

**The World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP)
Recommandations sur les marqueurs biologiques dans la démence :**

**Intérêt des analyses du sang et du LCR pour le diagnostic précoce
et différentiel de la démence**

**J. WILTFANG^{1,2}, P. LEWCZUK^{1,2}, P. RIEDERER³, E. GRÜNBLATT³, C. HOCK⁴,
P. SCHELTENS⁵, H. HAMPEL⁶, H. VANDERSTICHELE⁷, K. IQBAL⁸, D. GALASKO⁹,
L. LANNFELT¹⁰, M. OTTO¹¹, H. ESSELMANN¹², A. W. HENKEL¹, J. KORNHUBER¹² &
K. BLENNOW¹³**

1Department of Psychiatry and Psychotherapy, University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany,

2Center for Clinical Neuroproteomics, Erlangen, Germany,

3Clinic for Psychiatry and Psychotherapy, Department Clinical Neurochemistry, Bayerische Julius-Maximilians-University Würzburg, Würzburg, Germany,

4Division of Psychiatry Research, University of Zurich, Zurich, Switzerland,

5The Alzheimer Center/Department of Neurology, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands,

6Department of Psychiatry, Ludwig Maximilian University, Munich, Germany,

7Innogenetics, Ghent, Belgium,

8Department of Neurochemistry, Chemical Neuropathology Laboratory, New York State Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, New York, NY, USA,

9Department of Neurosciences, UCSD, La Jolla, CA, USA,

10Department of Public Health and Caring Sciences/Geriatrics, Uppsala University, Uppsala, Sweden,

11Department of Neurology, University of Goettingen, Goettingen, Germany,

12Department of Psychiatry and Psychotherapy, University of Goettingen, Goettingen, Germany

13Department of Clinical Neuroscience, Section of Experimental Neuroscience, Sahlgrenska University Hospital, Mölndal, Sweden

Publié dans The World Journal of Biological Psychiatry, 2005; 6(2): 69-84

Traduction française :

Michel BENOIT Clinique de Psychiatrie et de Psychologie Médicale, Pôle Neurosciences Cliniques, CHU Pasteur - Pavillon M, 30 avenue de la Voie Romaine, 06002 NICE cedex 1
Danièle BENTUE-FERRER Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine, CS 34317, 2, avenue du Pr Léon Bernard, 35043 RENNES

Résumé

La prévalence de la démence augmente avec le vieillissement de la population et l'augmentation de l'espérance de vie. Ce syndrome peut être l'expression d'une affection curable et réversible du système nerveux central (ex. neuroinflammation), ou d'une affection jugée actuellement irréversible (ex maladie d'Alzheimer (MA)). Dans ce dernier cas, plusieurs approches thérapeutiques potentiellement efficaces sont actuellement testées, ce qui demande

une bonne qualité du diagnostic *pre-mortem*. Les analyses biologiques du sérum et du liquide céphalo-rachidien (LCR), bien que réalisées en routine dans les pathologies neuroinflammatoires, doivent faire l'objet d'une standardisation pour être une aide au diagnostic clinique de MA. Plusieurs paramètres du LCR rattachés à la MA (protéine tau totale, formes phosphorylées de tau, peptides A β , génotype ApoE, p97, etc.) mesurés séparément ou groupés apportent une sensibilité et une spécificité diagnostique de l'ordre de 85%, ce qui correspond à ce que l'on attend d'un outil diagnostique de qualité. Dans cette revue de la littérature, sont discutés les rapports récemment publiés sur le diagnostic neurochimique *pre-mortem* des démences et en particulier concernant le diagnostic précoce et différentiel de la MA. De nouvelles perspectives apportées par des technologies récentes, telles la spectroscopie à corrélation de fluorescence (SCF) et la spectrométrie de masse avec laser désorption/ionisation (SELDI-TOF MS) sont brièvement discutées.

Mots-clés : Démence, Maladie d'Alzheimer, neuroinflammation, liquide céphalo-rachidien

Introduction

Avec le vieillissement de la population et l'augmentation de l'espérance de vie, la démence va devenir un grave problème de santé publique. Toutefois, en ce qui concerne la maladie d'Alzheimer (MA), le nombre croissant de patients n'a pas permis à ce jour la mise au point de standards diagnostiques *in vivo*. Bien que la sensibilité du diagnostic clinique soit assez élevée (93%), sa spécificité est plus basse, estimée par exemple à 55% dans une étude multicentrique avec confirmation par autopsie (Mayeux 1998). Bien qu'après examen par des experts, le diagnostic clinique de maladie d'Alzheimer (MA) est prédictif d'une MA histologiquement prouvée dans 80 à 90% des cas, le diagnostic très précoce de la MA et le diagnostic différentiel de formes atypiques de démences restent difficiles sur des bases cliniques.

Avec l'arrivée de traitements potentiellement efficaces contre la démence avant qu'elle ne soit jugée irréversible, comme les inhibiteurs de l'acétylcholine estérase dans la MA (voir revue récente dans Bullock 2002; Knopman 2001), il y a un besoin encore plus important de diagnostics précoces et différentiels (1998). Des biomarqueurs apportés par les études de neuro-imagerie et les analyses de liquide céphalo-rachidien (LCR) ont été considérés comme des aides au diagnostic clinique. L'objectif de cette revue est donc de résumer l'état des avancées actuelles dans le diagnostic neurochimique des démences avec une attention particulière pour les biomarqueurs de la MA. Enfin, les nouvelles perspectives de recherche de biomarqueurs apportées par de nouvelles techniques sophistiquées, comme la spectroscopie à corrélation de fluorescence et la spectrométrie de masse en temps de vol sont brièvement abordées.

Le LCR étant en contact direct avec l'environnement du système nerveux central (SNC), il est logique que tout changement dans la composition biochimique du parenchyme cérébral se reflète en priorité dans le LCR. Une revue récente de Reiber (2001) argumente le concept d'une diffusion différente des protéines du cerveau vers le LCR par rapport aux protéines diffusant du sang dans le LCR, permettant aux protéines provenant du cerveau d'être prioritaires. Une ponction lombaire (PL) est un geste simple, avec très peu de complications secondaires. Dans une grande étude d'Andreasen et al. (2001), seulement 4,1% des patients ont ressenti des céphalées après PL, cette incidence étant rapportée à seulement 2% dans l'étude de Blennow et al. (1993). Aussi il est raisonnable de postuler que la PL est une procédure facile, modérément invasive, et que l'analyse du LCR pourrait améliorer le diagnostic porté par des moyens cliniques et neuroradiologiques.

La démence symptôme de maladies potentiellement réversibles

La démence peut être la traduction clinique de plusieurs maladies potentiellement curables du SNC. Aussi, l'Académie Américaine de Neurologie préconise l'analyse du LCR pour le diagnostic différentiel de démence dans les cas suspects de cancer métastatique, d'infection du SNC, de sérologie syphilitique positive, d'hydrocéphalie, d'immunosuppression, de

vascularite du SNC, et chez tous les patients de moins de 55 ans (1994). Ces recommandations n'ont pas changé sur le fond, et ont été confirmées récemment (Knopman et al. 2001). De plus, l'analyse de routine du LCR est une base pour l'exploration avancée des protéines du LCR, étant donné que l'analyse des protéines sanguines et du cerveau dans le LCR doit être faite en tenant compte de la barrière hémato-encéphalique, comme exprimée par le rapport LCR/sérum de concentration en albumine (Q_{Alb}) (Reiber et Peter 2001).

Parmi bien d'autres, les maladies inflammatoires du SNC constituent un groupe d'affections réversibles souvent caractérisées par des troubles de la mémoire, et l'analyse du LCR devrait être réalisée dans tous les cas suspects.

La neuroborréliose est une maladie du SNC causée par le spirochète transmis par les tiques *Borrelia burgdorferi*. Plusieurs complications neuropsychiatriques ont été observées dans cette maladie, dont la démence (Fallon et Niels 1994). La neuroborréliose devrait être considérée comme une cause possible de symptômes neuropsychiatriques, en particulier dans les zones endémiques. Avec une combinaison de paramètres analysés en routine dans le LCR et le sérum, il est possible de confirmer ou de rejeter ce diagnostic avec une spécificité de 96% et une sensibilité de 80% (Tumani et al. 1995). Cette maladie est habituellement caractérisée par une dysfonction de la barrière hémato-encéphalique (rapport Q_{Alb} augmenté), une augmentation des mononucléaires, une synthèse intrathécale prévalente ou isolée des IgM, et des anticorps spécifiques augmentés (Tumani et al. 1995 ; Reiber et Peter 2001).

Dans la neurosyphilis, un autre exemple de maladie inflammatoire du SNC qui peut se présenter avec un syndrome démentiel, on peut mettre en évidence une barrière hémato-encéphalique normale ou légèrement dysfonctionnelle, ainsi qu'une synthèse intra-thécale d'IgM et d'IgG (Reiber et Peter 2001). Les analyses sérologiques (TPHA et VDRL) sont habituellement positives et confirment le diagnostic.

L'infection par le HIV peut affecter les fonctions cognitives de plusieurs façons. L'atteinte du SNC est une complication fréquente du SIDA, concernant 30 à 60% des patients (voir revue par Luer et al. 1988). Dans l'étude allemande de Poser et al. (1988), 11% des sujets atteints de SIDA ont un syndrome démentiel, une proportion plus basse que dans les études américaines (Navia et Price 1987). Un déficit mnésique, ainsi que d'autres troubles cognitifs sont beaucoup plus fréquents dans les encéphalites liés au HIV et sont d'apparition plus précoce que dans les démences liées au SIDA. L'infection du SNC liée au HIV ne conduit pas seulement à des encéphalites avec troubles cognitifs par elle-même. De façon encore plus importante, l'immunodéficience conduit à des complications infectieuses sévères connues comme des infections opportunistes. Ces dernières incluent la toxoplasmose cérébrale, l'infection par cytomégalo virus (CMV), par herpes simplex (HSV), la tuberculose du SNC et beaucoup d'autres. Sachant que toutes ces affections sont potentiellement curables, leur diagnostic différentiel devrait toujours inclure l'analyse du LCR. Des stigmates immunologiques (synthèse intrathécale d'anticorps spécifiques) associés à une analyse génétique en PCR (*Polymerase Chain Reaction*) peuvent même accroître la fiabilité du diagnostic.

Jusqu'à 71% des patients atteints de maladie de Whipple neurologique ont des troubles cognitifs (Louis et al. 1996). Les signes de l'infection systémique sont des troubles gastro-intestinaux, une perte de poids, des arthrites, et l'infection du SNC se traduit par une ophtalmoplégie supranucléaire, un niveau de conscience altéré, et des troubles des mouvements (Louis 2003). Les modifications du LCR dans cette affection inflammatoire chronique due à *Tropheryma whippelii* comprennent une augmentation cellulaire légère avec des macrophages PAS-positifs typiques appelés cellules de Sieracki, dans environ 30% des cas. L'usage de la PCR avec des sondes reconnaissant l'ADN bactérien peut améliorer significativement la sensibilité diagnostique.

Des études ont retrouvé des déficits neuropsychologiques dans la sclérose en plaques (SEP), avec des atteintes mnésiques et même des syndromes démentiels (Rao 1986 ; Rovaris et Filippi 2000). De façon typique, les patients atteints de SEP ont un nombre de cellules normal ou légèrement augmenté avec des perturbations de la barrière hémato-

encéphalique en analyse courante du LCR, ainsi qu'une synthèse intrathécale d'immunoglobulines. On peut observer des bandes oligoclonales d'IgG, ainsi qu'une synthèse locale d'IgG, d'IgM, moins fréquemment d'IgA. Une synthèse intrathécale d'anticorps spécifiques pour les virus neurotrophiques (rougeole, rubéole, varicelle-zona) est très fréquente, phénomène connu sous le nom de réaction MRZ. Cliniquement, la sensibilité de la réaction MRZ et des bandes oligoclonales d'IgG dans la SEP est respectivement de 89 et 98%, par exemple similaire aux méthodes de neuroimagerie (Reiber et al. 1998) ; toutefois, la spécificité des bandes oligoclonales est beaucoup plus basse dans ce cas par rapport à d'autres affections neuroinflammatoires. Actuellement, la focalisation isoélectrique est considérée comme une méthode de choix pour détecter les bandes oligoclonales dans le LCR et le sérum.

