anticorps de détection 2B11, dirigé contre la p-tau₂₃₁, a été choisi sur ses critères de sensibilité et de spécificité pour mettre au point cette détection dans le LCR. Cet anticorps s'est révélé le plus sensible pour détecter les p-tau₂₃₁.[†] Les anticorps de détection 9D8 et 5G7 ont été testés par la suite au cours des différentes modifications de paramètres pour l'optimisation de la spécificité de cette détection.

* Cf. **Partie 3 - 1.2.1.2.1 Reconformation des PHF dans leurs formes biologiques natives**

† Cf. **Partie 3**

1.2.1 Détermination des paramètres initiaux

1.2.1.1 Détermination de la concentration optimale de l'anticorps de capture pour sa fixation

Nous avons déterminé les paramètres initiaux permettant de saturer les plaques 96 puits dans les meilleures conditions de détection. Cent microlitres d'anticorps monoclonal T46 ont été déposés dans les puits à des concentrations croissantes de 0.25 µg/mL, 0.5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL et 5 µg/mL dans un tampon carbonate/bicarbonate (0.5M, pH 9.6). Les plaques ont ensuite été incubées 2 heures à 37°C. Trois saturations ont été utilisées pour déterminer la concentration d'anticorps de capture à incuber afin d'obtenir une fixation optimale :

- Gélatine à 2.5% (vol/vol) dans un tampon PBS (pH 7.4) contenant du Triton X-100 à 0.05% (vol/vol)
- Albumine de sérum bovin (BSA) à 5% (m/vol) dans un tampon PBS (pH 7.4) contenant du Triton X-100 à 0.05% (vol/vol)
- Lait à 5% (m/vol) dans un tampon PBS (pH 7.4) contenant du Triton X-100 à 0.05% (vol/vol)

Des PHF solubilisées (dilution 1/1000 dans un tampon PBS contenant du Triton X-100 à 0.05% [vol/vol]) ont alors été incubées dans les puits pendant 2 heures à température ambiante. Après lavages, l'anticorps de détection 2B11 couplé à la biotine (1/1000 dans un tampon PBS [pH 7.4] contenant du Triton X-100 à 0.05% [vol/vol]) a été incubé pendant 2 heures à température ambiante. L'avidine (HRP-Avidine, Zymed Laboratories, Invitrogen, Carlsbad, Californie, USA) a été incubée 1 heure à température ambiante à une concentration de 1/2000 dilué dans le tampon PBS (pH 7.4] contenant du Triton X-100 à 0.05% (vol/vol). Après lavage, 100µL de tetramethylbenzidine (TMB, Sigma, Missouri, USA) ont été ajoutés. Après une incubation de 10 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière, 100µL d'une solution de H₂SO₄ (0.6 M) ont été ajoutés afin de stopper la réaction de la peroxydase. La lecture des densités optiques (DO) a été effectuée avec TECAN GENios (TECAN, Grödig/Salzburg, Autriche) à l'aide du logiciel Magellan version 3.0. La lecture des plaques a été effectuée avec une longueur d'onde d'émission de 450 nm.

1.2.1.2 Détermination de la nature et de la concentration du saturant à utiliser

Les bruits de fond ont ensuite été évalués de façon systématique pour les différentes saturations suivantes diluées dans : 1) tampon PBS (pH 7.4) 2) tampon PBS (pH 7.4) contenant du Triton X-100 à 0.05% (vol/vol) 3) tampon PBS (pH 7.4) contenant du Triton X-100 à 0.1% (vol/vol).

- Lait à 5% (m/vol)
- Lait à 3% (m/vol) et BSA à 3% (m/vol)
- BSA à 5%
- BSA à 3% (m/vol) et albumine de sérum humaine (HSA) à 1% (vol/vol)
- HSA à 3% (m/vol)
- Lait à 3% (m/vol) et HSA à 1% (vol/vol)
- Gélatine à 2.5% (vol/vol)

Le pouvoir saturant des tampons ayant permis de diluer le lait, la BSA, l'HSA et la gélatine a aussi été évalué.

La détection a été effectuée avec l'anticorps de capture 2B11 (1/1000 dilué dans un tampon PBS [pH 7.4] contenant du Triton X-100 à 0.05% [vol/vol]) couplé à la biotine *via* le système biotine-avidine. La révélation ainsi que la lecture des DO ont été effectuées comme précédemment.*

1.2.2 **Mise au point de la détection de la p-tau231 dans le liquide céphalorachidien**

1.2.2.1 Détection par le système biotine-avidine

Les meilleures conditions de fixation de l'anticorps de capture et de saturation ont été choisies pour la mise au point de la détection de la p-tau₂₃₁ dans le LCR. Nous sommes partis d'un protocole initial comportant une incubation des LCR (100µL) de patients atteints par la MA, la DFT ou ND de 12 heures à température ambiante. Nous avons utilisé ici un seul LCR de chaque pathologie pour la mise au point. Après lavage, 100µL d'anticorps de détection

* Cf. 1.2.1.1 Détermination de la concentration optimale de l'anticorps de capture pour sa fixation au sein de ce chapitre.

(dilution 1/1000 dans un tampon PBS [pH 7.4] contenant du Triton X-100 à 0.05% [vol/vol]) ont été déposés dans les puits et incubés 2 heures à température ambiante. Nous avons effectué cette mise au point avec l'anticorps monoclonal 2B11 dans un premier temps puis avec les anticorps 9D8 et 5G7 dans un deuxième temps. La révélation a par la suite été effectuée avec de l'avidine (dilution à 1/1000 dans un tampon PBS [pH 7.4] contenant du Triton X-100 à 0.05% [vol/vol]) incubé 1h à température ambiante. La révélation ainsi que la lecture des DO ont été réalisées comme précédemment.*

Nous avons par la suite modifié ces paramètres initiaux en vue d'améliorer la spécificité de la détection de la p-tau₂₃₁ dans le LCR.

1.2.2.2 Détection par le système HRP

L'anticorps monoclonal 2B11 a été couplé à l'HRP. Nous avons choisi de conserver les meilleures conditions de dilution et d'incubation de l'antigène ainsi que de l'anticorps de détection. Nous avons utilisés 4 LCR de patients atteints par la MA avec une biologie des marqueurs (T-tau, p-tau₁₈₁ et A β ₄₂) positifs pour cette maladie et 3 LCR de patients ND sans argument biologique pour une pathologie dégénérative. Nous avons effectué la révélation comme précédemment décrite. Les paramètres de lecture des absorbances sont les mêmes que celles précédemment décrites plus haut.*

2 RÉSULTATS

2.1 Détection par le système biotine-streptavidine

2.1.1 Détermination des paramètres initiaux

Les PHF solubilisées sont détectées à des valeurs de DO équivalentes pour des concentrations en T46 de 2 μ g/mL et 5 μ g/mL avec une saturation dans un tampon PBS (pH 7.4) contenant du lait à 5% (m/vol) et du Triton X-100 à 0.05% (vol/vol) (figure 48).

* Cf. 1.2.1.1 Détermination de la concentration optimale de l'anticorps de capture pour sa fixation au sein de ce chapitre.

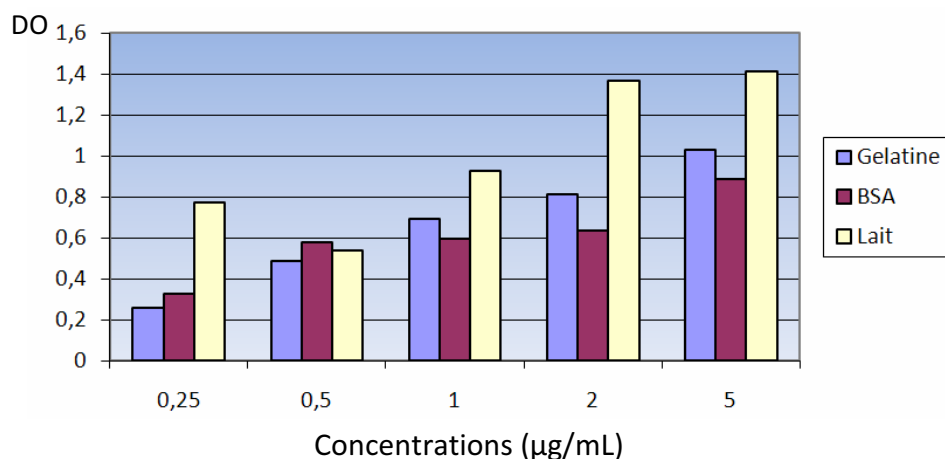


Figure 48. Détection des PHF en fonction de la concentration de T46 fixée sur la plaque 96 puits avec 3 saturations courantes. BSA : albumine de sérum bovin ; DO : densité optique (saturations : gélatine à 2.5% [vol/vol] ou BSA à 3% [m/vol] ou lait à 5% (m/vol) dans un tampon PBS [pH 7.4] contenant du triton X-100 à 0.05% [vol/vol]).

Nous avons évalué les bruits de fonds pour différentes saturations (figure 49). Les saturations ayant donné les meilleurs résultats sont résumées dans la figure 50.

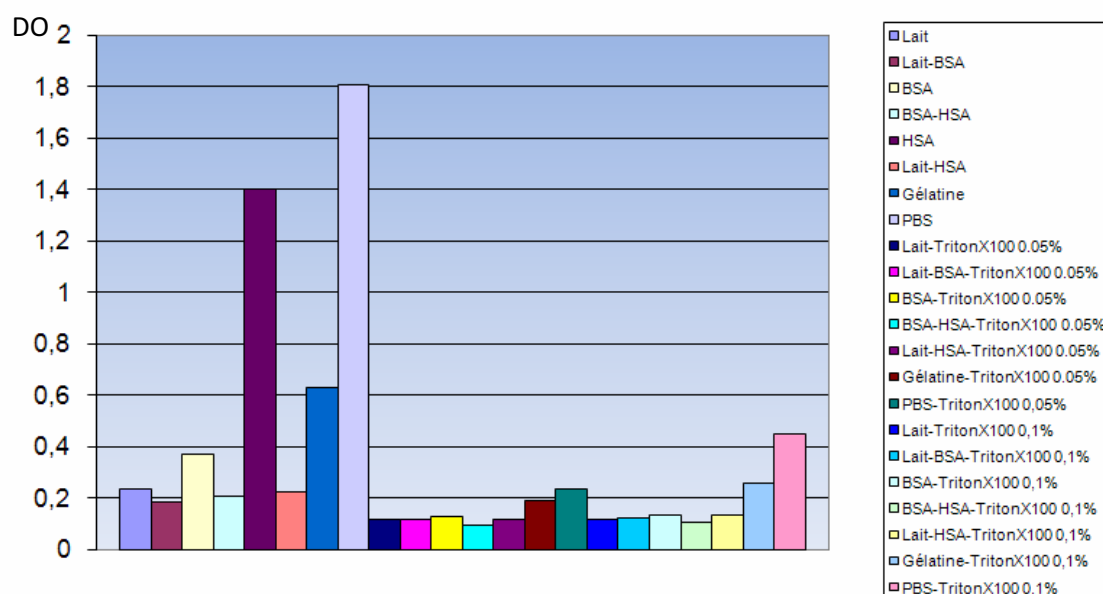


Figure 49. Détermination de la saturation optimale avec l'anticorps de capture 2B11. BSA : albumine de sérum bovin ; HSA : albumine de sérum humaine ; PBS : tampon phosphate salin ; DO : densité optique (saturations : lait à 5% (m/vol), BSA à 5% [m/vol], HSA à 3% [vol/vol], gélatine à 2.5% [vol/vol]).

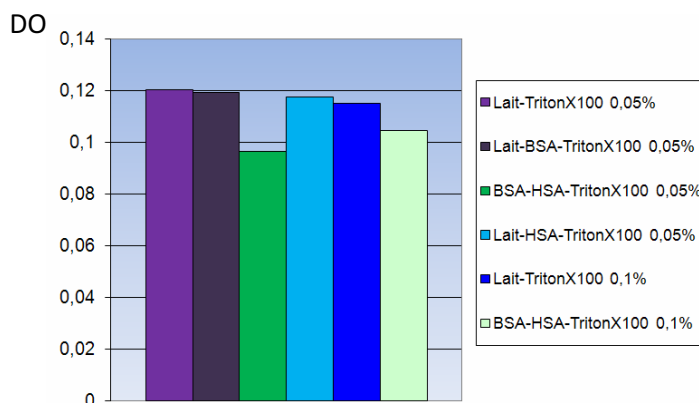


Figure 50. Meilleures saturations pour l'anticorps de capture 2B11. BSA : albumine de sérum bovin ; HSA : albumine de sérum humaine ; DO : densité optique (saturations : lait à 5% [m/vol], BSA à 5% [m/vol], HSA à 3% [vol/vol], BSA à 3% [m/vol] et HSA à 1% [vol/vol] dans un tampon PBS [pH 7.4] contenant du Triton X-100 à 0.05% [vol/vol] et lait à 5% [m/vol], BSA à 3% [m/vol] et HSA à 1% [vol/vol] dans un tampon PBS [pH 7.4] contenant du Triton X-100 à 0.1% [vol/vol]).

Nous avons mis en évidence et confirmé que certaines saturations n'étaient pas efficaces (gélatine, HSA seules notamment) (Figure 49). L'ajout du Triton X-100 semble avoir un effet important sur l'efficacité des saturations. Il n'y a pas de différence significative entre le lait à 5% (m/vol), BSA à 5% (m/vol), HSA à 3% (vol/vol), BSA à 3% (m/vol) avec HSA à 1% (vol/vol) dans un tampon PBS (pH 7.4) contenant du Triton X-100 à 0.05% (vol/vol) ainsi que le lait à 5% (m/vol) et la BSA à 3% (m/vol) avec HSA à 1% (vol/vol) dans un tampon PBS (pH 7.4) contenant du Triton X-100 à 0.1% (vol/vol) (figure 50). Notre choix s'est donc porté sur la saturation avec de la BSA à 3% (m/vol) et HSA à 1% (vol/vol) dans un tampon PBS (pH 7.4) contenant du Triton X-100 à 0.05% (vol/vol).

2.1.2 Mise au point de la détection de la p-tau₂₃₁ dans le liquide céphalorachidien

Les DO observées avec l'anticorps T46 en capture sont plus élevées que celles observées avec le 3F4 en capture ainsi que sans anticorps de capture (figure 51 A). De plus, ce signal est plus élevé pour le LCR du patient atteint par la MA. Néanmoins l'anticorps 2B11 obtient un signal en couplage avec l'anticorps de capture T46 sans LCR. De même, le contrôle sans anticorps de détection obtient une DO de 0.5. Les DO observées restent élevées pour les LCR avec l'anticorps de capture 3F4 et sans anticorps de capture. Afin de vérifier la spécificité du signal, nous avons déposé les LCR dans des puits sans anticorps de capture ni de détection

(figure 51 B). Les DO observées avec les dépôts contrôles de LCR sont très élevées. Nous sommes en présence d'un signal non spécifique provenant du LCR. Nous avons obtenu des résultats identiques avec les différents anticorps de capture 2B11, 9D8 et 5G7 (données non montrées).

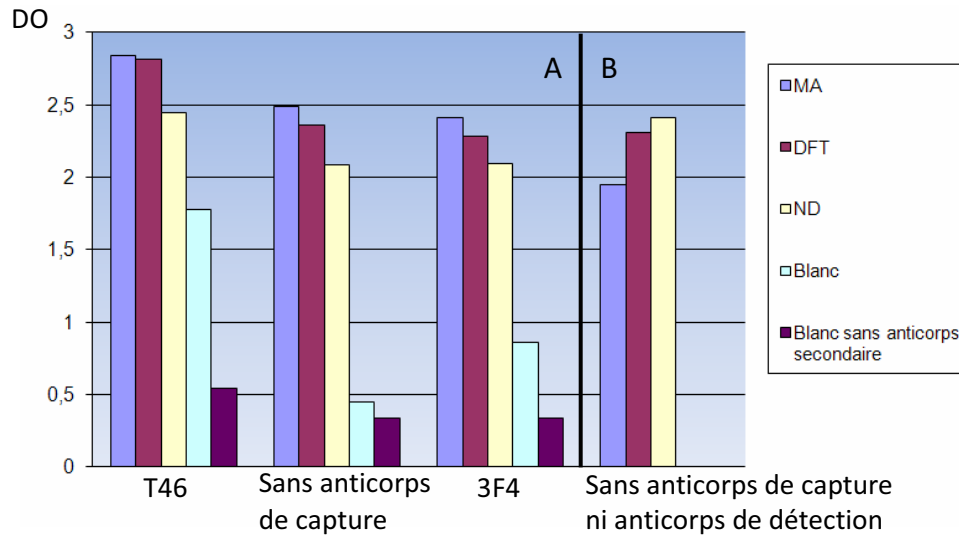


Figure 51. Détection de la tau phosphorylée sur l'acide aminé 231 dans le liquide céphalorachidien avec le 2B11. MA : maladie d'Alzheimer ; DFT : démence frontotemporale ; ND : non dégénératif ; DO : densité optique (A : dépôts de 3 LCR de patients atteints par une maladie d'Alzheimer, une démence frontotemporale et une maladie non dégénérative dans les puits ou sont fixés les anticorps T46, 3F4 ainsi qu'un contrôle sans anticorps, les « blancs » correspondent à du PBS ; B : dépôts des 3 LCR dans des puits sans anticorps de capture ni anticorps de détection).

Afin de diminuer le signal non spécifique, nous avons effectué des dilutions de l'avidine (1/2000, 1/3000, 1/5000) dans différents tampons :

- PBS (pH 7.4) contenant du Triton X-100 à 0.05% (vol/vol)
- Lait à 5% (m/vol) dans un tampon PBS (pH 7.4) contenant du Triton X-100 à 0.05% (vol/vol)
- BSA à 3% (m/vol) et HSA à 1% (vol/vol) dans un tampon PBS (pH 7.4) contenant du Triton X-100 à 0.05% (vol/vol)
- BSA à 6% (m/vol) et HSA à 2% (vol/vol) dans un tampon PBS (pH 7.4) contenant du Triton X-100 à 0.05% (vol/vol)

Néanmoins aucune de ces conditions ne nous a permis d'améliorer le signal non spécifique observé (données non montrées). Les conditions d'incubation de l'avidine ont alors été

modifiées et nous avons choisi de l'incuber à 4°C pendant 1 heure dans les différentes conditions de dilution citées plus haut. Nous avons constaté une diminution générale des DO obtenues par cette incubation à 4°C avec une légère diminution de la non spécificité (données non montrées). Suite à cette légère amélioration nous avons décidé de conserver l'incubation de l'avidine à 4°C.

L'anticorps de détection 2B11 a aussi été dilué dans les tampons ayant permis de diluer l'avidine, néanmoins nous n'avons pas observé de bénéfice sur la spécificité et seules les DO sont très nettement diminuées de manière générale (données non montrés). La dilution de l'anticorps de détection dans le tampon PBS (pH 7.4) contenant du Triton X-100 à 0.05% (vol/vol) semble être optimale. Nous avons ensuite testé l'effet de la température d'incubation de l'anticorps de détection sur la spécificité. Le 2B11 dilué dans le tampon PBS (pH 7.4) contenant du Triton X-100 à 0.05% (vol/vol) a été incubé pendant 12 h à 4°C à la place de la température ambiante. Nous avons observé une légère amélioration de la spécificité (figure 52). Nous conserverons ce paramètre.

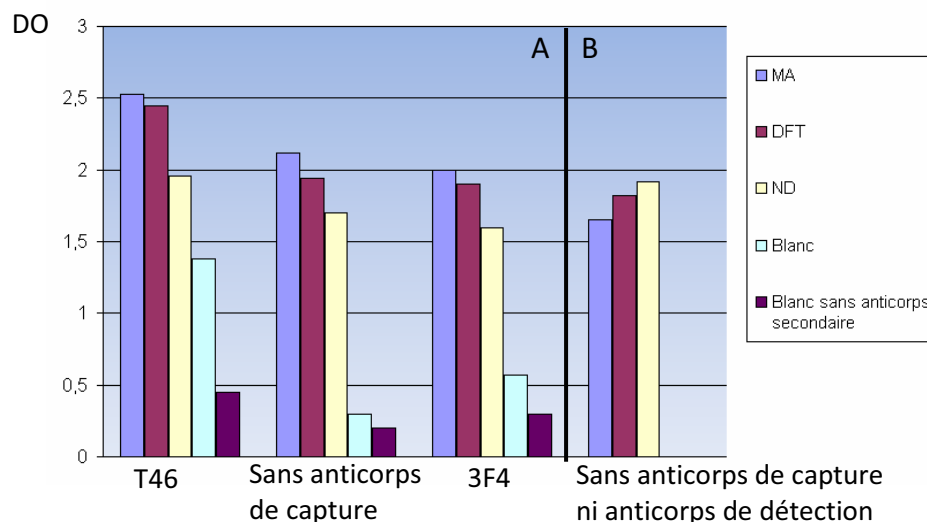


Figure 52. Incubation de l'anticorps de détection 2B11 à 4°C pendant 12 heures. MA : maladie d'Alzheimer ; DFT : démence frontotemporale ; ND : non dégénératif ; DO : densité optique (A : dépôts de 3 LCR de patients atteints par une maladie d'Alzheimer, une démence frontotemporale et une maladie non dégénérative dans les puits où sont fixés les anticorps T46, 3F4 ainsi qu'un contrôle sans anticorps, les « blancs » correspondent à du PBS ; B : dépôts des 3 LCR dans des puits sans anticorps de capture ni anticorps de détection).

Les LCR ont alors été dilués (1/2) dans les différents tampons précédents nous ayant permis de diluer l'avidine et l'anticorps de détection :

- PBS (pH 7.4) contenant du Triton X-100 à 0.05% (vol/vol)
- Lait à 5% (m/vol) dans un tampon PBS (pH 7.4) contenant du Triton X-100 à 0.05% (vol/vol)
- BSA à 3% (m/vol) et HSA à 1% (vol/vol) dans un tampon PBS (pH 7.4) contenant du Triton X-100 à 0.05% (vol/vol)
- BSA à 6% (m/vol) et HSA à 2% (vol/vol) dans un tampon PBS (pH 7.4) contenant du Triton X-100 à 0.05% (vol/vol)

La dilution des LCR (1/2) dans le tampon PBS (pH 7.4) contenant du Triton X-100 à 0.05% (vol/vol) a permis de diminuer le signal non spécifique obtenu (figure 53). La DO obtenue avec le LCR dilué de patient atteint par la MA incubé en présence de l'anticorps de capture T46 est retrouvée sensiblement plus élevée que toutes les autres DO (figure 53 A). De plus, nous avons observé une diminution des DO pour les contrôles (avec 3F4, sans anticorps de capture et/ou sans anticorps de détection). Les autres conditions de dilution ne nous ont pas permis d'obtenir d'amélioration de la spécificité (données non montrées).

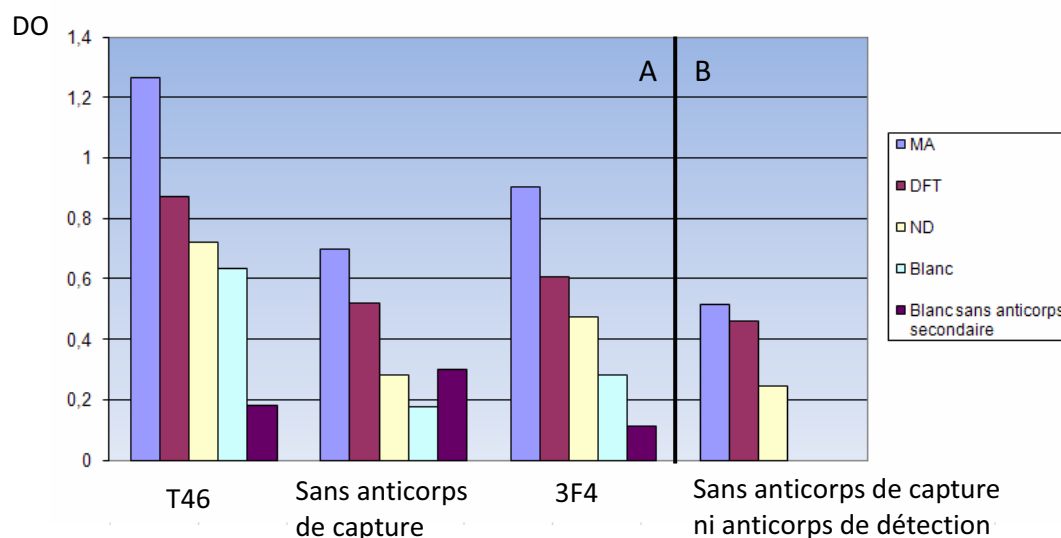


Figure 53. Détection de la p-tau₂₃₁ dans le LCR dilué (1/2) dans du PBS (pH 7.4) contenant du Triton X100 à 0.05% (vol/vol) révélé par le 2B11. MA : maladie d'Alzheimer ; DFT : démence frontotemporale ; ND : non dégénératif ; DO : densité optique (A : dépôts de 3 LCR de patients atteints par une maladie d'Alzheimer, la démence frontotemporale et une maladie non dégénérative dans les puits où sont fixés les anticorps T46, 3F4 ainsi qu'un contrôle sans anticorps, les « blancs » correspondent à du PBS ; B : dépôts des 3 LCR dans des puits sans anticorps de capture ni anticorps de détection).

Des dilutions plus importantes du LCR (dilutions au 1/3 et 1/4) ont montré des diminutions globales des DO et avec une augmentation de la non spécificité (données non montrées). Une dilution plus importante des LCR ne s'est donc pas avérée contributive.

Afin de diminuer ce signal non spécifique, les LCR dilués (1/2 dans le tampon PBS [pH 7.4] contenant du Triton X-100 à 0.05% [vol/vol]) ont été incubés 12 heures à 4°C (figure 54). Le signal non spécifique est réduit de manière générale sans perte du signal obtenu avec le T46 en capture (figure 54 A). Néanmoins, le 3F4 en capture obtient un signal significativement plus élevé que les autres contrôles.

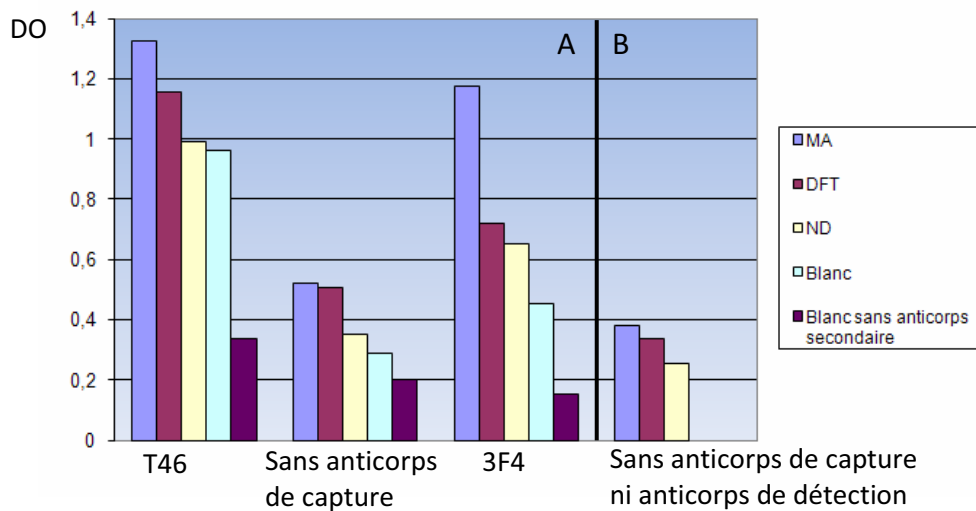


Figure 54. Détection de la p-tau₂₃₁ dans le LCR dilué (1/2) dans du PBS contenant du Triton X100 à 0.05% incubé à 4°C et révélé par le 2B11. MA : maladie d'Alzheimer ; DFT : démence frontotemporale ; ND : non dégénératif ; DO : densité optique (A : dépôts de 3 LCR de patients atteints par une maladie d'Alzheimer, la démence frontotemporale et une maladie non dégénérative dans les puits où sont fixés les anticorps T46, 3F4 ainsi qu'un contrôle sans anticorps, les « blancs » correspondent à du PBS ; B : dépôts des 3 LCR dans des puits sans anticorps de capture ni anticorps de détection).

L'utilisation du 9D8 en anticorps de détection n'a pas permis d'améliorer la spécificité du signal, les DO étant comparables à celles observées en utilisant le 2B11 (données non montrées). L'utilisation du 5G7 dans ces conditions n'a également pas permis d'améliorer la spécificité de façon générale, il permet néanmoins de diminuer légèrement le signal obtenu avec le 3F4 en capture dans ces conditions (figure 55).

