

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER**  
**FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE : 2021

THESES 2021/TOU3/2102

**THESE**

**POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement  
par

Ayoub BOULGHOBRA

Développement d'une nouvelle approche analytique « sans anticorps » pour le dosage des peptides amyloïdes : vers une amélioration de diagnostic moléculaire de la maladie d'Alzheimer

Date de soutenance  
15 décembre 2021

Directrice de thèse : Cécile ARELLANO

JURY

Président : Céline DERA EVE  
1er assesseur : Marie-Claude MENET  
2ème assesseur : Cécile ARELLANO

**PERSONNEL ENSEIGNANT**  
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier  
au 1er octobre 2020

**Professeurs Emérites**

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire
M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. GAIRIN J.E.	Pharmacologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie

**Professeurs des Universités**

**Hospitalo-Universitaires**

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

**Universitaires**

Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie pharmaceutique
Mme MULLER-STAUMONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

## Maîtres de Conférences des Universités

### Hospitalo-Universitaires

M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

### Universitaires

Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C. (*)	Biophysique
M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
Mme COLACIOS C.	Immunologie
Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
Mme DERAËVE C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme GADEA A.	Pharmacognosie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
M. LE NAOUR A.	Toxicologie
M. LEMARIE A.	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MONFERRAN S.	Biochimie
M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(\*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

## Enseignants non titulaires

### Assistants Hospitalo-Universitaires

Mme LARGEAUD L.	Immunologie
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie
M. MOUMENI A.	Biochimie
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique
Mme SALABERT A.S	Biophysique
Mme TRIBAUDEAU L.	Droit Pharmaceutique

### Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)

M. François-Xavier TOUBLET	Chimie Thérapeutique
----------------------------	----------------------

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Madame Cécile Arellano pour avoir accepté de diriger cette thèse d'exercice, pour sa disponibilité et ses précieux conseils. Je remercie également Madame Céline Deraeve et Madame Marie-Claude Menet, les membres du jury pour avoir accepté d'en faire partie et pour le temps qu'ils ont consacré à cette thèse.

Je voudrais également remercier Madame Myriam Taverna et Monsieur Thanh Duc Mai pour leur encadrement au cours de mon stage de Master 2, pour m'avoir fait confiance et pour leur bienveillance.

Un grand merci à toutes les personnes qui m'ont soutenu pendant la rédaction de ce manuscrit : Myriam, Antoine, Ninette, Marine, Kaouther, Lucie, Alexandre, Marco, Sylvie, Minh, Émilie...

Je remercie tout particulièrement ma famille : ma maman pour son soutien sans faille, mon papa pour ses précieux conseils et ma sœur pour son aide au quotidien. Les mots ne suffisent pas pour vous exprimer ma gratitude.

# Table des matières

Introduction .....	11
I. Présentation de la maladie d'Alzheimer.....	13
I.A. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer .....	13
I.A.1 Les plaques amyloïdes.....	13
I.A.2 Les enchevêtrements neurofibrillaires .....	15
I.A.3 La neuroinflammation .....	18
I.A.4 La perte synaptique .....	20
I.B. Diagnostic de la maladie d'Alzheimer .....	24
I.B.1 Les tests cognitifs.....	24
I.B.2 L'imagerie cérébrale .....	27
I.B.3 Les tests biochimiques .....	31
I.C. Les traitements de la maladie d'Alzheimer .....	35
I.C.1 Les inhibiteurs de l'acétylcholine estérase.....	35
I.C.2. La mémantine .....	36
I.C.3. Les candidats médicaments anti-Alzheimer .....	38
II. Inventaire des techniques actuelles de quantification des peptides $\beta$ -amyloïdes .....	40
II.A. L'ELISA, méthode standard de quantification des peptides $\beta$ -amyloïdes.....	40
II.A.1. Principe de l'ELISA.....	40
II.A.2 Les kits ELISA pour le dosage des peptides A $\beta$ .....	44
II.A.3. Avantages et inconvénients des immunodosages .....	48
II.B. La spectrométrie de masse pour le dosage des peptides $\beta$ -amyloïdes.....	50
II.B.1. Principe de la spectrométrie de masse .....	50
II.B.2. Le dosage des peptides $\beta$ -amyloïdes par LC-MS .....	51
II.B.3. Le dosage des peptides $\beta$ -amyloïdes par IP-MS .....	53
II.C. Le dosage des peptides $\beta$ -amyloïdes par électrophorèse capillaire.....	54
II.C.1 Principe de l'électrophorèse capillaire de zone .....	54
II.C.2. L'analyse par CE-UV .....	56

II.C.3. L'analyse par CE-LIF.....	58
II.C.4. L'analyse par ITP-CE-MS.....	59
III. Partie expérimentale.....	62
III.A. Présentation de la méthode à améliorer.....	62
III.B. Optimisation de l'instrumentation.....	65
III.C. Optimisation de la méthodologie CE-LIF.....	66
III.C.1. Modification de la géométrie et du revêtement du capillaire.....	66
III.C.2. Optimisation de la séparation.....	67
III.D. Optimisation du traitement d'échantillon.....	70
III.D.1. Protocole de traitement d'échantillon.....	70
III.D.2. Les performances du protocole de traitement d'échantillon.....	71
III.D.3. Optimisation du traitement d'échantillon.....	72
III.E. Autres axes d'optimisation explorés.....	73
III.E.1 Modalités de pré-concentration.....	73
III.E.2. Recherche d'un étalon interne.....	76
Conclusion.....	78
Références bibliographiques.....	79
Résumé en français.....	89
Titre et résumé en Anglais.....	89
MOTS-CLES.....	89