Marqueurs neurochimiques de la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est la principale cause de démence chez la personne âgée, chez qui elle est de surcroît une cause majeure de morbidité et de décès. Les marqueurs neuropathologiques de MA sont des dépôts extra-cellulaires de protéine β -amyloïde (plaques) et des dégénérescences neurofibrillaires (cf. revue dans Wiltfang et al. 2001b). On trouve couramment une perte neuronale avec une atrophie cérébrale, des perturbations de la neurotransmission ainsi que des réactions inflammatoires gliales localisées.

Récemment, ont été proposés des critères validant qu'un test peut être un marqueur diagnostique acceptable de la MA (1998). Dans l'idéal, un tel test devrait être capable de détecter un trait fondamental du processus pathologique, être validé dans des cas confirmés par l'étude histopathologique, être précis et reproductible, non invasif, facile à réaliser et peu coûteux. Il y a un consensus actuel pour affirmer que la sensibilité et la spécificité d'un tel test ne devraient pas, respectivement, être inférieures à 85% et 75-85% (1998).

Protéine Précurseur de la β -amyloïde (β -APP) : métabolisme et impact sur le diagnostic de la MA

Les plaques β -amyloïdes sont principalement composées de peptides issus de la coupure enzymatique de la protéine précurseur de la β -amyloïde (β -APP) (Kang et al. 1987). Cette protéine transmembranaire est encodée chez l'homme par un gène du chromosome 21, et son épissage alternatif peut conduire à au moins huit formes. La forme connue sous le nom de β -APP 695 (formée de 695 acides aminés) est représentée de façon prédominante dans le cerveau (Panegyres 1997). Le rôle physiologique de la β -APP n'est pas bien connu à ce jour ; on pense toutefois qu'elle est impliquée dans les interactions entre cellules et matrices. La β -APP, par des réactions enzymatiques d'a, b, et g-sécrétases, produit plusieurs formes de peptides β -amyloïdes ($A\beta$). Ce processus est schématisé dans la figure 1. Il est intéressant de constater que la production de peptides β -amyloïdes avec différentes C-terminaisons suggère que différentes activités β -sécrétase peuvent exister. Ainsi, il serait possible de synthétiser un inhibiteur spécifique capable de prévenir la production de $A\beta$ 1-42 en empêchant la scission à la position 42, et par conséquent empêchant la formation de plaques β -amyloïdes.

Plusieurs études, dont celles de notre groupe, retrouvent une baisse de concentration de $A\beta$ 1-42 dans le LCR (Wiltfang et al. 2002 ; Lewczuk et al. 2004c), ainsi que dans deux revues de la littérature (Blennow et al. 2001 ; Wiltfang et al. 2001b), alors qu'une autre rapporte que le taux total de peptides $A\beta$ reste inchangé (Motter et al. 1995). De façon encore plus prononcée, l' $A\beta$ 1-42 semble décroître au cours de l'évolution de la maladie avant qu'une chute sévère des fonctions cognitives ne soit observée (Riemenschneider et al. 2000). A titre d'exemple, on peut voir clairement une baisse de l' $A\beta$ 1-42 dans le LCR dans un cas de MA, obtenu par méthode immunologique SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) (Figure 2). Il faut souligner que la concentration de l' $A\beta$ 1-42 dans le LCR est fortement dépendante du traitement pré-analytique des échantillons (Wiltfang et al. 2002). Les résultats obtenus par des méthodes impliquant une incubation avec des détergents ou par chauffage (par ex. immunoprécipitation en présence de

détergent ou dénaturation par SDS-chauffage) peuvent être jusqu'à trois fois supérieurs à ceux obtenus sans ces traitements (cf. revue dans Wiltfang et al. 2002). Cela suggère la présence d'une fraction de peptides A β non accessibles aux anticorps, probablement en raison de liaison à des protéines de transport.

Les mécanismes qui conduisent à une baisse des concentrations de l'A β 1-42 dans le LCR de patients atteints de MA ne sont pas encore éclaircis. Quelques chercheurs suggèrent que cela pourrait être dû à son accumulation dans les plaques. Cette hypothèse ne peut pourtant pas expliquer nos résultats (Otto et al. 2000) d'une baisse de concentration du peptide dans le LCR d'un sous-groupe de patients atteints de maladie de Creutzfeld-Jacob (CJD) qui n'ont pas développé de plaques amyloïdes. De la même façon, des taux diminués d'A β 1-42 dans le LCR ont été montrés en cas de méningite bactérienne (Sjögren et al. 2001), une affection qui peut induire des troubles chroniques de la mémoire, mais sans plaques β -amyloïdes. En fait, les valeurs les plus basses de la grande étude multicentrique de Hulstaert et al. (1999) ont été observées dans deux cas de panencéphalite sclérosante subaiguë et un cas de méningite bactérienne. Une autre hypothèse serait que la formation de complexes de liaison A β 1-42 serait responsable d'une baisse de concentration du peptide dans le LCR (Wiltfang et al. 2002). Or, de tels complexes ont pu être mis en évidence dans le LCR de patients atteints de MA en spectroscopie à corrélation de fluorescence (Pitschke et al. 1998).

La sensibilité et la spécificité du dosage de l'A β 1-42 réalisé seul pour différencier les patients atteints de MA, des sujets âgés normaux, ont été évaluées respectivement à 78 et 81% dans l'étude de Hulstaert et al. (1999), et Galasko et al. (1998) retrouvent des valeurs similaires de 78 et 83%. Dans notre étude (Lewczuk et al. 2004c), la mesure dans le LCR de l'A β 42 seule a permis une répartition correcte de 87% des patients dans trois groupes : MA, démence non-MA, absence de démence. Blennow et al. (2001) ont analysé les données de sept études regroupant 562 patients atteints de MA et 273 sujets témoins, et rapportent en moyenne une sensibilité de 85% et une spécificité de 84%.

Nous avons récemment retrouvé un autre A β peptide N-terminal, le A β 2-42, dans le LCR de patients atteints de MA (Wiltfang et al. 2001a), et ce peptide est le deuxième le plus représenté, après l'A β 1-42, dans le lobe frontal en cas de MA. Dans le LCR, il est présent dans une proportion de 35% des cas de MA. Des études expérimentales avec des souris invalidées ont montré que l'A β 2-42 provenait probablement d'une scission par une autre β -sécrétase, ce qui a une importance physiopathologique notable sachant que ce peptide peut servir de point de départ à la formation des plaques β -amyloïdes (Wiltfang et al. 2001a).

L'usage d'un système d'électrophorèse en gel contenant de l'urée (Wiltfang et al. 1991) a permis de découvrir d'autres peptides A β C-terminaux, par ex. A β 1-37/38/39 dans le LCR humain (Wiltfang et al. 2002) de même que dans le sang (Lewczuk et al. 2004d). Ce profil très spécifique a été observé dans tous les échantillons de LCR examinés à ce jour, la MA se caractérisant par une fraction élevée (%) de A β 1-40 (A β 1-40%), une A β 1-42% diminuée, et une A β 1-38% élevée dans quelques cas (Wiltfang et al. 2002). L'augmentation de concentration de ce dernier peptide, observable aussi dans quelques cas de maladies neuroinflammatoires chroniques, est en faveur du rôle de l'inflammation, communément reconnu dans la pathogénèse de la MA (Eikelenboom et al. 2000 ; McGeer et McGeer 2001).

Protéine Tau et ses formes phosphorylées

Les protéines tau font partie de la famille des protéines associées aux microtubules (MAP) présentes dans les neurones et les cellules non neuronales (cf. pour revue Buee et al. 2000). Le gène humain de tau est situé sur le bras long du chromosome 17. Son épissage alternatif conduit à la synthèse de six formes de la protéine comprenant entre 352 et 441 acides aminés. Les études sur le rôle des protéines tau ont révélé que leur fonction principale est de promouvoir la stabilité et l'assemblage des microtubules neuronaux. Elles sont aussi impliquées dans la promotion de la nucléation, de la croissance et du regroupement des microtubules, et on pense que la phosphorylation de la protéine tau est un facteur important de régulation de l'interaction entre les microtubules (cf. pour revue Shahani et Brandt 2002). On considère que le statut de phosphorylation de tau change au cours du développement, avec un degré relativement élevé de phosphorylation pendant la période fœtale, suivie par

une décroissance régulière avec l'âge, probablement en rapport avec une activation de phosphatases (Mawal-Dewan et al. 1994 ; Rosner et al. 1995). Il y a un nombre croissant de preuves que les protéines tau interagissent directement ou indirectement avec le cytosquelette, et jouent un rôle important dans la morphologie et la mobilité des cellules, ainsi que dans l'interaction entre les microtubules et la membrane plasmique (cf. pour revue Shahani et Brandt 2002). Comme récemment rapporté par le groupe de E. Mandelkow, il est intéressant de constater que tau régule le trafic intracellulaire des vésicules et inhibe le transport de la l'APP dans les extensions neuronales, ce qui conduit à une accumulation de l'APP dans le corps cellulaire (Stamer et al. 2002). Il a été montré par des modèles de culture cellulaire que tau est aussi impliquée dans la croissance et la stabilisation des neurites (Baas et al. 1991 ; Knops et al. 1991). De surcroît, des cultures primaires de neurones provenant de souris génétiquement modifiées avec un gène tau invalidé montrent un retard significatif dans leurs extensions axonale et dendritiques (Dawson et al. 2001) ; néanmoins un autre groupe a mis en évidence chez des souris avec un gène tau absent un phénotype complètement normal (Harada et al. 1994). Ces résultats apparemment contradictoires ont été récemment expliqués par la découverte que d'autres MAP peuvent compenser l'absence du gène tau (Takei et al. 2000). Le rôle de tau et de sa phosphorylation par GSK-3 dans le transport antérograde et dans la croissance des neurites a été récemment montré par Tatebayashi et al. (2004).

La concentration totale de protéine tau a été largement étudiée en tant que marqueur non spécifique de la destruction neuronale dans la MA. Une méta-analyse de Sunderland et al. (2003) a repris les données de 17 rapports sur l'A β 42 et de 34 rapports sur tau dans le LCR dans la MA, et toutes les études incluses dans cette méta-analyse ont retrouvé une tau totale augmentée dans la MA. Etant donné qu'une élévation de la concentration de tau avec l'âge a été montrée par certains chercheurs chez des sujets non atteints de démence (Buerger et al. 2003), les valeurs de référence de tau totale devraient tenir compte de l'âge (Sjogren et al. 2001). Des concentrations de tau totale augmentées dans le LCR sont retrouvées dans d'autres troubles neuropsychiatriques que la MA, par ex. la CJD et les accidents vasculaires cérébraux (AVC) (Otto et al. 1997 ; Hesse et al. 2001). Cependant, le fait que tau peut probablement servir de marqueur pour contrôler l'efficacité de médicaments neuroprotecteurs dans la MA et le fait que la CJD et les AVC aigus peuvent être facilement distingués cliniquement de la MA ne devraient pas diminuer la valeur de ce marqueur.

L'hyperphosphorylation de tau est un évènement pathologique

On pense que certaines réactions d'hyperphosphorylation peuvent modifier la conformation des molécules de tau, conduisant à une baisse des liens entre microtubules, une moindre capacité à promouvoir l'assemblage entre microtubules, et une plus grande instabilité dynamique des microtubules. Il a été montré que la phosphorylation de la sérine 262 empêche partiellement la capacité de tau de se lier aux microtubules (Singh et al. 1996), tandis que la phosphorylation de la thréonine 231 et de la sérine 235 favorise fortement la fixation de tau aux microtubules (Sengupta et al. 1998). Dans les cerveaux de patients atteints de MA, les molécules hyperphosphorylées de protéine tau s'assemblent pour former des inclusions filamenteuses intraneuronales, des enchevêtrements neurofibrillaires, un des aspects caractéristiques de la MA, et il a été observé que la densité d'enchevêtrements neurofibrillaires est étroitement corrélée avec la sévérité de la démence (Alafuzoff et al. 1987, Braak et Braak 1991, Arriagada et al. 1992). Des dépôts intracellulaires de tau hyperphosphorylée sont observés dans plusieurs troubles neurodégénératifs connus sous le nom de tauopathies ; toutefois, dans la MA, ces inclusions sont seulement intraneuronales. Il a été récemment suggéré que la phosphorylation des protéines tau dans la MA survient dans un type d'évolution, avec des acides aminés en position 153, 262 et 231 modifiés dans les stades débutants de la maladie, et les positions 199, 202, 205, 396 et 404 relativement tardivement (Augustinack et al. 2002). Cette évolution des sites de phosphorylation de la molécule tau correspond à l'évolution morphologique des enchevêtrements neurofibrillaires dans la MA. On peut mesurer simultanément une augmentation de concentration des formes hyperphosphorylées de protéine tau dans le LCR des patients atteints de MA (Vanmechelen

et al. 2000; Itoh et al. 2001; Buerger et al. 2002). Il a été montré que plusieurs kinases peuvent phosphoryler les protéines tau (Buee et al. 2000), incluant entre autres des protéines kinases activées par le stress, ou des facteurs mitogènes, ou la kinase-3-glycogène-synthétase, entre autres.