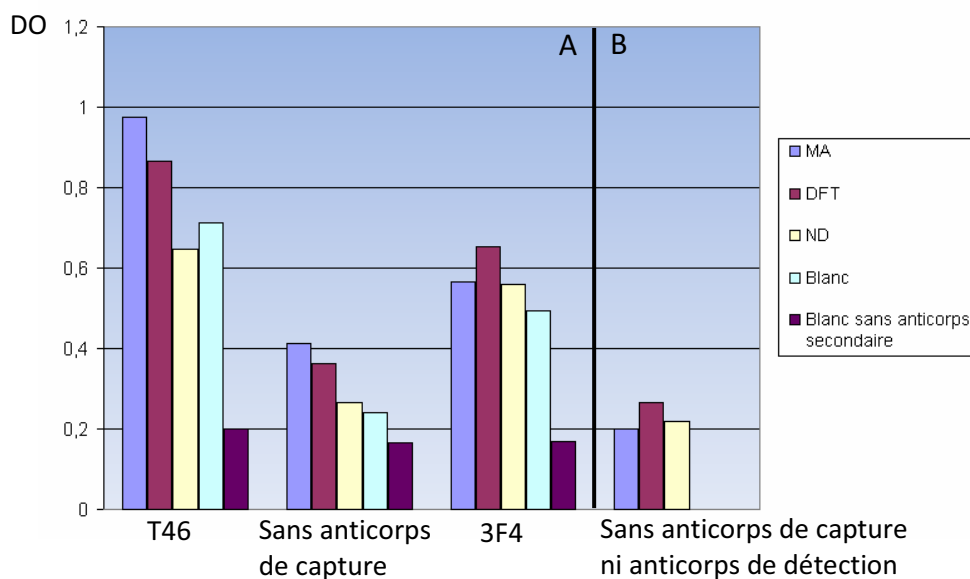


Figure 55. Détection de la p-tau₂₃₁ dans le LCR dilué (1/2) dans du PBS contenant du Triton X100 à 0.05% incubé à 4°C et révélé par le 5G7. MA : maladie d'Alzheimer ; DFT : démence frontotemporale ; ND : non dégénératif ; DO : densité optique (A : dépôts de 3 LCR de patients atteints par une maladie d'Alzheimer, la démence frontotemporale et une maladie non dégénérative dans les puits où sont fixés les anticorps T46, 3F4 ainsi qu'un contrôle sans anticorps, les « blancs » correspondent du PBS ; B : dépôts des 3 LCR dans des puits sans anticorps de capture ni anticorps de détection).

Nous n'avons pas amélioré la spécificité du signal en remplaçant la BSA par le lait dans ces conditions (données non montrées). De plus, afin de concentrer les LCR pour augmenter la concentration potentielle de la p-tau₂₃₁ au sein de ce liquide, les LCR ont été ultrafiltrés. Nous avons observé un signal bien moins spécifique que ceux obtenus auparavant (données non montrées).

Nous avons tout de même réussi à améliorer la spécificité au sein des conditions contrôles sans anticorps de capture ni anticorps de détection (figure 53 B). Néanmoins il existe toujours un manque de spécificité puisque l'anticorps 3F4 semble capturer des éléments détectés par la suite. Il pourrait s'agir en partie d'un problème lié à la méthode de détection elle-même (système biotine-avidine). Nous avons donc choisi une autre méthode de détection permettant de se soustraire de l'avidine qui pourrait être une étape limitante pour la spécificité des signaux.

2.2 Détection par le système HRP

Nous avons décidé de garder les conditions nous permettant d'obtenir les meilleurs résultats avec la méthode de détection précédente : incubation des LCR dilués 1/2 dans le tampon PBS (pH 7.4) contenant du Triton X-100 à 0.05% (vol/vol) pendant 12 heures à 4°C et incubation à 4°C pendant 12 heures de l'anticorps de capture (1/1000) dilué dans le tampon PBS (pH 7.4) contenant du Triton X-100 à 0.05% (vol/vol).

Nous avons testé les 2 types de saturations s'avérant précédemment les plus efficaces pour cette nouvelle technique de détection avec les anticorps secondaires directement couplés à la peroxydase :

- Lait à 5% (m/vol) dans un tampon PBS (pH 7.4) contenant du Triton X-100 à 0.05% (vol/vol)
- BSA à 3% (m/vol) avec HSA à 1% (vol/vol) dans un tampon PBS (pH 7.4) contenant du Triton X-100 à 0.05% (vol/vol)

Quatre LCR de patients atteints par la MA et 3 LCR de patients ND ont été déposés.

L'utilisation du lait apparaît légèrement plus efficace que la BSA avec HSA dans ces nouvelles conditions de détection (figures 56 et 57). De plus nous avons obtenu une spécificité supérieure avec le lait en saturation que lors de la détection précédente. Nous avons observé une diminution importante du bruit de fond en utilisant la peroxydase directement couplée à l'anticorps de détection par rapport au système avidine-biotine (figures 55 et 56).

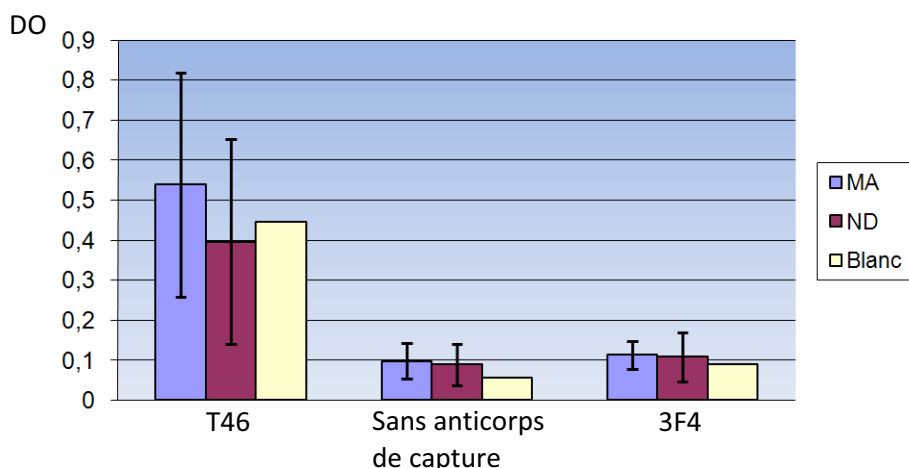


Figure 56. Détection de la p-tau₂₃₁ dans le LCR révélé par le 2B11 avec une saturation au lait. MA : maladie d'Alzheimer (n=4) ; ND : non dégénératif (n=3); Blanc : tampon PBS ; DO : densité optique

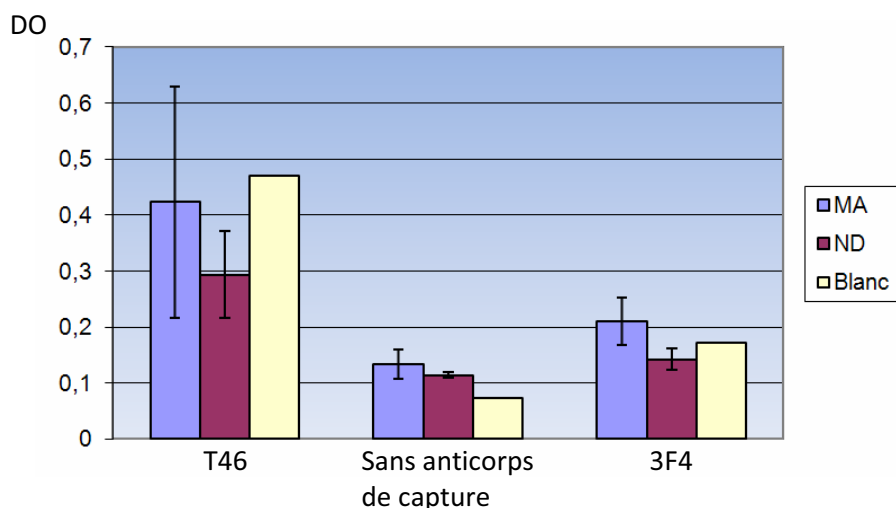


Figure 57. Détection de la p-tau₂₃₁ dans le LCR révélé par le 2B11 avec une saturation à la BSA et HSA. MA : maladie d'Alzheimer (n=4) ; ND : non dégénératif (n=3) ; Blanc : tampon PBS ; DO : densité optique.

Les valeurs de DO sont faibles avec cette nouvelle technique de détection. Afin d'améliorer la capture ainsi que l'écart entre la capture spécifique et non spécifique (signaux avec le 3F4 et sans anticorps de capture), une augmentation du temps d'incubation des LCR à 4°C a été effectuée avec une incubation pendant 72 heures à 4°C. Nous n'observons pas d'amélioration de la spécificité avec des ratios signaux spécifiques sur non spécifiques identiques, néanmoins une légère augmentation générale des valeurs de DO a été observée (données non montrées).

Afin d'améliorer la détection de la p-tau₂₃₁ dans les LCR, nous avons décidé de les déposer purs en conservant les paramètres précédents : incubation des LCR pendant 72 heures au lieu de 12 heures à 4°C et incubation à 4°C pendant 12 heures de l'anticorps de capture (1/1000) dilué dans le tampon PBS (pH 7.4) contenant du Triton X-100 à 0.05% (vol/vol).

Le dépôt des LCR non dilués dans ces conditions nous révèle des valeurs de DO importantes avec le 3F4 en capture pour les LCR de patients atteints par une MA et ND (figure 58). Nous avons confirmé sur plus de quatre essais différents la réalité des signaux obtenus sur ces LCR avec le 3F4 en capture.

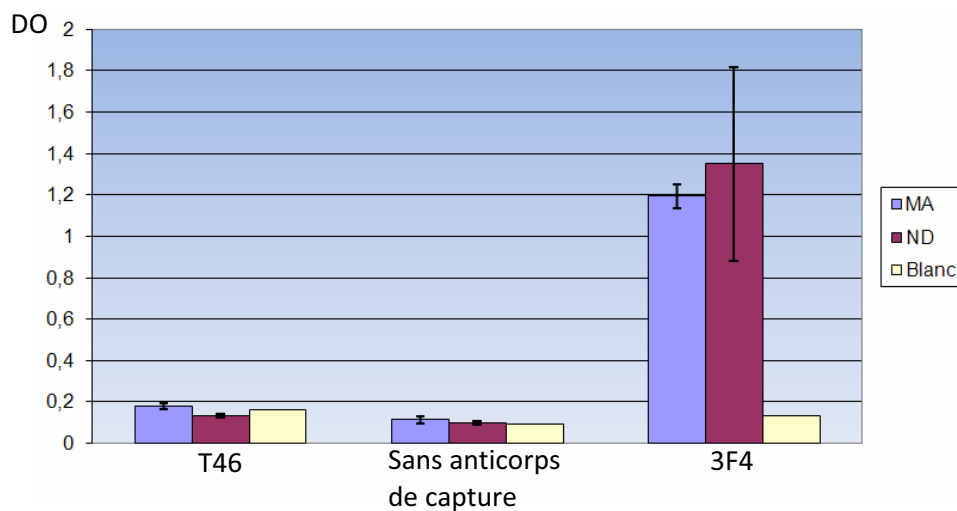


Figure 58. Détection de la p-tau₂₃₁ dans le LCR déposé pur et révélé par le 2B11. MA : maladie d'Alzheimer ; ND : non dégénératif ; Blanc : tampon PBS ; DO : densité optique.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons utilisé en complément du 3F4 un autre anticorps monoclonal, le 12F10, reconnaissant la séquence 142-160 de la PrP (figure 59). En plus des dépôts de LCR nous avons déposé des PHF solubilisées (dilution 1/1000 dans du PBS [pH 7.4] contenant du Triton X-100 à 0.05% [vol/vol]). Le T46 en capture reconnaît les PHF de manière sensible alors que le signal obtenu avec les anticorps anti-PrP est faible. Néanmoins le signal obtenu avec le T46 en capture sur les LCR MA et ND est dans le bruit de fond. Les anticorps dirigés contre la PrP arrivent à capturer, spécifiquement du point de vue de notre mise au point technique, une entité biologique présente dans le LCR et reconnu par le 2B11. L'anticorps 12F10 est plus sensible dans cette capture que l'anticorps 3F4. Il n'y a pas de différence de valeurs de DO entre les LCR de patients MA et ND.

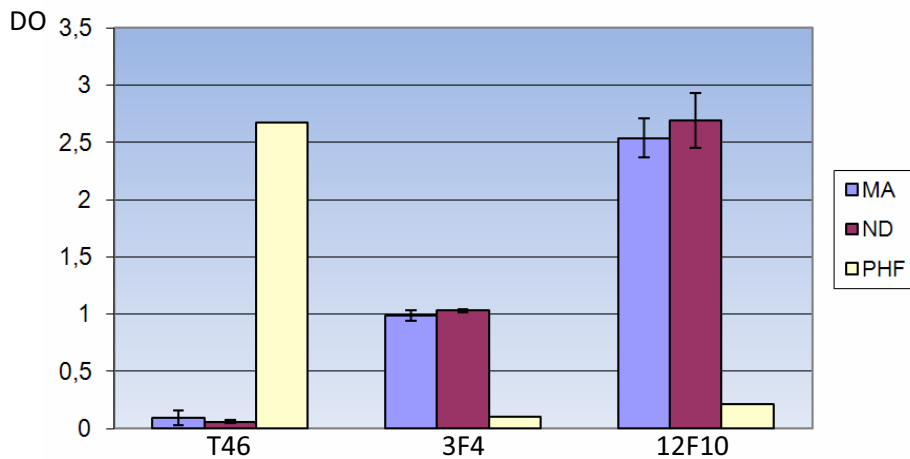


Figure 59. Détection de la p-tau₂₃₁ dans le LCR déposé pur et révélé par le 2B11. MA : maladie d'Alzheimer ; ND : non dégénératif ; DO : densité optique.

Afin de confirmer ces données, nous avons effectué la même capture que précédemment avec une révélation par l'anticorps 15F5 couplé à la peroxydase et reconnaissant la séquence 129-142 de la PrP (Roboscreen, Liepzig) (figure 60). L'anticorps T46 n'obtient aucun signal avec l'anticorps 15F5 en détection, de même que l'anticorps 12F10 qui obtient un très faible signal avec le 15F5 en détection. Aux vues des signaux obtenus à l'aide du sandwich 3F4/15F5, nous pouvons affirmer que ces LCR contiennent de la PrP.

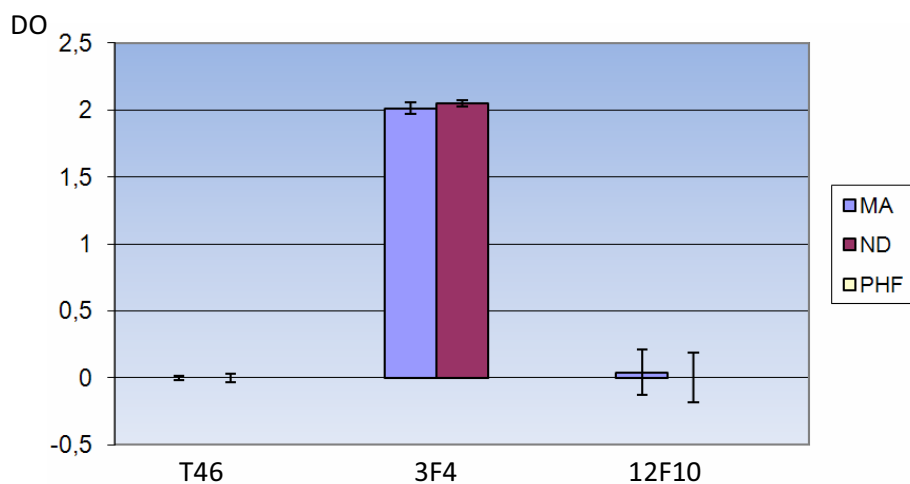


Figure 60. Détection de la protéine Prion dans le LCR déposé pur et révélé par le 15F5. MA : maladie d'Alzheimer ; ND : non dégénératif ; DO : densité optique.

3 DISCUSSION

Nous avons finalement réussi à mettre au point les paramètres techniques permettant de diminuer de façon drastique les signaux non spécifiques. La nouvelle méthode de détection utilisée (anticorps de détection directement couplé à l'HRP) nous a permis d'éliminer une étape (incubation de l'avidine) extrêmement limitante pour l'obtention d'un signal spécifique. De même, l'incubation des LCR à 4°C notamment, le dépôt des LCR non dilués ainsi que l'augmentation de ces temps d'incubation ont favorisé l'apparition d'un signal spécifique. Ces temps d'incubations relativement long (plus de 60 heures) ont été rapportés dans la littérature et font partie des étapes critiques du dosage de la p-tau₂₃₁ dans le LCR.⁵¹⁰ Néanmoins, nous n'avons pas réussi à obtenir un signal de la p-tau₂₃₁ suffisamment sensible. De plus nous ne sommes pas parvenu à mettre en évidence de différences entre les patients atteints par une MA et ND.

Selon des études anatomopathologiques, la phosphorylation de la protéine tau sur l'acide aminé 231 apparaît très précocement dans l'établissement des lésions de type Alzheimer.^{243, 379} Sa présence et son dosage dans le LCR pourrait être un élément important du diagnostic précoce de la MA chez les sujets atteints par une MA débutante encore au stade MCI. Il existe des disparités dans les concentrations intrathécales observées de cette protéine qui varient considérablement selon les différentes études. Certaines études dans le LCR rapportent des concentrations considérables de la p-tau₂₃₁ dans le LCR des patients atteints par la MA (de l'ordre de 500pg/mL jusqu'à 1000ng/mL) alors que d'autres études obtiennent des concentrations plus faibles que celles retrouvées pour la p-tau₁₈₁ (inférieures à 50pg/mL).^{367, 374, 382, 510-513} Il est intéressant de noter que les valeurs les plus élevées ont été chronologiquement retrouvées au début de l'étude des dosages de la p-tau₂₃₁ dans le LCR. Plus récemment, ces valeurs sont retrouvés plus basses, soulignant sûrement un problème de spécificité au début de la saga scientifique.

Quoi qu'il en soit, le dosage de la p-tau₂₃₁ permet de différencier les patients avec une MA des patients atteints par d'autres troubles neurologiques avec une sensibilité de 85% et une spécificité de 97%.⁵¹⁰ Ces très bonnes performances sont retrouvées de façon générale dans les études s'intéressant au dosage de cette protéine dans le LCR. Néanmoins cette performance diminue dans la différenciation de la MA des démences vasculaires ou de la DCL, ces résultats pouvant être expliqués par l'existence fréquente de pathologies

concomitantes.^{367, 371} En revanche sa performance est très bonne pour l'identification des patients avec un MCI atteints d'une MA sous-jacente et débutante.³⁸²

Afin de mettre au point notre technique ELISA pour le dosage de la p-tau₂₃₁ dans le LCR, nous avons choisi des LCR de patients atteints par la MA ainsi que des patients ND. Les patients atteints par la MA ont été choisis selon des critères biologiques (avec une élévation de la concentration des protéines T-tau, p-tau₁₈₁ et une diminution de la concentration peptide A β ₄₂ dans le LCR) et des critères cliniques. Il a été rapporté une diminution importante de la concentration intrathécale de la p-tau₂₃₁ avec la progression de la MA.³⁸³ C'est pourquoi nous avons choisi des patients atteints par la MA à un stade débutant de la maladie ou avec un diagnostic de MCI faisant fortement suspecter une MA débutante d'un point de vu clinique. Cependant nous ne sommes pas parvenus à détecter la p-tau₂₃₁ de manière suffisamment sensible. Ces résultats pourraient être expliqués par la faible quantité intrathécale de cette protéine retrouvée dans certaines études.^{382, 512, 513} Ainsi le masquage de cette protéine par d'autres protéines retrouvées en quantité plus importante dans ce fluide biologique (telle que l'albumine par exemple) pourrait avoir réduit l'accessibilité de l'épitope à l'anticorps de capture T46.

De façon surprenante, nous avons détecté dans des conditions très spécifiques un signal semblant provenir de la PrP avec l'anticorps de détection 2B11 dirigé contre la p-tau₂₃₁ (figure 59). Nous avons ensuite confirmé la présence de PrP dans les LCR de patients MA et ND dans ces conditions (figure 60) et ainsi que ce signal correspondait vraisemblablement à de la PrP. La détection par l'anticorps 15F5 a révélé un signal important avec le 3F4 en capture mais un signal très faible avec le 12F10 en capture. Les sites de fixation de ces anticorps à la PrP (3F4 : acides aminés 109 à 112 ; 12F10 : acides aminés 142 à 160 ; 15F5 : acides aminés 129 à 142) sont très proches pour cette protéine en ce qui concerne le 12F10 et le 15F5. La proximité de ces épitopes peut gêner considérablement la détection de la PrP par ces 2 anticorps. Ce signal nous apparaît donc spécifique dans ces conditions.

Néanmoins, la présence d'un tel signal avec l'anticorps 2B11 en détection est surprenante. La concentration de PrP dans le LCR est connue et dépasse les 200 ng/mL.⁴³⁶ Cette charge importante dans le LCR pourrait être en partie responsable des faibles DO observés pour le dosage de la p-tau₂₃₁ dans nos conditions. Cependant notre anticorps de capture, dirigé contre la p-tau₂₃₁, révèle la PrP fixée aux anticorps de capture 3F4 et 12F10. Aucune homologie dans

les séquences primaires des protéines tau et Prion n'a été observée. Ce signal pourrait être expliqué par une reconnaissance conformationnelle de la PrP par l'anticorps 2B11 ou alors une action chaperonne de la PrP envers la protéine tau qui serait révélée par le 2B11. Néanmoins les résultats que nous avons obtenus en Dot Blot (avec des LCR) ainsi qu'en WB avec l'anticorps 2B11 (figures 43 et 46 A) n'ont pas montré de détection non spécifique.

L'anatomopathologie avec l'examen immunohistochimique nous révèle une coexistence fréquente des lésions impliquant la protéine tau et la PrP.¹⁷³ De plus et de manière très intéressante, certaines lésions (DNF notamment) pourraient être constituées en même temps des deux protéines (figure 61). Nous avons étudié rétrospectivement, au sein du laboratoire d'anatomopathologie du groupement hospitalier Est (Lyon), 10 cas de patients autopsiés entre 2009 et 2010 avec une suspicion clinique de MCJ. Les diagnostics de confirmation révélaient 7 patients atteints par une MCJ, 1 patient avec une DFT, 1 patient avec une démence mixte (DCL de Braak 6 et MA de Braak 3) et enfin un patient ND. Dans 5 des 7 patients avec une MCJ il n'existait pas de lésion neuritique ou de DNF constituée de protéines tau et les plaques rencontrées étaient constituées de PrP. En revanche, les anticorps 12F10 et 3F4 (dirigés contre la protéine Prion) ont clairement détecté la présence de neurites caractéristiques de la protéine tau ainsi que des pré-dégénérescences neurofibrillaires au niveau du cortex préfrontal chez 2 patients avec une MCJ confirmée (figure 61 D). Il a été observé le même marquage chez le patient atteint par une démence mixte (figure 61 A) ainsi que dans l'insula du patient avec une DFT (figure 61 B). Ces marquages avec les anticorps anti-PrP n'ont pas été observés chez les autres patients.

Il est connu que la charge cérébrale de PrP augmente dans les synapses détruites par les processus dégénératifs de la MA.⁵¹⁴ Ainsi il n'est pas rare de retrouver un marquage de la PrP par les anticorps 12F10 et 3F4 au niveau des neurites et des plaques neuritiques constituées par la protéine tau. Néanmoins la présence de PrP dans les DNF reste encore à élucider (figure 61) et il pourrait s'agir d'un phénomène plus large faisant intervenir une co-agrégation de ces deux protéines. Il a été récemment montré, lors d'une étude *in vitro*, que la PrP interagissait avec la protéine tau et que cette interaction spécifique était susceptible de former des complexes entre ces 2 protéines.⁵¹⁵ Les résultats *in vivo* que nous avons obtenus dans le LCR, corroborant les observations immunohistochimiques *post-mortem*, pourraient refléter ce processus physiopathologique encore mal connu et il apparaît important de confirmer ces hypothèses.

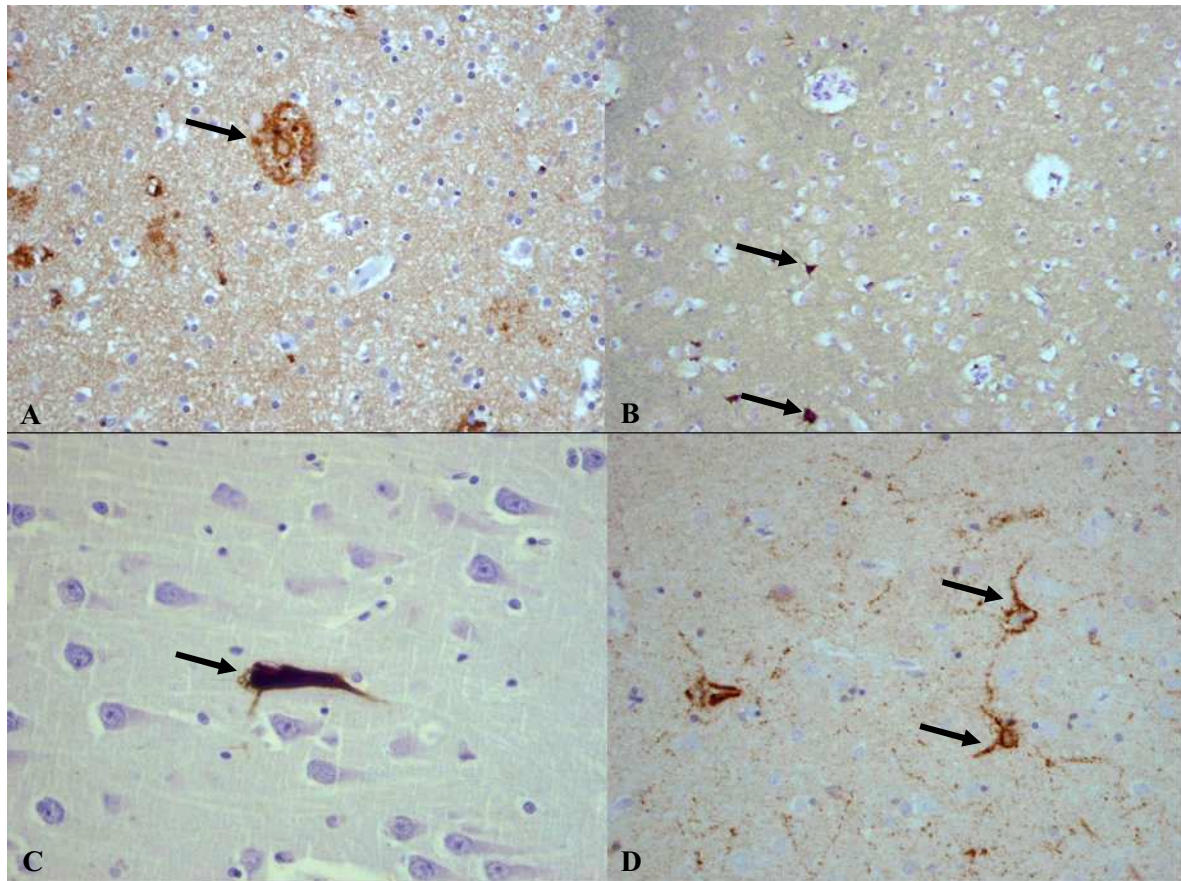


Figure 61. Coupes de tissus cérébraux arborant des lésions tauopathiques marquées par des anticorps anti-Prion en immunohistochimie. A : plaques neuritiques (flèche noire) dans le cortex préfrontal d'un patient atteint par une démence mixte (maladie d'Alzheimer à un stade de Braak 3 et démence à corps de Lewy à un stade de Braak 6) révélées par l'anticorps 12F10 ; B : dégénérescences neurofibrillaires (flèches noires) dans l'insula d'un patient avec une démence frontotemporale révélées par l'anticorps 12F10 ; C : dégénérescences neurofibrillaires (flèche noire) dans l'insula d'un patient avec une démence frontotemporale révélé par l'anticorps AT8 dirigé contre la protéine tau phosphorylée ; D : neurites et pré-dégénérescences fibrillaires (flèches noires) marquées par l'anticorps 3F4 dans le cortex préfrontal d'un patient atteint par une MCJ (résultats fournis par le Dr. Nathalie Streichenberger).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'introduction des biomarqueurs du LCR dans la stratégie diagnostique de la Maladie d'Alzheimer a permis d'améliorer considérablement la performance du diagnostic différentiel de la MA. Les études de la valeur de ces marqueurs impliquant une confirmation neuropathologique montrent que le diagnostic biologique est plus sensible et spécifique que le diagnostic clinique dans le cadre d'un syndrome démentiel.³⁴⁴ L'association des différentes disciplines que sont la clinique, la biologie, la radiologie ainsi que la neuropsychologie contribue à améliorer la performance de ce diagnostic difficile.