## Liste des abréviations

$\mu_{eo}$	Mobilité électroosmotique
$\mu_{ep}$	Mobilité électrophorétique
<b>ADAS-Cog</b>	Alzheimer's disease assesment scale - Cognitive subscale
<b>ADCS-ADLsev</b>	Alzheimer's disease cooperative study - Activities of daily living
<b>AICD</b>	Domaine intracellulaire de la protéine APP
<b>AMPA</b>	2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque acid
<b>APP</b>	Protéine précurseur amyloïde
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>A<math>\beta</math></b>	Peptide $\beta$ -amyloïde
<b>A<math>\beta</math><sub>1-38</sub></b>	Peptide $\beta$ -amyloïde de 38 acides aminés
<b>A<math>\beta</math><sub>1-40</sub></b>	Peptide $\beta$ -amyloïde de 40 acides aminés
<b>A<math>\beta</math><sub>1-42</sub></b>	Peptide $\beta$ -amyloïde de 42 acides aminés
<b>BGE</b>	BackGround electrolyte
<b>Bio</b>	Biotine
<b>CE</b>	Electrophorèse capillaire
<b>CHES</b>	Acide N-cyclohexyl-2-aminoéthanesulfonique
<b>CV</b>	Coefficient de variation
<b>CZE</b>	Electrophorèse capillaire de zone
<b>DAMP</b>	Motifs moléculaires associés à un danger
<b>E</b>	Champ électrique
<b>EDAC</b>	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>EOF</b>	Flux électroosmotique
<b>FDG</b>	[ <sup>18</sup> F]-fluorodeoxyglucose
<b>HRP</b>	Peroxydase de raifort
<b>IP</b>	Immunoprécipitation
<b>IRM</b>	Imagerie par résonance magnétique

<b>ITP</b>	Isotachophorèse
<b>LCR</b>	Liquide céphalorachidien
<b>LEDIF</b>	Fluorescence induite par diode électroluminescente
<b>LIF</b>	Fluorescence induite par Laser
<b>LLOD</b>	Limite de détection
<b>LLOQ</b>	Limite de quantification
<b>LVSEP</b>	Large volume sample stacking with an electroosmotic flow pump
<b>MA</b>	Maladie d'Alzheimer
<b>MALDI</b>	Désorption-ionisation Laser assistée par matrice
<b>MMSE</b>	Mini-examen de l'état mental
<b>MS</b>	Spectrométrie de masse
<b>MSD</b>	Mesoscale discovery
<b>NMDA</b>	N-methyl-D-aspartic acid
<b>NO</b>	Monoxyde d'azote
<b>PAMP</b>	Motifs moléculaires associés à un pathogène
<b>PIB</b>	Composé Pittsburgh
<b>PNAS</b>	Protéine et Nanotechnologies en Sciences Analytiques
<b>PSD-95</b>	Protéine postsynaptic density 95
<b>P-tau</b>	Protéine tau phosphorylée
<b>PVA</b>	Polyvinyl alcool
<b>ROS</b>	Espèces réactives oxygénées
<b>SM</b>	Matrice d'échantillon
<b>SV</b>	Streptavidine
<b>TEP</b>	Tomographie par émission de positons
<b>TLR</b>	Récepteurs Toll-like
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Facteur de nécrose tumorale $\alpha$
<b>TOF</b>	Analyseur à temps de vol
<b>TRIS</b>	Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane

<b>T-tau</b>	Protéine tau totale
<b>UHPLC</b>	Chromatographie en phase liquide ultrahaute performance
<b>UV</b>	Ultraviolet
<b><math>\eta</math></b>	Viscosité

## Introduction

---

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative du tissu cérébral qui entraîne la perte progressive et irréversible des fonctions cognitives et en particulier de la mémoire. Il s'agit de la forme la plus fréquente de démence chez l'être humain. En effet, en France 900 000 individus sont atteints de MA et chaque année, 225 000 nouvelles personnes sont diagnostiquées (1). En termes de physiopathologie, la MA se caractérise par la présence de plaques séniles observées au niveau extracellulaire dans le cerveau. Ces plaques séniles correspondent à l'accumulation et à l'agrégation de peptides  $\beta$ -amyloïdes ( $A\beta$ ) et notamment des peptides  $\beta$ -amyloïde de 42 et 40 acides aminés ( $A\beta_{1-42}$ ,  $A\beta_{1-40}$ ). Ceci est lié à une altération des processus protéolytiques de la protéine APP (protéine précurseur amyloïde) qui engendre la formation des différents isoformes de peptides  $A\beta$ . Ces derniers, du fait de leurs propriétés biochimiques favorisant l'agrégation et d'une réduction de leur clairance cérébrale, s'accumulent pour former des oligomères, puis des fibrilles et enfin des plaques séniles. Cette accumulation est à l'origine de l'activation de voies de signalisation neurotoxiques qui entraînent, à terme, la mort neuronale (2–4). La MA se caractérise également par une hyperphosphorylation de la protéine tau, protéine associée aux microtubules. Cette hyperphosphorylation de la protéine tau réduit sa capacité à se lier et à stabiliser les éléments du cytosquelette (5).

L'accumulation de protéine tau hyperphosphorylée à l'intérieur des neurones entraîne la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires (3,6). Ces derniers sont à l'origine de l'entrée en apoptose des neurones et participent ainsi à la neurodégénérescence (3,7). De plus, une composante neuroinflammatoire a été décrite dans la physiopathologie de la MA. En effet, les cellules gliales entraînent une inflammation au niveau cérébrale qui s'intensifie au cours de la progression de la maladie (8). Par ailleurs, des études sur des cerveaux d'individus atteints de MA ont permis d'observer une perte synaptique importante. Cette dernière présenterait une corrélation avec la perte mnésique (9,10). La neurodégénérescence ainsi que la perte synaptique seraient donc à l'origine de l'apparition des symptômes de la MA qui diffèrent en fonction des individus.

Le symptôme initial le plus commun correspond à une altération progressive de la capacité de créer de nouveaux souvenirs. Ceci est dû au fait que les premiers neurones touchés par la neurodégénérescence sont dans les régions du cerveau impliquées dans la création de nouveaux souvenirs, notamment au niveau de l'hippocampe. Lorsque les neurones d'autres parties du cerveau sont détruits, d'autres symptômes apparaissent. Il s'agit par exemple d'une perte de mémoire perturbant les activités de la vie quotidienne, d'une désorientation spatio-temporelle, de troubles du langage, de troubles du sommeil ainsi que des changements de l'humeur et de la personnalité pouvant aller jusqu'à des épisodes dépressifs (11,12). La mémoire épisodique qui permet de se rappeler des événements passés ainsi que de leur contexte, est la plus affectée par la MA. La progression de ces symptômes entraîne à terme l'apparition d'une démence, c'est-à-dire une dégradation de la mémoire, du comportement, du raisonnement et de la capacité à réaliser les activités quotidiennes (13,14).