L'hyperphosphorylation de tau dans le LCR est un biomarqueur de la maladie d'Alzheimer

Alors que l'augmentation de la protéine tau totale dans le LCR est considérée comme un reflet d'une rupture aspécifique des cellules nerveuses, l'hyperphosphorylation anormale de tau est une marque spécifique de la MA (Iqbal et al. 1986), et les molécules hyperphosphorylées de tau forment les enchevêtrements neurofibrillaires (Grundke-Iqbal et al. 1986). Tau peut être phosphorylée à 79 endroits potentiels, au niveau des sérine et thréonine de façon prédominante. Récemment, il a été rapporté par des équipes indépendantes que les augmentations de concentration de tau phosphorylée dans le LCR différencient la MA d'autres démences. Dans les études disponibles à ce jour, la sensibilité et la spécificité de la présence de tau hyperphosphorylée à différentes positions varient respectivement entre 44 et 94%, et entre 80 et 100% (Blennow et al. 2001). De façon intéressante, Hu et al. (2002) ont montré que le rapport entre pTau396/404 et la protéine tau totale dans le LCR pouvait différencier la MA d'autres démences et d'autres troubles neurologiques avec une sensibilité de 96% et une spécificité de 94%. Ces découvertes suggèrent que l'analyse dans le LCR de la protéine tau phosphorylée sur la sérine-396/404 pourrait être plus prometteuse que sur certains autres sites mentionnés jusqu'à ce jour. Il est aussi à noter que bien que les processus d'hyperphosphorylation prédominent dans la MA, on suppose que la déphosphorylation de ces molécules peut survenir aussi, et le rapport entre protéines tau phosphorylées et déphosphorylées doit être considéré de façon dynamique. Plus encore, la déphosphorylation de tau hyperphosphorylée semble être une des cibles thérapeutiques les plus prometteuses dans la MA (Iqbal et al. 2002).

Dans une étude récente, nous avons trouvé des concentrations augmentées de pTau181 dans le LCR d'un groupe de patients ayant un diagnostic clinique étayé neurochimiquement par une diminution de l'A42 dans le LCR (Lewczuk et al. 2004a). Cette forme semble particulièrement intéressante, car pTau181 reste constante, alors que la protéine tau totale est augmentée après un AVC aigu (Hesse et al. 2001). Cela peut suggérer que pTau181 n'est pas seulement un marqueur de simple perte neuronale. De façon similaire, Vanmechelen et al. (2001) ont rapporté des taux significativement élevés de pTau181 dans la MA en comparaison avec d'autres pathologies (démence fronto-temporale, démence à corps de Lewy, maladie de Parkinson, atrophie de système multiple, et paralysie supranucléaire progressive) à l'exception de la dégénérescence corticobasale. Parnetti et al. (2001) ont confirmé que pTau181 est un marqueur utile pour différencier la MA de la démence à corps de Lewy. De plus, en accord avec les résultats de notre étude, Vanmechelen et al. (2001) et Nägga et al. (2002) ont trouvé une forte corrélation entre tau totale et pTau181 indépendamment du groupe diagnostique. De façon similaire, il a été rapporté des augmentations dans le LCR de pTau181 chez des patients avec une MA probable, en comparaison avec des sujets contrôles (Nägga et al. 2002), et Papassotiropoulos et al. (2003) ont trouvé une augmentation de concentration de pTau181 dans le LCR associée avec un polymorphisme de CYP46. L'équipe de C. Hock a rapporté que ce gène était associé avec un risque augmenté de MA sporadique de survenue tardive.

En ce qui concerne les autres sites de phosphorylation, Itoh et al. (2001) ont rapporté dans une étude multicentrique internationale, une augmentation significative de pTau199 chez des patients atteints de MA par rapport à tous les autres groupes comparés n'ayant pas de MA. Dans cette étude, tant la sensibilité que la spécificité de pTau199 pour discriminer les MA d'autres groupes a atteint 85% pour un seuil de 1,05 fmol/ml. La protéine tau phosphorylée sur la thréonine 231 (pTau231) pourrait contribuer à différencier les MA de maladies apparentées telles que démence fronto-temporale, démence vasculaire et démence à corps de Lewy (voir revue dans Blennow et al. 2001). Une étude longitudinale a mis en évidence une concentration augmentée dans le LCR de pTau231 au début de la maladie suivie par des concentrations décroissantes de pTau231, mais pas de la tau totale, dans un groupe de

patients atteints de MA et non traités. Cela suggère un intérêt possible de cet isoforme dans le suivi de l'évolution naturelle de la maladie (Hampel et al. 2001). Il est intéressant d'observer que la protéine tau phosphorylée à la fois sur les positions thréonine 231 et sérine 235 tend à être augmentée chez des patients ayant un trouble cognitif léger (MCI) qui ont développé ensuite une MA (Arai et al. 2000). Dans cette étude, une mesure simultanée de la tau totale et de la tau phosphorylée différencie le groupe des patients à risque de développer une MA de ceux qui avaient une plainte mnésique sans déficit mnésique objectif. Dans une étude récemment publiée, trois formes différentes de phospho-tau ont été comparées dans leur valeur discriminante pour des patients avec des formes différentes de démence, de même qu'avec des contrôles non atteints de démence. Les résultats de cette étude ont montré une valeur diagnostique comparable pour pTau181 et pTau231, et une valeur moins bonne pour pTau199. De façon intéressante, la capacité de discrimination entre MA et démence à corps de Lewy a été optimisée en utilisant pTau181 à une sensibilité de 94% et une spécificité de 64%, et pTau231 a permis de différencier MA et DFT avec une sensibilité de 88% et une spécificité de 92%. Par conséquent, il y a une tendance non significative à ce que les protéines phospho-tau aient une valeur discriminante différente pour des types divers de démence (Hampel et al. 2004).

Génotype de l'apolipoprotéine E (ApoE)

L'ApoE est une protéine impliquée dans le transport du cholestérol. Hormis sa présence plasmatique, elle est aussi produite par des astrocytes dans le SNC pour favoriser la croissance et la réparation neuronale. Le gène de l'ApoE est porté par le chromosome 19 et on lui décrit trois allèles $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$. Un nombre croissant de preuves a été récemment établi sur l'association de ApoE $\epsilon 4$ et la MA de survenue tardive familiale (cf. pour revue Mulder et al. 2000). Jusqu'à 40 à 50% des patients atteints de MA ont l'allèle $\epsilon 4$ en comparaison à 15-25% des sujets témoins (Strittmatter et al. 1993a). Les individus homozygotes pour l'allèle $\epsilon 4$ ont un risque 6 à 8 fois plus important de développer la MA, alors que ce même risque est multiplié par 3 à 4 chez des individus hétérozygotes (cf. revue par Mulder et al. 2000). L'allèle $\epsilon 4$ a été identifié comme l'un des facteurs de risque principaux, indépendamment du sexe, de l'âge et de l'ethnie (Farrer et al. 1997). Dans une grande étude américaine portant sur 2188 patients, l'analyse de l'allèle $\epsilon 4$ a révélé une sensibilité et une spécificité modestes, respectivement de 65 et 68% (Mateux et al. 1998). Aussi, on peut suggérer que le génotypage de l'allèle ApoE devrait être réservé pour des patients atteints de démence, et que la présence d'un ou de deux allèles ApoE $\epsilon 4$ peut améliorer la spécificité diagnostique chez des patients ayant des critères cliniques de MA. Les mécanismes régulant un risque augmenté de développer la MA chez des individus porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ sont encore mal connus à ce jour.

La monoamine oxydase B sanguine comme biomarqueur dans la maladie d'Alzheimer

La monoamine oxydase B (MAO-B, E.C. : 1.4.3.4), une flavoenzyme localisée dans la membrane externe de la mitochondrie, est une des enzymes indirectement engagées dans le stress oxydant (Greenawalt et Schnaitman 1970) et est impliquée dans la désamination oxydative des neurotransmetteurs (noradrénaline, dopamine et sérotonine) et des amines exogènes (e. g. tyramine) (Weyler et al. 1990). Son activité catalytique génère du peroxyde d'hydrogène, une source possible de stress oxydant, qui peut provoquer la mort neuronale dans la MA mais aussi dans d'autres maladies neurodégénératives (Riederer et Youdim 1993). Plusieurs études antérieures ont rapporté une augmentation d'activité de la MAO-B dans le cerveau et le sang de patients atteints de MA ou de Parkinson (Adolfsson et al. 1980 ; Smith et al. 1982 ; Gottfries et al. 1983 ; Oreland et Gottfries 1986 ; Alexopoulos et al. 1987 ; Danielczyk et al. 1988 ; Bonuccelli et al. 1990 ; Fischer et al. 1994 ; Zhou et al. 2001). Le niveau d'activité de la MAO-B, comme celle de la MAO-A, dans le cerveau de sujets souffrant de MA est différent selon la localisation, par exemple l'activité de la MAO-B est diminuée dans le nucleus basalis de Meynert mais augmentée dans le pôle temporal, alors que le profil d'expression dans la maladie de Parkinson ou dans la maladie de Pick est

différent (Sparks et al. 1991). L'augmentation cérébrale de la MAO-B peut être due à l'augmentation transcriptionnelle de cette protéine (Nakamura et al. 1990) et prédomine dans les plaques associées aux astrocytes, comme cela a été montré dans les cerveaux Alzheimer avec astroglie qui ont bénéficié d'une vérification anatomopathologique (Jossan et al. 1991 ; Saura et al. 1994). Même si le mécanisme d'augmentation de l'activité de la MAO-B plaquettaire est encore inconnu, il peut être lié à l'augmentation transcriptionnelle de la protéine MAO-B et/ou à des changements dans le milieu cellulaire modifiant l'activité enzymatique (Song et al. 2000 ; Damberg et al. 2001 ; Balciuniene et al. 2002). En accord avec des études précédentes (Oreland et Gottfries 1986 ; Parnetti et al. 1994 ; Götz et al. 1998), nous avons montré dans une étude longitudinale, réalisée à Vienne, portant sur des sujets de 75 ans (Fischer et al. 2002), une augmentation hautement significative de l'activité de la MAO-B plaquettaire dans un groupe de patients atteints de démence de type Alzheimer (Figure 3). Une modification du rapport entre le nombre de neurones et le nombre de cellules de soutien dans les aires de cerveaux montrant une dégénération peut expliquer l'augmentation de l'activité de la MAO-B dans les cerveaux d'Alzheimer. Cependant, l'augmentation de l'activité de la MAO-B dans les plaquettes, qui n'expriment que la forme B de l'enzyme, interroge sur l'existence d'un facteur additionnel mais inconnu qui pourrait agir sur la régulation transcriptionnelle (Ekblom et al. 1998) de la quantité d'enzyme et/ou sur la régulation cinétique de l'activité moléculaire de la MAO-B plaquettaire (Bongioanni et al. 1997 ; Song et al. 2000).

Autres facteurs possibles

En plus des biomarqueurs classiques, par ex. les protéines tau et leurs formes phosphorylées et les peptides A β , plusieurs autres candidats biomarqueurs ont été testés et récemment décrits de façon exhaustive (Frank et al. 2003). Les NTP (*neuronal thread proteins*) représentent une famille de molécules exprimées dans le SNC. Dans une étude *post-mortem*, il a été montré une augmentation significative de l'immunoréactivité des NTP dans les cerveaux de patients Alzheimer (de la Monte et Wands 1992). A la suite de ce travail, l'étude de la NTP dans le LCR a révélé une concentration augmentée de ces NTP corrélée avec la progression de la démence et la dégénérescence neuronale (de la Monte et al. 1992). Mais la sensibilité et la spécificité de cette protéine en tant que marqueur possible de la MA n'ont pas été établies sur un nombre suffisant de patients.