Dans notre travail, nous avons validé les seuils de concentrations les plus efficaces pour les 3 marqueurs biologiques usuels du LCR dans le cadre d'un diagnostic différentiel de MA (T-tau, p-tau₁₈₁ et A β ₄₂). Ces seuils sont conformes à ceux retrouvés dans la littérature.^{359, 516, 517} Dans ces biomarqueurs de routine, l'utilisation du peptide A β ₄₂ dans la majorité des diagnostics différentiels de la MA a plutôt fait diminuer les performances diagnostiques. Cela nous a encouragé à étudier un marqueur complémentaire de la voie amyloïde, le peptide A β ₄₀. L'apport du dosage du peptide A β ₄₀ au sein de cette triade biologique est significatif pour l'amélioration des performances. En effet, nous avons montré que le ratio de la concentration des peptides A β ₄₂/A β ₄₀ associé aux concentrations des protéines T-tau et p-tau₁₈₁ permettait d'obtenir une meilleure performance diagnostique que la triade de routine. Nous avons observé une augmentation significative de la sensibilité, passant de 81.1% à 96% avec l'association du ratio A β ₄₂/A β ₄₀ et des dosages des protéines T-tau et p-tau₁₈₁ pour tous les diagnostics différentiels. De même les spécificités ont été améliorées de manière générale par l'utilisation de ce ratio pour discriminer les patients avec une MA de ceux atteints par d'autres pathologies: la distinction avec la DFT passant de 88.2% à 92.5%, la discrimination avec la DCB passant de 61.5% à 85.7%, ainsi que la distinction avec la MCJ qui était de 84.6% pour les biomarqueurs de routine et qui a été augmentée à 100% avec l'utilisation du ratio A β ₄₂/A β ₄₀. Seule la spécificité dans la distinction de la MA et de la DCL a légèrement chuté, néanmoins une spécificité acceptable de 82.8% a été conservée.

C'est donc fort logiquement que nous avons choisi d'évaluer l'intérêt de ces dosages (T-tau, p-tau₁₈₁ et ratio A β ₄₂/A β ₄₀) lors de présentations cliniques syndromiques afin d'identifier biologiquement les patients atteints par une MA à présentation clinique focale. L'utilisation de ce ratio au sein des dosages des protéines T-tau et p-tau₁₈₁ nous a permis de mettre en évidence des profils biologiques dont l'interprétation était finalement biaisée par le résultat du dosage du peptide A β ₄₂. Ainsi, nous avons donc diminué significativement le nombre de

situations biologiques dites « atypiques », c'est-à-dire présentant soit un argument biologique en faveur de la présence de DNF (augmentation intrathécale des protéines T-tau et p-tau₁₈₁) sans modification initiale du peptide Aβ₄₂, soit une diminution de ce seul peptide alors que les 2 autres marqueurs restaient dans les valeurs dites normales. L'enseignement principal est que devant un profil biologique atypique, la mesure du peptide Aβ₄₀ reflétant la charge globale en peptides amyloïdes, est indispensable pour interpréter la concentration du peptide mesurée par le peptide Aβ₄₂. Il paraît tout à fait étonnant que le milieu scientifique n'aie pas remis en cause plus rapidement l'hypothèse communément admise établissant le lien entre les plaques amyloïdes intracérébrales et la diminution intrathécale du peptide Aβ₄₂ alors que le dosage du peptide Aβ₄₀ était déjà disponible. Néanmoins, malgré l'utilisation de ce ratio, nous avons trouvé encore une proportion loin d'être négligeable de biologie dite « atypique » au sein de cette population de patients. De ce fait, l'étiologie sous-jacente de ces syndromes n'a pas pu être posée dans ces situations. Ces observations peuvent être en rapport avec l'existence de pathologies co-occurentes chez ces patients.

Cette coexistence fréquente des lésions retrouvées neuropathologiquement lors d'un tableau clinique de démence est une limite au diagnostic *antemortem* mais laisse aussi apparaître des questions physiopathologiques concernant la genèse du substrat lésionnel de pathologies connues que sont les différentes maladies neurodégénératives. Ainsi des plaques neuritiques peuvent être observées dans le cerveau de patients atteints par le vMCJ par exemple.⁵⁰⁷ Les lésions cérébrales constituées par la protéine tau (DNF et plaques neuritiques notamment) peuvent être associées à d'autres profils neuropathologiques ne faisant pas intervenir cette protéine de prime abord. En mettant en place au laboratoire de neurobiologie du groupement hospitalier Est de Lyon une technique biochimique de détection et de caractérisation des PHF constituant les DNF, nous avons contribué efficacement à la description originale de pathologies concomitantes dont certains profils lésionnels font intervenir les protéines tau pathologiques chez des patients atteints d'une MCJ génétique (mutation E200K du gène de la PrP).¹⁷³ Nous avons notamment observé dans des proportions variables, la présence de PHF ainsi que des formes tronquées de protéines tau pathologiques, et le type d'inclusions de protéines tau (3R ou 4R). Au delà de la caractérisation de ces anomalies concernant les protéines tau, c'est la première fois qu'il est montré sur une cohorte de 40 patients atteints d'une MCJ génétique (au regard d'une maladie rare, c'est une cohorte très importante), un pourcentage aussi élevé de coexistence de différentes lésions pathologiques considérées normalement non reliées à la pathologie en cause (amyloïdopathie, α-synucléopathies et

jusqu'à 90 % d'anomalies concernant les protéines tau). Ces résultats débouchent sur la question importante de la nécessité de l'existence de co-pathologies pour l'expression clinique de ce type de maladie à prions et ouvrent un champ d'investigation quasi inexploré dans les pathologies neurodégénératives sur le lien entre co-pathologies et hétérogénéité de l'expression clinique.

L'observation de ces pathologies intercurrentes met en lumière toute la complexité et les limites actuelles pour établir une classification nosologique de ces différentes protéinopathies, posant un voile toujours plus opaque sur les processus étiopathogéniques mis en jeu dans l'instauration des lésions cérébrales. Les expressions cliniques de certaines pathologies pourraient prendre leurs sources dans les phénomènes d'altérations protéiques observés cérébralement et l'existence fréquente de tels processus intriqués tend à rendre encore plus difficile le diagnostic clinique du vivant du patient.

Quoi qu'il en soit, la maîtrise de cet examen biochimique, *via* la migration électrophorétique des PHF, nous a permis d'évaluer la sensibilité ainsi que la spécificité d'outils immunologiques conçus au sein d'un *consortium* médico-scientifique. Dans l'optique d'améliorer la spécificité du diagnostic biologique, nous avons conçu et caractérisé des anticorps dirigés contre des formes de la protéine tau retrouvées en plus grande quantité dans le LCR des patients atteints par la MA. Dans un premier temps nous avons principalement évalué des anticorps reconnaissant la p-tau₂₃₁ connue pour sa grande spécificité ainsi que sa précocité d'apparition dans le LCR chez ces patients.³⁸² De plus nous avons aussi évalué un anticorps d'une grande qualité dirigé contre la p-tau_{231/235}. Néanmoins, nous n'avons pas choisi d'évaluer ce dernier clone dans le LCR du fait de concentrations intrathécales extrêmement faibles retrouvées chez les patients atteints par la MA.³⁸⁵ Bien que très fastidieux et consommateur de temps, nous avons caractérisé l'ensemble des clones sur des fragments cérébraux à partir de techniques de screening et de WB. Dans un deuxième temps nous avons utilisé les anticorps nous paraissant les plus sensibles et spécifiques afin de mettre au point un test ELISA susceptible de détecter et doser par la suite les p-tau₂₃₁ dans le LCR.

Nous avons été longtemps confrontés à des problèmes de fixation non spécifique ne nous permettant pas de présager de la fixation de la p-tau₂₃₁ lors de notre mise au point. Une autre méthode de détection nous a permis d'affiner considérablement la spécificité de notre ELISA mais finalement, le dosage de la p-tau₂₃₁ dans ce sandwich est resté sous le seuil de détection

de notre technique. De façon très surprenante, nous avons obtenu un signal spécifique ne provenant pas de la protéine tau. Les tests que nous avons effectués avec d'autres anticorps dirigés contre la PrP nous ont confirmé que ce signal provenait de la PrP retrouvée dans le LCR. Néanmoins sa détection par un clone dirigé contre la p-tau₂₃₁ reste à expliquer. Les faibles DO obtenues par notre sandwich pour la détection de la p-tau₂₃₁ pourraient provenir d'autres protéines en concentration plus élevées dans le LCR (albumine, voire même PrP) masquant en partie l'interaction de l'anticorps de capture avec la p-tau₂₃₁. De même, une reconnaissance conformationnelle de la protéine Prion par notre anticorps de détection ainsi qu'une action chaperonne de la PrP envers la protéine tau ayant permis sa détection par l'anticorps secondaire sont des hypothèses envisageables. Quoi qu'il en soit, une confirmation des hypothèses formulées paraît nécessaire.

Afin d'améliorer la détection de la p-tau₂₃₁ dans le LCR dans les conditions spécifiques que nous avons établies, l'utilisation d'un autre anticorps commercial de capture dirigé contre la protéine T-tau et ayant confirmé son intérêt dans le LCR est à tester au sein de ce sandwich. De même, nous évaluerons l'utilisation combinée de 2 anticorps de détection dirigés contre la p-tau₂₃₁ afin d'augmenter le seuil de détection de cette espèce protéique avec notre technique.

Dans cette optique, nous pouvons envisager d'effectuer des extractions de la PrP chez des patients atteints de MCJ et pouvant présenter pour certains d'entre eux des caractéristiques neuropathologiques de tauopathies. Après séparation électrophorétique de ces extractions,⁴²⁹ il serait intéressant de révéler ces WB avec notre anticorps de détection reconnaissant la p-tau₂₃₁. De plus, et afin d'approcher l'interaction potentielle de la PrP et de la protéine tau dans le LCR, il nous faudrait utiliser des techniques puissantes et robustes de protéomique fonctionnelle analysant les interactions protéiques telle que le Biacore. Ces technologies pourraient nous permettre de mieux comprendre les résultats biologiques que nous avons obtenus et de façon plus générale la genèse et le *substratum* vraisemblablement commun de toutes ces affections neurodégénératives.

ANNEXES

ANNEXE 1 :

CRITÈRES DE DÉFINITION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER SELON LE DSM-IV (DIAGNOSTIC AND STATISTICAL MANUAL OF MENTAL DISORDERS, 4^e ÉDITION).

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

1. une altération de la mémoire (altération de la capacité d'apprendre des informations nouvelles ou de 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 malgré des fonctions motrices intactes)
 - c. agnosie (impossibilité de reconnaître des objets malgré des fonctions sensorielles intactes)
 - d. perturbation des fonctions exécutives (faire des projets, organiser dans le temps, avoir une pensée abstraite)

B. Les déficits cognitifs des critères A1 et A2

Ces déficits sont tous 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, chorée de Huntington, hématome sous-dural, hydrocéphalie à pression normale, tumeur cérébrale)

2. à des affections générale pouvant entrainer 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

Les déficits ne surviennent pas de façon exclusive au cours de l'évolution d'un delirium

ANNEXE 2 :

MINI MENTAL STATE (MMS)

Mini Mental State Examination (MMSE) (Version consensuelle du GRECO)

Orientation

/ 10

Je vais vous poser quelques questions pour apprécier comment fonctionne votre mémoire.

Les unes sont très simples, les autres un peu moins. Vous devez répondre du mieux que vous pouvez.

Quelle est la date complète d'aujourd'hui ? _____

Si la réponse est incorrecte ou incomplète, posez les questions restées sans réponse, dans l'ordre suivant :

1. En quelle année sommes-nous ?
2. En quelle saison ?
3. En quel mois ?
4. Quel jour du mois ?
5. Quel jour de la semaine ?

Je vais vous poser maintenant quelques questions sur l'endroit où nous trouvons.

6. Quel est le nom de l'hôpital où nous sommes ?*
7. Dans quelle ville se trouve-t-il ?
8. Quel est le nom du département dans lequel est située cette ville ?**
9. Dans quelle province ou région est située ce département ?
10. A quel étage sommes-nous ?

Apprentissage

/ 3

Je vais vous dire trois mots ; je vous voudrais que vous me les répétiez et que vous essayiez de les retenir car je vous les redemanderai tout à l'heure.

- | | | | | | |
|------------|----|--------|----|----------|--------------------------|
| 11. Cigare | | Citron | | Fauteuil | <input type="checkbox"/> |
| 12. Fleur | ou | Clé | ou | Tulipe | <input type="checkbox"/> |
| 13. Porte | | Ballon | | Canard | <input type="checkbox"/> |

Répéter les 3 mots.

Attention et calcul

/ 5

Voulez-vous compter à partir de 100 en retirant 7 à chaque fois ?*

- | | | |
|-----|----|--------------------------|
| 14. | 93 | <input type="checkbox"/> |
| 15. | 86 | <input type="checkbox"/> |
| 16. | 79 | <input type="checkbox"/> |
| 17. | 72 | <input type="checkbox"/> |
| 18. | 65 | <input type="checkbox"/> |

Pour tous les sujets, même pour ceux qui ont obtenu le maximum de points, demander :

Voulez-vous épeler le mot MONDE à l'envers ?**

Rappel

/ 3

Pouvez-vous me dire quels étaient les 3 mots que je vous ai demandés de répéter et de retenir tout à l'heure ?

- | | | | | | |
|------------|----|--------|----|----------|--------------------------|
| 11. Cigare | | Citron | | Fauteuil | <input type="checkbox"/> |
| 12. Fleur | ou | Clé | ou | Tulipe | <input type="checkbox"/> |
| 13. Porte | | Ballon | | Canard | <input type="checkbox"/> |

Langage

/ 8

Montrer un crayon.

22. Quel est le nom de cet objet ?*

Montrer votre montre.

23. Quel est le nom de cet objet ?**

24. Ecoutez bien et répétez après moi : « PAS DE MAIS, DE SI, NI DE ET »***

Poser une feuille de papier sur le bureau, la montrer au sujet en lui disant : « Ecoutez bien et faites ce que je vais vous dire :

25. Prenez cette feuille de papier avec votre main droite,
26. Pliez-la en deux,
27. Et jetez-la par terre. »****

Tendre au sujet une feuille de papier sur laquelle est écrit en gros caractère : « FERMEZ LES YEUX » et dire au sujet :

28. « Faites ce qui est écrit ».

Tendre au sujet une feuille de papier et un stylo, en disant :

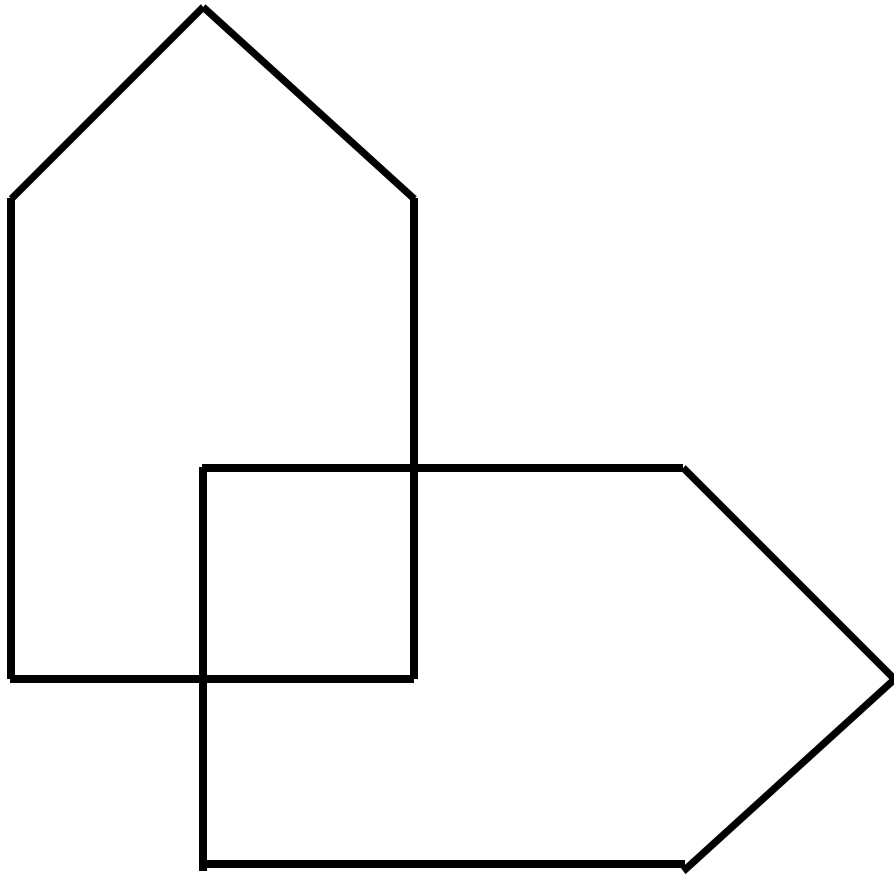
29. « Voulez-vous m'écrire une phrase, ce que vous voulez, mais une phrase entière. »*****

Praxies constructives

/ 1

Tendre au sujet une feuille de papier et lui demander : 30. « Voulez-vous recopier ce dessin ? »

« FERMEZ LES YEUX »



ANNEXE 3 :

TEST DES 5 MOTS DE DUBOIS

Le test de Cinq mots

(B Dubois. Fiche technique. Neurologie-Psychiatrie-Gériatrie 2001).

Date du test Prénom Nom

On présente une liste de 5 mots et on demande de les lire à haute voix et de les retenir. Ces 5 mots sont placés dans 5 catégories (les catégories ne sont pas présentées).

---- Fleur : **Rose**

---- Animal : **éléphant**

---- Vêtement : **chemise**

---- Fruit : **abricot**

---- Instrument de musique : **violon**

RAPPEL IMMEDIAT DE COMPREHENSION

Ensuite, immédiatement et avec la liste devant lui, on demande au patient de retrouver les mots en lui citant les catégories : le nom du fruit, de l'animal, etc... (rappel indicé, pour s'assurer de la compréhension des mots et des catégories),

RAPPEL IMMEDIAT DE L'ENCODAGE

Ensuite, immédiatement mais en masquant la liste, on lui demande de redonner les mots sans fournir la catégorie (rappel libre) **puis** en donnant la catégorie (rappel indicé)

Cela nécessite donc 10 réponses. Chaque bonne réponse donne un point,

Le score obtenu est le « **T otal 1** » (par exemple 8 pour 2 erreurs),

NB, En cas d'erreur la liste est remontrée au patient, puis cachée à nouveau pour refaire l'épreuve notée sur 10. Ces deux opérations sont faites jusqu'à ce que le patient atteigne le score 10/10 (pour garantir le pré-requis nécessaire à la poursuite du test)

EPREUVE ATTENTIONNELLE INTERCURENTE

Ensuite on fait effectuer au patient une autre tâche comme compter de 20 à 0 de 2 en 2 ou toute autre activité (comme la vérification de ses capacités d'orientation temporo-spatiales : date, lieu, etc...).

RAPPEL DIFFERE

On lui demande ensuite de donner les 5 mots : rappel libre, **et éventuellement** en cas de difficulté par catégorie : rappel indicé : « il y avait une fleur; un vêtement; un instrument, etc,»

Le score obtenu est le « **T otal 2** » (1 point par bonne réponse soit un maximum de 10)

RESULTATS

Il existe un trouble de la mémoire dès qu'un mot a été oublié.

*L'addition "Total 1 " + "Total 2" permet de différencier un trouble de la **mémoire** (suspicion de maladie d'Alzheimer, par exemple) d'un simple trouble de **l'attention** lié à l'âge ou à l'anxiété, dépression, fatigue chronique, etc ,,,*

Cette somme doit être normalement au-dessus de 16

SI le score total est < 10 :. Un bilan complet doit être pratiqué et un avis spécialisé envisagé.

ANNEXE 4 :

**CRITÈRES POUR LE DIAGNOSTIC DE LA MALADIE D'ALZHEIMER SELON LE
NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL AND COMMUNICATIVE
DISORDERS AND STROKE – ALZHEIMER DISEASE AND RELATED
DISORDERS ASSOCIATION (NINCDS-ADRDA)**

I. Les critères pour le diagnostic clinique de « MA probable » incluent :

L'établissement de la démence grâce à l'examen clinique, objectivé par le Mini-Mental State, l'échelle de démence de Blessed, ou des examens similaires, et confirmé par les tests neuropsychologiques ;

Des déficits observés dans au moins deux domaines cognitifs ;

Un déclin progressif de la mémoire et d'autres fonctions cognitives ;

Aucune altération de la conscience ;

Un début compris entre 40 et 90 ans, le plus souvent après 65 ans ;

Une absence de troubles systémiques ou d'autres affections cérébrales pouvant participer au déclin progressif de la mémoire et d'autres fonctions cognitives.

II. Le diagnostic de « MA probable » est appuyé par :

Une détérioration progressive des fonctions exécutives spécifiques telles que le langage (aphasie), l'habileté motrice (apraxie) et la perception (agnosie) ;

Un retentissement sur la vie quotidienne avec baisse des activités et troubles du comportement ;

Des antécédents familiaux avec des troubles similaires, et particulièrement si confirmés neuropathologiquement ;

Des examens paracliniques :

Ponction lombaire normale évaluée par des techniques standards.

Tracé EEG normal ou changements non spécifiques comme une augmentation de l'activité des ondes lentes.

Mise en évidence d'une atrophie cérébrale progressive à l'imagerie objectivée dans le temps par une série d'examens.

III. Autres signes cliniques compatibles avec le diagnostic de « MA probable », après exclusion des causes de démences autre que MA, incluant :

Une phase de plateau observée lors de la progression de la maladie ;

Des syndromes associés tels que dépression, insomnie, incontinence, illusions, hallucinations, accès de violences verbales, émotionnelles ou physiques, troubles sexuels et perte de poids ;

D'autres anomalies neurologiques chez quelques patients, particulièrement lors des stades plus avancés de la maladie, incluant des signes moteurs tels qu'une augmentation du tonus musculaire, des myoclonies ou des troubles de la marche.

Des attaques lors de stades avancés de la maladie

Une imagerie cérébrale normale pour l'âge.

IV. Symptômes qui font du diagnostic de « MA probable » incertain ou peu probable :

Début soudain et apoplectique ;

Points d'appels neurologiques focaux tels qu'une hémiparésie, une perte de la sensibilité, des troubles du champ visuel et une incoordination intervenant précocement au cours de la maladie ;

Attaques ou troubles de la marche très précoces.

V. Diagnostic clinique de « MA possible »

Peut être fait sur la base d'un syndrome démentiel en l'absence d'autres troubles neurologiques, psychiatriques ou systémiques pouvant causer une démence, et avec des variations dans le mode d'entrée de la maladie, de sa présentation et son évolution clinique ;

Peut être fait avec l'association d'un désordre systémique ou cérébral pouvant causer une démence mais n'étant pas considéré comme la cause de la démence ;

Peut être utilisé lors de recherches quand un seul déficit cognitif graduellement progressif et sévère est identifié en l'absence d'autres causes identifiables.

VI. Critères pour le diagnostic de certitude de MA :

Les critères cliniques de « MA probable » associés à la mise en évidence de lésions histopathologiques spécifiques obtenus par biopsie ou autopsie.

VII. La classification de MA à des fins de recherche doit spécifier les symptômes qui peuvent différencier les sous-types de la maladie, tels que :

Survenue familiale ;

Début avant l'âge de 65 ans ;

Présence de Trisomie 21 ;

Coexistence d'autres critères se rapportant à d'autres pathologies telles que la maladie de Parkinson.

ANNEXE 5 :

FORMULAIRE DE CONSENTEMENT ÉCLAIRÉ

Diagnostic étiologique des troubles cognitifs dégénératifs: valeur prédictive d'un profil de marqueurs biologiques

Formulaire de consentement de participation

De M. ou Mme

Adresse :

.....

Le Docteur

m'a proposé de participer à l'étude mentionnée ci-dessus, dont l'objectif est d'évaluer l'intérêt du dosage de différentes protéines dans le liquide céphalo-rachidien et le sang pour le diagnostic précoce de ces maladies dégénératives. Certains tests seront réalisés à Lyon, d'autres en Belgique (Université de Liège), au Royaume-Uni (Université de Lancaster) et en Hongrie (Institut National de Psychiatrie et Neurologie, Budapest).

J'ai reçu les informations médicales détaillées, résumées dans la fiche d'information, concernant la nature et le but de cette étude.

J'accepte de participer à cette étude dans les conditions suivantes :

- Réalisation d'une ponction lombaire et d'une prise de sang dans le service hospitalier du neurologue qui m'a proposé de participer à l'étude. Ces examens seront effectués à l'occasion d'une hospitalisation programmée, permettant la réalisation des examens rendus nécessaires par mon état de santé

- On attend de cette étude qu'elle permette d'identifier, à partir d'une série de dosages, un profil biologique qui serait le plus spécifique possible de chacune des maladies dégénératives du cerveau entraînant des troubles intellectuels.

- Il s'agit d'une étude sans bénéfice individuel direct qui n'aura pas d'incidence sur ma prise en charge médicale, dont la réalisation a fait l'objet d'un avis favorable par le Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Lyon le

- J'ai été informé(e) que mon identité n'apparaîtra dans aucun rapport ou publication, et que toute information me concernant sera traitée de façon confidentielle. J'accepte que les données enregistrées fassent l'objet d'un traitement informatisé conformément à la loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique et aux libertés. Je pourrais exercer mon droit d'accès et de rectification de ces données directement ou par l'intermédiaire du médecin de mon choix, dans le respect des dispositions de l'article L.1111-7 du code de la Santé Publique.

Je suis libre de refuser de participer à cette étude sans avoir à le justifier, et je serai libre d'interrompre ma participation à tout moment sans que la qualité de ma prise en charge n'en soit altérée et sans que ma responsabilité ne soit engagée.

Mon consentement ne décharge pas le médecin de ses responsabilités.

Fait à, le/...../.....

Signature du patient :

Signature (éventuelle) de la personne de confiance, du conjoint, ou de l'aidant principal :

Signature de l'investigateur

Formulaire établi en double exemplaire, l'un remis au patient et l'autre conservé dans le dossier source

ANNEXE 6 :

NOTICE DE PARTICIPATION A L'ÉTUDE

NOTE D'INFORMATION REMISE AU PATIENT

Conformément à la loi n°88-1138 du 20 décembre 1988 modifiée (dite « Loi Huriet Sérusclat »), relative à la protection des personnes qui se prêtent à des recherches biomédicales.

Investigateur principal : **Dr Pierre Krolak-Salmon**,: Service de Neurologie D, Hôpital Neurologique Pierre Wertheimer, 59 boulevard Pinel, 69677 Bron cedex, Tél : 04 72 11 80 71, Fax : 04 72 35 73 51
E-mail pierre.krolak-salmon@chu-lyon.fr

Investigateurs cliniciens associés : **Pr Alain Vighetto** (CHU de Lyon), **Pr Bernard Laurent** (CHU de Saint Etienne), **Pr Marc Bonnefoy** (CHU de Lyon), **Dr Bernard Croisile** (CHU de Lyon), **Dr Olivier Moreaud** (CHU de Grenoble), **Dr Pierre Haond** (CHU de Lyon), **Dr Dominique Felten** (HIA de Lyon), **Dr Alice Setiey** (CHG de Villefranche sur Saône), **Dr Eric Diot** (CHG de Vienne), **Dr Jean Jacques Ventre** (hôpital St Joseph-St Luc, Lyon), **Dr Martin Salzmann** (CHG de Roanne), **Dr Pierric Giraud** (CHG d'Annecy), **Dr Henri Robert** (CHG de Macon), **Dr Jacques Boulliat** (CHG de Bourg en Bresse).

Promoteur sollicité: Hospices Civils de Lyon – 3, quai des Célestins – 69229 LYON CEDEX 02

Le but de cette notice d'information est de vous faire connaître l'objectif de cette étude. Veuillez la lire avec attention et noter toutes les questions qui vous semblent nécessaires. Le médecin sera là pour y répondre et en discuter avec vous.

Introduction

Cette étude est destinée à améliorer le diagnostic précoce des maladies dégénératives du cerveau qui sont à l'origine de troubles intellectuels, concernant notamment la mémoire, l'attention ou le langage. Les maladies dégénératives en cause sont nombreuses et comprennent notamment la maladie d'Alzheimer, la maladie à corps de Lewy diffus, la maladie de Parkinson, les dégénérescences fronto-temporales, la maladie de Creutzfeldt-Jacob. Ces troubles intellectuels peuvent aussi être en rapport avec des affections non dégénératives, comme les pathologies vasculaires ou traumatiques, avec une origine psychique, comme la dépression ou l'anxiété, et ils doivent être distingués des difficultés ressenties lors du vieillissement normal.

Le diagnostic des affections dégénératives est difficile à un stade précoce. Il requiert d'une part d'identifier le trouble intellectuel comme étant anormal, d'autre part de rapporter ce symptôme à l'une des maladies causales. Les outils de ce diagnostic sont actuellement représentés par l'examen clinique, les tests neuropsychologiques et l'imagerie cérébrale (scanner ou IRM). Les outils disponibles ne permettent pas toujours de conclure, notamment au début de ces maladies. Aussi la certitude du diagnostic causal n'est souvent acquise qu'à un stade relativement tardif de l'évolution, à un moment où les lésions cérébrales sont déjà évoluées. La recherche d'indicateurs à la fois plus précoces et plus spécifiques du diagnostic constitue un enjeu très important. En effet, établir un diagnostic plus tôt de la maladie en cause doit permettre une meilleure prise en charge et, dans une perspective d'avenir, de mieux cibler en début de maladie, la thérapeutique la plus adaptée.

L'étude qui vous est proposée vise à l'identification d'un dosage biologique comme aide au diagnostic

Objectif de l'étude

L'étude concerne le dosage de différents marqueurs biologiques dans le liquide céphalo-rachidien et dans le sang. Ces résultats seront ensuite confrontés aux tests neuropsychologiques et radiologiques. L'objectif est d'identifier un profil biologique, issu des différents dosages, qui permettrait de déceler avec une forte probabilité le diagnostic de l'une ou l'autre des maladies dégénératives cérébrales.