Cette thèse porte sur les méthodes de quantification des peptides A $\beta$  et plus particulièrement, une méthode d'électrophorèse capillaire qui a été développée au sein du groupe PNAS (Protéine et Nanotechnologies en Sciences Analytiques) à l'Institut Galien de Paris Saclay, puis fait l'objet d'une optimisation par la suite. Ainsi, la première partie de cette thèse, sera consacrée à la présentation de la MA, puis une seconde partie présentera un inventaire des techniques actuelles permettant la quantification des A $\beta$  et enfin, la méthode d'électrophorèse proposée ainsi que les optimisations mises en place seront détaillées dans une troisième partie.

# **I. Présentation de la maladie d'Alzheimer**

---

La physiopathologie de la MA est la clé pour comprendre les manifestations cliniques de cette dernière ainsi que le choix des différents tests de diagnostic de cette maladie.

## **I.A. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer**

La physiopathologie de la MA se subdivise en quatre différents phénomènes décrits au niveau cérébral (3). Il s'agit des plaques séniles ou plaques amyloïdes formées par l'agrégation extracellulaire des peptides A $\beta$  (4,15–17), des enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaire de protéine tau (5–7,18), de la neuroinflammation (19–22) et de la perte synaptique (9,10,23).

### **I.A.1 Les plaques amyloïdes**

Les plaques séniles correspondent à des lésions cérébrales extracellulaires caractéristiques de la MA (4,16). Elles sont formées par l'agrégation de peptides A $\beta$  d'environ 40 acides aminés (24,25). Ces peptides sont issus de la protéolyse de la protéine précurseur des peptides A $\beta$  (APP). Il s'agit d'une protéine transmembranaire codée par un gène localisé sur le chromosome 21 (26). La protéine APP contient une partie extracellulaire, une partie hydrophobe transmembranaire et un domaine C-terminal intracellulaire (24). APP subit des modifications post-traductionnelles impliquant des sécrétases et des protéases avec deux voies principales. Dans la voie non-amyloïdogénique (Figure 1), la protéine APP subit séquentiellement l'action de l' $\alpha$ -sécrétase puis de la  $\gamma$ -sécrétase. Cette protéolyse entraîne la formation des peptides A $\beta$ PP- $\alpha$ , P3 et AICD (domaine intracellulaire de la protéine APP) mais ne génère pas de peptides A $\beta$  car l' $\alpha$ -sécrétase clive la protéine APP au milieu de la séquence du peptide A $\beta$  (24). Les trois peptides formés sont solubles et dégradés rapidement. Dans la voie amyloïdogénique (Figure 1), APP est d'abord prise en charge par la  $\beta$ -sécrétase (27) puis par la  $\gamma$ -sécrétase générant alors des peptides A $\beta$ .

Dans des conditions physiologiques, la protéine APP est préférentiellement métabolisée dans la voie non-amyloïdogénique et il existe un équilibre entre la sécrétion et la

clairance cérébrale des peptides A $\beta$  (2). Dans le cas de la MA, un déséquilibre en faveur de la voie amyloïdogénique est observé avec une surproduction de peptides A $\beta$ , en plus d'une diminution de la clairance cérébrale de ces peptides (2,4). Ces derniers, du fait de leur caractère hydrophobe, s'accumulent pour former des fibrilles qui se déposent en plaques neuritiques ou plaques amyloïdes et se développent en suivant le schéma séquentiel suivant : 1) plaques neuritiques diffuses, 2) plaques neuritiques matures puis 3) plaques séniles pour les stades les plus avancés de la maladie. La formation des plaques séniles a un impact délétère sur les neurones. En effet, elle peut entraîner des dysfonctionnements neuronaux, voire la mort de ces cellules.

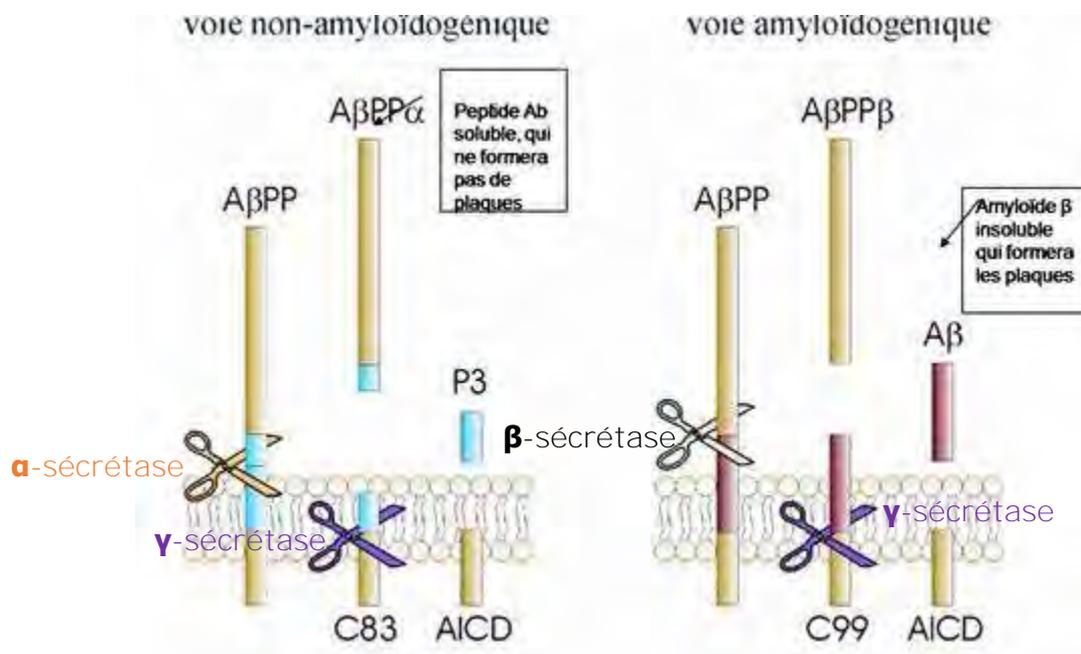


Figure 1: Schéma des voies protéolytiques de la protéine APP (24)