Il a été proposé que la forme soluble de la protéine p97 de liaison du fer était augmentée dans le sang des patients atteints de MA. Dans une étude, tous les patients Alzheimer avaient des concentrations sériques élevées de ce paramètre sans recouvrement avec les sujets contrôles (Kennard et al. 1997). Récemment, ce résultat intéressant a été confirmé avec une technique analytique différente (Ujii et al. 2002). D'autres études sont nécessaires pour confirmer la protéine p97 comme marqueur fiable de la MA. Un autre facteur prometteur a été étudié dans le plasma, le niveau d'homocystéine qui pourrait être corrélé avec le risque de développer une MA. Un taux supérieur à 14 μ m/L serait associé avec un risque multiplié par deux de développer une MA (Seshadri et al. 2002).

Récemment, une augmentation significative des concentrations du TGF- β 1 (*transforming factor beta 1*) a été retrouvée dans la MA par deux groupes indépendants de chercheurs (Tarkowski et al. 2002 ; Zetterberg et al. 2004).

La prise en compte du rôle des agressions oxydantes et/ou nitrées des cellules dans la pathogenèse de la MA a conduit à tester des facteurs impliqués dans la peroxydation lipidique comme candidats marqueurs de MA. Récemment, Pratico et al. (2002) ont signalé des niveaux augmentés d'isoprostanés (par ex. 8,12-iso-iPF₂ α -VI) dans les liquides biologiques des patients atteints de MA. Ces résultats ont été confortés par les taux élevés de ce facteur retrouvés dans les liquides biologiques de souris transgéniques exprimant une amyloïdose de type MA (Pratico et al. 2001).

Analyse combinée de paramètres du LCR

Il y a beaucoup d'exemples de maladies du SNC où l'association de plusieurs paramètres augmente significativement la valeur du diagnostic, comme pour des maladies

neuroinflammatoires telles la neuroborréliose (Tumani et al. 1995) ou la SEP (Reiber et al. 1998). De même, plusieurs études ont montré une amélioration de la sensibilité et de la spécificité de l'association de plusieurs paramètres dans le diagnostic précoce et différentiel de la MA.

Dans un projet multicentrique international, l'analyse combinée de l'A β 1-42 et de la protéine tau a montré une sensibilité diagnostique de 85% et une spécificité de 58% pour distinguer une démence de type MA des autres démences (Hulstaert et al. 1999). Dans cette étude, le niveau moyen de sensibilité et de spécificité des marqueurs pris individuellement était significativement amélioré, de 74-79 à 86%, si les deux marqueurs étaient considérés simultanément. Dans notre étude (Lewczuk et al. 2004c), nous avons pu mettre en évidence une discrimination entre les patients atteints d'une MA, d'une démence de type non Alzheimer et de contrôles, légèrement supérieure quand les valeurs de l'A β 42 étaient associées avec celles de l'A β 40 (i. e. en considérant le quotient A β 42/A β 40). La discrimination était encore un peu améliorée par l'évaluation simultanée de la concentration de la protéine tau totale dans le LCR et la combinaison de ces trois paramètres permettait une caractérisation correcte de 94% des sujets. Andreassen et al. ont rapporté une sensibilité de 94% dans un groupe de 105 MA probables et de 88% dans un groupe de 58 MA possibles quand l'analyse dans le LCR de la protéine tau totale était accompagnée de la détermination de l'A β 1-42 (Andreassen et al. 2001). Cette étude montrait une forte spécificité pour différencier la MA d'autres troubles psychiatriques et de sujets non déments (100 et 89%, respectivement) ; cependant, de faibles concentrations de l'A β 1-42 étaient retrouvées dans plusieurs cas de démences à corps de Lewy, entraînant une spécificité plus faible dans la discrimination de cette pathologie. La spécificité la plus faible (48%) concernait la différenciation entre la MA et la démence vasculaire, probablement du fait d'une comorbidité avec la MA. L'étude de Kanai et al. (1998) rapporte des résultats similaires, avec des chiffres de 71 et 83% respectivement, pour la sensibilité et la spécificité diagnostique, avec la détermination simultanée de tau et de l'A β 1-42.

En reportant sur un diagramme les concentrations de l'A β 1-42 et de tau, Motter et al. (1995) trouvent une valeur prédictive de 96% pour les sujets avec des fortes valeurs de tau et des faibles valeurs de l'A β 1-42 d'avoir une MA et une valeur prédictive de 100% pour les sujets avec des faibles valeurs de tau et des fortes valeurs de l'A β 1-42 de ne pas avoir de MA. Des chiffres similaires, avec des valeurs prédictives positives et négatives de 90 et 95% respectivement, avec une prévalence de MA probable de 44%, ont été obtenus par Andreassen et al. (2001). Pour évaluer les données de l'analyse simultanée de l'A β 1-42 et de tau dans le LCR, Galasko et al. (1998) utilisent un système de classification binaire et obtiennent 85,2% de diagnostic exact avec une sensibilité et une spécificité de 90 et 80%, respectivement. Dans une étude récemment publiée, la combinaison, dans le LCR, de taux faibles d'A β 42 et de taux élevés de pTau181 permet de distinguer des MA débutantes de dégénérescences fronto-temporales avec une sensibilité de 72% et une spécificité de 93% (Schoonenboom et al. 2004).

Des résultats quelque peu discordants ont été mis en évidence quand les taux dans le LCR des protéines tau et tau phosphorylées ont été rapportés au génotype ApoE ; ainsi Arai et al. (1995) ne trouvent pas de corrélation entre la protéine tau totale et le nombre d'allèles ApoE ϵ 4 et Itoh et al. (2001) rapportent des résultats similaires avec la p-tau 199. Golombowski et al. (1997) et Blomberg et al. (1996) trouvent que les patients MA avec l'allèle ApoE ϵ 4 présentent des valeurs plus élevées de la protéine tau dans le LCR que ceux qui en sont dépourvus. Si l'on compare le génotype de l'ApoE et les taux de l'A β 1-42, les plus fortes concentrations du peptide ont été retrouvées chez les patients avec une MA ne possédant pas l'allèle ϵ 4, avec des valeurs intermédiaires pour les patients hétérozygotes pour ϵ 4 et avec les valeurs les plus faibles pour les homozygotes (Galasko et al. 1998 ; Hulstaert et al. 1999 ; Riemenschneider et al. 2000). Pour expliquer cette corrélation, une liaison à haute affinité entre l'A β 1-42 et l'ApoE a été suggérée (Strittmatter et al. 1993b). De plus, la sensibilité de la combinaison tau-A β 1-42 dans le LCR pour des patients suspectés de MA possédant l'allèle ϵ 4 augmente de 94 à 99% pour les cas probables et de 88 à 100% pour

les cas possibles (Andreasen et al. 2001). Par ailleurs, dans une étude incluant plus de 400 cas de MA, aucun effet de l'allèle ApoE ϵ 4 sur les taux de protéine tau dans le LCR n'a été mis en évidence (Andreasen et al. 1999). Ces observations conduisent à la conclusion que le génotype ApoE doit être pris en considération pour l'interprétation des taux de l'A β 1-42 et que l'association de ce génotype avec les autres paramètres peut améliorer significativement la spécificité et la sensibilité du diagnostic.

Nous avons récemment rapporté une diminution de la fraction A β 1-42 par rapport à l'ensemble des peptides A β dans le LCR de patients avec une MA. Dans cette étude, tous les patients avec une MA, et aucun des contrôles, apparaissent en dessous de la ligne de discrimination de 8,5%. Le diagramme des concentrations relatives de l'A β 1-42 versus l'A β 1-38 montre que tous les cas de MA et aucun des contrôles se situent dans la partie correspondant aux valeurs basses de l'A β 1-42 ; cependant, quelques cas de MA présentent des valeurs augmentées de l'A β 1-38, similaires à celles des sujets avec une maladie neuroinflammatoire chronique (Wiltfang et al. 2002) (figure 4). Cette observation attire l'attention sur la présence de réactions (micro)inflammatoires chroniques dans le SNC des sujets ayant une MA. De plus, ces données donnent des arguments pour faire l'hypothèse que la sévérité de la démence est corrélée négativement au pourcentage, mais non à la valeur absolue, des peptides A β coupés à leur extrémité carboxyl.

L'un des aspects les plus prometteurs de l'analyse neurochimique des démences est de définir des biomarqueurs capables de prédire de développement d'une MA chez des patients présentant un MCI (*mild cognitive impairment*). Un tel diagnostic précoce permettrait une mise en œuvre rapide d'un traitement. Si l'on se réfère aux données épidémiologiques de Petersen et al. (1999), environ 10-15% des sujets avec un MCI développeront une MA dans l'année. Récemment, Andreasen et al. (2003) ont rapporté une probabilité positive augmentée du rapport de la protéine tau totale (8,45), de la phospho-tau (7,49) et de l'A β 42 (8,2) dans le suivi d'une durée d'un an de 44 MCI progressant vers une MA. Ces données suggèrent que ces biomarqueurs sont déjà altérés dans la phase précoce de la démence et que ces facteurs peuvent aider à identifier les sujets avec un MCI qui évolueront vers une MA. De même, Andreassen et al. (2001) ont mis en évidence un taux de protéine tau élevé et un taux de l'A β 42 abaissé pour les valeurs basales des patients avec un MCI.

Dans une étude récente, une combinaison de trois marqueurs dans le LCR, soit la protéine tau, l'épitope phosphorylé pTau181 et l'A β 42, a pu détecter les MA débutantes parmi des patients remplissant les critères du MCI avec une sensibilité de 68% (95% CI 45-86%) et une spécificité de 97% (95% CI 83-100%) suggérant là encore la possibilité de discriminer un sous groupe de patients présentant un MCI qui pourraient évoluer vers une MA, de ceux qui resteront stables, et permettre un traitement précoce pour les sujets à risque (Zetterberg et al. 2003).

Une limite dans l'interprétation des performances des marqueurs du LCR est l'absence de standardisation des dosages. Les taux des marqueurs dans le LCR varient selon les études, à la fois entre des centres qui utilisent la même méthode ELISA, qu'entre des centres qui utilisent des méthodes ELISA différentes. Une standardisation analytique apparaît comme un pré requis pour les études ultérieures. Dans le cadre d'un projet EC, des aliquotes de pools de LCR avec différents niveaux de tau et d'A β sont maintenant disponibles et offrent une opportunité pour effectuer des comparaisons directes des résultats entre différents centres académiques.

Plusieurs facteurs pré-analytiques ou biologiques peuvent influencer la fiabilité analytique des analyses de LCR, comme le gradient de concentration des protéines le long de la moelle épinière, les liquides hémorragiques, la présence de protéines du plasma et le passage des barrières hémocéphalique et/ou hémoméningée et la dégradation ou la perte de protéines *in vitro* après le prélèvement. Pour les marqueurs tau et A β dans le LCR, le seul facteur pré-analytique capital est lié à la fixation des protéines sur les parois des tubes en verre ou en plastique dur, induisant des résultats faussement abaissés (Andreasen et al. 1999). Aussi, il est indispensable de prélever le LCR dans des tubes non absorbant en polypropylène. La conservation de ces LCR pour une période allant jusqu'à trois jours n'influence pas les taux

de ces protéines. Ainsi, les échantillons de LCR peuvent être transmis au laboratoire à température ambiante, après quoi les échantillons de LCR seront congelés jusqu'au dosage. Un autre point à considérer concerne les propriétés intrinsèques des anticorps utilisés dans les dosages d'immunoanalyse pour la quantification des protéines d'intérêt. Des différences entre les performances diagnostiques de différents kits peuvent provenir du fait que les anticorps reconnaissent des isoformes différentes ou des changements conformationnels de ces protéines. Les caractéristiques des anticorps monoclonaux de la protéine tau HT7, BT2 et AT120, ont été décrites en détail (Vanmechelen et al. 2000). Des données non publiées provenant de notre groupe montrent que la combinaison de l'anticorps monoclonal HT7 avec AT120 (un anticorps qui reconnaît tau indépendamment de son hyperphosphorylation) est meilleure qu'avec BT2 (qui reconnaît tau non phosphorylé à Ser 199), pour différencier les cas de MA des contrôles. De plus, la quantification du peptide β -amyloïde ne dépend pas seulement de l'anticorps C-terminal mais aussi du N-terminal. Tandis que l'anticorps 3D6 nécessite un groupement NH₂ libre à l'extrémité N-terminale du peptide β -amyloïde, d'autres anticorps (e. g. 6E10, 4G8, WO2) ne reconnaissent pas seulement le peptide A β 1-42 entier mais également tronqué à l'extrémité N-terminale.