Les prélèvements du sang et du liquide céphalorachidien sont tous deux indispensables à l'étude. L'analyse dans le liquide céphalorachidien constitue la première étape. Les perturbations biologiques en lien avec les affections dégénératives étudiées seront plus aisément identifiables dans ce liquide, qui est en contact avec le cerveau. Dans un second temps, les perturbations biologiques seront recherchées dans le sang.

Déroulement de l'étude pour les patients

Les examens requis pour cette étude seront effectués lors du bilan hospitalier qui vous a été proposé pour le diagnostic de vos troubles. Il s'agit d'une hospitalisation programmée de brève durée, qui permet de réaliser dans un même temps et selon les cas les différents examens nécessaires, comme les tests sanguins, les tests psychométriques, une ponction lombaire, un électroencéphalogramme et une imagerie cérébrale.

Le dosage sanguin est réalisé à l'occasion de la prise de sang effectuée lors du bilan biologique diagnostique. Le prélèvement est de 15 ml.

Le dosage dans le liquide céphalo-rachidien nécessite une ponction lombaire. Si l'examen est nécessaire dans le cadre du diagnostic de votre maladie, le prélèvement effectué pour la recherche ne représente qu'un tube supplémentaire de prélèvement (volume 10ml). Si la ponction lombaire n'est pas jugée indispensable au diagnostic de votre cas, elle vous sera demandée dans le cadre de la recherche.

La ponction lombaire est un examen effectué en routine dans un service de neurologie. Une anesthésie locale par pommade sera réalisée afin d'éviter la douleur liée à la piqûre. Cet examen ne peut être réalisé en cas de traitement anticoagulant ou antiagrégant plaquettaire fluidifiant le sang. Il conviendra donc d'en avertir le médecin si un tel traitement est en cours. Le médecin sera bien sûr tenu d'obtenir ce renseignement de vous-même ou d'un de vos proches.

Après cette ponction, il est souhaitable de rester allongé pendant deux heures. Les effets secondaires possibles de la ponction lombaire sont représentés par des maux de tête et des nausées, rarement des vomissements, ces troubles étant régressifs en quelques jours. Un traitement des symptômes serait proposé dans un tel cas. Les complications plus graves sont représentées par la survenue d'une infection au point de ponction, d'une méningite, ou d'un hématome sous dural. Ces complications sont exceptionnelles et minimisées par les conditions habituelles de l'examen, comportant une asepsie rigoureuse lors du geste et la réalisation préalable d'un bilan de coagulation.

Un suivi clinique est prévu pendant une année au moins.

Les prélèvements seront analysés dans les laboratoires de biologie participant à l'étude des CHU de Lyon et de Saint Etienne. Pour les prélèvements effectués à Lyon, une partie des échantillons sera conservée, avec votre accord, dans la banque de tissus NEUROBIOTEC, située à l'hôpital neurologique. Certains tests seront réalisés à Lyon, d'autres en Belgique (Liège), au Royaume-Uni (Lancaster) et en Hongrie (Budapest). Les femmes enceintes ne peuvent participer à cette étude. Une affiliation à la sécurité sociale est requise.

Bénéfices attendus

L'étude ne modifie pas votre prise en charge médicale. Il s'agit pour vous d'une étude sans bénéfice individuel direct. La retombée escomptée de l'étude est de disposer d'un examen biologique pouvant aider, dans l'avenir, au diagnostic précoce des affections dégénératives du cerveau.

Un examen médical préalable à l'inclusion sera réalisé et ses résultats seront communiqués au médecin de votre choix. Votre participation à cette étude sera consignée dans un fichier automatisé des volontaires géré par le ministère de la santé. Aucune période d'exclusion n'est envisagée.

Participation volontaire et droit de retrait

Votre participation à cette étude est entièrement libre et volontaire. Vous pouvez refuser sans avoir à vous justifier. Sachez que le fait de refuser ne modifiera en rien votre prise en charge de la maladie et que vous continuerez de bénéficier de la compétence des médecins qui vous suivent.

Confidentialité et accès aux dossiers :

Toutes les données vous concernant seront recueillies dans un cahier spécial unique, identifié par un numéro de patient. Ces données resteront confidentielles et seront utilisées de manière anonyme lors de leur traitement et de la diffusion des résultats de l'étude. Vous avez un droit d'accès, de rectification et d'opposition au traitement informatisé par le biais de votre médecin.

Les résultats globaux de l'étude pourront vous être communiqués à la demande (loi du 4 mars 2002).

Conformément à la loi française, n°88-1138 du 20 décembre 1988 modifiée (dite « Loi Huriot-Sérusclat) relative à la protection des personnes qui se prêtent à des recherches biomédicales,

- ce projet a été soumis à l'avis d'un Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale. Le Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Lyon ... qui a étudié ce projet de recherche, a émis un avis favorable à sa réalisation le.....

- un contrat d'assurance en responsabilité civile a été souscrit par les Hospices Civils de Lyon, Promoteur de l'étude, auprès de la société SHAM sous le numéro 123166.

Les frais de l'étude seront pris en charge par le Promoteur. Aucune indemnité n'est prévue pour le patient.

Fait à, le ___/___/_____

Signature du patient

Signature de la personne de confiance, du conjoint, de l'aidant principal

Nom et signature du médecin

Notice établie en double exemplaire, l'une remise au patient, l'autre conservée dans le dossier.

ANNEXE 7 :

**IN VIVO DEMONSTRATION OF AMYLOID BURDEN IN POSTERIOR CORTICAL
ATROPHY: A CASE SERIES WITH PET AND CSF FINDINGS**

**M. Formaglio, N. Costes, J. Seguin, Y. Tholance, D. Le Bars, I. Rouillet-Solignac, B.
Mercier, P. Krolak-Salmon, A. Vighetto**

J Neurol 2011, In Press

In vivo demonstration of amyloid burden in posterior cortical atrophy: a case series with PET and CSF findings

Maité Formaglio · Nicolas Costes · Jérémie Seguin ·
Yannick Tholance · Didier Le Bars · Isabelle Rouillet-Solignac ·
Bernadette Mercier · Pierre Krolak-Salmon · Alain Vighetto

Received: 28 July 2010/Revised: 18 January 2011/Accepted: 24 March 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Our objective was to evaluate amyloid deposition in posterior cortical atrophy (PCA), using both cerebrospinal fluid (CSF) biomarker analysis and amyloid imaging. Five PCA patients, selected based on their neuropsychological profile and atrophic changes in posterior regions on MRI, underwent CSF analysis. CSF amyloid-beta 1–42, total tau, and phosphorylated tau at threonine

181 levels were determined. They also had positron emission tomography (PET) with Pittsburgh Compound B (^{11}C PIB). ^{11}C PIB ratio images were assessed with visual, regional and voxel-based analyses and compared to eight typical Alzheimer's disease (AD) patients and eight controls. The biological profile in the five PCA patients, resulting from CSF and ^{11}C PIB images analysis, was consistent with AD. Individual comparisons of PCA patients' ^{11}C PIB images with the AD group with Statistical Parametric Mapping (SPM) revealed a distinctive posterior uptake in four out of the five patients showing increased amyloid deposition in occipital, temporal, and/or parietal regions. ROI group analysis showed a tendency for higher amyloid deposition in occipital and temporal regions. However, this pattern was not found with SPM group analysis when the global level of ^{11}C PIB uptake was used as a covariate. Our results indicate that amyloid burden can be demonstrated in vivo in PCA suggesting a diagnosis of AD. PCA patients may present a higher global amyloid load than AD that was not related to age at onset, disease severity, disease duration, or educational level in our study. Combined CSF and PET biomarkers seem helpful for in vivo diagnosis of this focal syndrome with underlying AD pathology.

M. Formaglio (✉) · I. Rouillet-Solignac · B. Mercier ·
P. Krolak-Salmon · A. Vighetto
Department of Neurology, Service de Neurologie D,
Hospices Civils de Lyon, Hôpital Neurologique,
59 boulevard Pinel, 69003 Lyon, France
e-mail: maite.formaglio@chu-lyon.fr

N. Costes · D. Le Bars
CERMEP, Imagerie du vivant, 59 boulevard Pinel,
69003 Lyon, France

J. Seguin · Y. Tholance
Neurobiology Laboratory, Department of Biochemistry,
Hospices Civils de Lyon, Centre de Biologie et de Pathologie
Est, 59 boulevard Pinel, 69003 Lyon, France

M. Formaglio · N. Costes · J. Seguin · Y. Tholance ·
D. Le Bars · P. Krolak-Salmon · A. Vighetto
Lyon 1 University, Lyon, France

P. Krolak-Salmon
INSERM Unit 821, Cerebral Dynamics and Cognition,
Centre Hospitalier le Vinatier, 95 boulevard Pinel,
69500 Bron, France

A. Vighetto
INSERM UMR-S 864, Space and Action,
16 avenue du Doyen Lépine, 69676 Bron Cedex, France

M. Formaglio · I. Rouillet-Solignac · B. Mercier ·
P. Krolak-Salmon · A. Vighetto
Center for Memory Resources and Research,
Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

Keywords Posterior cortical atrophy · Pittsburgh Compound B · PET · Voxel based analysis · CSF biomarkers · Alzheimer's disease

Introduction

Posterior cortical atrophy (PCA) is a rare neurodegenerative syndrome. It is characterized by progressive development of higher-order visuo-perceptive deficits, in addition to

atrophic or metabolic changes in the posterior regions of the brain [1–4]. Clinical features may include Balint's syndrome, Gerstmann's syndrome, alexia, visual object agnosia, visuospatial neglect, prosopagnosia, environmental disorientation and apraxia. Homonymous hemianopia may also be present [5]. Magnetic resonance imaging (MRI) usually shows cortical atrophy in the parietal, occipital and posterior temporal regions [6], while [^{18}F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) may reveal hypometabolism in the posterior cerebral hemispheres, even in the absence of concomitant atrophy [7, 8]. This syndrome almost universally progresses to more diffuse cognitive impairment and dementia.

Histologically, PCA is most often associated with Alzheimer's disease (AD) pathology [9]. Neurofibrillary tangles (NFT), corresponding to tau protein deposits, are preferentially located in the posterior cortex, including primary visual cortex and visual associative areas [2, 3]. Senile plaques (SPs), corresponding to amyloid deposits, may also predominate posteriorly but this finding is more controversial [2, 10].

Cerebrospinal fluid (CSF) levels of amyloid-beta 1–42 (A_{42}) are decreased in AD, and those of total tau (T-tau) and tau phosphorylated at threonine 181 (P-tau181) are increased. When levels of all three are combined into a single biomarker, both sensitivity and specificity for diagnosing AD are in the region of 90% [11, 12].

The PET imaging radioligand Pittsburgh Compound B (^{11}C]PIB) allows in vivo assessment of $\text{A}\beta$ plaque burden. PIB is a derivative of thioflavin T that binds specifically to fibrillar $\text{A}\beta$ deposits in human brain [13]. Human PET studies have shown significantly higher neocortical retention of [^{11}C]PIB in AD than controls [14, 15], reflecting the presence of $\text{A}\beta$ plaques and amyloid angiopathy [16–18].

We studied amyloid deposition in five PCA patients, using CSF biomarker analysis and [^{11}C]PIB imaging with visual, regional and voxel-based analyses. Eight typical AD patients and eight controls also had [^{11}C]PIB imaging for comparison. Our objective was to demonstrate in vivo amyloid burden in PCA and to reveal any specific pattern of cortical deposit in comparison to typical AD.

Materials and methods

Subjects

PCA subjects

Five PCA patients (mean age: 65.2 ± 7.6 years; MMSE [19]: 20.4 ± 5 ; CDR [20]: 1 ± 0 ; Table 1) were prospectively recruited from our memory clinic. PCA was

diagnosed according to the following diagnostic criteria [Renner et al. (2004), McMonagle et al. (2006)]: (1) History of progressive acquired visual impairment, interfering with daily life, and not due to ophthalmological abnormalities. (2) Evidence of one or several disorders reflecting dysfunction of occipito-parieto-temporal association cortices, such as Balint's syndrome, Gerstmann's syndrome or apraxia. (3) Absent or minor memory impairment, executive dysfunction or language deficits. (4) Evidence of atrophy of the posterior cortex on MRI, or of reduced regional blood flow on [^{99}Tc]HMPAO SPECT. A visual analysis of MRI and, when available, SPECT images was performed for each patient at their inclusion in the study. Patients showing major vascular lesions on MRI were excluded from the study. All PCA patients underwent full ophthalmological testing, including visual field determination. They all underwent a lumbar puncture for CSF biomarkers analysis and amyloid PET imaging with [^{11}C]PIB.

AD group

Eight patients (mean age: 74.6 ± 6.2 years; MMSE: 21.4 ± 5.9 , CDR: 1.2 ± 0.4) with mild or moderate AD were recruited from our memory clinic as a comparison group for [^{11}C]PIB analysis (Table 2). They had a history of progressive cognitive impairment with mild or moderate weakening of autonomy; memory complaint; and memory impairment at neuropsychological testing. The other cognitive functions could be variably affected. AD patients met the NINCDS-ADRDA diagnostic criteria for probable AD [21]. They underwent the same neuropsychological tests and imaging as PCA patients. Visual analysis of amyloid PET imaging showed increased [^{11}C]PIB binding consistent with probable AD in all.

Control group

Eight normal volunteers (mean age: 73.9 ± 6.1 years, MMSE: 29.4 ± 0.7 , CDR: 0) without cognitive complaints were recruited from the community by advertisement as a comparison group for [^{11}C]PIB analysis. All were free of relevant medical illness. Control subjects were screened via an evaluation that included a medical history, functional assessment, neurological examination and neuropsychological testing. Only cognitively intact subjects were included. They all had normal [^{11}C]PIB binding on PET according to visual analysis.

All patients and controls gave their written informed consent to participate. The study was approved by the institutional ethics committee. [^{11}C]PIB PET scanning in humans was approved by the French regulatory authorities (AFSSAPS).

Table 1 Demographic characteristics and clinical features of PCA patients

Subjects	PCA 1	PCA 2	PCA 3	PCA 4	PCA 5
Age at Imaging (y)	63	65	54	74	70
Education (y)	11	12	10	11	11
Sex (M/F)	F	M	M	M	F
Initial complaint	Driving	Reading	Getting lost writing	Reading Writing Driving	Reading Writing
Duration of symptoms at presentation (y)	2	1–2	1–2	3–4	3
MMSE/30 at PET	28	22	20	15	17
CDR at PET	0.5	0.5	0.5	1.5	1
Full Balint syndrome	x	x	–	x	x
Isolated simultanagnosia	–	–	x	–	–
Full Gerstmann syndrome	–	–	x	–	x
Isolated acalculia	–	x	–	x	x
Isolated agraphia	x	x	–	x	x
Apraxia					
Dressing	–	–	–	x	x
Ideomotor	x	–	x	x	x
Constructional	x	x	x	x	x
Alexia	x	x		x	x
Environmental agnosia	–	–	x	x	x
Visuospatial neglect	x	–	–	–	x
Visual field examination	Visual attention deficit	Left hemianopia	Normal	Visual attention deficit	Left hemianopia
Hallucinations	–	–	–	–	x
Fluctuations	–	–	–	–	–
Mild Parkinsonism	x	–	x	–	–

MMSE Mini-mental state examination, CDR Clinical dementia rating, x clinical signs observed, – clinical signs not observed

Table 2 Demographic characteristics of AD patients

Subjects	Age at imaging (y)	Education (y)	Gender (M/F)	Duration of symptoms at presentation (y)	MMSE at PET/30	CDR at PET	
AD 1	77	8	F	2	24	0.5	
AD 2	84	9	F	1	24	1	
AD 3	80	13	F	2	26	1	
AD 4	66	11	F	3	27	0.5	
AD 5	66	9	M	4	7	2	
AD 6	70	9	F	4	20	1	
MMSE Mini-mental state examination, CDR Clinical dementia rating	AD 7	75	8	M	5	22	1
	AD 8	79	9	F	5	21	1

Statistical analysis

Demographic and neuropsychological data were compared between PCA and AD groups using a non-parametric test (Mann–Whitney *U*) because of the small sample size; *p* values <0.05 were considered significant (Table 3). Analysis was performed with MedCalc® version 11.1.1.0

(Frank Schoonjans, MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

Neuropsychological evaluation

Verbal episodic memory was assessed with the Free and Cued Selective Recall Reminding Test (FCSRT) [22] or

Table 3 Neuropsychological data of PCA and AD patients

Subjects	Age (y)	Education (y)	Disease duration (y)	MMSE/30	CDR	FCSRT free recall/48	FCSRT total recall/48	FCSRT free delayed recall/16	FCSRT total delayed recall/16	FCSRT intrusions	FCSRT recognition/16	TMT-A	TMT-B	STROOP (inhibition condition)	Verbal fluency (letter P)	Verbal fluency (animals)	Bachy/36	Figures copying/3	Clock drawing/7	VOSP incomplete letters/20	VOSP number location/10
PCA 1	63	11	2	28	0.5	33	47	12	16	2	16	282	340	NF	15	25	36	1	3	14	NF
PCA 2	54	12	2	20	0.5	8	25	4	11	10	15	178	NF	20.34	8	18	36	0	0	NF	NF
PCA 3	74	10	4	15	1	3	8	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	5	10	31	0	0	NF	NF
PCA 4	65	11	2	22	0.5	NF	NF	NF	NF	NF	NF	222	NF	NF	14	16	33	0	6	14	5
PCA 5	70	11	3	17	1	19	42	14	15	10	15	NF	NF	NF	13	12	NF	0	0	NF	NF
Mean \pm SD	65.2 \pm 7.6	11 \pm 7.6	2.6 \pm 0.9	20.4 \pm 5.0	1 \pm 0	15.75 \pm 13.3	30.5 \pm 17.7	10 \pm 5.3	14 \pm 2.6	7.33 \pm 4.6	15.3 \pm 0.6	227.3 \pm 52.2	340	20.34	11 \pm 4.3	16.2 \pm 5.8	34 \pm 2.4	0.2 \pm 0.4	1.8 \pm 2.7	14	5
AD 1	77	8	2	24	0.5	2	18	0	7	22	16	42	NR	42.1	14	14	34	1	5	18	NA
AD 2	84	9	1	24	1	14	32	2	13	6	16	65	180	NA	11	13	30	1	NA	NA	NA
AD 3	80	13	2	26	1	8	27	1	6	9	15	98	224	33.26	10	14	36	1	5	20	NA
AD 4	66	11	3	27	0.5	7	33	1	9	40	16	112	262	39.6	17	9	36	3	7	NA	NA
AD 5	66	9	4	7	2	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NA	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
AD 6	70	9	4	20	1	2	6	NF	NF	NF	16	129	347	NA	12	10	34	3	4	NA	NA
AD 7	75	8	5	22	1	2	8	0	2	19	14	67	197	NA	8	21	36	3	NA	20	9
AD 8	79	9	5	21	1	2	16	2	8	7	16	73	271	30.49	8	11	30	3	4	NA	NF
Mean \pm SD	74.6 \pm 6.2	9.5 \pm 1.6	3.3 \pm 1.4	21.4 \pm 5.9	1.2 \pm 0.4	5.3 \pm 4.3	20 \pm 10.2	1 \pm 0.8	7.5 \pm 3.3	17.17 \pm 11.9	15.6 \pm 0.7	83.7 \pm 28.1	246.8 \pm 55.3	36.4 \pm 5.4	11.4 \pm 3	13.1 \pm 3.7	33.7 \pm 2.5	2.1 \pm 1	5 \pm 1.1	19.3 \pm 0.9	9
<i>p</i> -Value	0.03	0.06	0.41	0.46	0.21	0.07	0.3	0.02	0.048	0.44	0.46	0.02	–	–	1	0.33	0.86	0.008	0.08	0.08	–

Significant *p* value < 0.05 are highlighted

FCSRT Free and Cued Selective Reminding Test, CVLT California Verbal Learning Test, TMT Trail Making Test, STROOP Stroop test, Bachy Bachy-Langedock denomination task, VOSP Visual object and space perception battery, NF not feasible due to patient's cognitive difficulties, NA not assessed

the French version of the California Verbal Learning Test [23]. We explored verbal fluency [24] and naming with the Bachy-Langedock denomination task [25]. Executive functions were assessed with the Stroop Test [26] or the Trail Making Test [27]. Visuospatial, visuoperceptive and visuoconstructive abilities were assessed with the Visual Object and Space Perception battery [28], the clock drawing test [29], and complex figure copying tests. Praxis were most often evaluated with informal personal procedures. These neuropsychological tests and PIB-PET were performed within the same month, and both within 1 year after the lumbar puncture.

CSF data

CSF sampling and storage

CSF sampling was performed according to a standard protocol. In total, 10 mL were collected in polypropylene vials and then centrifuged immediately. Supernatant was sampled in polypropylene vials and aliquots were stored at -80°C until analysis.

CSF analysis

CSF T-tau, P-tau181 and $A\beta_{42}$ levels were determined using a commercially available ELISA kit (INNOTEST httau-Ag, INNOTEST Phospho-Tau₍₁₈₁₎, INNOTEST β -amyloid₍₁₋₄₂₎, respectively, Innogenetics[®], Gent, Belgium) according to the manufacturer's instructions. All biomarker levels were measured in duplicate. The inter-assay coefficient of variation was less than 10%. Cut-off values were determined from literature data and experience of our neurobiology department, and were T-tau >350 pg/mL, P-tau181 >60 pg/mL and $A\beta_{42}$ <500 pg/mL [30–32]. If all three levels lay beyond these cut-off values, subjects were considered to have a typical AD profile. CSF pattern was said atypical for patients with either elevated T-tau >350 pg/mL and P-tau181 >60 pg/mL or decreased $A\beta_{42}$ <500 pg/mL.

PET imaging

Radiochemistry

[^{11}C]PIB was produced by methylation of 1.2 mg of its desmethyl precursor 6-OH-BTA-0 (ABX Germany) with [^{11}C]methyl triflate in 200 μL acetone for 3 min at 100°C , with a Bioscan MeI + synthesizer, starting from [^{11}C]O₂ produced via a $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$ nuclear reaction using an IBA Cyclone 18/9 cyclotron. The reaction product was purified using high-performance liquid chromatography with a SymetryPrep column (Waters) using water/acetonitrile

(50:50) at 3 mL/min. The collected fraction was loaded on a C18 SepPak, washed with 10 mL of water and eluted with 1 mL absolute ethanol. After addition of NaCl 0.9% the product was sterilized through a 0.22 μm Millipore sterile filter (Waters). The radioligand purity was assessed by analytical radio-HPLC (Beckman 32 K). Radiochemical purity was in excess of 95%, and specific activity in the range of 10–40 GBq/ μmol .

PET imaging

PET scans were performed on a CTI-Siemens HR + scanner (Knoxville, TN, USA). For tracer injections, an intravenous catheter was placed in a vein of the left forearm. Before emission acquisition, a 10-min transmission scan was performed using three ^{68}Ge rod sources for the measurement of tissue and head support attenuation. After i.v. injection of a bolus of [^{11}C]PIB (470 ± 12 MBq), a dynamic emission scan consisting of 34 frames of increasing duration (20 s–5 min) was acquired over 90 min. The PET scanner was operating in 3D mode. Images were corrected for scatter and attenuation, and reconstructed using a filtered back projection (Hanning filter, cut-off 0.5 cycles/pixels) to provide a 3D volume of 63 slices (2.42 mm thickness) with 128×128 voxels in plane (2.06 mm^2).

MRI

Structural brain MRI was performed using a 1.5 T Siemens Magnetom scanner (Siemens AG, Erlangen, Germany), with a 3D anatomical T1-weighted sequence (TR: 9.7 ms, TE: 4 ms) covering the whole brain volume with 1 mm^3 cubic voxels.

Visual analysis

Voxel based [^{11}C]PIB parametric RATIO images were computed by dividing, for each voxel, the integrated activity over the 40–90 min interval by integrated activity of the reference region (cerebellar gray matter) for the same interval. [^{11}C]PIB-RATIO images were read by a neurologist unaware of the clinical diagnosis. Images were graded as normal (similar to controls), doubtful or probable AD. Transverse, sagittal, and coronal views were available for viewing. Before reading the [^{11}C]PIB images, a demonstration was given using two AD images and one typical HC [^{11}C]PIB-RATIO image. The reader was advised to use a rainbow color scale. Subjects with cortical binding (yellow or red) in frontal, cingulate, parietal and temporal cortex were classified as having probable AD, depending on intensity and extent of [^{11}C]PIB uptake.

ROI analysis

Five neocortical ROIs were considered [33]: the cingulate gyrus, and the frontal, lateral temporal, parietal and occipital cortices. These ROI were defined on individual PET scans using the Hammers maximum probability atlas [34] and SPM5 software (Wellcome Trust Centre for Neuroimaging, UCL, London, UK) as follows. First, T1 MRIs were coregistered to summed activity PIB-PET images without reslicing, then spatially normalized to the MNI/ICBM152 T1 stereotactic template using deformations obtained via Unified Segmentation [35]. The inverse deformation fields were applied to the Hammers atlas to fit the individual T1 anatomy. Probabilistic images of the grey and white matter and CSF tissue classes were obtained in the segmentation step. Gray matter images were thresholded at a probability of >0.5 and multiplied with the atlas resampled in the individual space. Finally, regional activities of the selected ROIs were extracted from 40 to 90 min [^{11}C]PIB RATIO images. Regional values were compared between the three groups using Kruskal-Wallis testing with MedCalc[®]. If significant differences ($p < 0.05$) were observed then intergroup comparisons were performed using Mann-Whitney U tests.

Parametric image analysis

Using SPM5, [^{11}C]PIB-RATIO images were spatially normalized to a customized template created from PCA and AD patients' MRIs. Pairwise comparisons were performed between groups (control, PCA and AD), and PCA patients compared individually with the AD group. A voxel based ANCOVA with age as a covariate was used to identify clusters of voxels that significantly differed in these comparisons. Global cerebral mean was used as group specific covariate in a second analysis. Statistical parametric maps resulting from contrasts of comparisons were thresholded at $p_{\text{uncorr}} < 0.001$ at the voxel level. Further thresholding at $p_{\text{uncorr}} < 0.001$ at the cluster level, with a minimum cluster extent of 350 voxels, led to a joint probability significance level of $p_{\text{corr}} < 0.01$ corrected for multiple comparisons at the cluster level.

Results

Demographic and clinical data

Simultanagnosia, alexia, acalculia, agraphia, ideomotor and constructional apraxia were the most frequent signs (Table 1). Two patients had a left hemianopia (cases 2 and 5). Mild signs of symmetrical parkinsonism were noticed in two patients (cases 1 and 3). One patient had visual

hallucinations (case 5). None had fluctuation of cognitive or motor symptoms. No patient had more than one of these three cardinal symptoms, and therefore, none fulfilled clinical criteria for dementia with Lewy bodies (DLB). None showed evidence of motor signs such as asymmetrical or unilateral parkinsonism with gestural apraxia or dystonia consistent with corticobasal degeneration (CBD). PCA patients were younger than AD patients ($p < 0.05$). PCA patients' symptoms had been progressing for 1 to 4 years at the clinical evaluation, compared with 1 to 5 years for AD patients (n.s). Level of education was also comparable in the two groups (Table 3). MRI most often showed asymmetrical cortical or subcortical atrophy in the parietal and occipital regions. No PCA patient had medial temporal lobe or hippocampal atrophy suggesting typical AD.

Neuropsychological deficits

Cognitive functions of PCA patients were variably affected with a mean MMSE ranging from 15 to 28. Impact of cognitive disorders on autonomy was also variable from one subject to another with a CDR ranging from 0.5 to 1 (Table 1). PCA and AD patients were not significantly different in terms of global cognitive function as measured with MMSE and CDR. Visuoceptive, visuospatial and visuoconstructive abilities were systematically affected for the five PCA patients. Their visuoconstructive apraxia as assessed with figure copying was more important than that of AD patients ($p = 0.008$). Verbal memory was preserved in two PCA patients (cases 1 and 2), mildly impaired in one patient (case 5) and moderately altered in two patients (cases 3 and 4). Because of his visual impairment, patient 4 could not perform FCSRT. His memory performance as assessed using the French version of the California Verbal Learning Test was moderately reduced (data not shown). Memory deficits evaluated with the FCSRT in the four other PCA patients was less severe than in AD patients (free delayed recall, $p = 0.02$; total delayed recall, $p = 0.048$). Executive functions were systematically but variably affected. PCA patients were slower than AD patients during the TMT-A ($p = 0.02$). Naming was preserved in two PCA cases (1 and 3) and impaired in the others (Table 3).

CSF data

Among our five PCA patients (Table 4), three fulfilled biological criteria for typical AD with abnormal levels of the three CSF markers (cases 1, 2 and 5). Two PCA patients were classified as atypical AD due to abnormalities of either tau or amyloid protein levels (cases 3 and 4). None had normal CSF biomarkers. Thus, all of PCA patients showed a biological profile consistent with AD, either typical or atypical.