Les plaques amyloïdes favorisent la dégénérescence neuronale en engendrant un stress oxydatif ainsi que des troubles dans le métabolisme énergétique cellulaire (28). Effectivement, des études *in vitro* ont démontré que les peptides A $\beta$  présents dans les plaques séniles peuvent inhiber les activités des enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale et de celles du cycle de l'acide citrique. Sachant que l'activité neuronale est hautement dépendante de la production d'adénosine triphosphate (ATP) par ces deux voies biochimiques au niveau des mitochondries, les peptides A $\beta$  sont à l'origine de dysfonctionnements neuronaux (28).

Par ailleurs, il a été observé *in vitro* que des oligomères de ces peptides A $\beta$  induisent des dommages mitochondriaux à l'image d'une inhibition de l'activité de la cytochrome c oxydase et une perte d'activité des chaînes respiratoires mitochondriales (28–30). Par conséquent, un déficit en métabolisme énergétique apparaît, ce qui engendre une augmentation de la production de radicaux libres oxygénés (ROS). Ce stress oxydatif possède un rôle central dans la neurodégénérescence et dans l'apparition de la MA (28). Les principaux ROS mis en jeu sont le monoxyde d'azote (NO) et ses dérivés. En effet, le NO est à l'origine d'une inhibition réversible de la cytochrome c oxydase alors que ses dérivés inactivent l'ATP synthase.

Cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels les peptides A $\beta$  génèrent cette toxicité intracellulaire et la mort neuronale ne sont que peu connus (28) même s'il semblerait que des taux élevés de peptides A $\beta$  entraînent une forte augmentation des taux de ROS au niveau mitochondriale. Ceci engendre une perte de l'intégrité de la membrane mitochondriale et la libération des protéines mitochondriales dans le cytoplasme, notamment la cytochrome c oxydase. Cette dernière active la cascade des caspases qui se termine par une mort cellulaire par apoptose (31).

Ainsi, une surproduction de peptides A $\beta$  est à l'origine de leur agrégation en plaque sénile, d'un dysfonctionnement neuronal et d'une neurodégénérescence.

### **I.A.2 Les enchevêtrements neurofibrillaires**

La protéine tau est une protéine associée aux microtubules exprimée et est dans la majorité des tissus chez l'Homme et en particulier dans les neurones (2,5–7,18). Elle joue un rôle majeur dans la formation des enchevêtrements neurofibrillaires (6,18). Environ 20% des acides aminés de cette protéine sont des sérines et des thréonines, c'est-à-dire des sites qui peuvent potentiellement être phosphorylés (18). La protéine tau présente deux types de domaines de liaisons aux microtubules : les domaines de basse affinité pour les microtubules et les domaines de haute affinité pour les microtubules. Les domaines de basse affinité

correspondent aux domaines fonctionnels à travers lesquels, la protéine tau stimule l'assemblage et la stabilisation des microtubules, tandis que les domaines de haute affinité contribuent à la fonction de tau en permettant la stabilisation des microtubules (18). La phosphorylation de la protéine sur ces deux types de domaines permet de réguler sa fonction.

Dans des conditions physiologiques (Figure 2), la phosphorylation de certains sites spécifiques de la protéine tau permet de réguler les interactions de la protéine avec les microtubules. En effet, la phosphorylation de ces sites permet globalement de réduire l'affinité de tau pour les microtubules et ainsi d'inhiber son activité de stabilisation et de stimulation de l'assemblage des microtubules (6,18). Par ailleurs, *via* cette action sur le cytosquelette neuronal, la protéine tau stimule la croissance des axones et joue un rôle dans le transport axonal (18).

Dans le cas de la MA (Figure 2), une hyperphosphorylation de la protéine tau a été décrite et ce, du fait d'une dérégulation des kinases impliquées dans la phosphorylation des sites spécifiques de la protéine (2,5-7,18). Ceci engendre une diminution de l'affinité de tau vis-à-vis des microtubules entraînant ainsi une diminution de l'assemblage des microtubules et un dysfonctionnement du transport axonal (5). La diminution de l'affinité de la protéine tau pour les microtubules fait que celle-ci est moins liée au cytosquelette, augmentant alors sa fraction libre. Il s'en suit plusieurs phosphorylations sur des sites spécifiques de la protéine tau libre ce qui modifie sa conformation, facilitant l'oligomérisation et, à terme, la formation de fibrilles à l'intérieur des neurones (18).

L'hyperphosphorylation favorise un changement de conformation avec la formation de filaments hélicoïdaux appariés. Ces derniers, étant moins solubles dans le milieu cellulaire, se rassemblent en oligomères. L'enchevêtrement de ces oligomères correspond à l'enchevêtrement des neurofibrilles observées dans les cerveaux des personnes atteintes de la MA (5-7,18).