Perspectives : nouvelles techniques de recherche de biomarqueurs de la MA (Spectroscopie à corrélation de fluorescence (SCF), Spectrométrie de masse (MS), DIGETM et multiplexing)

Une nouvelle approche pour appréhender la tendance des peptides A β à former de larges agrégats est leur détection et quantification dans le LCR par SCF (Eigen et Rigler 1994). Ces agrégats sont les composants principaux des plaques amyloïdes qui sont associées à la MA (Beyreuther et al. 1993). La nocivité des peptides A β provient de leur structure secondaire plus que de leur structure primaire définie par la séquence d'acides aminés (Selkoe 1994). Les peptides A β solubles constitués d'une forte proportion de structures en feuillets β forment des agrégats fibrillaires insolubles selon un procédé décrit comme une « polymérisation ensemencée » (Harper et Lansbury 1997).

La SCF détecte la fluorescence de molécules marquées passant dans un petit volume illuminé confocal de moins du femtolitre par diffusion aléatoire. Puisque le coefficient de diffusion des molécules dépend de leur taille, il est possible de faire la distinction entre les agrégats de grosses molécules et les petits monomères. Les gros agrégats isolés délivrent des flash d'intense fluorescence quand ils traversent le volume confocal, permettant de les différencier facilement du faible bruit de fond produit par les monomères. Le potentiel diagnostic de la SCF dans la MA a été démontré il y a cinq ans pour la première fois (Pitschke et al. 1998). Des peptides A β 1-42 synthétiques ont été marqués avec une sonde fluorescente et mélangés avec du LCR provenant de patients avec une MA, une démence d'un autre type ou de volontaires sains. Ces sondes se fixent sur les agrégats amyloïdes préexistant dans le LCR en présence de zinc (Brown et al. 1997). Tous les patients Alzheimer avaient des concentrations de grands agrégats significativement plus élevées que les contrôles ou que les patients avec une démence autre que de type Alzheimer. Cette étude montre que la technique de SCF représentera dans le futur un outil extrêmement sensible pour le diagnostic précoce et différentiel de la MA. Elle souligne le potentiel d'une détection sensible et sélective des agrégats amyloïdes délétères dans le plasma pour renforcer le diagnostic basé sur les biomarqueurs du LCR.

La spectrométrie de masse SELDI-TOF (*Surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight*) est actuellement appliquée dans plusieurs champs de la biologie et de la médecine, comme cela a été extensivement répertorié (Merchant et Weinberger 2000). Brièvement, les échantillons biologiques non prétraités (e. g. plasma, LCR, surnageants de cultures cellulaires, etc.) sont appliqués sur des « *ProteinChips* » qui utilisent des surfaces à propriétés chromatographiques (e. g. échanges cation/anion, interactions hydrophobes de surface, affinité métallique de surface, etc.), et après des étapes de lavage, seules les molécules retenues à la surface seront analysées.

Manifestement, cette technique offre l'opportunité d'utiliser des puces à immuno-affinité avec des anticorps spécifiques liés par covalence à leur surface pour capturer les antigènes

d'intérêt. Ces molécules sont ensuite désorbées et ionisées avec un faisceau laser et le temps de vol des molécules dans la chambre à vide du spectromètre de masse est corrélé avec la masse moléculaire des ions. En utilisant des standards de masse, la masse moléculaire des peptides ou protéines analysés peut être mesurée avec une imprécision de moins de 0,05%, i. e. environ 2-3 Da dans l'échelle des masses moléculaires des peptides. Les polypeptides d'intérêt peuvent être ensuite caractérisés par dégradation en phase gazeuse et la technologie de cartographie peptidique, en utilisant d'autres techniques de spectrométrie de masse (e. g. LC-MS/MS). La spectrométrie de masse SELDI-TOF a été récemment utilisée avec succès pour analyser les peptides β -amyloïdes dans le surnageant de cellules HEK 293 transfectées (Frears et al. 1999), et nous sommes le premier groupe à avoir récemment analysé et comparé les profils de l'A β dans le LCR et le tissu cérébral *post-mortem* de patients avec une MA et des sujets contrôles non déments (Lewczuk et al. 2003, 2004b).

Une autre technique potentiellement intéressante est l'électrophorèse sur gel bidimensionnelle différentielle en fluorescence (DIGETM, *Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis*) qui offre des opportunités pour étudier des modifications dans l'expression des protéines dans du matériel biologique (Karp et al. 2004). Brièvement, jusqu'à trois échantillons peuvent subir l'électrophorèse sur un gel unique et peuvent ensuite être scannés avec un laser fluorescent à trois faisceaux (Typhon scanner). L'étape cruciale de la procédure est le marquage des protéines avec une sonde fluorescente (CyDye) qui permette de quantifier précisément les différences dans les profils d'expression des protéines (coefficient de variation < 20%, jusqu'à 3000 spots différents), en utilisant un logiciel sophistiqué (DeCyder). Comme des échantillons en provenance de plusieurs sources (par ex. des patients ou des témoins) sont simultanément analysés sur le même gel, une imprécision dans la méthode concernera des protéines similaires de la même façon par ex., ce qui compense les erreurs méthodologiques. Le seuil de sensibilité pour les protéines est de l'ordre du nanogramme. Malgré le marquage fluorescent, la protéine d'intérêt peut ensuite être caractérisée par un séquençage en phase gazeuse ou une cartographie de peptides. Les LCR de patients présentant des troubles neurodégénératifs et de sujets contrôles sont d'abord débarrassés des protéines présentes en grande quantité par passage sur des colonnes à multiples immunoaffinités. Après une étape de purification et de concentration, les échantillons sont étudiés par DIGE en utilisant un gradient de pH pour la première dimension (IPG, gradient non linéaire 3-10) et en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) dans la seconde dimension (masses moléculaires 600 000-5000).

Puisqu'il est vraisemblable qu'une analyse combinée de plusieurs marqueurs dans le LCR sera nécessaire pour améliorer la performance diagnostique, les méthodes de multiplex prendront de l'importance. L'une de ces techniques utilise des microbilles xMAP (*Multiple Analyte Profile*, Luminex, Austin TX, US), méthode multiplex de cytométrie de flux basée sur le couplage d'anticorps à des microsphères où sont incorporés des marqueurs fluorescents (Vignali 2000). Un anticorps fluorescent complémentaire se lie aux protéines capturées par les microsphères, chaque microsphère a un spectre identifié et la quantification est basée sur l'intensité du signal. Par comparaison avec les méthodes ELISA conventionnelles, cette technologie multiplex permet la quantification simultanée de plus de cent protéines dans un faible volume d'échantillon et permet une meilleure reproductibilité que plusieurs méthodes ELISA. Nous avons utilisé la technologie xMAP pour produire des dosages multiplex pour la quantification simultanée de plusieurs peptides A β et d'isoformes de protéines tau. Les données préliminaires montrent que la performance diagnostique est équivalente ou supérieure à celle obtenue avec la technique ELISA.

Conclusion

Le nombre croissant de patients déments appelle une amélioration des standards diagnostics *intra vitam*. Les arguments brièvement résumés dans cet article sont en faveur de l'utilisation de l'analyse du LCR pour l'aide au diagnostic dans la démence. Quand il existe une forte suspicion de maladies infectieuse ou inflammatoire ou en cas de démences

subaiguës, une analyse de routine du LCR associée à d'autres tests de recherche de la cause de la démence, telle l'infection, peut conduire à un diagnostic spécifique et souvent curable. Cette option est renforcée par la faible incidence de fait des complications de la ponction de LCR, en particulier dans ce groupe de patients. (Blennow et al. 1993, Andreasen et al. 2001). L'analyse LCR/sérum doit être effectuée en tenant compte du concept généralement accepté, sur des bases théoriques et des confirmations pratiques, d'une diffusion protéique liée au débit de LCR (Reiber et Peter 2001). L'analyse LCR/sérum peut livrer des informations utiles pour des patients considérés comme non traitables. Un diagnostic précoce et définitif peut permettre de démarrer un traitement alors que le patient n'a encore que des déficits mineurs et est au mieux à même d'en bénéficier. A mesure que les traitements s'amélioreront, un diagnostic très précoce de la MA deviendra impératif. L'analyse simultanée de deux voire davantage de paramètres dans le LCR peut significativement améliorer la fiabilité du diagnostic de la MA. Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer la sensibilité et la spécificité des marqueurs, incluant des patients pour qui l'on dispose d'une confirmation *post-mortem* du diagnostic. Avec l'introduction de nouvelles techniques très sensibles e. g. la SCF ou la spectrométrie de masse, une avancée supplémentaire dans le diagnostic précoce de la MA est attendue.

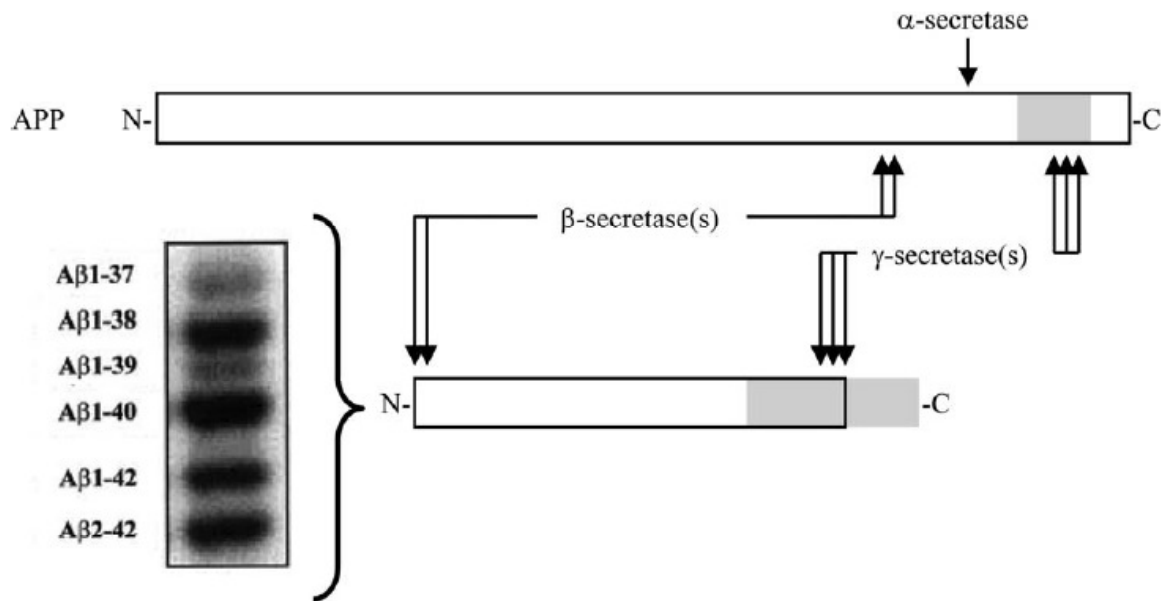


Figure 1. La scission normale de l'APP (*amyloid precursor protein*) par les β - et γ -sécrétases conduit à la formation d'au moins six peptides β -amyloïdes différents. La position « classique » de la scission par la β -sécrétase est définie par la position-1 des A β peptides; toutefois, une scission alternative par la β -sécrétase conduit à la libération de peptides débutant en position-2 et aussi, probablement, en position-3. Les scissions par la(les) γ -sécrétase(s) au niveau de l'isoleucine (position-40) génèrent A β 1-40, et les scissions au niveau de la thréonine (position 42) génère A β 1-42. Récemment, il a été aussi découvert des peptides avec des positions C-terminales 37, 38, et 39 (Wiltfang et al. 2002). Ceci peut indiquer la présence de plus d'une activité de cette enzyme, ce qui fait rechercher un possible inhibiteur spécifique. La boîte grisée indique la position du domaine transmembranaire de l'APP.