Table 4 CSF biomarker profile and PIB-PET pattern of PCA patients

Subjects	A β ₁₋₄₂ (pg/mL)	T-tau (pg/mL)	P-tau181 (pg/mL)	CSF profile	PIB-PET pattern
PCA 1	441	450	69	Typical AD	Probable AD
PCA 2	461	618	107	Typical AD	Probable AD
PCA 3	573	582	107	<i>Atypical AD</i>	Probable AD
PCA 4	216	241	48	<i>Atypical AD</i>	Probable AD
PCA 5	389	1128	143	Typical AD	Probable AD

CSF pattern is considered atypical for patients presenting either elevated T-tau and P-tau181 or decreased A β 42 concentrations. Normal levels of T-tau, P-tau181 or A β 42 and atypical CSF profile are shown in italics. Subjects are considered to have a typical AD profile if all three levels lay beyond determined CSF cut-off values. PIB-PET pattern is consistent with a probable AD when showing neocortical retention of [¹¹C]PIB

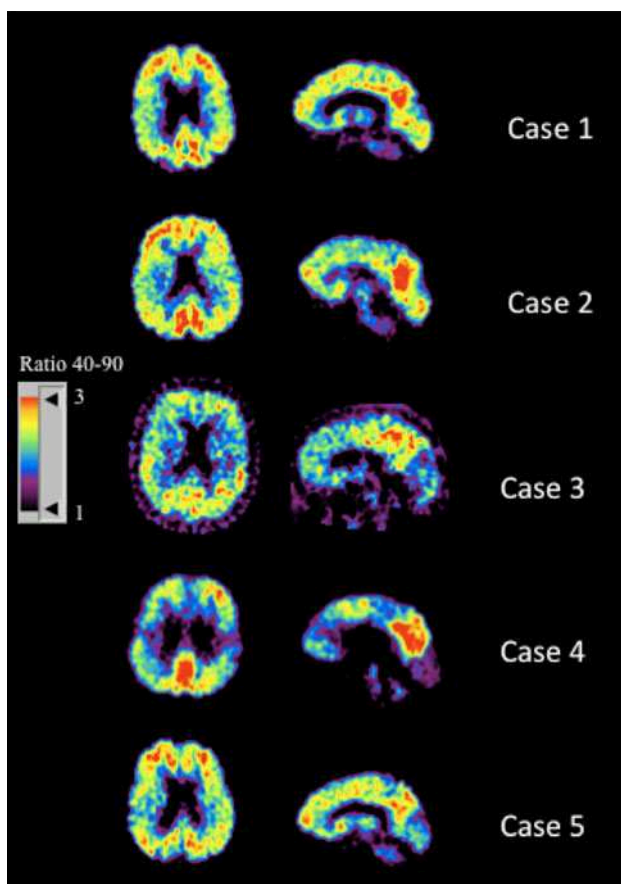


Fig. 1 [¹¹C]PIB-PET images of PCA patients. [¹¹C]PIB-RATIO images of all PCA patients show an extensive but variable cortical [¹¹C]PIB uptake in frontal, temporal, parietal, occipital and cingulate cortices consistent with amyloid deposition and probable AD. [¹¹C]PIB uptake in posterior regions is variable from one PCA subject to another

[¹¹C]PIB data

Visual analysis

Visual inspection of the quantitative data showed neocortical retention of [¹¹C]PIB in all PCA patients (Table 3), as in AD subjects, suggesting underlying amyloid pathology.

No [¹¹C]PIB-RATIO scans of our PCA patients were considered as normal or doubtful (Table 4, Fig. 1).

ROI analysis (Fig. 2)

PCA, AD versus controls. ROI group analysis showed that AD and PCA patients had significantly higher RATIO values than controls in all five neocortical regions investigated ($p < 0.001$). PCA versus AD. There was no statistical difference of [¹¹C]PIB uptake in the frontal cortex ($p = 0.24$), parietal cortex ($p = 0.14$) and cingulate cortex ($p = 0.88$) between PCA and AD patients. PCA patients had a significantly higher RATIO of [¹¹C]PIB uptake than AD patients in the occipital cortex ($p = 0.03$). A trend for higher binding in PCA was also noticed in the lateral temporal cortex ($p = 0.05$).

Parametric image analysis (Fig. 3)

PCA, AD versus controls. Both PCA and AD patients had significantly higher [¹¹C]PIB uptake in neocortical brain regions than control subjects (data not shown). PCA versus AD. When global mean was not included as a covariate in the analysis, PCA subjects showed a focally higher [¹¹C]PIB uptake in the visual cortex, the bilateral occipito-temporal junction, the left parietal cortex and the right temporal cortex, and to a lesser degree in the frontal cortex (Fig. 3, no global). These differences were no longer significant when global cerebral mean was included as a covariate (Fig. 3, global). AD versus PCA. There were no regions of higher [¹¹C]PIB RATIO in AD than in PCA patients. Individual comparison of PCA patients with the AD patient group revealed a great heterogeneity of [¹¹C]PIB-RATIO patterns. In four PCA patients (cases 1, 2, 3 and 5), the posterior regions showed a significantly higher [¹¹C]PIB-RATIO retention than in the AD group. Retention of [¹¹C]PIB could encompass the visual cortex on both sides (case 1 and 2), with more variable extension to temporal and parietal cortices (cases 2, 3 and 5). However, two of the four PCA patients (cases 1 and 5) also

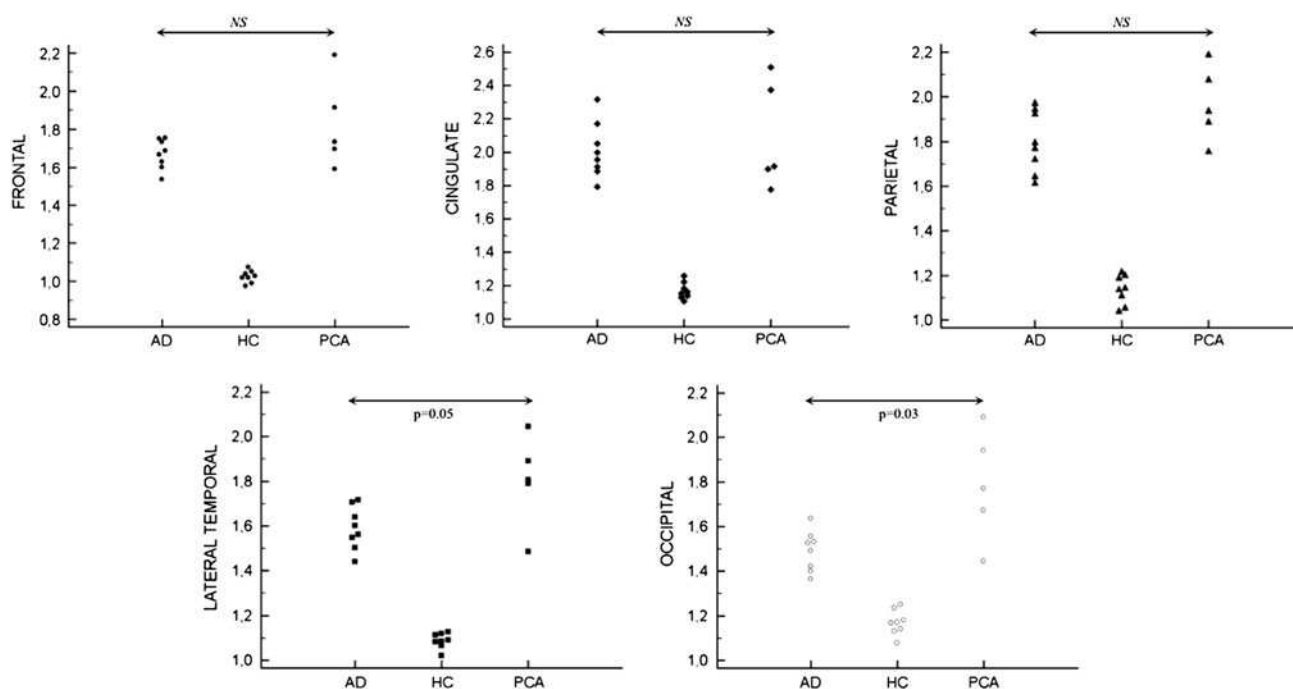


Fig. 2 ROI analysis of PCA group versus typical AD group. AD and PCA patients have significantly higher RATIO values than controls in all five investigated neocortical regions ($p < 0.001$). There is no statistical difference of [^{11}C]PIB retention in the frontal ($p = 0.24$),

parietal ($p = 0.14$) and cingulate cortices ($p = 0.88$) between PCA and AD patients. PCA patients have a significantly higher RATIO of [^{11}C]PIB uptake than AD in the occipital cortex ($p = 0.03$). A trend is also noticed in lateral temporal cortex ($p = 0.05$)

showed a higher [^{11}C]PIB retention in the frontal cortex. Finally, one PCA patient (case 4) did not show higher [^{11}C]PIB retention in any region as compared to the AD group, i.e. his [^{11}C]PIB-RATIO pattern was similar to that of typical AD subjects (Fig. 3).

Discussion

In this study, the combination of CSF biomarker analysis and [^{11}C]PIB PET scanning in five consecutive prototypical PCA patients demonstrated in vivo a profile overall suggestive of AD both for CSF biomarkers and cerebral amyloid imaging. A posterior cortical distribution of [^{11}C]PIB involving parietal, temporal and occipital cortices, particularly visual cortex, was inconsistently found in individual PCA cases, as well as in the group analyses, but was not significant when global means were taken into account. Our imaging and CSF data suggestive of AD diagnosis are concordant with neuropathological studies showing AD pathology in most PCA cases [2, 3, 9]. There are few studies comparing CSF and PIB results in AD and we found only a single PCA case report in the literature where both biomarkers were available, results of which were consistent with our findings [36]. Our combined biomarker study reinforces the hypothesis that the PCA syndrome is most often a focal form of AD.

Only four case reports, including a total of six patients, have been published to date. They have shown abnormal [^{11}C]PIB retention in PCA using visual inspection [36, 37], ROI analysis [38], or SPM analysis [39], but none combined these three types of analysis.

In our study, SPM and ROI group comparisons showed higher [^{11}C]PIB retention in PCA patients compared with AD patients, with a posterior emphasis (Figs. 2, 3). Visual inspection of scans showed that the five PCA patients had abnormal cortical retention of [^{11}C]PIB of similar magnitude as patients with typical AD (Fig. 1). However, individual SPM analyses showed a pattern of cortical [^{11}C]PIB retention that significantly differed from the AD group, with higher amyloid burden in the primary visual cortex, in the parietal or the temporal cortices. Two patients also had a higher [^{11}C]PIB uptake in anterior regions. Only one PCA patient had a pattern not distinguishable from AD, i.e. 4/5 did show differences, indicating that such analyses may be clinically relevant.

ROI and SPM individual analyses also showed a great interregional variability in [^{11}C]PIB uptake in patients compared to control subjects, particularly for the PCA group (Figs. 2, 3). The posterior-anterior gradient of amyloid load seen in a majority of our PCA patients may be related to a particular distribution pattern of lesions as shown in autopsied cases [2, 10]. Indeed, these authors found more numerous SPs in occipital [2] or occipito-

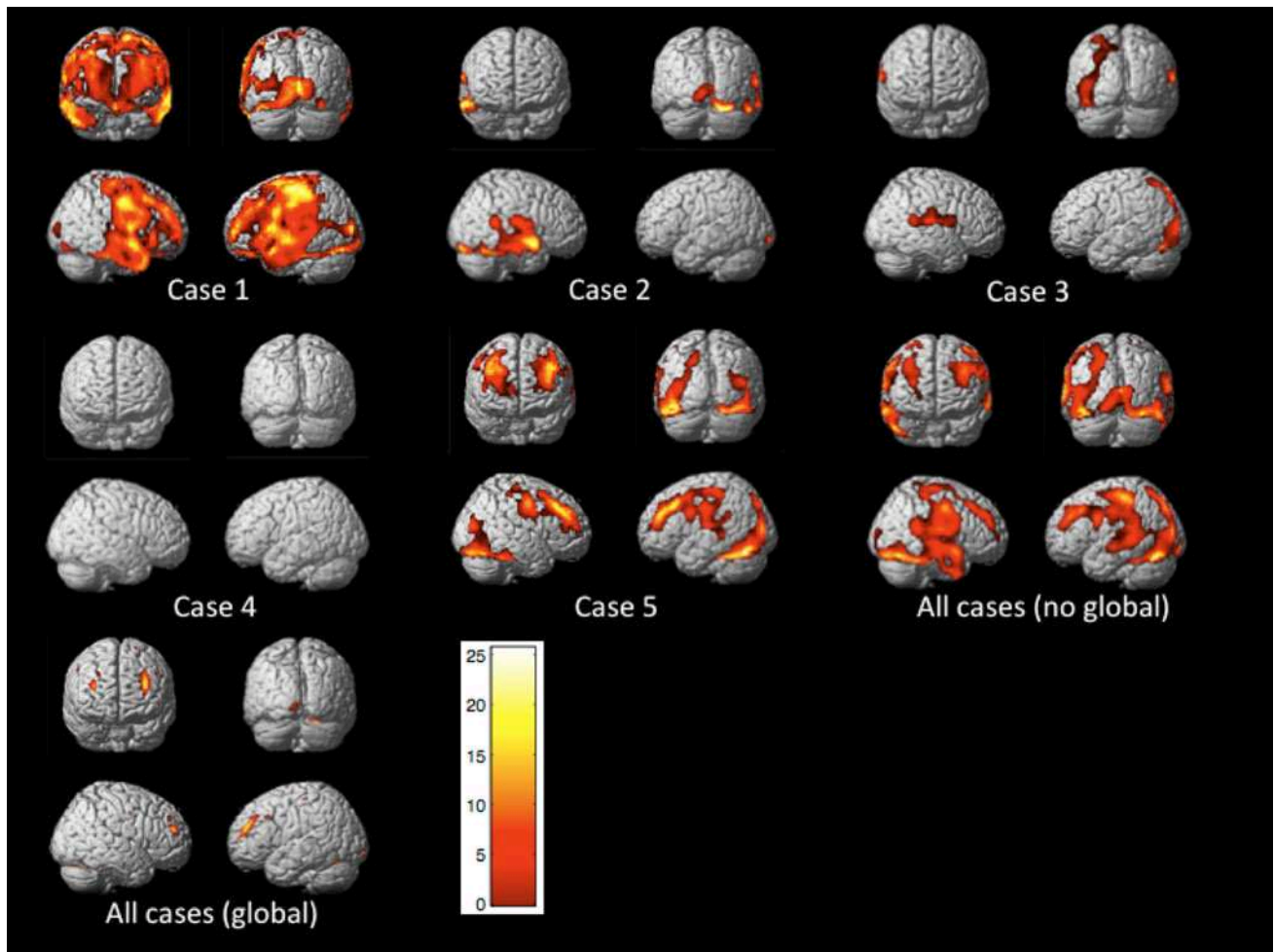


Fig. 3 SPM analysis of individual PCA patients and PCA group vs typical AD group. Individual analysis. Four PCA patients (cases 1, 2, 3 and 5) show a significantly higher retention of [^{11}C]PIB than typical AD in posterior regions with a variable pattern including occipital, temporal and/or parietal cortices. Two of these four PCA patients (cases 1 and 5) also show a higher [^{11}C]PIB retention in the anterior regions. One case (case 4) presents a [^{11}C]PIB uptake pattern similar

parietal regions [10] than in frontal regions [10] and hippocampus [2]. However, these data seem less robust than those related to NFTs, showing higher density in posterior regions in PCA compared to AD. Thus, the pattern of posterior predominance of PIB uptake was no longer found when the overall level of PIB binding was included as a covariate in the SPM group comparison (Fig. 3). This discrepancy is likely to be due to a global higher [^{11}C]PIB retention in PCA compared to AD (Fig. 2).

Some previous PIB-PET studies showed a positive correlation between [^{11}C]PIB uptake, severity of cognitive deficit in AD [40], hypometabolism [41] and level of education [42]. These variables, as well as disease duration, were, however, not different between groups in our sample, and hence do not explain the higher amyloid load in our PCA group. Age is unlikely to underlie the global

to that of typical AD subjects. Group analysis. When global mean is not included as a covariate in the analysis, PCA subjects, in comparison to AD patients, show a focally higher [^{11}C]PIB retention in the visual cortex, the bilateral occipito-temporal junction, the left parietal and the right temporal cortices but also in frontal cortex at a lesser degree. These differences are no longer found with global cerebral mean as a covariate

difference, even if the patients in the PCA group were younger, this variable having been included as a covariate in the SPM analysis. In the same way, another study did not show any correlation between [^{11}C]PIB uptake and age at onset, clinical status or glucose metabolism in AD [43]. Higher NFT density and more severe neuronal loss were shown in early-onset PCA compared to late-onset cases [10] whereas differences in amyloid load were not reported.

Increased [^{11}C]PIB retention in neocortical regions in our AD group compared to controls is consistent with the literature [14, 15, 42, 44]. The five PCA patients had neocortical [^{11}C]PIB retention comparable to AD patients. PIB positivity is highly suggestive of amyloid deposition [16]. It correlates with the presence and the concentration of neuritic plaques characteristic of AD [18]. It is indicative

of amyloid brain pathology, but not pathognomonic of AD. Amyloid deposits can also be found in DLB [45, 46], and in non-demented aged controls [47, 48]. Based on [¹¹C]PIB data, our five PCA patients have increased amyloid concentrations and are likely to have AD pathology. None of them have symptoms consistent with DLB or CBD, which is also in line with this hypothesis.

CSF showed decreased $A\beta_{42}$ levels in four patients and elevated levels of T-tau and P-tau181 in a partially overlapping group of four others. According to our results, three of the five PCA patients (cases 1, 2 and 5) showed a typical AD CSF profile. The two others (cases 3 and 4) with either elevated CSF tau or decreased $A\beta_{42}$ showed a less typical profile, which is nevertheless consistent with AD. Our study thus identified a dominant AD type biological profile in PCA. These findings are in accordance with published studies with CSF analysis in PCA [49] (Seguin et al., in press). Decreased CSF $A\beta_{42}$ and elevated phosphorylated tau at threonine 199 levels have been reported in a single case of PCA [36].

Decreased levels of CSF $A\beta_{42}$, which have been linked to trapping of the protein in senile plaques [50], is a reliable marker of AD pathology, with a variable diagnostic sensitivity (58–96%) and specificity (61–86%). Taking into account increased levels of T-tau protein and P-tau181 protein also helps to identify AD patients with a sensitivity of 65–80% and specificity of 60–92% in different studies with post-mortem confirmation of diagnosis [12, 51, 52]. Combining the three biomarkers achieves sensitivities and specificities of about 90% [30, 53]. Cut-off values used in our study are compatible with normative data of most laboratories [30–32, 54], and we are confident in the AD diagnosis of our patients with typical AD CSF profiles.

Atypical CSF patterns have previously been described in patients with autopsy-based diagnosis of AD [55] and remain consistent with underlying AD pathology. However, these CSF profiles are less specific of AD and can be found in other neurodegenerative diseases, sometimes associated with AD. CSF profiles with low $A\beta_{42}$ and normal tau proteins level have been found in particular in patients showing AD lesions in association with DLB [56], vascular dementia, or Parkinson's disease with dementia [55]. Similarly, CSF profiles with normal $A\beta_{42}$ and elevated tau and P-tau181 levels were described in autopsied cases, either with vascular dementia or DLB [55]. None of our patients, even those with atypical CSF patterns, fulfilled diagnostic criteria for DLB. They are therefore most likely to have underlying AD, but DLB associated with AD pathology remains a differential diagnosis.

Although histological data were not available and the sample size was small, our results indicated that a combination of biomarkers could demonstrate amyloid burden in vivo in PCA, suggesting a diagnosis of AD in these

patients. We could not formally exclude associated DLB pathology, but our PET and CSF data were consistent with those of neuropathological studies in PCA. Our results also showed a posterior regional pattern of amyloid deposits in PCA. Although this finding was reminiscent of the regional distribution of histological lesions, it was partially explained by a globally higher [¹¹C]PIB retention in PCA as compared to AD in our sample. This higher amyloid burden in PCA compared to AD was not related to age at onset, disease severity, disease duration or level of education.

Although post mortem examination remains the only way to determine the whole spectrum of pathological events related to this clinical condition, we found combined CSF and PET biomarkers helpful in the in vivo diagnosis of PCA with underlying AD pathology.

Conflict of interest None.

References

1. Benson DF, Davis RJ, Snyder BD (1988) Posterior cortical atrophy. *Arch Neurol* 45(7):789–793
2. Tang-Wai DF et al (2004) Clinical, genetic, and neuropathologic characteristics of posterior cortical atrophy. *Neurology* 63(7):1168–1174
3. Renner JA et al (2004) Progressive posterior cortical dysfunction: a clinicopathologic series. *Neurology* 63(7):1175–1180
4. McMonagle P et al (2006) The cognitive profile of posterior cortical atrophy. *Neurology* 66(3):331–338
5. Formaglio M et al (2009) Homonymous hemianopia and posterior cortical atrophy. *Rev Neurol (Paris)* 165(3):256–62
6. Whitwell JL et al (2007) Imaging correlates of posterior cortical atrophy. *Neurobiol Aging* 28(7):1051–1061
7. Nestor PJ et al (2003) The topography of metabolic deficits in posterior cortical atrophy (the visual variant of Alzheimer's disease) with FDG-PET. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74(11):1521–1529
8. Schmidtke K, Hull M, Talazko J (2005) Posterior cortical atrophy: variant of Alzheimer's disease? A case series with PET findings. *J Neurol* 252(1):27–35
9. Alladi S et al (2007) Focal cortical presentations of Alzheimer's disease. *Brain* 130(Pt 10):2636–2645
10. Hof PR et al (1997) Atypical form of Alzheimer's disease with prominent posterior cortical atrophy: a review of lesion distribution and circuit disconnection in cortical visual pathways. *Vision Res* 37(24):3609–3625
11. Hulstaert F et al (1999) Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid(1–42) and tau levels in CSF. *Neurology* 52(8):1555–1562
12. Shaw LM et al (2009) Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects. *Ann Neurol* 65(4):403–413
13. Mathis CA et al (2002) A lipophilic thioflavin-T derivative for positron emission tomography (PET) imaging of amyloid in brain. *Bioorg Med Chem Lett* 12(3):295–298
14. Klunk WE et al (2004) Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol* 55(3):306–319
15. Engler H et al (2006) Two-year follow-up of amyloid deposition in patients with Alzheimer's disease. *Brain* 129(Pt 11):2856–2866

16. Bacskai BJ et al (2007) Molecular imaging with Pittsburgh Compound B confirmed at autopsy: a case report. *Arch Neurol* 64(3):431–434
17. Lockhart A et al (2007) PIB is a non-specific imaging marker of amyloid-beta (Abeta) peptide-related cerebral amyloidosis. *Brain* 130(Pt 10):2607–2615
18. Ikonovic MD et al (2008) Post-mortem correlates of in vivo PiB-PET amyloid imaging in a typical case of Alzheimer's disease. *Brain* 131(Pt 6):1630–1645
19. Folstein MF, McHugh PR (1975) Mini-mental state. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12:189–198
20. Morris JC (1993) The clinical dementia rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology* 43(11):2412–2414
21. McKhann G et al (1984) 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* 34(7):939–944
22. Grober E, Buschke H (1987) Genuine memory deficits in dementia. *Dev Psychol* 3:13–36
23. Delis D et al (1987) The California Verbal Learning Test (research edition). Psychological corporation, New York
24. Cardebat DDB, Puel M, Goulet P, Joanne Y (1990) Formal and semantic lexical evocation in normal subjects. Performance and dynamics of production as a function of sex, age and educational level. *Acta Neurol Belg* 90:207–217
25. Bachy-Langedock N (1989) Batterie d'examen des troubles en denomination, Editest, Bruxelles
26. Stroop (1935) Studies of interferences in serial verbal reactions. *J Exp Psychol* 18:643–662
27. Reitan RM, Wolfson D (2004) The Trail Making Test as an initial screening procedure for neuropsychological impairment in older children. *Arch Clin Neuropsychol* 19(2):281–288
28. Rapport LJ, Millis SR, Bonello PJ (1998) Validation of the Warrington theory of visual processing and the visual object and space perception battery. *J Clin Exp Neuropsychol* 20(2): 211–220
29. Sunderland T et al (1989) Clock drawing in Alzheimer's disease. A novel measure of dementia severity. *J Am Geriatr Soc* 37(8):725–729
30. Hansson O et al (2006) Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *Lancet Neurol* 5(3):228–234
31. Tapiola T et al (2009) Cerebrospinal fluid {beta}-amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain. *Arch Neurol* 66(3):382–389
32. Mattsson N et al (2009) CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *Jama* 302(4): 385–393
33. Lopresti BJ et al (2005) Simplified quantification of Pittsburgh Compound B amyloid imaging PET studies: a comparative analysis. *J Nucl Med* 46(12):1959–1972
34. Hammers A et al (2003) Three-dimensional maximum probability atlas of the human brain, with particular reference to the temporal lobe. *Hum Brain Mapp* 19(4):224–247
35. Ashburner J, Friston KJ (2005) Unified segmentation. *Neuroimage* 26(3):839–851
36. Kambe T et al (2010) Posterior cortical atrophy with [11C] Pittsburgh compound B accumulation in the primary visual cortex. *J Neurol* 257(3):469–471
37. Migliaccio R et al (2009) Clinical syndromes associated with posterior atrophy: early age at onset AD spectrum. *Neurology* 73(19):1571–1578
38. Tenovuo O et al (2008) Posterior cortical atrophy: a rare form of dementia with in vivo evidence of amyloid-beta accumulation. *J Alzheimers Dis* 15(3):351–355
39. Ng SY et al (2007) Evaluating atypical dementia syndromes using positron emission tomography with carbon 11 labeled Pittsburgh Compound B. *Arch Neurol* 64(8):1140–1144
40. Grimmer T et al (2009) Clinical severity of Alzheimer's disease is associated with PIB uptake in PET. *Neurobiol Aging* 30(12):1902–1909
41. Edison P et al (2007) Amyloid, hypometabolism, and cognition in Alzheimer disease: an [11C]PIB and [18F]FDG PET study. *Neurology* 68(7):501–508
42. Kemppainen NM et al (2007) PET amyloid ligand [11C]PIB uptake is increased in mild cognitive impairment. *Neurology* 68(19):1603–1606
43. Rabinovici GD et al (2010) Increased metabolic vulnerability in early-onset Alzheimer's disease is not related to amyloid burden. *Brain* 133(Pt 2): p 512–28
44. Forsberg A et al (2008) PET imaging of amyloid deposition in patients with mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 29(10):1456–1465
45. Gomperts SN et al (2008) Imaging amyloid deposition in Lewy body diseases. *Neurology* 71(12):903–910
46. Edison P et al (2008) Amyloid load in Parkinson's disease dementia and Lewy body dementia measured with [11C]PIB positron emission tomography. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79(12):1331–1338
47. Pike KE et al (2007) Beta-amyloid imaging and memory in non-demented individuals: evidence for preclinical Alzheimer's disease. *Brain* 130(Pt 11):2837–2844
48. Villemagne VL et al (2008) Abeta deposits in older non-demented individuals with cognitive decline are indicative of preclinical Alzheimer's disease. *Neuropsychologia* 46(6):1688–1697
49. Baumann TP et al (2010) CSF-Tau and CSF-Abeta(1–42) in posterior cortical atrophy. *Dement Geriatr Cogn Disord* 29(6):530–533
50. Strozzyk D et al (2003) CSF Abeta 42 levels correlate with amyloid-neuropathology in a population-based autopsy study. *Neurology* 60(4):652–656
51. Roher AE et al (2009) Proteomics-derived cerebrospinal fluid markers of autopsy-confirmed Alzheimer's disease. *Biomarkers* 14(7):493–501
52. Koopman K et al (2009) Improved discrimination of autopsy-confirmed Alzheimer's disease (AD) from non-AD dementias using CSF P-tau(181P). *Neurochem Int* 55(4):214–218
53. Mulder C et al (2010) Amyloid-beta(1–42), total tau, and phosphorylated tau as cerebrospinal fluid biomarkers for the diagnosis of Alzheimer disease. *Clin Chem* 56(2):248–53
54. Hort J et al (2010) Use of cerebrospinal fluid biomarkers in diagnosis of dementia across Europe. *Eur J Neurol* 17(1):90–6
55. Engelborghs S et al (2008) Diagnostic performance of a CSF-biomarker panel in autopsy-confirmed dementia. *Neurobiol Aging* 29(8):1143–1159
56. Iqbal K et al (2005) Subgroups of Alzheimer's disease based on cerebrospinal fluid molecular markers. *Ann Neurol* 58(5): 748–757

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Steenland K, MacNeil J, Seals R, Levey A. Factors affecting survival of patients with neurodegenerative disease. *Neuroepidemiology* 2010;35:28-35.
2. Ownby RL, Crocco E, Acevedo A, John V, Loewenstein D. Depression and risk for Alzheimer disease: systematic review, meta-analysis, and metaregression analysis. *Arch Gen Psychiatry* 2006;63:530-8.
3. Portet F, Scarmeas N, Cosentino S, Helzner EP, Stern Y. Extrapyrmidal signs before and after diagnosis of incident Alzheimer disease in a prospective population study. *Arch Neurol* 2009;66:1120-6.
4. Lopez OL, Becker JT, Sweet RA, et al. Psychiatric symptoms vary with the severity of dementia in probable Alzheimer's disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2003;15:346-53.
5. Waldemar G, Dubois B, Emre M, et al. Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline. *Eur J Neurol* 2007;14:e1-26.
6. Ferri CP, Prince M, Brayne C, et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 2005;366:2112-7.
7. Mura T, Dartigues JF, Berr C. How many dementia cases in France and Europe? Alternative projections and scenarios 2010-2050. *Eur J Neurol* 2010;17:252-9.
8. Knopman DS, DeKosky ST, Cummings JL, et al. Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2001;56:1143-53.
9. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th ed. Washington DC: APA; 1995.
10. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975;12:189-98.
11. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984;34:939-44.
12. Galton CJ, Patterson K, Xuereb JH, Hodges JR. Atypical and typical presentations of Alzheimer's disease: a clinical, neuropsychological, neuroimaging and pathological study of 13 cases. *Brain* 2000;123 Pt 3:484-98.
13. Lonie JA, Herrmann LL, Tierney KM, et al. Lexical and semantic fluency discrepancy scores in aMCI and early Alzheimer's disease. *J Neuropsychol* 2009;3:79-92.
14. Thomas-Antérion C, Borg C, Basaglia-Pappas S, Laroche L, Minvielle B, Bedoin N. [Semantic knowledge in MCI and Alzheimer's disease: the French version of the New Words Interview]. *Rev Neurol (Paris)* 2010;166:419-27.
15. Hort J, O'Brien JT, Gainotti G, et al. EFNS guidelines for the diagnosis and management of Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 2010;17:1236-48.
16. Alladi S, Xuereb J, Bak T, et al. Focal cortical presentations of Alzheimer's disease. *Brain* 2007;130:2636-45.
17. Scheltens P. Imaging in Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci* 2009;11:191-9.
18. Scheltens P, Fox N, Barkhof F, De Carli C. Structural magnetic resonance imaging in the practical assessment of dementia: beyond exclusion. *Lancet Neurol* 2002;1:13-21.
19. Burton EJ, Barber R, Mukaetova-Ladinska EB, et al. Medial temporal lobe atrophy on MRI differentiates Alzheimer's disease from dementia with Lewy bodies and vascular cognitive impairment: a prospective study with pathological verification of diagnosis. *Brain* 2009;132:195-203.
20. Jack CR, Jr., Dickson DW, Parisi JE, et al. Antemortem MRI findings correlate with hippocampal neuropathology in typical aging and dementia. *Neurology* 2002;58:750-7.
21. Bobinski M, de Leon MJ, Wegiel J, et al. The histological validation of post mortem magnetic resonance imaging-determined hippocampal volume in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 2000;95:721-5.
22. Lehericy S, Marjanska M, Mesrob L, Sarazin M, Kinkingnehun S. Magnetic resonance imaging of Alzheimer's disease. *Eur Radiol* 2007;17:347-62.