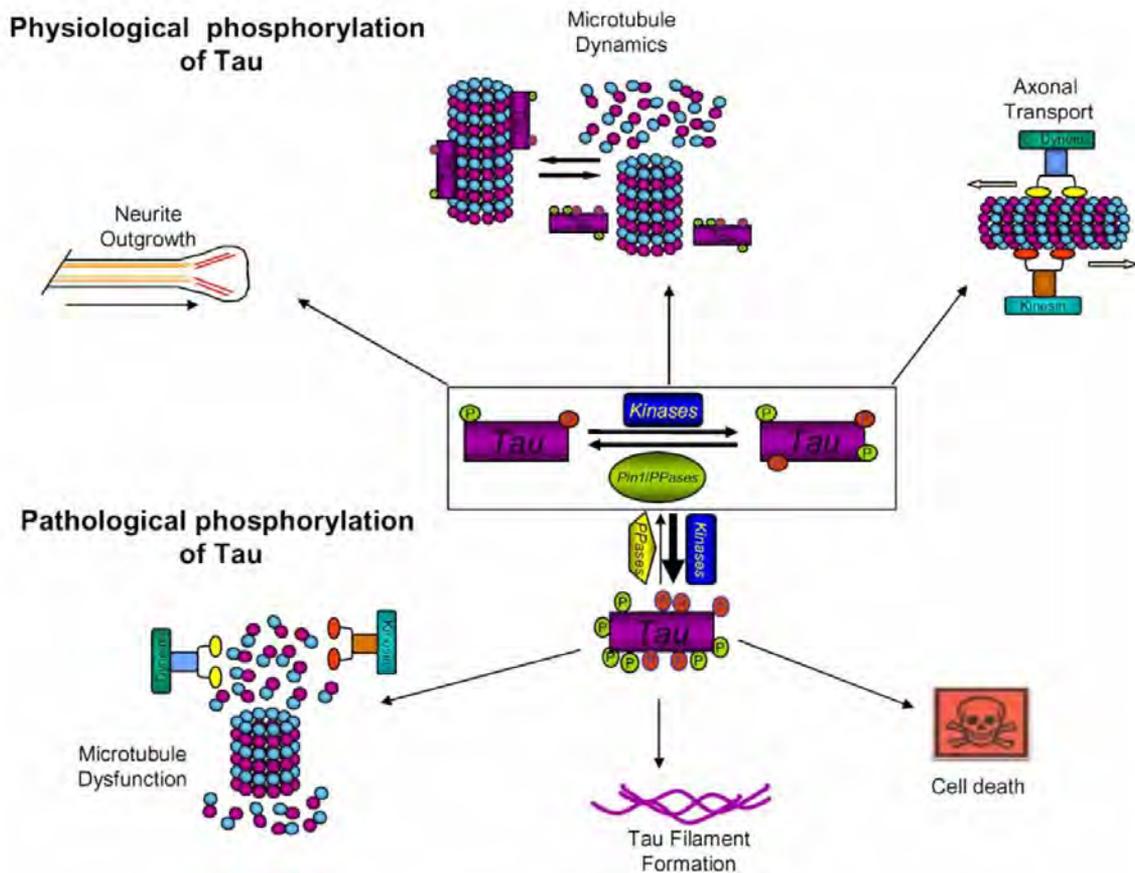


Figure 2 : Schéma récapitulatif de la fonction de la protéine tau selon son état de phosphorylation (18)

Il est à noter que le processus par lequel l'hyperphosphorylation de la protéine tau entraîne une augmentation de la toxicité pour les neurones n'est pas totalement décrit même s'il apparaît que cette hyperphosphorylation engendre une diminution de la liaison au cytosquelette microtubulaire (2,18). Ceci fait que les microtubules sont déstabilisés et ne peuvent plus assurer leurs fonctions. En effet, le processus de remodelage du cytosquelette ne peut plus être mis en place ce qui perturbe les transports intracellulaires et le métabolisme synaptique, réduisant ainsi la plasticité des synapses (2). Par ailleurs, la phosphorylation de tau correspond à un point critique dans la régulation de l'homéostasie neuronale par son intervention dans d'autres voies de signalisation impliquant des transporteurs et des récepteurs transmembranaires (2). Ainsi, l'hyperphosphorylation de tau est à l'origine de dysfonctionnements neuronaux et de la perte d'intégrité du cytosquelette microtubulaire ce qui entraîne, à terme, la mort neuronale (2,5,6,18).

### I.A.3 La neuroinflammation

Une autre caractéristique physiopathologique de la MA correspond à la neuroinflammation (3,19,21). En effet, il a été démontré que de fortes interactions se mettent en place entre le compartiment neuronale et le système immunitaire au niveau cérébral (19). Ces interactions débutent par la reconnaissance par des cellules immunitaires gliales d'agrégats de protéines dont la conformation a été modifiée ou de peptides tels que les peptides A $\beta$ . Cette reconnaissance se fait au niveau de récepteurs spécifiques de motifs moléculaires associés à un danger (DAMP) ou de motifs moléculaires associés à un pathogène (PAMP) (19). Ces récepteurs sont situés au niveau des membranes des cellules microgliales, cellules capables de phagocytose et résidant dans le système nerveux central (19,22).

Dans le cas de la MA, les cellules de la microglie peuvent se lier aux peptides A $\beta$  oligomérisés solubles ou aux fibrilles insolubles constituées par ces peptides. Les oligomères de peptides A $\beta$  sont alors phagocytés et entrent dans la voie endolysosomale où ils sont pris en charge par différentes protéases qui les dégradent (19). Les agrégats fibrillaires de peptides A $\beta$  ne peuvent, quant à eux, pas être phagocytés du fait de leur caractère insoluble. La reconnaissance de ces peptides par les récepteurs spécifiques au niveau des cellules microgliales, quel que soit leur état de polymérisation, entraîne la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), l'interleukine 1 $\alpha$  et l'interleukine 6, en plus de chimiokines (19,20,22). Ainsi, initialement, la réaction inflammatoire permet d'améliorer l'élimination des peptides A $\beta$  du cerveau et de restaurer l'homéostasie tissulaire (19).

Par ailleurs, certains éléments déclencheurs tels qu'un traumatisme, additionnés à des facteurs aggravants comme une inflammation périphérique ou l'obésité entretiennent l'activation du système immunitaire inné au niveau du cerveau (Figure 3). Ceci entraîne une exposition des neurones aux cytokines pro-inflammatoires de façon persistante, ce qui cause des modifications structurales et fonctionnelles de ces cellules et, à terme, la mort neuronale (Figure 3) (19,32).

Cette neuroinflammation liée aux cellules de la microglie est d'autant plus persistante que l'accumulation des peptides A $\beta$  est chronique dans le cas de la MA. En effet, la production continue de ces peptides génère une boucle de rétrocontrôle positif sur l'activation des cellules microgliales et donc sur la libération de cytokines proinflammatoires (19,22).