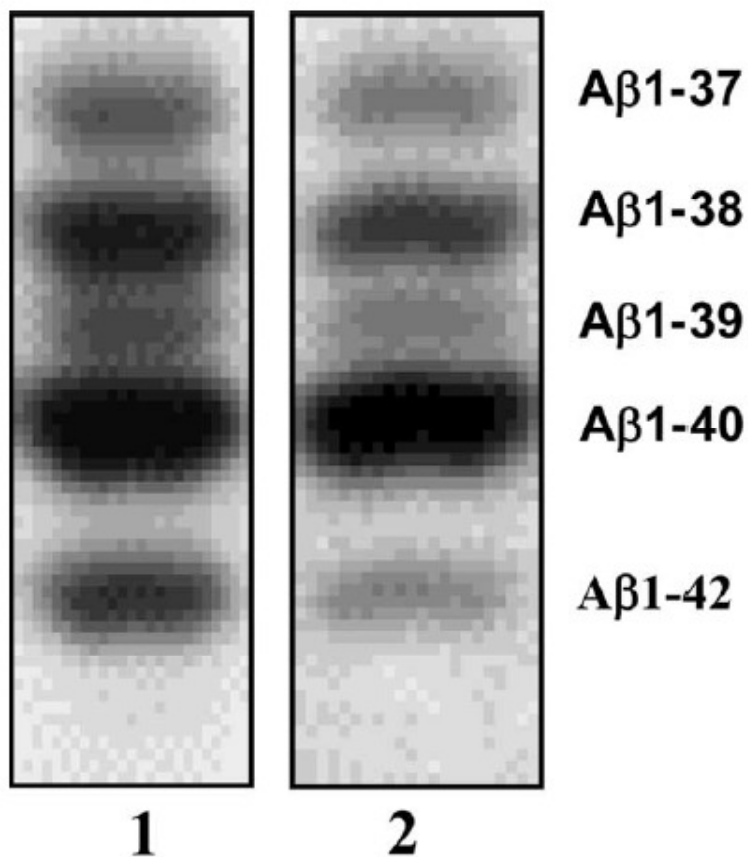


Figure 2. Décroissance de Aβ1-42 dans le LCR d'un patient atteint de MA (bande 2) comparée à un cas témoin (bande 1) (Aβ-SDS-PAGE/immunoblot quantitatif). D'après Wiltfang et al. 2001a, avec modifications.

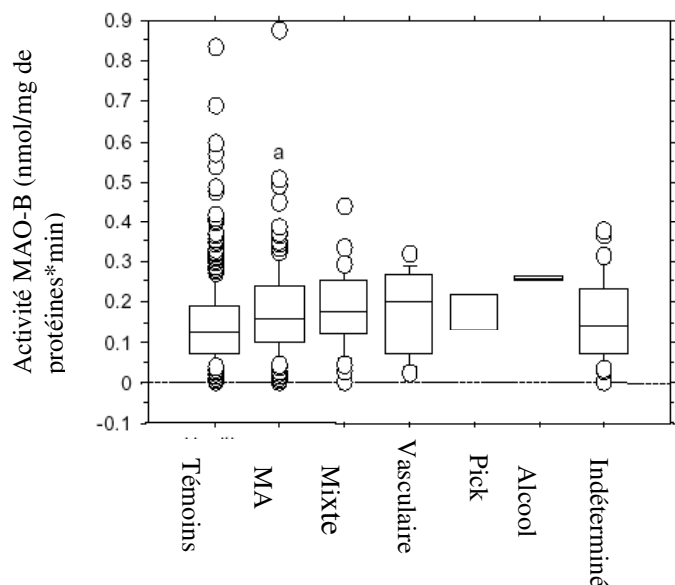


Figure 3. Niveau d'activité de la MAO-B plaquettaire dans les groupes VITA et centenaires. Comparaison entre différents diagnostics de démences et des volontaires sains. Groupe témoin (n = 473, MMSE $28,1 \pm 0,06$) ; Maladie d'Alzheimer (n = 129, MMSE $13,6 \pm 0,81$) ; démence mixte (n = 29, MMSE $10,2 \pm 1,49$) ; démence vasculaire (n = 11, MMSE $14 \pm 2,86$) ; Maladie de Pick (n = 3, MMSE $3,7 \pm 3,66$) ; démence alcoolique (n = 2, MMSE $12 \pm 1,00$) ; indéterminé (n = 32, MMSE $20,0 \pm 2,02$). ANOVA et Fisher-PLSD : P < 0,005, témoins versus maladie d'Alzheimer

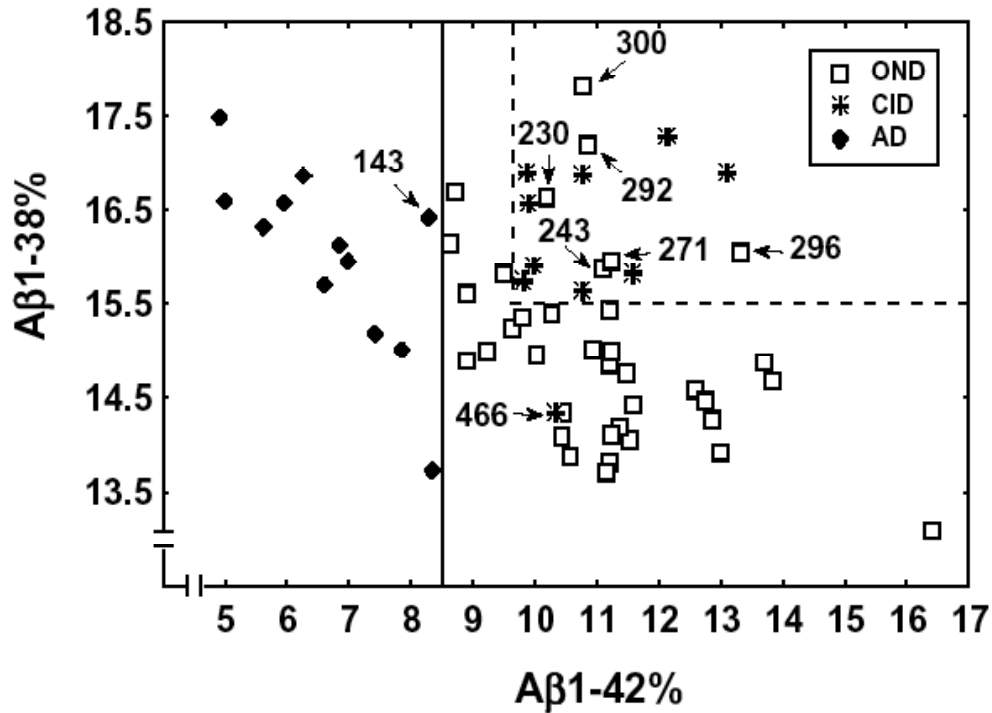


Figure 4. Diagramme du rapport des concentrations relatives dans le LCR de l'Aβ1-38 (axe vertical Aβ1-38%) et Aβ1-42 (axe horizontal Aβ1-42%), pour des cas de Maladie d'Alzheimer (AD), de pathologies neurologiques non démentielles (OND) et de maladies neuro-inflammatoires chroniques (CID). Avec une valeur discriminante de 8,5% pour le pourcentage d'Aβ1-42, tous les cas de maladie d'Alzheimer sont séparés des autres, avec une sensibilité et une spécificité de 100%. L'augmentation du pourcentage de l'Aβ1-38 au-dessus de 15,5% observé dans quelques cas de maladie d'Alzheimer correspond à l'augmentation de l'Aβ1-38 dans le CID et montre des signes de neuro-inflammation dans ces cas de maladie d'Alzheimer. Modifié d'après Wiltfang et al. (2002)

Bibliographie

- Adolfsson R, Gottfries CG, Oreland L, Wiberg A, Winblad B. 1980. Increased activity of brain and platelet monoamine oxidase in dementia of Alzheimer type. *Life Sci* 27:1029-1034.
- Alafuzoff I, Iqbal K, Friden H, Adolfsson R, Winblad B. 1987. Histopathological criteria for progressive dementia disorders: Clinical-pathological correlation and classification by multivariate data analysis. *Acta Neuropathol (Berlin)* 74:209-225.
- Alexopoulos GS, Young RC, Lieberman KW, Shamoian CA. 1987. Platelet MAO activity in geriatric patients with depression and dementia. *Am J Psychiatry* 144:1480-1483.
- Andreasen N, Minthon L, Clarberg A, Davidsson P, Gottfries J, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Winblad B, Blennow K. 1999. Sensitivity, specificity, and stability of CSF-tau in AD in a community-based patient sample. *Neurology* 53:1488-1494.
- Andreasen N, Minthon L, Davidsson P, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Winblad B, Blennow K. 2001. Evaluation of CSF tau and CSF-Aβ42 as diagnostic markers for Alzheimer disease in clinical practice. *Arch Neurol* 58:373-379.
- Andreasen N, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Davidsson P, Blennow K. 2003. Cerebrospinal fluid levels of total-tau, phospho-tau and Aβ42 predicts development of Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Acta Neurol Scand Suppl* 179:47-51.
- Arai H, Terajima M, Miura M, Higuchi S, Muramatsu T, Machida N, Seiki H, Takase S, Clark CM, Lee VM et al. 1995. Tau in cerebrospinal fluid: a potential diagnostic marker in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 38:649-652.
- Arai H, Ishiguro K, Ohno H, Moriyama M, Itoh N, Okamura N, Matsui T, Morikawa Y, Horikawa E, Kohno H, Sasaki H, Imahori K. 2000. CSF phosphorylated tau protein and mild cognitive impairment: A prospective study. *Exp Neurol* 166:201-203.
- Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. 1992. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42:631-639.
- Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow EM, Hyman BT. 2002. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berlin)* 103:26-35.
- Baas PW, Pienkowski TP, Kosik KS. 1991. Processes induced by tau expression in Sf9 cells have an axon-like microtubule organization. *J Cell Biol* 115:1333-1344.
- Balciuniene J, Emilsson L, Oreland L, Pettersson U, Jazin E. 2002. Investigation of the functional effect of monoamine oxidase polymorphisms in human brain. *Hum Genet* 110:1-7.
- Beyreuther K, Pollwein P, Multhaup G, Monning U, König G, Dyrks T, Schubert W, Masters CL. 1993. Regulation and expression of the Alzheimer's beta/A4 amyloid protein precursor in health, disease, and Down's syndrome. *Ann NY Acad Sci* 695:91-102.
- Blennow K, Wallin A, Hager O. 1993. Low frequency of postlumbar puncture headache in demented patients. *Acta Neurol Scand* 88:221-223.
- Blennow K, Vanmechelen E, Hampel H. 2001. CSF total tau, Aβ42 and phosphorylated tau protein as biomarkers for Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 24:87-97.
- Blomberg M, Jensen M, Basun H, Lannfelt L, Wahlund LO. 1996. Increasing cerebrospinal fluid tau levels in a subgroup of Alzheimer patients with apolipoprotein E ε4 allele during 14 months follow-up. *Neurosci Lett* 214:163-166.
- Bongioanni P, Gemignani F, Boccardi B, Borgna M, Rossi B. 1997. Platelet monoamine oxidase molecular activity in demented patients. *Ital J Neurol Sci* 18:151-156.
- Bonuccelli U, Piccini P, Marazziti D, Cassano GB, Muratorio A. 1990. Increased platelet 3H-imipramine binding and monoamine oxidase B activity in Alzheimer's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 2:139-147.
- Braak H, Braak E. 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berlin)* 82:239-259.
- Brown AM, Tummolo DM, Rhodes KJ, Hofmann JR, Jacobsen JS, Sonnenberg-Reines J. 1997. Selective aggregation of endogenous beta-amyloid peptide and soluble amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid by zinc. *J Neurochem* 69:1204-1212.

- Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. 2000. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 33:95-130.
- Buerger K, Zinkowski R, Teipel S.J, Tapiola T, Arai H, Blennow K, Andreasen N, Hofmann-Kiefer K, DeBernardis J, Kerkman D, McCulloch C, Kohnken R, Padberg F, Pirttila T, Schapiro MB, Rapoport SI, Moller HJ, Davies P, Hampel H. 2002. Differential diagnosis of Alzheimer disease with cerebrospinal fluid levels of tau protein phosphorylated at threonine 231. *Arch Neurol* 59:1267-1272.
- Buerger K, Zinkowski R, Teipel SJ, Arai H, DeBernardis J, Kerkman D, McCulloch C, Padberg F, Faltraco F, Goernitz A, Tapiola T, Rapoport SI, Pirttila T, Moller HJ, Hampel H. 2003. Differentiation of geriatric major depression from Alzheimer's disease with CSF tau protein phosphorylated at threonine 231. *Am J Psychiatry* 160:376-379.
- Bullock R. 2002. New drugs for Alzheimer's disease and other dementias. *Br J Psychiatry* 180:135-139.
- Damberg M, Garpenstrand H, Hallman J, Oreland L. 2001. Genetic mechanisms of behavior: Don't forget about the transcription factors. *Mol Psychiatry* 6:503-510.
- Danielczyk W, Streifler M, Konradi C, Riederer P, Moll G. 1988. Platelet MAO-B activity and the psychopathology of Parkinson's disease, senile dementia and multi-infarct dementia. *Acta Psychiatr Scand* 78:730-736.
- Dawson HN, Ferreira A, Eyster M.V, Ghoshal N, Binder LI, Vitek MP. 2001. Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J Cell Sci* 114:1179-1187.
- de la Monte SM, Volicer L, Hauser SL, Wands JR. 1992. Increased levels of neuronal thread protein in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 32:733-742.
- De la Monte SM, Wands JR. 1992. Neuronal thread protein overexpression in brains with Alzheimer's disease lesions. *J Neurol Sci* 113:152-164.
- Eigen M, Rigler R. 1994. Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5740-5747.
- Eikelenboom P, Rozemuller AJ, Hoozemans JJ, Veerhuis R, van Gool WA. 2000. Neuroinflammation and Alzheimer disease: clinical and therapeutic implications. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 14:S54-61.
- Eklom J, Garpenstrand H, Damberg M, Chen K, Shih JC, Oreland L. 1998. Transcription factor binding to the core promoter of the human monoamine oxidase B gene in the cerebral cortex and in blood cells. *Neurosci Lett* 258:101-104.
- Fallon BA, Nields JA. 1994. Lyme disease: A neuropsychiatric illness. *Am J Psychiatry* 151:1571-1583.
- Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM. 1997. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *J Am Med Assoc* 278:1349-1356.
- Fischer P, Gotz ME, Ellinger B, Streifler M, Riederer P, Danielczyk W. 1994. Platelet monoamine oxidase B activity and vitamin B12 in dementia. *Biol Psychiatry* 35:772-774.
- Fischer P, Jungwirth S, Krampla W, Weissgram S, Kirchmeyr W, Schreiber W, Huber K, Rainer M, Bauer P, Tragl KH. 2002. Vienna Transdanube Aging 'VITA': Study design, recruitment strategies and level of participation. *J Neural Transm Suppl* 105-116.
- Frank RA, Galasko D, Hampel H, Hardy J, de Leon MJ, Mehta PD, Rogers J, Siemers E, Trojanowski JQ. 2003. Biological markers for therapeutic trials in Alzheimer's disease. Proceedings of the Biological Markers Working Group; NIA initiative on neuroimaging in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 24:521-536.
- Frears ER, Stephens DJ, Walters CE, Davies H, Austen BM. 1999. The role of cholesterol in the biosynthesis of b-amyloid. *Neuroreport* 10:1699-1705.
- Galasko D, Chang L, Motter R, Clark CM, Kaye J, Knopman D, Thomas R, Kholodenko D, Schenk D, Lieberburg I, Miller B, Green R, Basherad R, Kertiles L, Boss MA, Seubert P. 1998. High cerebrospinal fluid tau and low amyloid b42 levels in the clinical diagnosis of Alzheimer disease and relation to apolipoprotein E genotype. *Arch Neurol* 55:937-945.

Golombowski S, Muller-Spahn F, Romig H, Mendla K, Hock C. 1997. Dependence of cerebrospinal fluid tau protein levels on apolipoprotein E4 allele frequency in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 225:213-215.

Gottfries CG, Adolfsson R, Aquilonius SM, Carlsson A, Eckernas SA, Nordberg A, Oreland L, Svennerholm L, Wiberg A, Winblad B. 1983. Biochemical changes in dementia disorders of Alzheimer type (AD/SDAT). *Neurobiol Aging* 4:261-271.

Götz ME, Fischer P, Gsell W, Riederer P, Streifler M, Simanyi M, Muller F, Danielczyk W. 1998. Platelet monoamine oxidase B activity in dementia. A 4-year follow-up. *Dement Geriatr Cogn Disord* 9:74-77.

Greenawalt JW, Schnaitman C. 1970. An appraisal of the use of monoamine oxidase as an enzyme marker for the outer membrane of rat liver mitochondria. *J Cell Biol* 46:173-179.

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4913-4917.

Hampel H, Buerger K, Kohnken R, Teipel SJ, Zinkowski R, Moeller HJ, Rapoport SI, Davies P. 2001. Tracking of Alzheimer's disease progression with cerebrospinal fluid tau protein phosphorylated at threonine 231. *Ann Neurol* 49:545- 546.

Hampel H, Buerger K, Zinkowski R, Teipel SJ, Goernitz A, Andreasen N, Sjögren M, DeBernardis J, Kerkman D, Ishiguro K, Ohno H, Vanmechelen E, Vanderstichele H, McCulloch C, Moller HJ, Davies P, Blennow K. 2004. Measurement of phosphorylated tau epitopes in the differential diagnosis of Alzheimer disease: A comparative cerebrospinal fluid study. *Arch Gen Psychiatry* 61:95-102.

Harada A, Oguchi K, Okabe S, Kuno J, Terada S, Ohshima T, Sato-Yoshitake R, Takei Y, Noda T, Hirokawa N. 1994. Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* 369:488-491.

Harper JD, Lansbury PT. Jr. 1997. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: Mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu Rev Biochem* 66:385-407.

Hesse C, Rosengren L, Andreasen N, Davidsson P, Vanderstichele H, Vanmechelen E, Blennow K. 2001. Transient increase in total tau but not phospho-tau in human cerebrospinal fluid after acute stroke. *Neurosci Lett* 297:187-190.

Hu YY, He SS, Wang X, Duan QH, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Wang J. 2002. 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* 160:1269-1278.

Hulstaert F, Blennow K, Ivanoiu A, Schoonderwaldt HC, Riemenschneider M, De Deyn PP, Bancher C, Cras P, Wiltfang J, Mehta PD, Iqbal K, Pottel H, Vanmechelen E, Vanderstichele H. 1999. Improved discrimination of AD patients using b-amyloid(1-42) and tau levels in CSF. *Neurology* 52:1555- 1562.

Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Zaidi T, Merz PA, Wen GY, Shaikh SS, Wisniewski HM, Alafuzoff I, Winblad B. 1986. Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease. *Lancet* ii:421- 426.

Iqbal K, Alonso Adel C, El-Akkad E, Gong CX, Haque N, Khatoon S, Pei JJ, Tsujio I, Wang JZ, Grundke-Iqbal I. 2002. Significance and mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration and therapeutic targets to inhibit this lesion. *J Mol Neurosci* 19:95-99.

Itoh N, Arai H, Urakami K, Ishiguro K, Ohno H, Hampel H, Buerger K, Wiltfang J, Otto M, Kretschmar H, Moeller HJ, Imagawa M, Kohno H, Nakashima K, Kuzuhara S, Sasaki H, Imahori K. 2001. Large-scale, multicenter study of cerebrospinal fluid tau protein phosphorylated at serine 199 for the antemortem diagnosis of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 50:150-156.

Jossan SS, Gillberg PG, Gottfries CG, Karlsson I, Oreland L. 1991. Monoamine oxidase B in brains from patients with Alzheimer's disease: A biochemical and autoradiographical study. *Neuroscience* 45:1-12.

Kanai M, Matsubara E, Isoe K, Urakami K, Nakashima K, Arai H, Sasaki H, Abe K, Iwatsubo T, Kosaka T, Watanabe M, Tomidokoro Y, Shizuka M, Mizushima K, Nakamura T, Igeta Y,

Ikeda Y, Amari M, Kawarabayashi T, Ishiguro K, Harigaya Y, Wakabayashi K, Okamoto K, Hirai S, Shoji M. 1998. Longitudinal study of cerebrospinal fluid levels of tau, A beta1-40, and A beta1-42(43) in Alzheimer's disease: A study in Japan. *Ann Neurol* 44:17-26.

Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B. 1987. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325:733-736.

Karp NA, Kreil DP, Lilley KS. 2004. Determining a significant change in protein expression with DeCyder during a pair-wise comparison using two-dimensional difference gel electrophoresis. *Proteomics* 4:1421-1432.

Kennard ML, Feldman H, Yamada T, Jefferies WA. 1996. Serum levels of the iron binding protein p97 are elevated in Alzheimer's disease. *Nat Med* 2:1230-1235.

Knopman D. 2001. Pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 1:428-434.

Knopman DS, DeKosky ST, Cummings JL, Chui H, Corey-Bloom J, Relkin N, Small GW, Miller B, Stevens JC. 2001. Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 56:1143-1153.

Knops J, Kosik KS, Lee G, Pardee JD, Cohen-Gould L, McConlogue L. 1991. Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes. *J Cell Biol* 114:725-733.

Lewczuk P, Esselmann H, Meyer M, Wollscheid V, Neumann M, Otto M, Maler JM, Ruther E, Kornhuber J, Wiltfang J. 2003. The amyloid-b (Ab) peptide pattern in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease: evidence of a novel carboxyterminally elongated Ab peptide. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17:1291-1296.

Lewczuk P, Esselmann H, Bibl M, Beck G, Maler JM, Otto M, Kornhuber J, Wiltfang J. 2004a. 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* 23:115-122.

Lewczuk P, Esselmann H, Groemer TW, Bibl M, Maler JM, Steinacker P, Otto M, Kornhuber J, Wiltfang J. 2004b. Amyloid b peptides in cerebrospinal fluid as profiled with surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: Evidence of novel biomarkers in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 55:524-530.

Lewczuk P, Esselmann H, Otto M, Maler JM, Henkel AW, Henkel MK, Eikenberg O, Antz C, Krause WR, Reulbach U, Kornhuber J, Wiltfang J. 2004c. Neurochemical diagnosis of Alzheimer's dementia by CSF Ab42, Ab42/Ab40 ratio and total tau. *Neurobiol Aging* 25:273-281.

Lewczuk P, Esselmann H, Bibl M, Paul S, Svitek J, Miertschischk J, Meyrer R, Smirnov A, Maler J.M, Klein C, Otto M, Bleich S, Sperling W, Kornhuber J, Ruther E, Wiltfang J. 2004d. Electrophoretic separation of amyloid b (Ab) peptides in plasma. *Electrophoresis* 25:3336-3343.

Louis ED, Lynch T, Kaufmann P, Fahn S, Odel J. 1996. Diagnostic guidelines in central nervous system Whipple's disease. *Ann Neurol* 40:561-568.

Louis ED. 2003. Whipple disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 3:470-475.

Luer W, Poser S, Weber T, Jurgens S, Eichenlaub D, Pohle HD, Felgenhauer K. 1988. Chronic HIV encephalitis. I. Cerebrospinal fluid diagnosis. *Klin Wochenschr* 66:21-25.

Mawal-Dewan M, Henley J, Van de Voorde A, Trojanowski JQ, Lee VM. 1994. The phosphorylation state of tau in the developing rat brain is regulated by phosphoprotein phosphatases. *J Biol Chem* 269:30981-30987.

Mayeux R. 1998. Evaluation and use of diagnostic tests in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 19:139-143.

Mayeux R, Saunders AM, Shea S, Mirra S, Evans D, Roses AD, Hyman BT, Crain B, Tang MX, Phelps CH. 1998. Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of Alzheimer's disease. Alzheimer's Disease Centers Consortium on Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease. *New Engl J Med* 338:506-511.

McGeer PL, McGeer EG. 2001. Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 22:799-809.

Merchant M, Weinberger SR. 2000. Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Electrophoresis* 21:1164-1177.

Motter R, Vigo-Pelfrey C, Kholodenko D, Barbour R, Johnson- Wood K, Galasko D, Chang L, Miller B, Clark C, Green R et al. 1995. Reduction of beta-amyloid peptide₄₂ in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 38:643-648.