23. van de Pol LA, Hensel A, van der Flier WM, et al. Hippocampal atrophy on MRI in frontotemporal lobar degeneration and Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77:439-42.
24. O'Brien JT, Paling S, Barber R, et al. Progressive brain atrophy on serial MRI in dementia with Lewy bodies, AD, and vascular dementia. *Neurology* 2001;56:1386-8.
25. Barber R, Ballard C, McKeith IG, Gholkar A, O'Brien JT. MRI volumetric study of dementia with Lewy bodies: a comparison with AD and vascular dementia. *Neurology* 2000;54:1304-9.
26. Jagust WJ, Zheng L, Harvey DJ, et al. Neuropathological basis of magnetic resonance images in aging and dementia. *Ann Neurol* 2008;63:72-80.
27. Schneider JA, Arvanitakis Z, Bang W, Bennett DA. Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons. *Neurology* 2007;69:2197-204.
28. Swan GE, DeCarli C, Miller BL, et al. Association of midlife blood pressure to late-life cognitive decline and brain morphology. *Neurology* 1998;51:986-93.
29. Longstreth WT, Jr., Manolio TA, Arnold A, et al. Clinical correlates of white matter findings on cranial magnetic resonance imaging of 3301 elderly people. The Cardiovascular Health Study. *Stroke* 1996;27:1274-82.
30. Gold G, Giannakopoulos P, Herrmann FR, Bouras C, Kovari E. Identification of Alzheimer and vascular lesion thresholds for mixed dementia. *Brain* 2007;130:2830-6.
31. Wolf H, Ecke GM, Bettin S, Dietrich J, Gertz HJ. Do white matter changes contribute to the subsequent development of dementia in patients with mild cognitive impairment? A longitudinal study. *Int J Geriatr Psychiatry* 2000;15:803-12.
32. Reiman EM, Chen K, Alexander GE, et al. Functional brain abnormalities in young adults at genetic risk for late-onset Alzheimer's dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:284-9.
33. Herholz K, Salmon E, Perani D, et al. Discrimination between Alzheimer dementia and controls by automated analysis of multicenter FDG PET. *Neuroimage* 2002;17:302-16.
34. Foster NL, Heidebrink JL, Clark CM, et al. FDG-PET improves accuracy in distinguishing frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Brain* 2007;130:2616-35.
35. Nordberg A. PET imaging of amyloid in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2004;3:519-27.
36. Wong DF, Rosenberg PB, Zhou Y, et al. In vivo imaging of amyloid deposition in Alzheimer disease using the radioligand 18F-AV-45 (florbetapir [corrected] F 18). *J Nucl Med* 2010;51:913-20.
37. Edison P, Rowe CC, Rinne JO, et al. Amyloid load in Parkinson's disease dementia and Lewy body dementia measured with [11C]PIB positron emission tomography. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;79:1331-8.
38. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)* 1991;82:239-59.
39. Mirra SS, Heyman A, McKeel D, et al. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 1991;41:479-86.
40. Wolf DS, Gearing M, Snowdon DA, Mori H, Markesbery WR, Mirra SS. Progression of regional neuropathology in Alzheimer disease and normal elderly: findings from the Nun study. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1999;13:226-31.
41. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:4245-9.
42. Uchihara T, Duyckaerts C, Lazarini F, et al. Inconstant apolipoprotein E (ApoE)-like immunoreactivity in amyloid beta protein deposits: relationship with APOE genotype in aging brain and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 1996;92:180-5.
43. Burns MP, Noble WJ, Olm V, et al. Co-localization of cholesterol, apolipoprotein E and fibrillar Aβ in amyloid plaques. *Brain Res Mol Brain Res* 2003;110:119-25.
44. Buée L, Hof PR, Roberts DD, Delacourte A, Morrison JH, Fillit HM. Immunohistochemical identification of thrombospondin in normal human brain and in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1992;141:783-8.
45. Nishiyama E, Iwamoto N, Ohwada J, Arai H. Distribution of apolipoprotein E in senile plaques in brains with Alzheimer's disease: investigation with the confocal laser scan microscope. *Brain Res* 1997;750:20-4.

46. Thal DR, Rub U, Orantes M, Braak H. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 2002;58:1791-800.
47. Bacskai BJ, Frosch MP, Freeman SH, et al. Molecular imaging with Pittsburgh Compound B confirmed at autopsy: a case report. *Arch Neurol* 2007;64:431-4.
48. Feany MB, Dickson DW. Neurodegenerative disorders with extensive tau pathology: a comparative study and review. *Ann Neurol* 1996;40:139-48.
49. Yoshida M. Cellular tau pathology and immunohistochemical study of tau isoforms in sporadic tauopathies. *Neuropathology* 2006;26:457-70.
50. Berg L, McKeel DW, Jr., Miller JP, et al. Clinicopathologic studies in cognitively healthy aging and Alzheimer's disease: relation of histologic markers to dementia severity, age, sex, and apolipoprotein E genotype. *Arch Neurol* 1998;55:326-35.
51. Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 1992;42:631-9.
52. Tiraboschi P, Hansen LA, Thal LJ, Corey-Bloom J. The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD. *Neurology* 2004;62:1984-9.
53. Braak H, Braak E. Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging* 1995;16:271-8; discussion 8-84.
54. Alafuzoff I, Arzberger T, Al-Sarraj S, et al. Staging of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease: a study of the BrainNet Europe Consortium. *Brain Pathol* 2008;18:484-96.
55. Braak H, Braak E. Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol Aging* 1997;18:351-7.
56. Galasko D, Hansen LA, Katzman R, et al. Clinical-neuropathological correlations in Alzheimer's disease and related dementias. *Arch Neurol* 1994;51:888-95.
57. Schneider JA, Arvanitakis Z, Leurgans SE, Bennett DA. The neuropathology of probable Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Ann Neurol* 2009;66:200-8.
58. Snowdon DA, Greiner LH, Mortimer JA, Riley KP, Greiner PA, Markesbery WR. Brain infarction and the clinical expression of Alzheimer disease. The Nun Study. *Jama* 1997;277:813-7.
59. Pathological correlates of late-onset dementia in a multicentre, community-based population in England and Wales. Neuropathology Group of the Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study (MRC CFAS). *Lancet* 2001;357:169-75.
60. Jellinger KA, Attems J. Neuropathological evaluation of mixed dementia. *J Neurol Sci* 2007;257:80-7.
61. Zekry D, Duyckaerts C, Belmin J, et al. The vascular lesions in vascular and mixed dementia: the weight of functional neuroanatomy. *Neurobiol Aging* 2003;24:213-9.
62. Parkkinen L, Kauppinen T, Pirttila T, Autere JM, Alafuzoff I. Alpha-synuclein pathology does not predict extrapyramidal symptoms or dementia. *Ann Neurol* 2005;57:82-91.
63. Clinton LK, Blurton-Jones M, Myczek K, Trojanowski JQ, LaFerla FM. Synergistic Interactions between A beta, tau, and alpha-synuclein: acceleration of neuropathology and cognitive decline. *J Neurosci* 2010;30:7281-9.
64. Kraybill ML, Larson EB, Tsuang DW, et al. Cognitive differences in dementia patients with autopsy-verified AD, Lewy body pathology, or both. *Neurology* 2005;64:2069-73.
65. Aho L, Parkkinen L, Pirttila T, Alafuzoff I. Systematic appraisal using immunohistochemistry of brain pathology in aged and demented subjects. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2008;25:423-32.
66. Hansen L, Salmon D, Galasko D, et al. The Lewy body variant of Alzheimer's disease: a clinical and pathologic entity. *Neurology* 1990;40:1-8.
67. Hamilton RL. Lewy bodies in Alzheimer's disease: a neuropathological review of 145 cases using alpha-synuclein immunohistochemistry. *Brain Pathol* 2000;10:378-84.
68. Ranginwala NA, Hynan LS, Weiner MF, White CL, 3rd. Clinical criteria for the diagnosis of Alzheimer disease: still good after all these years. *Am J Geriatr Psychiatry* 2008;16:384-8.
69. Amador-Ortiz C, Lin WL, Ahmed Z, et al. TDP-43 immunoreactivity in hippocampal sclerosis and Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2007;61:435-45.
70. Higashi S, Iseki E, Yamamoto R, et al. Concurrence of TDP-43, tau and alpha-synuclein pathology in brains of Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Brain Res* 2007;1184:284-94.

71. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, et al. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol* 2010.
72. Perrin RJ, Fagan AM, Holtzman DM. Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease. *Nature* 2009;461:916-22.
73. Bennett DA, Schneider JA, Arvanitakis Z, et al. Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies. *Neurology* 2006;66:1837-44.
74. Mayeux R. Epidemiology of neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* 2003;26:81-104.
75. Schellenberg GD. Early Alzheimer's disease genetics. *J Alzheimers Dis* 2006;9:367-72.
76. Campion D, Dumanchin C, Hannequin D, et al. Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet* 1999;65:664-70.
77. Kwok JB, Taddei K, Hallupp M, et al. Two novel (M233T and R278T) presenilin-1 mutations in early-onset Alzheimer's disease pedigrees and preliminary evidence for association of presenilin-1 mutations with a novel phenotype. *Neuroreport* 1997;8:1537-42.
78. O'Riordan S, McMonagle P, Janssen JC, et al. Presenilin-1 mutation (E280G), spastic paraparesis, and cranial MRI white-matter abnormalities. *Neurology* 2002;59:1108-10.
79. Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:5644-51.
80. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993;261:921-3.
81. Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet* 1994;7:180-4.
82. Roses AD. Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. *Annu Rev Med* 1996;47:387-400.
83. Bird TD. Genetic aspects of Alzheimer disease. *Genet Med* 2008;10:231-9.
84. Jarvik G, Larson EB, Goddard K, Schellenberg GD, Wijsman EM. Influence of apolipoprotein E genotype on the transmission of Alzheimer disease in a community-based sample. *Am J Hum Genet* 1996;58:191-200.
85. Wilcock GK, Lilienfeld S, Gaens E. Efficacy and safety of galantamine in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: multicentre randomised controlled trial. *Galantamine International-1 Study Group. Bmj* 2000;321:1445-9.
86. Hansen RA, Gartlehner G, Webb AP, Morgan LC, Moore CG, Jonas DE. Efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Clin Interv Aging* 2008;3:211-25.
87. Reisberg B, Doody R, Stoffler A, Schmitt F, Ferris S, Mobius HJ. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2003;348:1333-41.
88. Neary D, Snowden JS, Gustafson L, et al. Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology* 1998;51:1546-54.
89. Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia. The Lund and Manchester Groups. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57:416-8.
90. Kril JJ, Macdonald V, Patel S, Png F, Halliday GM. Distribution of brain atrophy in behavioral variant frontotemporal dementia. *J Neurol Sci* 2005;232:83-90.
91. Graff-Radford NR, Woodruff BK. Frontotemporal dementia. *Semin Neurol* 2007;27:48-57.
92. Snowden JS, Bathgate D, Varma A, Blackshaw A, Gibbons ZC, Neary D. Distinct behavioural profiles in frontotemporal dementia and semantic dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;70:323-32.
93. Whitwell JL, Josephs KA, Rossor MN, et al. Magnetic resonance imaging signatures of tissue pathology in frontotemporal dementia. *Arch Neurol* 2005;62:1402-8.
94. Lomen-Hoerth C, Anderson T, Miller B. The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Neurology* 2002;59:1077-9.
95. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006;314:130-3.
96. Grossman M, Libon DJ, Forman MS, et al. Distinct antemortem profiles in patients with pathologically defined frontotemporal dementia. *Arch Neurol* 2007;64:1601-9.
97. Rademakers R, Hutton M. The genetics of frontotemporal lobar degeneration. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2007;7:434-42.

98. Forman MS, Farmer J, Johnson JK, et al. Frontotemporal dementia: clinicopathological correlations. *Ann Neurol* 2006;59:952-62.
99. Kertesz A, McMonagle P, Blair M, Davidson W, Munoz DG. The evolution and pathology of frontotemporal dementia. *Brain* 2005;128:1996-2005.
100. Kertesz A, Martinez-Lage P, Davidson W, Munoz DG. The corticobasal degeneration syndrome overlaps progressive aphasia and frontotemporal dementia. *Neurology* 2000;55:1368-75.
101. Josephs KA, Petersen RC, Knopman DS, et al. Clinicopathologic analysis of frontotemporal and corticobasal degenerations and PSP. *Neurology* 2006;66:41-8.
102. Claassen DO, Parisi JE, Giannini C, Boeve BF, Dickson DW, Josephs KA. Frontotemporal dementia mimicking dementia with Lewy bodies. *Cogn Behav Neurol* 2008;21:157-63.
103. Engelborghs S, Vloeberghs E, Maertens K, Marescau B, De Deyn PP. Evidence for an association between the CSF HVA:5-HIAA ratio and aggressiveness in frontotemporal dementia but not in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75:1080.
104. Yang Y, Schmitt HP. Frontotemporal dementia: evidence for impairment of ascending serotonergic but not noradrenergic innervation. Immunocytochemical and quantitative study using a graph method. *Acta Neuropathol* 2001;101:256-70.
105. Mesulam MM. Slowly progressive aphasia without generalized dementia. *Ann Neurol* 1982;11:592-8.
106. Le Rhun E, Richard F, Pasquier F. Natural history of primary progressive aphasia. *Neurology* 2005;65:887-91.
107. Gorno-Tempini ML, Dronkers NF, Rankin KP, et al. Cognition and anatomy in three variants of primary progressive aphasia. *Ann Neurol* 2004;55:335-46.
108. Mummery CJ, Patterson K, Price CJ, Ashburner J, Frackowiak RS, Hodges JR. A voxel-based morphometry study of semantic dementia: relationship between temporal lobe atrophy and semantic memory. *Ann Neurol* 2000;47:36-45.
109. Knibb JA, Xuereb JH, Patterson K, Hodges JR. Clinical and pathological characterization of progressive aphasia. *Ann Neurol* 2006;59:156-65.
110. Kertesz A. Pick Complex: an integrative approach to frontotemporal dementia: primary progressive aphasia, corticobasal degeneration, and progressive supranuclear palsy. *Neurologist* 2003;9:311-7.
111. Deramecourt V, Lebert F, Debachy B, et al. Prediction of pathology in primary progressive language and speech disorders. *Neurology* 2010;74:42-9.
112. Mesulam M, Wicklund A, Johnson N, et al. Alzheimer and frontotemporal pathology in subsets of primary progressive aphasia. *Ann Neurol* 2008;63:709-19.
113. Benson DF, Davis RJ, Snyder BD. Posterior cortical atrophy. *Arch Neurol* 1988;45:789-93.
114. McMonagle P, Deering F, Berliner Y, Kertesz A. The cognitive profile of posterior cortical atrophy. *Neurology* 2006;66:331-8.
115. Tang-Wai DF, Graff-Radford NR, Boeve BF, et al. Clinical, genetic, and neuropathologic characteristics of posterior cortical atrophy. *Neurology* 2004;63:1168-74.
116. Renner JA, Burns JM, Hou CE, McKeel DW, Jr., Storandt M, Morris JC. Progressive posterior cortical dysfunction: a clinicopathologic series. *Neurology* 2004;63:1175-80.
117. Whitwell JL, Jack CR, Jr., Kantarci K, et al. Imaging correlates of posterior cortical atrophy. *Neurobiol Aging* 2007;28:1051-61.
118. Formaglio M, Costes N, Seguin J, et al. In vivo demonstration of amyloid burden in posterior cortical atrophy: a case series with PET and CSF findings. *J Neurol* 2011.
119. Victoroff J, Ross GW, Benson DF, Verity MA, Vinters HV. Posterior cortical atrophy. Neuropathologic correlations. *Arch Neurol* 1994;51:269-74.
120. Tang-Wai DF, Josephs KA, Boeve BF, Dickson DW, Parisi JE, Petersen RC. Pathologically confirmed corticobasal degeneration presenting with visuospatial dysfunction. *Neurology* 2003;61:1134-5.
121. Tang-Wai DF, Josephs KA, Boeve BF, Petersen RC, Parisi JE, Dickson DW. Coexistent Lewy body disease in a case of "visual variant of Alzheimer's disease". *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:389.
122. Josephs KA. Capgras syndrome and its relationship to neurodegenerative disease. *Arch Neurol* 2007;64:1762-6.

123. Levine DN, Lee JM, Fisher CM. The visual variant of Alzheimer's disease: a clinicopathologic case study. *Neurology* 1993;43:305-13.
124. Hof PR, Archin N, Osmand AP, et al. Posterior cortical atrophy in Alzheimer's disease: analysis of a new case and re-evaluation of a historical report. *Acta Neuropathol* 1993;86:215-23.
125. Berthier ML, Leiguarda R, Starkstein SE, Sevlever G, Taratuto AL. Alzheimer's disease in a patient with posterior cortical atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991;54:1110-1.
126. McKeith I, Mintzer J, Aarsland D, et al. Dementia with Lewy bodies. *Lancet Neurol* 2004;3:19-28.
127. Uchiyama M, Isse K, Tanaka K, et al. Incidental Lewy body disease in a patient with REM sleep behavior disorder. *Neurology* 1995;45:709-12.
128. Gagnon JF, Bedard MA, Fantini ML, et al. REM sleep behavior disorder and REM sleep without atonia in Parkinson's disease. *Neurology* 2002;59:585-9.
129. McKeith IG, Dickson DW, Lowe J, et al. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. *Neurology* 2005;65:1863-72.
130. Pasquier F, Hamon M, Lebert F, Jacob B, Pruvo JP, Petit H. Medial temporal lobe atrophy in memory disorders. *J Neurol* 1997;244:175-81.
131. Walker Z, Jaros E, Walker RW, et al. Dementia with Lewy bodies: a comparison of clinical diagnosis, FP-CIT single photon emission computed tomography imaging and autopsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78:1176-81.
132. Bain PG. The management of tremor. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;72 Suppl 1:13-19.
133. Ballard C, Grace J, McKeith I, Holmes C. Neuroleptic sensitivity in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. *Lancet* 1998;351:1032-3.
134. McKeith I, Del Ser T, Spano P, et al. Efficacy of rivastigmine in dementia with Lewy bodies: a randomised, double-blind, placebo-controlled international study. *Lancet* 2000;356:2031-6.
135. McKeith IG, Galasko D, Kosaka K, et al. Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the consortium on DLB international workshop. *Neurology* 1996;47:1113-24.
136. Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003;24:197-211.
137. Markesbery WR, Jicha GA, Liu H, Schmitt FA. Lewy body pathology in normal elderly subjects. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009;68:816-22.
138. Merdes AR, Hansen LA, Jeste DV, et al. Influence of Alzheimer pathology on clinical diagnostic accuracy in dementia with Lewy bodies. *Neurology* 2003;60:1586-90.
139. Tröster AI. Neuropsychological characteristics of dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease with dementia: differentiation, early detection, and implications for "mild cognitive impairment" and biomarkers. *Neuropsychol Rev* 2008;18:103-19.
140. Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55:181-4.
141. Dickson DW, Braak H, Duda JE, et al. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol* 2009;8:1150-7.
142. Rebeiz JJ, Kolodny EH, Richardson EP, Jr. Corticodentatonigral degeneration with neuronal achromasia. *Arch Neurol* 1968;18:20-33.
143. Gibb WR, Luthert PJ, Marsden CD. Corticobasal degeneration. *Brain* 1989;112 (Pt 5):1171-92.
144. Grimes DA, Lang AE, Bergeron CB. Dementia as the most common presentation of cortical-basal ganglionic degeneration. *Neurology* 1999;53:1969-74.
145. Wenning GK, Litvan I, Jankovic J, et al. Natural history and survival of 14 patients with corticobasal degeneration confirmed at postmortem examination. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;64:184-9.
146. Rinne JO, Lee MS, Thompson PD, Marsden CD. Corticobasal degeneration. A clinical study of 36 cases. *Brain* 1994;117 (Pt 5):1183-96.
147. Boeve BF, Maraganore DM, Parisi JE, et al. Pathologic heterogeneity in clinically diagnosed corticobasal degeneration. *Neurology* 1999;53:795-800.

148. Boeve BF, Lang AE, Litvan I. Corticobasal degeneration and its relationship to progressive supranuclear palsy and frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 2003;54 Suppl 5:S15-9.
149. Savoirdo M, Grisoli M, Girotti F. Magnetic resonance imaging in CBD, related atypical parkinsonian disorders, and dementias. *Adv Neurol* 2000;82:197-208.
150. Dickson DW, Bergeron C, Chin SS, et al. Office of Rare Diseases neuropathologic criteria for corticobasal degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:935-46.
151. Nath U, Ben-Shlomo Y, Thomson RG, Lees AJ, Burn DJ. Clinical features and natural history of progressive supranuclear palsy: a clinical cohort study. *Neurology* 2003;60:910-6.
152. Williams DR, Lees AJ. Progressive supranuclear palsy: clinicopathological concepts and diagnostic challenges. *Lancet Neurol* 2009;8:270-9.
153. Litvan I, Hauw JJ, Bartko JJ, et al. Validity and reliability of the preliminary NINDS neuropathologic criteria for progressive supranuclear palsy and related disorders. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55:97-105.
154. WHO. Global surveillance, diagnosis and therapy of human transmissible spongiform encephalopathies. Report of a WHO Consultation. WHO (ed), World Health Organization, Geneva 1998.
155. Ladogana A, Puopolo M, Croes EA, et al. Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia, and Canada. *Neurology* 2005;64:1586-91.
156. Wadsworth JD, Collinge J. Update on human prion disease. *Biochim Biophys Acta* 2007;1772:598-609.
157. Kovacs GG, Puopolo M, Ladogana A, et al. Genetic prion disease: the EUROCCJD experience. *Hum Genet* 2005;118:166-74.
158. Mead S. Prion disease genetics. *Eur J Hum Genet* 2006;14:273-81.
159. Collinge J, Whitfield J, McKintosh E, et al. Kuru in the 21st century--an acquired human prion disease with very long incubation periods. *Lancet* 2006;367:2068-74.
160. Brandel JP, Salomon D, Capek I, Vaillant V, Alperovitch A. [Epidemiological surveillance of Creutzfeldt-Jakob in France]. *Rev Neurol (Paris)* 2009;165:684-93.
161. Chazot G, Broussolle E, Lapras C, Blattler T, Aguzzi A, Kopp N. New variant of Creutzfeldt-Jakob disease in a 26-year-old French man. *Lancet* 1996;347:1181.
162. Will RG, Ironside JW, Zeidler M, et al. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 1996;347:921-5.
163. Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 1996;383:685-90.
164. Herzog C, Sales N, Etchegaray N, et al. Tissue distribution of bovine spongiform encephalopathy agent in primates after intravenous or oral infection. *Lancet* 2004;363:422-8.
165. Knight R. Creutzfeldt-Jakob disease: a rare cause of dementia in elderly persons. *Clin Infect Dis* 2006;43:340-6.
166. Steinhoff BJ, Zerr I, Glatting M, Schulz-Schaeffer W, Poser S, Kretschmar HA. Diagnostic value of periodic complexes in Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 2004;56:702-8.
167. Schroter A, Zerr I, Henkel K, Tschampa HJ, Finkenstaedt M, Poser S. Magnetic resonance imaging in the clinical diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* 2000;57:1751-7.
168. Budka H, Aguzzi A, Brown P, et al. Neuropathological diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases). *Brain Pathol* 1995;5:459-66.
169. Kovacs GG, Preusser M, Strohschneider M, Budka H. Subcellular localization of disease-associated prion protein in the human brain. *Am J Pathol* 2005;166:287-94.
170. Hainfellner JA, Wanschitz J, Jellinger K, Liberski PP, Gullotta F, Budka H. Coexistence of Alzheimer-type neuropathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol* 1998;96:116-22.
171. Tsuchiya K, Yagishita S, Ikeda K, et al. Coexistence of CJD and Alzheimer's disease: an autopsy case showing typical clinical features of CJD. *Neuropathology* 2004;24:46-55.
172. Haraguchi T, Terada S, Ishizu H, et al. Coexistence of Creutzfeldt-Jakob disease, Lewy body disease, and Alzheimer's disease pathology: an autopsy case showing typical clinical features of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathology* 2009;29:454-9.
173. Kovacs GG, Seguin J, Quadrio I, et al. Genetic Creutzfeldt-Jakob disease associated with the E200K mutation: characterization of a complex proteinopathy. *Acta Neuropathol* 2011;121:39-57.

174. Price JL, Morris JC. Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1999;45:358-68.
175. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* 1999;56:303-8.
176. Crook T, Bahar H, Sudilovsky A. Age-associated memory impairment: diagnostic criteria and treatment strategies. *Int J Neurol* 1987;21-22:73-82.
177. Levy R. Aging-associated cognitive decline. Working Party of the International Psychogeriatric Association in collaboration with the World Health Organization. *Int Psychogeriatr* 1994;6:63-8.
178. Ebly EM, Hogan DB, Parhad IM. Cognitive impairment in the nondemented elderly. Results from the Canadian Study of Health and Aging. *Arch Neurol* 1995;52:612-9.
179. Petersen RC, Morris JC. Mild cognitive impairment as a clinical entity and treatment target. *Arch Neurol* 2005;62:1160-3; discussion 7.
180. Craig-Schapiro R, Fagan AM, Holtzman DM. Biomarkers of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 2009;35:128-40.
181. Dubois B, Albert ML. Amnesic MCI or prodromal Alzheimer's disease? *Lancet Neurol* 2004;3:246-8.
182. Petersen RC. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J Intern Med* 2004;256:183-94.
183. Fennema-Notestine C, McEvoy LK, Hagler DJ, Jr., Jacobson MW, Dale AM, The Alzheimer's Disease Neuroimaging I. Structural neuroimaging in the detection and prognosis of pre-clinical and early AD. *Behav Neurol* 2009;21:3-12.
184. Rinne JO, Nagren K. Positron emission tomography in at risk patients and in the progression of mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2010;19:291-300.
185. Jack CR, Jr., Wiste HJ, Vemuri P, et al. Brain beta-amyloid measures and magnetic resonance imaging atrophy both predict time-to-progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Brain* 2010;133:3336-48.
186. Bennett DA, Schneider JA, Bienias JL, Evans DA, Wilson RS. Mild cognitive impairment is related to Alzheimer disease pathology and cerebral infarctions. *Neurology* 2005;64:834-41.
187. Jicha GA, Parisi JE, Dickson DW, et al. Neuropathologic outcome of mild cognitive impairment following progression to clinical dementia. *Arch Neurol* 2006;63:674-81.
188. Pancrazi MP, Simeone I. Ethique et prescription chez le sujet atteint de maladie d'Alzheimer. *Ann méd psychol* 2000;158:158-89.
189. Selmes J, Derouesne C. [On the disclosure of the diagnosis of Alzheimer's disease]. *Psychol Neuropsychiatr Vieil* 2004;2:133-40.
190. Dubois B. Plaidoyer pour un diagnostic précoce de la maladie d'Alzheimer. *Gerontol Prat* 2006;179:1-2.
191. Arendt T. Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2009;118:167-79.
192. Scheff SW, Price DA. Alzheimer's disease-related alterations in synaptic density: neocortex and hippocampus. *J Alzheimers Dis* 2006;9:101-15.
193. Martin JB. Molecular basis of the neurodegenerative disorders. *N Engl J Med* 1999;340:1970-80.
194. Castellani RJ, Lee HG, Zhu X, Nunomura A, Perry G, Smith MA. Neuropathology of Alzheimer disease: pathognomonic but not pathogenic. *Acta Neuropathol (Berl)* 2006;111:503-9.
195. Munishkina LA, Cooper EM, Uversky VN, Fink AL. The effect of macromolecular crowding on protein aggregation and amyloid fibril formation. *J Mol Recognit* 2004;17:456-64.
196. Munishkina LA, Ahmad A, Fink AL, Uversky VN. Guiding protein aggregation with macromolecular crowding. *Biochemistry* 2008;47:8993-9006.
197. Sunde M, Serpell LC, Bartlam M, Fraser PE, Pepys MB, Blake CC. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J Mol Biol* 1997;273:729-39.
198. Linding R, Schymkowitz J, Rousseau F, Diella F, Serrano L. A comparative study of the relationship between protein structure and beta-aggregation in globular and intrinsically disordered proteins. *J Mol Biol* 2004;342:345-53.
199. Gamblin TC, Chen F, Zambrano A, et al. Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:10032-7.