En plus de la cellule de la microglie, une autre catégorie cellulaire est impliquée dans la neuroinflammation observée dans le cadre de la MA. Il s'agit des astrocytes (19,21).

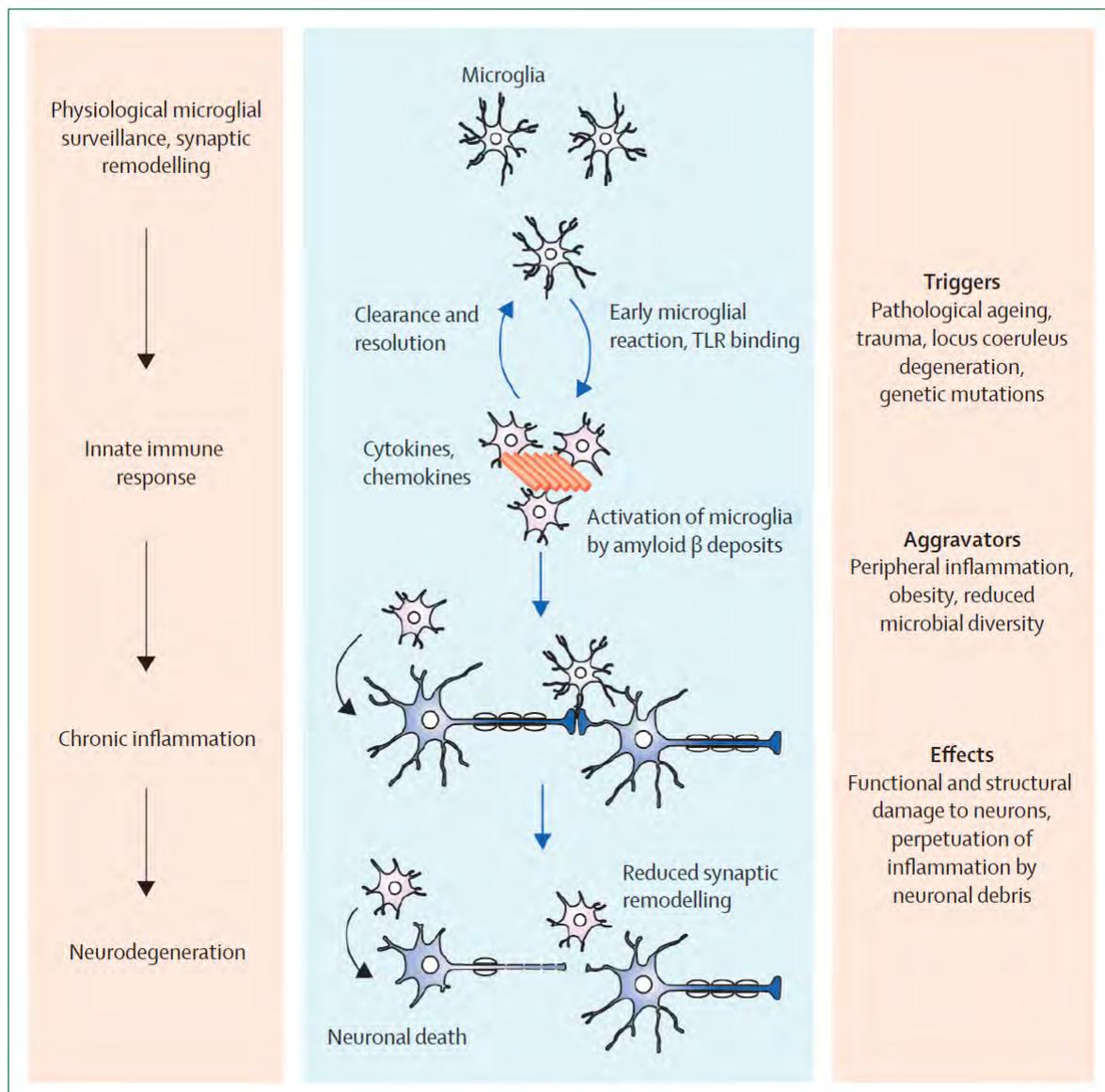


Figure 3 : Mécanisme d'activation de la réponse microgliale et ses conséquences sur la neurodégénérescence (24)

La réponse précoce des cellules astrocytaires aux cytokines pro-inflammatoires correspond à une atrophie. Cette dernière pourrait avoir des conséquences globales sur la connectivité synaptique puisque les astrocytes jouent un rôle central dans la transmission

synaptique. Leur atrophie contribue ainsi à l'apparition du déficit cognitif (33–35). Ces astrocytes atrophies apparaissent tout d'abord à proximité des plaques séniles sous l'effet des agrégats de peptides A $\beta$ . Ils sont retrouvés à distance des plaques séniles dans les derniers stades de développement de la MA (19).

Tout comme les cellules microgliales, les astrocytes sécrètent des cytokines, des chimiokines, des ROS et d'autres composés potentiellement cytotoxiques après leur exposition aux peptides A $\beta$ . Ceci fait que ces cellules contribuent à l'exacerbation de la réponse inflammatoire au niveau du système nerveux central et à la mort neuronale (19,32).

#### **I.A.4 La perte synaptique**

Le déclin cognitif ainsi que la perte de mémoire observés dans la MA ne résultent pas seulement de l'accumulation extracellulaire de peptides A $\beta$ , des neurofibrilles intracellulaires de protéine tau ou de la neuroinflammation, mais sont également la conséquence d'un dysfonctionnement et d'une perte synaptiques (9,10,23). De nombreuses études ont démontré que la corrélation entre le déclin cognitif dans la MA avec la perte synaptique est plus marquée qu'avec la formation de plaques séniles ou d'enchevêtrements des neurofibrilles (3,9,10,23). Ce dysfonctionnement synaptique est médié par la neurotoxicité des agrégats de peptides A $\beta$  ou celle de la protéine tau hyperphosphorylée (23).