Mulder C, Scheltens P, Visser JJ, van Kamp GJ, Schutgens RB. 2000. Genetic and biochemical markers for Alzheimer's disease: Recent developments. *Ann Clin Biochem* 37:593-607.

Nägga K, Gottfries J, Blennow K, Marcusson J. 2002. Cerebrospinal fluid phospho-tau, total tau and b-amyloid₁₋₄₂ in the differentiation between Alzheimer's disease and vascular dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 14:183-190.

Nakamura S, Kawamata T, Akiguchi I, Kameyama M, Nakamura N, Kimura H. 1990. Expression of monoamine oxidase B activity in astrocytes of senile plaques. *Acta Neuropathol (Berlin)* 80:419-425.

National Institute on Aging Working Group. 1998. 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* 19:109-116.

Navia BA, Price RW. 1987. The acquired immunodeficiency syndrome dementia complex as the presenting or sole manifestation of human immunodeficiency virus infection. *Arch Neurol* 44:65-69.

Oreland L, Gottfries CG. 1986. Brain and brain monoamine oxidase in aging and in dementia of Alzheimer's type. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 10:533-540.

Otto M, Wiltfang J, Tumani H, Zerr I, Lantsch M, Kornhuber J, Weber T, Kretzschmar HA, Poser S. 1997. Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt- Jakob disease. *Neurosci Lett* 225:210-212.

Otto M, Esselmann H, Schulz-Shaeffer W, Neumann M, Schroter A, Ratzka P, Cepek L, Zerr I, Steinacker P, Windl O, Kornhuber J, Kretzschmar HA, Poser S, Wiltfang J. 2000. Decreased b-amyloid₁₋₄₂ in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 54:1099-1102.

Panegyres PK. 1997. The amyloid precursor protein gene: A neuropeptide gene with diverse functions in the central nervous system. *Neuropeptides* 31:523-535.

Papassotiropoulos A, Streffer JR, Tsolaki M, Schmid S, Thal D, Nicosia F, Iakovidou V, Maddalena A, Lu" tjohnann D, Ghebremedhin E, Hegi T, Pasch T, Tra" xler M, Bru" hl A, Benussi L, Binetti G, Braak H, Nitsch R.M, Hock C. 2003. Increased brain b-amyloid load, phosphorylated tau, and risk of Alzheimer disease associated with an intronic CYP46 polymorphism. *Arch Neurol* 60:29-35.

Parnetti L, Reboldi GP, Santucci C, Santucci A, Gaiti A, Brunetti M, Cecchetti R, Senin U. 1994. Platelet MAO-B activity as a marker of behavioural characteristics in dementia disorders. *Aging (Milano)* 6:201-207.

Parnetti L, Lanari A, Amici S, Gallai V, Vanmechelen E, Hulstaert F. 2001. CSF phosphorylated tau is a possible marker for discriminating Alzheimer's disease from dementia with Lewy bodies., Phospho-Tau International Study Group. *Neurol Sci* 22:77-78.

Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. 1999. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* 56:303-308.

Pitschke M, Prior R, Haupt M, Riesner D. 1998. Detection of single amyloid beta-protein aggregates in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's patients by fluorescence correlation spectroscopy. *Nat Med* 4:832-834.

Poser S, Luer W, Eichenlaub D, Pohle HD, Weber T, Jurgens S, Felgenhauer K. 1988. Chronic HIV encephalitis. II. Clinical aspects. *Klin Wochenschr* 66:26-31.

Pratico D, Uryu K, Leight S, Trojanoswki JQ, Lee VM. 2001. Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *J Neurosci* 21:4183-4187.

Pratico D, Clark CM, Liun F, Rokach J, Lee VY, Trojanowski JQ. 2002. Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment: A possible predictor of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 59:972-976.

Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. 1994. Practice parameter for diagnosis and evaluation of dementia (summary statement). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 44:2203-2206.

Rao SM. 1986. Neuropsychology of multiple sclerosis: A critical review. *J Clin Exp Neuropsychol* 8:503-542.

Reiber H, Ungefehr S, Jacobi C. 1998. The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. *Mult Scler* 4:111-117.

Reiber H. 2001. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta* 310:173-186.

Reiber H, Peter JB. 2001. Cerebrospinal fluid analysis: Disease related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci* 184:101-122.

Riederer P, Youdim MBH. 1993. The therapeutic place and value of present and future MAO-B inhibitors-L-deprenyl as the gold standard. In: Szelenyi J, editor. *Inhibitors of monoamine oxidase B, pharmacology and clinical use in neurodegenerative disorders*. Basel: Birkhäuser. p 327-338.

Riemenschneider M, Schmolke M, Lautenschlager N, Guder WG, Vanderstichele H, Vanmechelen E, Kurz A. 2000. Cerebrospinal beta-amyloid (1-42) in early Alzheimer's disease: Association with apolipoprotein E genotype and cognitive decline. *Neurosci Lett* 284:85-88.

Rosner H, Rebhan M, Vacun G, Vanmechelen E. 1995. Developmental expression of tau proteins in the chicken and rat brain: Rapid down-regulation of a paired helical filament epitope in the rat cerebral cortex coincides with the transition from immature to adult tau isoforms. *Int J Dev Neurosci* 13:607-617.

Rovaris M, Filippi M. 2000. MRI correlates of cognitive dysfunction in multiple sclerosis patients. *J Neurovirol* 6(Suppl 2):S172-175.

Saura J, Luque JM, Cesura AM, Da Prada M, Chan-Palay V, Huber G, Loffler J, Richards JG. 1994. Increased monoamine oxidase B activity in plaque-associated astrocytes of Alzheimer brains revealed by quantitative enzyme radioautography. *Neuroscience* 62:15-30.

Schoonenboom NS, Pijnenburg YA, Mulder C, Rosso SM, Van Elk EJ, Van Kamp GJ, Van Swieten JC, Scheltens P. 2004. Amyloid beta(1-42) and phosphorylated tau in CSF as markers for early-onset Alzheimer disease. *Neurology* 62:1580-1584.

Selkoe DJ. 1994. Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease. *Annu Rev Cell Biol* 10:373-403.

Sengupta A, Kabat J, Novak M, Wu Q, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. 1998. Phosphorylation of tau at both Thr 231 and Ser 262 is required for maximal inhibition of its binding to microtubules. *Arch Biochem Biophys* 357:299-309.

Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, Wilson PW, Wolf PA. 2002. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *New Engl J Med* 346:476-483.

Shahani N, Brandt R. 2002. Functions and malfunctions of the tau proteins. *Cell Mol Life Sci* 59:1668-1680.

Singh TJ, Wang JZ, Novak M, Kontzekova E, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. 1996. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylates tau at Ser-262 but only partially inhibits its binding to microtubules. *FEBS Lett* 387:145-148.

Sjögren M, Vanderstichele H, Agren H, Zachrisson O, Edsbacke M, Wikkelso C, Skoog I, Wallin A, Wahlund LO, Marcusson J, Nägga K, Andreasen N, Davidsson P, Vanmechelen E, Blennow K. 2001. Tau and Abeta42 in cerebrospinal fluid from healthy adults 21-93 years of age: Establishment of reference values. *Clin Chem* 47:1776-1781.

Sjögren M, Gisslen M, Vanmechelen E, Blennow K. 2001. Low cerebrospinal fluid b-amyloid 42 in patients with acute bacterial meningitis and normalization after treatment. *Neurosci Lett* 314:33-36.

Smith RC, Ho BT, Kralik P, Voulis G, Gordon J, Wolff J. 1982. Platelet monamine oxidase in Alzheimer's disease. *J Gerontol* 37:572-574.

Song W, Zhou LJ, Zheng SX, Zhu XZ. 2000. Amyloid-beta 25-35 peptide induces expression of monoamine oxidase B in cultured rat astrocytes. *Acta Pharmacol Sin* 21:557-563.

Sparks DL, Woeltz VM, Markesbery WR. 1991. Alterations in brain monoamine oxidase activity in aging, Alzheimer's disease, and Pick's disease. *Arch Neurol* 48:718-721.

Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM. 2002. Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol* 156:1051-1063.

Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. 1993a. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1977-1981.

Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong LM, Salvesen GS, Pericak-Vance M, Schmechel D, Saunders AM, Goldgaber D, Roses AD. 1993b. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: Isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8098-8102.

Sunderland T, Linker G, Mirza N, Putnam KT, Friedman DL, Kimmel LH, Bergeson J, Manetti GJ, Zimmermann M, Tang B, Bartko JJ, Cohen RM. 2003. Decreased beta-amyloid1-42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *J Am Med Assoc* 289:2094-2103.

Takei Y, Teng J, Harada A, Hirokawa N. 2000. Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. *J Cell Biol* 150:989-1000.

Tarkowski E, Issa R, Sjögren M, Wallin A, Blennow K, Tarkowski A, Kumar P. 2002. Increased intrathecal levels of the angiogenic factors VEGF and TGF-beta in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurobiol Aging* 23:237-243.

Tatebayashi Y, Haque N, Tung YC, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. 2004. Role of tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3beta in the regulation of organelle transport. *J Cell Sci* 117:1653-1663.

Tumani H, Nolker G, Reiber H. 1995. Relevance of cerebrospinal fluid variables for early diagnosis of neuroborreliosis. *Neurology* 45:1663-1670.

Ujiié M, Dickstein DL, Jefferies WA. 2002. p97 as a biomarker for Alzheimer disease. *Front Biosci* 7:E42-47.

Vanmechelen E, Vanderstichele H, Davidsson P, Van Kerschaver E, Van Der Perre B, Sjögren M, Andreasen N, Blennow K. 2000. Quantification of tau phosphorylated at threonine 181 in human cerebrospinal fluid: A sandwich ELISA with a synthetic phosphopeptide for standardization. *Neurosci Lett* 285:49-52.

Vanmechelen E, Van Kerschaver E, Blennow K, De Deyn PP, Galasko D, Parnetti L, Sindic CJM, Arai H, Riemenschneider M, Hampel H, Pottel H, Valgaeren A, Hulstaert F, Vanderstichele H. 2001. CSF-Phospho-tau (181P) as a promising marker for discriminating Alzheimer's disease from dementia with Lewy bodies in Alzheimer's disease. In: Iqbal K, Sisodia SS, Winblad B, editors. *Advances in etiology, pathogenesis and therapeutics*. Chichester: John Wiley and Sons Ltd. p 285- 291.

Vignali DA. 2000. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *J Immunol Methods* 243:243-255.

Weyler W, Hsu YP, Breakefield XO. 1990. Biochemistry and genetics of monoamine oxidase. *Pharmacol Ther* 47:391-417.

Wiltfang J, Arold N, Neuhoff V. 1991. A new multiphasic buffer system for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electro-phoresis of proteins and peptides with molecular masses 100,000-1000, and their detection with picomolar sensitivity. *Electrophoresis* 12:352-366.

Wiltfang J, Esselmann H, Cupers P, Neumann M, Kretzschmar H, Beyermann M, Schleuder D, Jahn H, Ruther E, Kornhuber J, Annaert W, De Strooper B, Saftig P. 2001a. Elevation of b-amyloid peptide 2-42 in sporadic and familial Alzheimer's disease and its generation in PS1 knockout cells. *J Biol Chem* 276:42645-42657.

Wiltfang J, Esselmann H, Maler JM, Bleich S, Hu" ther G, Kornhuber J. 2001b. Molecular biology of Alzheimer's dementia and its clinical relevance to early diagnosis and new therapeutic strategies. *Gerontology* 47:65-71.

Wiltfang J, Esselmann H, Bibl M, Smirnov A, Otto M, Paul S, Schmidt B, Klafki HW, Maler M, Dyrks T, Bienert M, Beyermann M, Ru" ther E, Kornhuber J. 2002. Highly conserved and disease-specific patterns of carboxyterminally truncated Ab peptides 1-37/38/39 in addition to 1-40/42 in Alzheimer's disease and in patients with chronic neuroinflammation. *J Neurochem* 81:481-496.

Zetterberg H, Wahlund LO, Blennow K. 2003. Cerebrospinal fluid markers for prediction of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 352:67-69.

Zetterberg H, Andreasen N, Blennow K. 2004. Increased cerebrospinal fluid levels of transforming growth factor-beta1 in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 367:194-196.

Zhou G, Miura Y, Shoji H, Yamada S, Matsuishi T. 2001. Platelet monoamine oxidase B and plasma beta-phenylethylamine in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 70:229-231.