200. Giasson BI, Forman MS, Higuchi M, et al. Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein. *Science* 2003;300:636-40.
201. Rissman RA, Poon WW, Blurton-Jones M, et al. Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. *J Clin Invest* 2004;114:121-30.
202. Moechars D, Dewachter I, Lorent K, et al. Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J Biol Chem* 1999;274:6483-92.
203. Klement IA, Skinner PJ, Kaytor MD, et al. Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Cell* 1998;95:41-53.
204. Kirkitadze MD, Bitan G, Teplow DB. Paradigm shifts in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: the emerging role of oligomeric assemblies. *J Neurosci Res* 2002;69:567-77.
205. Lansbury PT, Lashuel HA. A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic. *Nature* 2006;443:774-9.
206. Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, et al. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 2005;8:79-84.
207. Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, et al. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 2006;440:352-7.
208. Buée L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 2000;33:95-130.
209. Himmler A, Drechsel D, Kirschner MW, Martin DW, Jr. Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol Cell Biol* 1989;9:1381-8.
210. Gendron TF, Petrucelli L. The role of tau in neurodegeneration. *Mol Neurodegener* 2009;4:13.
211. Shahani N, Brandt R. Functions and malfunctions of the tau proteins. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:1668-80.
212. Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM. Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol* 2002;156:1051-63.
213. Sjoberg MK, Shestakova E, Mansuroglu Z, Maccioni RB, Bonnefoy E. Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *J Cell Sci* 2006;119:2025-34.
214. Johnson GV, Hartigan JA. Tau protein in normal and Alzheimer's disease brain: an update. *J Alzheimers Dis* 1999;1:329-51.
215. Reynolds CH, Garwood CJ, Wray S, et al. Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase Cgamma1, Grb2, and Src family kinases. *J Biol Chem* 2008;283:18177-86.
216. Lewczuk P, Esselmann H, Bibl M, et al. Tau protein phosphorylated at threonine 181 in CSF as a neurochemical biomarker in Alzheimer's disease: original data and review of the literature. *J Mol Neurosci* 2004;23:115-22.
217. Sternberger NH, Sternberger LA, Ulrich J. Aberrant neurofilament phosphorylation in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:4274-6.
218. Ulloa L, Montejo de Garcini E, Gomez-Ramos P, Moran MA, Avila J. Microtubule-associated protein MAP1B showing a fetal phosphorylation pattern is present in sites of neurofibrillary degeneration in brains of Alzheimer's disease patients. *Brain Res Mol Brain Res* 1994;26:113-22.
219. Vijayan S, El-Akkad E, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. A pool of beta-tubulin is hyperphosphorylated at serine residues in Alzheimer disease brain. *FEBS Lett* 2001;509:375-81.
220. Uversky VN, Winter S, Galzitskaya OV, Kittler L, Lober G. Hyperphosphorylation induces structural modification of tau-protein. *FEBS Lett* 1998;439:21-5.
221. Alonso A, Zaidi T, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:6923-8.
222. Alonso AC, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med* 1996;2:783-7.
223. Kidd M. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 1963;197:192-3.

224. Lee VM, Balin BJ, Otvos L, Jr., Trojanowski JQ. A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science* 1991;251:675-8.
225. Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, et al. Hyperphosphorylation of tau in PHF. *Neurobiol Aging* 1995;16:365-71; discussion 71-80.
226. Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, et al. Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J Biol Chem* 1995;270:823-9.
227. Liu F, Liang Z, Gong CX. Hyperphosphorylation of tau and protein phosphatases in Alzheimer disease. *Panminerva Med* 2006;48:97-108.
228. Garcia-Sierra F, Wischik CM, Harrington CR, Luna-Munoz J, Mena R. Accumulation of C-terminally truncated tau protein associated with vulnerability of the perforant pathway in early stages of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *J Chem Neuroanat* 2001;22:65-77.
229. Wischik CM, Novak M, Thogersen HC, et al. Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:4506-10.
230. Mena R, Edwards PC, Harrington CR, Mukaetova-Ladinska EB, Wischik CM. Staging the pathological assembly of truncated tau protein into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 1996;91:633-41.
231. Abraha A, Ghoshal N, Gamblin TC, et al. C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. *J Cell Sci* 2000;113 Pt 21:3737-45.
232. Guillozet-Bongaarts AL, Garcia-Sierra F, Reynolds MR, et al. Tau truncation during neurofibrillary tangle evolution in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2005;26:1015-22.
233. Garcia-Sierra F, Ghoshal N, Quinn B, Berry RW, Binder LI. Conformational changes and truncation of tau protein during tangle evolution in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2003;5:65-77.
234. Schneider A, Biernat J, von Bergen M, Mandelkow E, Mandelkow EM. Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* 1999;38:3549-58.
235. Uboga NV, Price JL. Formation of diffuse and fibrillar tangles in aging and early Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2000;21:1-10.
236. Ghoshal N, Garcia-Sierra F, Wu J, et al. Tau conformational changes correspond to impairments of episodic memory in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 2002;177:475-93.
237. Horowitz PM, Patterson KR, Guillozet-Bongaarts AL, et al. Early N-terminal changes and caspase-6 cleavage of tau in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2004;24:7895-902.
238. Binder LI, Guillozet-Bongaarts AL, Garcia-Sierra F, Berry RW. Tau, tangles, and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2005;1739:216-23.
239. Newman J, Rissman RA, Sarsoza F, et al. Caspase-cleaved tau accumulation in neurodegenerative diseases associated with tau and alpha-synuclein pathology. *Acta Neuropathol* 2005;110:135-44.
240. Guillozet-Bongaarts AL, Glajch KE, Libson EG, et al. Phosphorylation and cleavage of tau in non-AD tauopathies. *Acta Neuropathol* 2007;113:513-20.
241. Mondragon-Rodriguez S, Mena R, Binder LI, Smith MA, Perry G, Garcia-Sierra F. Conformational changes and cleavage of tau in Pick bodies parallel the early processing of tau found in Alzheimer pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2008;34:62-75.
242. Hrnkova M, Zilka N, Minichova Z, Koson P, Novak M. Neurodegeneration caused by expression of human truncated tau leads to progressive neurobehavioural impairment in transgenic rats. *Brain Res* 2007;1130:206-13.
243. Luna-Munoz J, Chavez-Macias L, Garcia-Sierra F, Mena R. Earliest Stages of Tau Conformational Changes are Related to the Appearance of a Sequence of Specific Phospho-Dependent Tau Epitopes in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2007;12:365-75.
244. Basurto-Islas G, Luna-Munoz J, Guillozet-Bongaarts AL, Binder LI, Mena R, Garcia-Sierra F. Accumulation of aspartic acid421- and glutamic acid391-cleaved tau in neurofibrillary tangles correlates with progression in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008;67:470-83.
245. Stanford PM, Shepherd CE, Halliday GM, et al. Mutations in the tau gene that cause an increase in three repeat tau and frontotemporal dementia. *Brain* 2003;126:814-26.

246. Zhao Z, Ho L, Suh J, et al. A role of P301L tau mutant in anti-apoptotic gene expression, cell cycle and apoptosis. *Mol Cell Neurosci* 2003;24:367-79.
247. Pollack M, Phaneuf S, Dirks A, Leeuwenburgh C. The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle, and heart. *Ann N Y Acad Sci* 2002;959:93-107.
248. Mondragon-Rodriguez S, Basurto-Islas G, Santa-Maria I, et al. Cleavage and conformational changes of tau protein follow phosphorylation during Alzheimer's disease. *Int J Exp Pathol* 2008;89:81-90.
249. Dickson DW, Crystal HA, Mattiace LA, et al. Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol Aging* 1992;13:179-89.
250. Liu F, Li B, Tung EJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX. Site-specific effects of tau phosphorylation on its microtubule assembly activity and self-aggregation. *Eur J Neurosci* 2007;26:3429-36.
251. von Bergen M, Friedhoff P, Biernat J, Heberle J, Mandelkow EM, Mandelkow E. Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:5129-34.
252. Friedhoff P, von Bergen M, Mandelkow EM, Davies P, Mandelkow E. A nucleated assembly mechanism of Alzheimer paired helical filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:15712-7.
253. Meraz-Rios MA, Lira-De Leon KI, Campos-Pena V, De Anda-Hernandez MA, Mena-Lopez R. Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2010;112:1353-67.
254. Khatoon S, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Brain levels of microtubule-associated protein tau are elevated in Alzheimer's disease: a radioimmuno-slot-blot assay for nanograms of the protein. *J Neurochem* 1992;59:750-3.
255. Deshpande A, Win KM, Busciglio J. Tau isoform expression and regulation in human cortical neurons. *Faseb J* 2008;22:2357-67.
256. Takahashi M, Tsujioka Y, Yamada T, et al. Glycosylation of microtubule-associated protein tau in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol* 1999;97:635-41.
257. Wang JZ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Glycosylation of microtubule-associated protein tau: an abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease. *Nat Med* 1996;2:871-5.
258. Ledesma MD, Bonay P, Colaco C, Avila J. Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments. *J Biol Chem* 1994;269:21614-9.
259. Ledesma MD, Bonay P, Avila J. Tau protein from Alzheimer's disease patients is glycosylated at its tubulin-binding domain. *J Neurochem* 1995;65:1658-64.
260. Horiguchi T, Uryu K, Giasson BI, et al. Nitration of tau protein is linked to neurodegeneration in tauopathies. *Am J Pathol* 2003;163:1021-31.
261. Reynolds MR, Reyes JF, Fu Y, et al. Tau nitration occurs at tyrosine 29 in the fibrillar lesions of Alzheimer's disease and other tauopathies. *J Neurosci* 2006;26:10636-45.
262. Alonso A, Li B, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Polymerization of hyperphosphorylated tau into filaments eliminates its inhibitory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:8864-9.
263. Andorfer C, Acker CM, Kress Y, Hof PR, Duff K, Davies P. Cell-cycle reentry and cell death in transgenic mice expressing nonmutant human tau isoforms. *J Neurosci* 2005;25:5446-54.
264. Keck S, Nitsch R, Grune T, Ullrich O. Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2003;85:115-22.
265. Sergeant N, Delacourte A, Buee L. Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 2005;1739:179-97.
266. Buee L, Delacourte A. Tau phosphorylation. *Functional neurobiology of aging* 2001;Hof P., Mobbs C.V., Ed. Academic Press.:315-32.
267. Sergeant N, David JP, Goedert M, et al. Two-dimensional characterization of paired helical filament-tau from Alzheimer's disease: demonstration of an additional 74-kDa component and age-related biochemical modifications. *J Neurochem* 1997;69:834-44.
268. Panda D, Samuel JC, Massie M, Feinstein SC, Wilson L. Differential regulation of microtubule dynamics by three- and four-repeat tau: implications for the onset of neurodegenerative disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:9548-53.
269. Goedert M, Jakes R. Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 2005;1739:240-50.

270. D'Souza I, Schellenberg GD. Regulation of tau isoform expression and dementia. *Biochim Biophys Acta* 2005;1739:104-15.
271. Haass C, Selkoe DJ. Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell* 1993;75:1039-42.
272. Skovronsky DM, Lee VM, Trojanowski JQ. Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. *Annu Rev Pathol* 2006;1:151-70.
273. Kirkitadze MD, Condrón MM, Teplow DB. Identification and characterization of key kinetic intermediates in amyloid beta-protein fibrillogenesis. *J Mol Biol* 2001;312:1103-19.
274. Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, et al. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 1994;264:1336-40.
275. Scheuner D, Eckman C, Jensen M, et al. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 1996;2:864-70.
276. Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* 1994;13:45-53.
277. Gravina SA, Ho L, Eckman CB, et al. Amyloid beta protein (A beta) in Alzheimer's disease brain. Biochemical and immunocytochemical analysis with antibodies specific for forms ending at A beta 40 or A beta 42(43). *J Biol Chem* 1995;270:7013-6.
278. Barrow CJ, Zagorski MG. Solution structures of beta peptide and its constituent fragments: relation to amyloid deposition. *Science* 1991;253:179-82.
279. Sergeant N, Bombois S, Ghestem A, et al. Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach. *J Neurochem* 2003;85:1581-91.
280. Vanderstichele H, De Meyer G, Andreasen N, et al. Amino-truncated beta-amyloid42 peptides in cerebrospinal fluid and prediction of progression of mild cognitive impairment. *Clin Chem* 2005;51:1650-60.
281. Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT, Jr. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 1993;32:4693-7.
282. Simmons LK, May PC, Tomaselli KJ, et al. Secondary structure of amyloid beta peptide correlates with neurotoxic activity in vitro. *Mol Pharmacol* 1994;45:373-9.
283. Walsh DM, Selkoe DJ. Abeta Oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem* 2007.
284. Lesne S, Kotilinek L, Ashe KH. Plaque-bearing mice with reduced levels of oligomeric amyloid-beta assemblies have intact memory function. *Neuroscience* 2008;151:745-9.
285. Villemagne VL, Fodero-Tavoletti MT, Pike KE, Cappai R, Masters CL, Rowe CC. The ART of loss: Abeta imaging in the evaluation of Alzheimer's disease and other dementias. *Mol Neurobiol* 2008;38:1-15.
286. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992;256:184-5.
287. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002;297:353-6.
288. Morris JC, Storandt M, McKeel DW, Jr., et al. Cerebral amyloid deposition and diffuse plaques in "normal" aging: Evidence for presymptomatic and very mild Alzheimer's disease. *Neurology* 1996;46:707-19.
289. Marti MJ, Tolosa E, Campdelacreu J. Clinical overview of the synucleinopathies. *Mov Disord* 2003;18 Suppl 6:S21-7.
290. Jellinger KA. Neuropathological spectrum of synucleinopathies. *Mov Disord* 2003;18 Suppl 6:S2-12.
291. Mukaetova-Ladinska EB, McKeith IG. Pathophysiology of synuclein aggregation in Lewy body disease. *Mech Ageing Dev* 2006;127:188-202.
292. Iwai A. Properties of NACP/alpha-synuclein and its role in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2000;1502:95-109.

293. Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, et al. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 2000;25:239-52.
294. Kim TD, Paik SR, Yang CH. Structural and functional implications of C-terminal regions of alpha-synuclein. *Biochemistry* 2002;41:13782-90.
295. Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Cairns NJ, Lantos PL, Goedert M. Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci Lett* 1998;251:205-8.
296. Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:6469-73.
297. El-Agnaf OM, Irvine GB. Review: formation and properties of amyloid-like fibrils derived from alpha-synuclein and related proteins. *J Struct Biol* 2000;130:300-9.
298. El-Agnaf OM, Irvine GB. Aggregation and neurotoxicity of alpha-synuclein and related peptides. *Biochem Soc Trans* 2002;30:559-65.
299. Beyer K, Lao JI, Carrato C, et al. Differential expression of alpha-synuclein isoforms in dementia with Lewy bodies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2004;30:601-7.
300. Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, et al. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 2002;4:160-4.
301. Giasson BI, Duda JE, Murray IV, et al. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* 2000;290:985-9.
302. Tofaris GK, Razaq A, Ghetti B, Lilley KS, Spillantini MG. Ubiquitination of alpha-synuclein in Lewy bodies is a pathological event not associated with impairment of proteasome function. *J Biol Chem* 2003;278:44405-11.
303. Harris DA. Cellular biology of prion diseases. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:429-44.
304. Oesch B, Westaway D, Walchli M, et al. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 1985;40:735-46.
305. Lopez Garcia F, Zahn R, Riek R, Wuthrich K. NMR structure of the bovine prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:8334-9.
306. Burns CS, Aronoff-Spencer E, Dunham CM, et al. Molecular features of the copper binding sites in the octarepeat domain of the prion protein. *Biochemistry* 2002;41:3991-4001.
307. Cervia JS, Sowemimo-Coker SO, Ortolano GA, Wilkins K, Schaffer J, Wortham ST. An overview of prion biology and the role of blood filtration in reducing the risk of transfusion-transmitted variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Transfus Med Rev* 2006;20:190-206.
308. Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:13363-83.
309. Chesebro B, Race R, Wehrly K, et al. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* 1985;315:331-3.
310. Collins SJ, Sanchez-Juan P, Masters CL, et al. Determinants of diagnostic investigation sensitivities across the clinical spectrum of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* 2006;129:2278-87.
311. Kaski D, Mead S, Hyare H, et al. Variant CJD in an individual heterozygous for PRNP codon 129. *Lancet* 2009;374:2128.
312. Caughey B, Baron GS. Prions and their partners in crime. *Nature* 2006;443:803-10.
313. Glatzel M, Stoeck K, Seeger H, Luhrs T, Aguzzi A. Human prion diseases: molecular and clinical aspects. *Arch Neurol* 2005;62:545-52.
314. Aguzzi A, Polymenidou M. Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell* 2004;116:313-27.
315. Kuo PH, Doudeva LG, Wang YT, Shen CK, Yuan HS. Structural insights into TDP-43 in nucleic-acid binding and domain interactions. *Nucleic Acids Res* 2009;37:1799-808.
316. Aeschlimann D, Thomazy V. Protein crosslinking in assembly and remodelling of extracellular matrices: the role of transglutaminases. *Connect Tissue Res* 2000;41:1-27.
317. Kahlem P, Green H, Djian P. Transglutaminase action imitates Huntington's disease: selective polymerization of Huntingtin containing expanded polyglutamine. *Mol Cell* 1998;1:595-601.
318. Kim SY, Grant P, Lee JH, Pant HC, Steinert PM. Differential expression of multiple transglutaminases in human brain. Increased expression and cross-linking by transglutaminases 1 and 2 in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 1999;274:30715-21.

319. Citron BA, Suo Z, SantaCruz K, Davies PJ, Qin F, Festoff BW. Protein crosslinking, tissue transglutaminase, alternative splicing and neurodegeneration. *Neurochem Int* 2002;40:69-78.
320. Miller ML, Johnson GV. Transglutaminase cross-linking of the tau protein. *J Neurochem* 1995;65:1760-70.
321. Ikura K, Takahata K, Sasaki R. Cross-linking of a synthetic partial-length (1-28) peptide of the Alzheimer beta/A4 amyloid protein by transglutaminase. *FEBS Lett* 1993;326:109-11.
322. Jensen PH, Sorensen ES, Petersen TE, Gliemann J, Rasmussen LK. Residues in the synuclein consensus motif of the alpha-synuclein fragment, NAC, participate in transglutaminase-catalysed cross-linking to Alzheimer-disease amyloid beta A4 peptide. *Biochem J* 1995;310 (Pt 1):91-4.
323. Zemaitaitis MO, Kim SY, Halverson RA, Troncoso JC, Lee JM, Muma NA. Transglutaminase activity, protein, and mRNA expression are increased in progressive supranuclear palsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:173-84.
324. Nemes Z, Devreese B, Steinert PM, Van Beeumen J, Fesus L. Cross-linking of ubiquitin, HSP27, parkin, and alpha-synuclein by gamma-glutamyl-epsilon-lysine bonds in Alzheimer's neurofibrillary tangles. *Faseb J* 2004;18:1135-7.
325. Norlund MA, Lee JM, Zainelli GM, Muma NA. Elevated transglutaminase-induced bonds in PHF tau in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1999;851:154-63.
326. Singer SM, Zainelli GM, Norlund MA, Lee JM, Muma NA. Transglutaminase bonds in neurofibrillary tangles and paired helical filament tau early in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 2002;40:17-30.
327. Dudek SM, Johnson GV. Transglutaminase facilitates the formation of polymers of the beta-amyloid peptide. *Brain Res* 1994;651:129-33.
328. Junn E, Ronchetti RD, Quezado MM, Kim SY, Mouradian MM. Tissue transglutaminase-induced aggregation of alpha-synuclein: Implications for Lewy body formation in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:2047-52.
329. Andringa G, Lam KY, Chegary M, Wang X, Chase TN, Bennett MC. Tissue transglutaminase catalyzes the formation of alpha-synuclein crosslinks in Parkinson's disease. *Faseb J* 2004;18:932-4.
330. Aguzzi A, O'Connor T. Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:237-48.
331. Bulic B, Pickhardt M, Mandelkow EM, Mandelkow E. Tau protein and tau aggregation inhibitors. *Neuropharmacology* 2010.
332. Ono K, Hirohata M, Yamada M. Alpha-synuclein assembly as a therapeutic target of Parkinson's disease and related disorders. *Curr Pharm Des* 2008;14:3247-66.
333. Kaye R, Jackson GR. Prefilament tau species as potential targets for immunotherapy for Alzheimer disease and related disorders. *Curr Opin Immunol* 2009;21:359-63.
334. Ludewigs H, Zuber C, Vana K, Nikles D, Zerr I, Weiss S. Therapeutic approaches for prion disorders. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007;5:613-30.
335. Tabira T. Immunization therapy for Alzheimer disease: a comprehensive review of active immunization strategies. *The Tohoku journal of experimental medicine* 2010;220:95-106.
336. Solomon B, Frenkel D. Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 2010.
337. Orgogozo JM, Gilman S, Dartigues JF, et al. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* 2003;61:46-54.
338. Boche D, Denham N, Holmes C, Nicoll JA. Neuropathology after active Abeta42 immunotherapy: implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *Acta Neuropathol* 2010;120:369-84.
339. Salloway S, Sperling R, Gilman S, et al. A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* 2009;73:2061-70.
340. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, et al. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* 2007;6:734-46.
341. Wiltfang J, Lewczuk P, Riederer P, et al. Consensus paper of the WFSBP Task Force on Biological Markers of Dementia: the role of CSF and blood analysis in the early and differential diagnosis of dementia. *World J Biol Psychiatry* 2005;6:69-84.
342. Blennow K, Wallin A, Hager O. Low frequency of post-lumbar puncture headache in demented patients. *Acta Neurol Scand* 1993;88:221-3.

343. Schoonenboom NS, van der Flier WM, Blankenstein MA, et al. CSF and MRI markers independently contribute to the diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2008;29:669-75.
344. Engelborghs S, De Vreese K, Van de Casteele T, et al. Diagnostic performance of a CSF-biomarker panel in autopsy-confirmed dementia. *Neurobiol Aging* 2008;29:1143-59.
345. Parnetti L, Lanari A, Silvestrelli G, Saggese E, Reboldi P. Diagnosing prodromal Alzheimer's disease: role of CSF biochemical markers. *Mech Ageing Dev* 2006;127:129-32.
346. Hort J, Bartos A, Pirttila T, Scheltens P. Use of cerebrospinal fluid biomarkers in diagnosis of dementia across Europe. *Eur J Neurol* 2010;17:90-6.
347. Andreasen N, Minthon L, Davidsson P, et al. Evaluation of CSF-tau and CSF-Abeta42 as diagnostic markers for Alzheimer disease in clinical practice. *Arch Neurol* 2001;58:373-9.
348. Riemenschneider M, Buch K, Schmolke M, Kurz A, Guder WG. Cerebrospinal protein tau is elevated in early Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1996;212:209-11.
349. Green AJ, Harvey RJ, Thompson EJ, Rossor MN. Increased tau in the cerebrospinal fluid of patients with frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1999;259:133-5.
350. Riemenschneider M, Lautenschlager N, Wagenpfeil S, Diehl J, Drzezga A, Kurz A. Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid 42 proteins identify Alzheimer disease in subjects with mild cognitive impairment. *Arch Neurol* 2002;59:1729-34.
351. Lewczuk P, Esselmann H, Otto M, et al. Neurochemical diagnosis of Alzheimer's dementia by CSF Abeta42, Abeta42/Abeta40 ratio and total tau. *Neurobiol Aging* 2004;25:273-81.
352. Grossman M, Farmer J, Leight S, et al. Cerebrospinal fluid profile in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2005;57:721-9.
353. Tapiola T, Overmyer M, Lehtovirta M, et al. The level of cerebrospinal fluid tau correlates with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 1997;8:3961-3.
354. Clark CM, Xie S, Chittams J, et al. Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid: how well do these biomarkers reflect autopsy-confirmed dementia diagnoses? *Arch Neurol* 2003;60:1696-702.
355. Otto M, Wiltfang J, Tumani H, et al. Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett* 1997;225:210-2.
356. Van Everbroeck B, Quoilin S, Boons J, Martin JJ, Cras P. A prospective study of CSF markers in 250 patients with possible Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:1210-4.
357. Hesse C, Rosengren L, Vanmechelen E, et al. Cerebrospinal fluid markers for Alzheimer's disease evaluated after acute ischemic stroke. *J Alzheimers Dis* 2000;2:199-206.
358. Hampel H, Teipel SJ, Fuchsberger T, et al. Value of CSF beta-amyloid1-42 and tau as predictors of Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Mol Psychiatry* 2004;9:705-10.
359. Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Londos E, Blennow K, Minthon L. Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *Lancet Neurol* 2006;5:228-34.
360. Otto M, Wiltfang J, Cepek L, et al. Tau protein and 14-3-3 protein in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 2002;58:192-7.
361. Sanchez-Juan P, Green A, Ladogana A, et al. CSF tests in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 2006;67:637-43.
362. Chen C, Shi Q, Zhang BY, et al. The prepared tau exon-specific antibodies revealed distinct profiles of tau in CSF of the patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *PLoS One* 2010;5:e11886.
363. Pijnenburg YA, Schoonenboom NS, Rosso SM, et al. CSF tau and Abeta42 are not useful in the diagnosis of frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 2004;62:1649.
364. Riemenschneider M, Wagenpfeil S, Diehl J, et al. Tau and Abeta42 protein in CSF of patients with frontotemporal degeneration. *Neurology* 2002;58:1622-8.
365. Urakami K, Wada K, Arai H, et al. Diagnostic significance of tau protein in cerebrospinal fluid from patients with corticobasal degeneration or progressive supranuclear palsy. *J Neurol Sci* 2001;183:95-8.
366. Borroni B, Gardoni F, Parnetti L, et al. Pattern of Tau forms in CSF is altered in progressive supranuclear palsy. *Neurobiol Aging* 2009;30:34-40.