Concernant la toxicité synaptique des peptides A $\beta$ , celle-ci nécessite une activité des récepteurs ionotropes au glutamate : NMDA (N-méthyl-D-aspartic acid) et AMPA (2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque acid) post-synaptique. L'action des oligomères insolubles de peptides A $\beta$  débute sur le récepteur AMPA (23). En effet, ces oligomères entraînent l'ubiquitinylation du récepteur AMPA. Ce dernier recrute alors une ubiquitine ligase (36) qui va permettre de réduire la densité du récepteur AMPA à la surface du neurone au niveau de la synapse (Figure 4).

La diminution du nombre de récepteurs AMPA synaptiques s'effectue également par une autre voie : les oligomères de peptides A $\beta$  agissent sur un ou plusieurs récepteurs et

active une voie de signalisation dépendante du récepteur NMDA au glutamate qui entraîne une diminution de l'expression des récepteurs AMPA (23,37). Les récepteurs AMPA sont impliqués dans la plasticité synaptique dans la mesure où ils régulent l'expression des récepteurs NMDA et donc l'activité synaptique. Ainsi, la réduction de la densité de récepteur AMPA sur le neurone post-synaptique entraîne, par différentes voies de signalisation, la diminution de l'expression des récepteurs NMDA et de la plasticité synaptique avec, à terme, une perte de la synapse (23,28,38,39).

Par ailleurs, l'hyperphosphorylation de la protéine tau fait que celle-ci s'autoassemble en neurofibrilles enchevêtrées. Comme vu précédemment, cette modification post-traductionnelle diminue l'affinité de la protéine tau pour les microtubules (23,40). Ainsi, cette protéine qui, en conditions physiologiques, est préférentiellement localisée dans l'axone neuronale, devient localisée dans la totalité du neurone et notamment dans les dendrites en conditions pathologiques (23). De même, en conditions physiologiques la protéine tau cible la tyrosine kinase Fyn en post-synaptique où celle-ci régule la fonction du récepteur NMDA au glutamate. Dans le cas de la MA, la présence de tau au niveau des dendrites entraîne une surproduction de Fyn au niveau de ces sites post-synaptiques. Cette tyrosine kinase phosphoryle alors le récepteur NMDA et stabilise les interactions entre ce récepteur et la protéine PSD-95, guanylate kinase associée à la membrane. Ainsi, durant la neurotransmission, en présence de glutamate, une suractivation du récepteur NMDA est observée résultant en une excitotoxicité avec un dysfonctionnement de la synapse (23,41,42). De plus, la protéine tau entraîne une dérégulation de l'homéostasie calcique au sein du neurone, rendant ainsi la transmission synaptique inefficace (43).

D'autre part, l'hyperphosphorylation de la protéine tau est à l'origine d'une perte d'intégrité des microtubules axonaux, ce qui fait que le transport de vésicules de neurotransmetteurs jusqu'à la terminaison synaptique est fortement réduit (23).

Tous ces éléments médiés par la protéine tau hyperphosphorylée ont pour conséquence le dysfonctionnement synaptique, voire la perte synaptique (Figure 4).

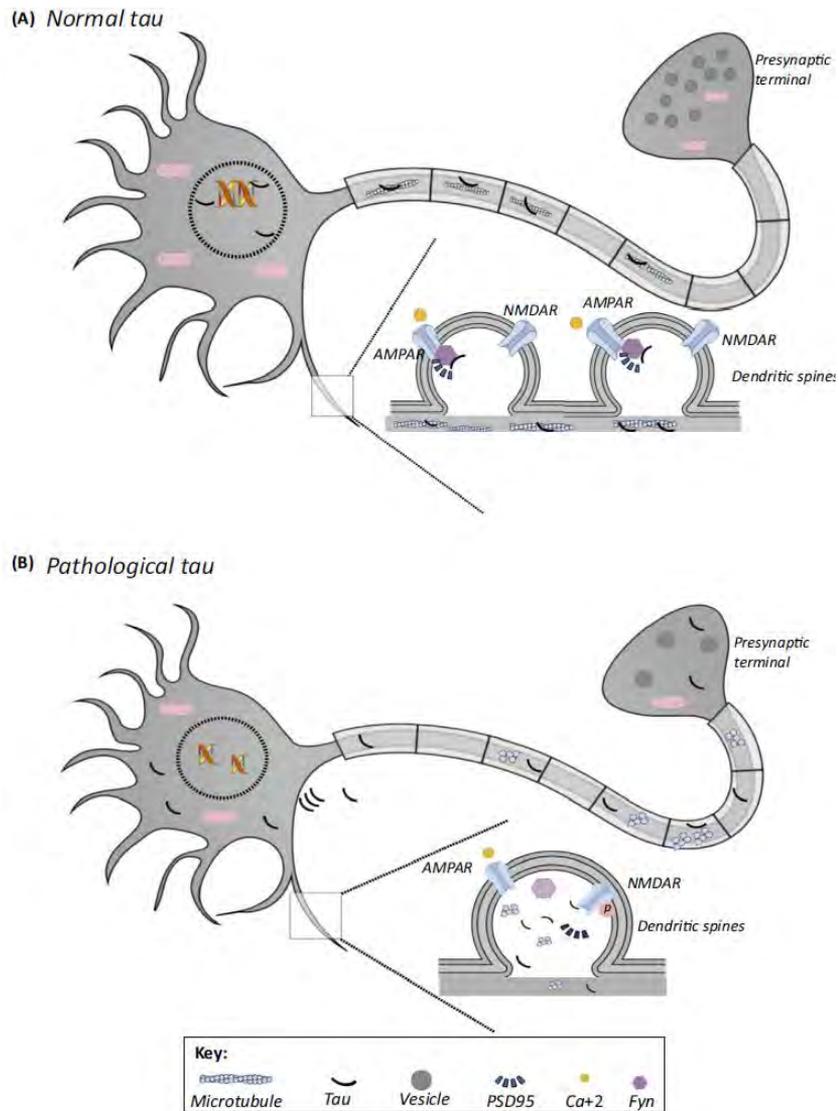


Figure 4: Effets de tau sur la synapse en conditions physiologiques (A) et dans le cas de la MA (B) (30)

NMDAR : récepteur NMDA au glutamate

AMPA : récepteur AMPA au glutamate

En conclusion, comme le montre la Figure 5, les caractéristiques physiopathologiques de la MA correspondent à l'agrégation de peptides A $\beta$ , les enchevêtrements de neurofibrilles de protéine tau hyperphosphorylée, la neuroinflammation médiée par les cellules microgliales et astrocytaires et la perte synaptique (4). Cependant, contrairement à ce que laisse penser

l'hypothèse de la cascade amyloïde (Figure 5), ces différents éléments surviennent de façon concomitante et non séquentielle (2,3).