367. Hampel H, Buerger K, Zinkowski R, et al. Measurement of phosphorylated tau epitopes in the differential diagnosis of Alzheimer disease: a comparative cerebrospinal fluid study. *Arch Gen Psychiatry* 2004;61:95-102.
368. Vanmechelen E, Vanderstichele H, Davidsson P, et al. Quantification of tau phosphorylated at threonine 181 in human cerebrospinal fluid: a sandwich ELISA with a synthetic phosphopeptide for standardization. *Neurosci Lett* 2000;285:49-52.
369. Parnetti L, Lanari A, Amici S, Gallai V, Vanmechelen E, Hulstaert F. CSF phosphorylated tau is a possible marker for discriminating Alzheimer's disease from dementia with Lewy bodies. Phospho-Tau International Study Group. *Neurol Sci* 2001;22:77-8.
370. Itoh N, Arai H, Urakami K, et al. Large-scale, multicenter study of cerebrospinal fluid tau protein phosphorylated at serine 199 for the antemortem diagnosis of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2001;50:150-6.
371. Buerger K, Zinkowski R, Teipel SJ, et al. Differential diagnosis of Alzheimer disease with cerebrospinal fluid levels of tau protein phosphorylated at threonine 231. *Arch Neurol* 2002;59:1267-72.
372. Andreasen N, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Davidsson P, Blennow K. Cerebrospinal fluid levels of total-tau, phospho-tau and A beta 42 predicts development of Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Acta Neurol Scand Suppl* 2003;179:47-51.
373. Herukka SK, Hallikainen M, Soininen H, Pirttila T. CSF Abeta42 and tau or phosphorylated tau and prediction of progressive mild cognitive impairment. *Neurology* 2005;64:1294-7.
374. Buerger K, Teipel SJ, Zinkowski R, et al. CSF tau protein phosphorylated at threonine 231 correlates with cognitive decline in MCI subjects. *Neurology* 2002;59:627-9.
375. Wallin AK, Blennow K, Andreasen N, Minthon L. CSF biomarkers for Alzheimer's Disease: levels of beta-amyloid, tau, phosphorylated tau relate to clinical symptoms and survival. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2006;21:131-8.
376. Maccioni RB, Lavados M, Guillon M, et al. Anomalously phosphorylated tau and A beta fragments in the CSF correlates with cognitive impairment in MCI subjects. *Neurobiol Aging* 2006;27:237-44.
377. Vanderstichele H, De Vreese K, Blennow K, et al. Analytical performance and clinical utility of the INNOTEST PHOSPHO-TAU181P assay for discrimination between Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:1472-80.
378. Schoonenboom NS, Pijnenburg YA, Mulder C, et al. Amyloid beta(1-42) and phosphorylated tau in CSF as markers for early-onset Alzheimer disease. *Neurology* 2004;62:1580-4.
379. Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow EM, Hyman BT. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 2002;103:26-35.
380. Mitchell AJ. CSF Phosphorylated Tau in the Diagnosis and Prognosis of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease - A Meta-analysis of 51 Studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009.
381. Buerger K, Ewers M, Pirttila T, et al. CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain* 2006;129:3035-41.
382. Brys M, Pirraglia E, Rich K, et al. Prediction and longitudinal study of CSF biomarkers in mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 2009;30:682-90.
383. Hampel H, Buerger K, Kohnken R, et al. Tracking of Alzheimer's disease progression with cerebrospinal fluid tau protein phosphorylated at threonine 231. *Ann Neurol* 2001;49:545-6.
384. Maurage CA, Sergeant N, Ruchoux MM, Hauw JJ, Delacourte A. Phosphorylated serine 199 of microtubule-associated protein tau is a neuronal epitope abundantly expressed in youth and an early marker of tau pathology. *Acta Neuropathol (Berl)* 2003;105:89-97.
385. Arai H, Ishiguro K, Ohno H, et al. CSF phosphorylated tau protein and mild cognitive impairment: a prospective study. *Exp Neurol* 2000;166:201-3.
386. Hu YY, He SS, Wang X, et al. Levels of nonphosphorylated and phosphorylated tau in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients : an ultrasensitive bienzyme-substrate-recycle enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Pathol* 2002;160:1269-78.
387. Bitsch A, Horn C, Kemmling Y, et al. Serum tau protein level as a marker of axonal damage in acute ischemic stroke. *Eur Neurol* 2002;47:45-51.

388. Mollenhauer B, Bibl M, Trenkwalder C, et al. Follow-up investigations in cerebrospinal fluid of patients with dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2005;112:933-48.
389. Wiltfang J, Esselmann H, Smirnov A, et al. Beta-amyloid peptides in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 2003;54:263-7.
390. Blennow K. Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *NeuroRx* 2004;1:213-25.
391. Strozyk D, Blennow K, White LR, Launer LJ. CSF Abeta 42 levels correlate with amyloid-neuropathology in a population-based autopsy study. *Neurology* 2003;60:652-6.
392. Fagan AM, Mintun MA, Mach RH, et al. Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans. *Ann Neurol* 2006;59:512-9.
393. Skoog I, Davidsson P, Aevarsson O, Vanderstichele H, Vanmechelen E, Blennow K. Cerebrospinal fluid beta-amyloid 42 is reduced before the onset of sporadic dementia: a population-based study in 85-year-olds. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2003;15:169-76.
394. Stefani A, Martorana A, Bernardini S, et al. CSF markers in Alzheimer disease patients are not related to the different degree of cognitive impairment. *J Neurol Sci* 2006;251:124-8.
395. Galasko D, Chang L, Motter R, et al. High cerebrospinal fluid tau and low amyloid beta42 levels in the clinical diagnosis of Alzheimer disease and relation to apolipoprotein E genotype. *Arch Neurol* 1998;55:937-45.
396. Pitschke M, Prior R, Haupt M, Riesner D. Detection of single amyloid beta-protein aggregates in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's patients by fluorescence correlation spectroscopy. *Nat Med* 1998;4:832-4.
397. Fukumoto H, Tokuda T, Kasai T, et al. High-molecular-weight beta-amyloid oligomers are elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. *Faseb J* 2010;24:2716-26.
398. Wiltfang J, Esselmann H, Bibl M, et al. Highly conserved and disease-specific patterns of carboxyterminally truncated Abeta peptides 1-37/38/39 in addition to 1-40/42 in Alzheimer's disease and in patients with chronic neuroinflammation. *J Neurochem* 2002;81:481-96.
399. Wiltfang J, Esselmann H, Bibl M, et al. Amyloid beta peptide ratio 42/40 but not A beta 42 correlates with phospho-Tau in patients with low- and high-CSF A beta 40 load. *J Neurochem* 2007;101:1053-9.
400. Krolak-Salmon P, Seguin J, Perret-Liaudet A, Desestret V, Vighetto A, Bonnefoy M. [Near a biological diagnosis of Alzheimer's disease and related disorders.]. *Rev Med Interne* 2008.
401. Gabelle A, Roche S, Geny C, et al. Correlations between soluble alpha/beta forms of amyloid precursor protein and Abeta38, 40, and 42 in human cerebrospinal fluid. *Brain Res* 2010;1357:175-83.
402. Lewczuk P, Esselmann H, Meyer M, et al. The amyloid-beta (Abeta) peptide pattern in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease: evidence of a novel carboxyterminally elongated Abeta peptide. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003;17:1291-6.
403. Bibl M, Mollenhauer B, Lewczuk P, et al. Validation of amyloid-beta peptides in CSF diagnosis of neurodegenerative dementias. *Mol Psychiatry* 2007.
404. Portelius E, Zetterberg H, Andreasson U, et al. An Alzheimer's disease-specific beta-amyloid fragment signature in cerebrospinal fluid. *Neurosci Lett* 2006;409:215-9.
405. Bibl M, Mollenhauer B, Esselmann H, et al. CSF amyloid-beta-peptides in Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease dementia. *Brain* 2006;129:1177-87.
406. Tang K, Hynan LS, Baskin F, Rosenberg RN. Platelet amyloid precursor protein processing: a bio-marker for Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 2006;240:53-8.
407. van Oijen M, Hofman A, Soares HD, Koudstaal PJ, Breteler MM. Plasma Abeta(1-40) and Abeta(1-42) and the risk of dementia: a prospective case-cohort study. *Lancet Neurol* 2006;5:655-60.
408. Seppälä TT, Herukka SK, Hänninen T, et al. Plasma Abeta42 and Abeta40 as markers of cognitive change in follow-up: a prospective, longitudinal, population-based cohort study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010;81:1123-7.
409. Gurol ME, Irizarry MC, Smith EE, et al. Plasma beta-amyloid and white matter lesions in AD, MCI, and cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* 2006;66:23-9.
410. Lewczuk P, Esselmann H, Bibl M, et al. Electrophoretic separation of amyloid beta peptides in plasma. *Electrophoresis* 2004;25:3336-43.

411. Raghavan R, Kruijff L, Sterrenburg MD, Rogers BB, Hladik CL, White CL, 3rd. Alpha-synuclein expression in the developing human brain. *Pediatr Dev Pathol* 2004;7:506-16.
412. Borghi R, Marchese R, Negro A, et al. Full length alpha-synuclein is present in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease and normal subjects. *Neurosci Lett* 2000;287:65-7.
413. El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, et al. Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *Faseb J* 2003;17:1945-7.
414. Tokuda T, Salem SA, Allsop D, et al. Decreased alpha-synuclein in cerebrospinal fluid of aged individuals and subjects with Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;349:162-6.
415. Kasuga K, Tokutake T, Ishikawa A, et al. Differential levels of alpha-synuclein, beta-amyloid42 and tau in CSF between patients with dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010;81:608-10.
416. El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, et al. Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *Faseb J* 2006;20:419-25.
417. Ono K, Noguchi-Shinohara M, Yoshita M, Naiki H, Yamada M. Cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies patients enhances alpha-synuclein fibril formation in vitro. *Exp Neurol* 2007;203:579-83.
418. Mukaetova-Ladinska EB, Milne J, Andras A, et al. Alpha- and gamma-synuclein proteins are present in cerebrospinal fluid and are increased in aged subjects with neurodegenerative and vascular changes. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2008;26:32-42.
419. Spies PE, Melis RJ, Sjogren MJ, Rikkert MG, Verbeek MM. Cerebrospinal fluid alpha-synuclein does not discriminate between dementia disorders. *J Alzheimers Dis* 2009;16:363-9.
420. Ballard C, Jones EL, Londos E, Minthon L, Francis P, Aarsland D. alpha-Synuclein antibodies recognize a protein present at lower levels in the CSF of patients with dementia with Lewy bodies. *Int Psychogeriatr* 2010;22:321-7.
421. Noguchi-Shinohara M, Tokuda T, Yoshita M, et al. CSF alpha-synuclein levels in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. *Brain Res* 2009;1251:1-6.
422. Öhrfelt A, Grognet P, Andreasen N, et al. Cerebrospinal fluid alpha-synuclein in neurodegenerative disorders-a marker of synapse loss? *Neurosci Lett* 2009;450:332-5.
423. Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Braunfeld MB, Barry RA, Prusiner SB. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:2310-4.
424. Grassi J, Creminon C, Frobert Y, et al. Specific determination of the proteinase K-resistant form of the prion protein using two-site immunometric assays. Application to the post-mortem diagnosis of BSE. *Arch Virol Suppl* 2000:197-205.
425. Haik S, Faucheux BA, Szadovitch V, et al. The sympathetic nervous system is involved in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Nat Med* 2003;9:1121-3.
426. Hill AF, Butterworth RJ, Joiner S, et al. Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet* 1999;353:183-9.
427. Hilton DA, Sutak J, Smith ME, et al. Specificity of lymphoreticular accumulation of prion protein for variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Clin Pathol* 2004;57:300-2.
428. Wadsworth JD, Joiner S, Hill AF, et al. Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* 2001;358:171-80.
429. Favereaux A, Quadrio I, Vital C, et al. Pathologic prion protein spreading in the peripheral nervous system of a patient with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* 2004;61:747-50.
430. Glatzel M, Abela E, Maissen M, Aguzzi A. Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 2003;349:1812-20.
431. Zanusso G, Ferrari S, Cardone F, et al. Detection of pathologic prion protein in the olfactory epithelium in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 2003;348:711-9.
432. Tagliavini F, Prelli F, Porro M, Salmona M, Bugiani O, Frangione B. A soluble form of prion protein in human cerebrospinal fluid: implications for prion-related encephalopathies. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;184:1398-404.

433. Bieschke J, Giese A, Schulz-Schaeffer W, et al. Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:5468-73.
434. Wong BS, Green AJ, Li R, et al. Absence of protease-resistant prion protein in the cerebrospinal fluid of Creutzfeldt-Jakob disease. *J Pathol* 2001;194:9-14.
435. Orru CD, Wilham JM, Hughson AG, et al. Human variant Creutzfeldt-Jakob disease and sheep scrapie PrP(res) detection using seeded conversion of recombinant prion protein. *Protein Eng Des Sel* 2009;22:515-21.
436. Meyne F, Gloeckner SF, Ciesielczyk B, et al. Total prion protein levels in the cerebrospinal fluid are reduced in patients with various neurological disorders. *J Alzheimers Dis* 2009;17:863-73.
437. Roberts TK, Eugenin EA, Morgello S, Clements JE, Zink MC, Berman JW. PrPC, the cellular isoform of the human prion protein, is a novel biomarker of HIV-associated neurocognitive impairment and mediates neuroinflammation. *Am J Pathol* 2010;177:1848-60.
438. Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, et al. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 2004;363:417-21.
439. HPA. Fourth case of variant CJD infection associated with blood transfusion. Health Protection Agency, United Kingdom 2007;1:2-3.
440. Hewitt PE, Llewelyn CA, Mackenzie J, Will RG. Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion: results of the UK Transfusion Medicine Epidemiological Review study. *Vox Sang* 2006;91:221-30.
441. Tattum MH, Jones S, Pal S, Khalili-Shirazi A, Collinge J, Jackson GS. A highly sensitive immunoassay for the detection of prion-infected material in whole human blood without the use of proteinase K. *Transfusion* 2010;50:2619-27.
442. Shaked GM, Shaked Y, Kariv-Inbal Z, Halimi M, Avraham I, Gabizon R. A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases. *J Biol Chem* 2001;276:31479-82.
443. Furukawa H, Doh-ura K, Okuwaki R, et al. A pitfall in diagnosis of human prion diseases using detection of protease-resistant prion protein in urine. Contamination with bacterial outer membrane proteins. *J Biol Chem* 2004;279:23661-7.
444. Dabaghian R, Zerr I, Heinemann U, Zanusso G. Detection of proteinase K resistant proteins in the urine of patients with Creutzfeldt-Jakob and other neurodegenerative diseases. *Prion* 2008;2:170-8.
445. Gonzalez-Romero D, Barria MA, Leon P, Morales R, Soto C. Detection of infectious prions in urine. *FEBS Lett* 2008;582:3161-6.
446. Mathiason CK, Powers JG, Dahmes SJ, et al. Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease. *Science* 2006;314:133-6.
447. Wallin AK, Blennow K, Zetterberg H, Londos E, Minthon L, Hansson O. CSF biomarkers predict a more malignant outcome in Alzheimer disease. *Neurology* 2010;74:1531-7.
448. Baumann TP, Duyar H, Sollberger M, et al. CSF-Tau and CSF-Abeta(1-42) in Posterior Cortical Atrophy. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2010;29:530-3.
449. Seguin J, Formaglio M, Perret-Liaudet A, et al. Cerebrospinal Fluid biomarkers in posterior cortical atrophy. *Neurology* in press.
450. Gomez-Tortosa E, Gonzalo I, Fanjul S, et al. Cerebrospinal fluid markers in dementia with lewy bodies compared with Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2003;60:1218-22.
451. Kapaki E, Paraskevas GP, Zalonis I, Zournas C. CSF tau protein and beta-amyloid (1-42) in Alzheimer's disease diagnosis: discrimination from normal ageing and other dementias in the Greek population. *Eur J Neurol* 2003;10:119-28.
452. Bian H, Van Swieten JC, Leight S, et al. CSF biomarkers in frontotemporal lobar degeneration with known pathology. *Neurology* 2008;70:1827-35.
453. Fagan AM, Roe CM, Xiong C, Mintun MA, Morris JC, Holtzman DM. Cerebrospinal fluid tau/beta-amyloid(42) ratio as a prediction of cognitive decline in nondemented older adults. *Arch Neurol* 2007;64:343-9.
454. de Souza LC, Lamari F, Belliard S, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in the differential diagnosis of Alzheimer's disease from other cortical dementias. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010.
455. Bibl M, Mollenhauer B, Esselmann H, et al. CSF diagnosis of Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *J Neural Transm* 2006;113:1771-8.

456. Riemenschneider M, Wagenpfeil S, Vanderstichele H, et al. Phospho-tau/total tau ratio in cerebrospinal fluid discriminates Creutzfeldt-Jakob disease from other dementias. *Mol Psychiatry* 2003;8:343-7.
457. Buerger K, Otto M, Teipel SJ, et al. Dissociation between CSF total tau and tau protein phosphorylated at threonine 231 in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Aging* 2006;27:10-5.
458. Goodall CA, Head MW, Everington D, Ironside JW, Knight RS, Green AJ. Raised CSF phospho-tau concentrations in variant Creutzfeldt-Jakob disease: diagnostic and pathological implications. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77:89-91.
459. de Leon MJ, DeSanti S, Zinkowski R, et al. MRI and CSF studies in the early diagnosis of Alzheimer's disease. *J Intern Med* 2004;256:205-23.
460. de Leon MJ, DeSanti S, Zinkowski R, et al. Longitudinal CSF and MRI biomarkers improve the diagnosis of mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 2006;27:394-401.
461. Hampel H, Burger K, Pruessner JC, et al. Correlation of cerebrospinal fluid levels of tau protein phosphorylated at threonine 231 with rates of hippocampal atrophy in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2005;62:770-3.
462. Wahlund LO, Blennow K. Cerebrospinal fluid biomarkers for disease stage and intensity in cognitively impaired patients. *Neurosci Lett* 2003;339:99-102.
463. Pijnenburg YA, Schoonenboom SN, Barkhof F, et al. CSF biomarkers in frontotemporal lobar degeneration: relations with clinical characteristics, apolipoprotein E genotype, and neuroimaging. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77:246-8.
464. Okamura N, Arai H, Higuchi M, et al. Cerebrospinal fluid levels of amyloid beta-peptide1-42, but not tau have positive correlation with brain glucose metabolism in humans. *Neurosci Lett* 1999;273:203-7.
465. Schmidt R, Schmidt H, Curb JD, Masaki K, White LR, Launer LJ. Early inflammation and dementia: a 25-year follow-up of the Honolulu-Asia Aging Study. *Ann Neurol* 2002;52:168-74.
466. Galimberti D, Schoonenboom N, Scheltens P, et al. Intrathecal chemokine levels in Alzheimer disease and frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 2006;66:146-7.
467. Galimberti D, Schoonenboom N, Scheltens P, et al. Intrathecal chemokine synthesis in mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2006;63:538-43.
468. Smyth MD, Cribbs DH, Tenner AJ, et al. Decreased levels of C1q in cerebrospinal fluid of living Alzheimer patients correlate with disease state. *Neurobiol Aging* 1994;15:609-14.
469. Lue LF, Walker DG, Rogers J. Modeling microglial activation in Alzheimer's disease with human postmortem microglial cultures. *Neurobiol Aging* 2001;22:945-56.
470. Schuitemaker A, van der Doef TF, Boellaard R, et al. Microglial activation in healthy aging. *Neurobiol Aging* 2011.
471. Pratico D, Clark CM, Lee VM, Trojanowski JQ, Rokach J, FitzGerald GA. Increased 8,12-iso-iPF2alpha-VI in Alzheimer's disease: correlation of a noninvasive index of lipid peroxidation with disease severity. *Ann Neurol* 2000;48:809-12.
472. Pratico D, Clark CM, Liun F, Rokach J, Lee VY, Trojanowski JQ. Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment: a possible predictor of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2002;59:972-6.
473. Montine TJ, Peskind ER, Quinn JF, Wilson AM, Montine KS, Galasko D. Increased Cerebrospinal Fluid F(2)-Isoprostanes are Associated with Aging and Latent Alzheimer's Disease as Identified by Biomarkers. *Neuromolecular Med* 2011;13:37-43.
474. Maruyama M, Higuchi M, Takaki Y, et al. Cerebrospinal fluid neprilysin is reduced in prodromal Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2005;57:832-42.
475. Iqbal K, Flory M, Khatoon S, et al. Subgroups of Alzheimer's disease based on cerebrospinal fluid molecular markers. *Ann Neurol* 2005;58:748-57.
476. Kudo T, Iqbal K, Ravid R, Swaab DF, Grundke-Iqbal I. Alzheimer disease: correlation of cerebro-spinal fluid and brain ubiquitin levels. *Brain Res* 1994;639:1-7.
477. Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Elevated levels of tau and ubiquitin in brain and cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatr* 1997;9 Suppl 1:289-96; discussion 317-21.
478. Lovell MA, Lynn BC, Xiong S, Quinn JF, Kaye J, Markesbery WR. An aberrant protein complex in CSF as a biomarker of Alzheimer disease. *Neurology* 2008;70:2212-8.

479. Papaliagkas VT, Anogianakis G, Tsolaki MN, Koliakos G, Kimiskidis VK. Prediction of conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease by CSF cytochrome c levels and N200 latency. *Curr Alzheimer Res* 2009;6:279-84.
480. Ruetschi U, Zetterberg H, Podust VN, et al. Identification of CSF biomarkers for frontotemporal dementia using SELDI-TOF. *Exp Neurol* 2005;196:273-81.
481. Zhong Z, Ewers M, Teipel S, et al. Levels of beta-secretase (BACE1) in cerebrospinal fluid as a predictor of risk in mild cognitive impairment. *Arch Gen Psychiatry* 2007;64:718-26.
482. Ewers M, Zhong Z, Burger K, et al. Increased CSF-BACE 1 activity is associated with ApoE-epsilon 4 genotype in subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Brain* 2008;131:1252-8.
483. Schultz K, Wiehager S, Nilsson K, et al. Reduced CSF CART in dementia with Lewy bodies. *Neurosci Lett* 2009;453:104-6.
484. de Jong D, Jansen RW, Pijnenburg YA, et al. CSF neurofilament proteins in the differential diagnosis of dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007.
485. Morrison DK. The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends Cell Biol* 2009;19:16-23.
486. Bahl JM, Heegaard NH, Falkenhorst G, et al. The diagnostic efficiency of biomarkers in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease compared to Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2009;30:1834-41.
487. Hsich G, Kenney K, Gibbs CJ, Lee KH, Harrington MG. The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *N Engl J Med* 1996;335:924-30.
488. Van Everbroeck BR, Boons J, Cras P. 14-3-3 {gamma}-isoform detection distinguishes sporadic Creutzfeldt-Jakob disease from other dementias. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76:100-2.
489. Chohan G, Pennington C, Mackenzie JM, et al. The role of cerebrospinal fluid 14-3-3 and other proteins in the diagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in the UK: a 10-year review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010.
490. Gmitterova K, Heinemann U, Bodemer M, et al. 14-3-3 CSF levels in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease differ across molecular subtypes. *Neurobiol Aging* 2009;30:1842-50.
491. Brown P, Preece M, Brandel JP, et al. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease at the millennium. *Neurology* 2000;55:1075-81.
492. Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, Kitamoto T, et al. Clinical features and diagnosis of dura mater graft associated Creutzfeldt Jakob disease. *Neurology* 2007;69:360-7.
493. Otto M, Lewczuk P, Wiltfang J. Neurochemical approaches of cerebrospinal fluid diagnostics in neurodegenerative diseases. *Methods* 2008;44:289-98.
494. Alzualde A, Indakoetxea B, Ferrer I, et al. A novel PRNP Y218N mutation in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease with neurofibrillary degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010;69:789-800.
495. Wakabayashi K, Mori F, Hasegawa M, et al. Co-localization of beta-peptide and phosphorylated tau in astrocytes in a patient with corticobasal degeneration. *Neuropathology* 2006;26:66-71.
496. Verbeek MM, Kremer BP, Rikkert MO, Van Domburg PH, Skehan ME, Greenberg SM. Cerebrospinal fluid amyloid beta(40) is decreased in cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 2009;66:245-9.
497. Noguchi M, Yoshita M, Matsumoto Y, Ono K, Iwasa K, Yamada M. Decreased beta-amyloid peptide42 in cerebrospinal fluid of patients with progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *J Neurol Sci* 2005;237:61-5.
498. Borroni B, Malinverno M, Gardoni F, et al. Tau forms in CSF as a reliable biomarker for progressive supranuclear palsy. *Neurology* 2008;71:1796-803.
499. Okazaki K, Fu YJ, Nishihira Y, et al. Alzheimer's disease: report of two autopsy cases with a clinical diagnosis of corticobasal degeneration. *Neuropathology* 2010;30:140-8.
500. Moreaud O, Belliard S, Snowden J, et al. [Semantic dementia: reflexions of a French working group for diagnostic criteria and constitution of a patient cohort]. *Rev Neurol (Paris)* 2008;164:343-53.

501. Hodges JR, Mitchell J, Dawson K, et al. Semantic dementia: demography, familial factors and survival in a consecutive series of 100 cases. *Brain* 2010;133:300-6.
502. Santpere G, Puig B, Ferrer I. Low molecular weight species of tau in Alzheimer's disease are dependent on tau phosphorylation sites but not on delayed post-mortem delay in tissue processing. *Neurosci Lett* 2006;399:106-10.
503. Kovacs GG, Pittman A, Revesz T, et al. MAPT S305I mutation: implications for argyrophilic grain disease. *Acta Neuropathol* 2008;116:103-18.
504. Buée-Scherrer V, Buée L, Leveugle B, et al. Pathological tau proteins in postencephalitic parkinsonism: comparison with Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Ann Neurol* 1997;42:356-9.
505. Kovacs GG, Botond G, Budka H. Protein coding of neurodegenerative dementias: the neuropathological basis of biomarker diagnostics. *Acta Neuropathol* 2010;119:389-408.
506. Vital A, Fernagut PO, Canron MH, et al. The nigrostriatal pathway in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009;68:809-15.
507. Giaccone G, Mangieri M, Capobianco R, et al. Tauopathy in human and experimental variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Aging* 2008;29:1864-73.
508. Wolf J, Lachmann I, Wagner U, Osman A, Mothes T. Immunoassay of in vitro activated human tissue transglutaminase. *Anal Biochem* 2011.
509. Mukhopadhyay A. Inclusion bodies and purification of proteins in biologically active forms. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 1997;56:61-109.
510. Kohnken R, Buerger K, Zinkowski R, et al. Detection of tau phosphorylated at threonine 231 in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett* 2000;287:187-90.
511. de Leon MJ, Segal S, Tarshish CY, et al. Longitudinal cerebrospinal fluid tau load increases in mild cognitive impairment. *Neurosci Lett* 2002;333:183-6.
512. Ewers M, Buerger K, Teipel SJ, et al. Multicenter assessment of CSF-phosphorylated tau for the prediction of conversion of MCI. *Neurology* 2007;69:2205-12.
513. Glodzik L, de Santi S, Tsui WH, et al. Phosphorylated tau 231, memory decline and medial temporal atrophy in normal elders. *Neurobiol Aging* 2010.
514. Takahashi RH, Tobiume M, Sato Y, Sata T, Gouras GK, Takahashi H. Accumulation of cellular prion protein within dystrophic neurites of amyloid plaques in the Alzheimer's disease brain. *Neuropathology* 2010.
515. Wang XF, Dong CF, Zhang J, et al. Human tau protein forms complex with PrP and some GSS- and fCJD-related PrP mutants possess stronger binding activities with tau in vitro. *Mol Cell Biochem* 2008;310:49-55.
516. Tapiola T, Alafuzoff I, Herukka SK, et al. Cerebrospinal fluid {beta}-amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain. *Arch Neurol* 2009;66:382-9.
517. Mattsson N, Zetterberg H, Hansson O, et al. CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *Jama* 2009;302:385-93.

RÉSUMÉ

Le diagnostic de la maladie d'Alzheimer (MA) est tardif et présente un manque de fiabilité en regard de l'examen neuropathologique *postmortem* permettant de confirmer ce diagnostic. En effet, les présentations cliniques de la MA peuvent être multiples et parfois atypiques. Des anomalies dans les concentrations des protéines tau, tau phosphorylées et amyloïdes bêta, au sein du liquide céphalorachidien (LCR), ont permis d'améliorer le diagnostic du vivant du patient. Nous avons évalué la performance de ces marqueurs, dans le LCR, utilisés pour le diagnostic de la MA dans les formes syndromiques atypiques. L'utilisation de ces marqueurs augmente la précision du diagnostic lors de ces différentes présentations cliniques. De plus, nous avons mis au point un test diagnostic biochimique *postmortem* des différentes tauopathies permettant de mieux les caractériser en complément de l'examen neuropathologique. Enfin, nous avons conçu et caractérisé des anticorps spécifiquement dirigés contre la protéine tau phosphorylée en position 231. Cet outil nous a permis de développer un test ELISA dans le LCR. Des résultats préliminaires suggéreraient une interaction *in vivo* entre les protéines tau et Prion. Ces résultats, décrits pour la première fois, sont corrélés à nos observations histologiques.

TITLE

Biological tools contribution for characterising several tauopathies with regard to various clinical presentations of neurodegenerative disorders

ABSTRACT

Diagnosis of Alzheimer's disease (AD) is late with a lack of reliability with regard to *postmortem* neuropathological examination that permits to confirm this diagnosis. Indeed, many clinical presentations of AD can occur and sometimes atypical. Anomalies in cerebrospinal fluid (CSF) levels of tau, phosphorylated tau and amyloid beta proteins permitted to improve *antemortem* diagnosis. We evaluated biomarkers performance, into CSF, used for AD diagnosis in syndromal atypical forms. The use of these biomarkers increases the accuracy of diagnosis during these different clinical presentations. Moreover, we adjusted a biochemical *postmortem* diagnosis test of tauopathies giving the interest to better characterize them in addition to neuropathological examination. Finally, we developed and characterized antibodies specifically directed against phosphorylated tau protein on 231 epitope. This tool permitted to make an ELISA test in CSF. Preliminary results may suggest an *in vivo* interaction between tau and Prion proteins. These results, described for the first time, correlated with our histological observations.

DISCIPLINE

Neurosciences

MOTS-CLÉS

Démences neurodégénératives, Alzheimer, liquide céphalorachidien, Creutzfeldt-Jakob, diagnostic, protéine tau, Prions, amyloïde bêta

INTITULÉ ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE

Laboratoire de Neurobiologie
Hospices Civils de Lyon
59 boulevard Pinel
69677 Bron Cedex

Unité 402
Hôpital neurologique
59 boulevard Pinel
69677 Bron Cedex

INSERM U1028
Centre Hospitalier Le Vinatier
95 boulevard Pinel
69500 Bron