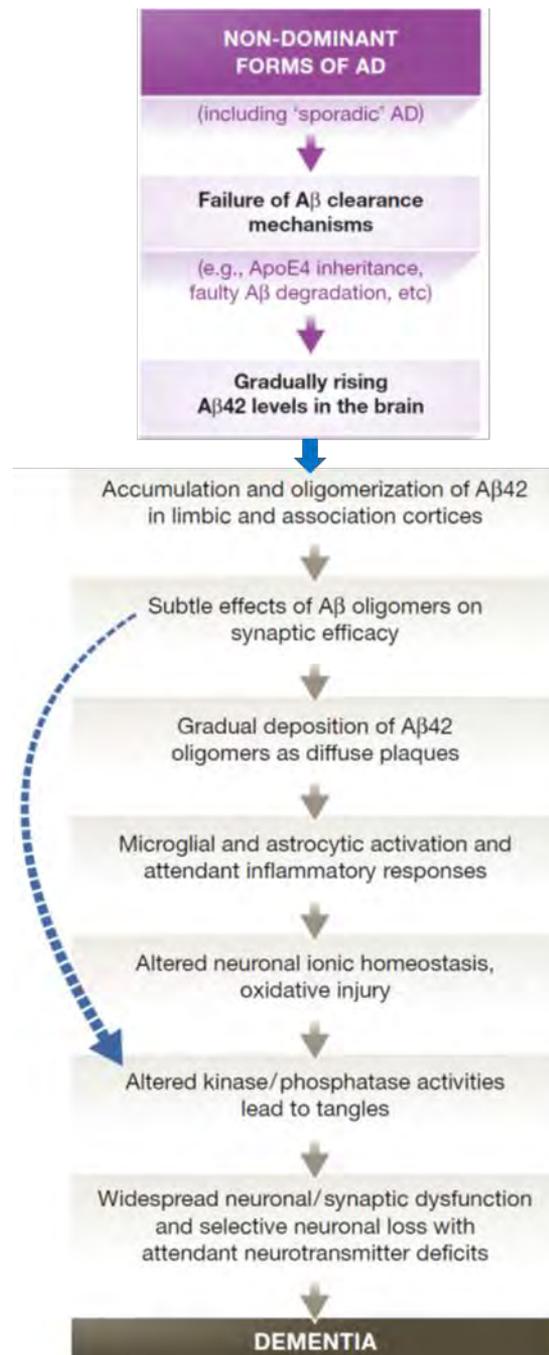


Figure 5 : Schéma de la cascade amyloïde (4)

## I.B. Diagnostic de la maladie d'Alzheimer

Le diagnostic de la MA est fondé sur trois types de tests, à savoir, l'évaluation clinique *via* les tests cognitifs, l'imagerie cérébrale et les tests biochimiques. Ces trois critères diagnostics ont des sensibilités et spécificités différentes. La sensibilité d'un test diagnostique correspond à la proportion de personnes malades ayant un résultat positif à ce test, tandis que la spécificité est la proportion de personnes saines ayant un résultat négatif (44).

### I.B.1 Les tests cognitifs

L'atteinte de la mémoire épisodique étant le principal symptôme de la MA, il s'agit d'un paramètre clé pour un diagnostic dès les premières phases de la maladie. En effet, les tests cognitifs ont pour objectif de discriminer le déficit cognitif de la MA du vieillissement ordinaire (45). Il est commun en pratique clinique et pour des essais cliniques de décrire les performances cognitives à travers un score unique. En effet, actuellement, le test le plus répandu en pratique clinique est le mini-examen de l'état mental (MMSE) (46,47) dont un exemple est présenté Figure 6.

			Score
1	<b>Orientation temporelle</b> Quel jour de la semaine sommes-nous ?	0, 1	/1
	Quelle est la date d'aujourd'hui ? La réponse permet de coter les questions 2 à 4.		
2	Quelle date sommes-nous ?	0, 1	/1
3	Quel mois sommes-nous ?	0, 1	/1
4	En quelle année sommes-nous ?	0, 1	/1
5	En quelle saison sommes-nous ?*	0, 1	/1
	<b>Orientation spatiale</b>		
6	Pouvez-vous me dire où nous sommes maintenant ? Dans quel pays sommes-nous ?	0, 1	/1
7	Pouvez-vous me dire où nous sommes maintenant ? Dans quelle province sommes-nous ?	0, 1	/1
8	Dans quelle ville/village sommes-nous maintenant ?	0, 1	/1
9	A quel étage sommes-nous dans ce bâtiment ? (ou dans quelle partie du bâtiment sommes-nous ?)	0, 1	/1
10	Où sommes-nous ? Comment s'appelle ce bâtiment ? A quelle adresse sommes-nous ? *	0, 1	/1
	<b>Langage: Expression – Dénomination</b>		
11	Montrez un crayon: Qu'est-ce que c'est ? Quel est le nom de cet objet ? * Montrez une montre: ? Qu'est-ce que c'est ? Quel est le nom de cet objet ?	0, 1 0, 1	/2
	<b>Langage: Expression – Répétition</b>		
12	Écoutez bien et répétez après moi: « Pas de mais, de si, ni de et »	0, 1	/1
	<b>Mémoire: Apprentissage</b>		
13	Je vais vous donner trois mots. Je voudrais que vous me les répétiez et que vous essayiez de les retenir. Je vous les redemanderai tout à l'heure. Donner les trois mots groupés, un par seconde, face au sujet, en articulant bien. * Compter un point par mot répété correctement au <b>premier essai</b> . Notez le nombre total de mots répétés. <b>CITRON</b> <b>CLES</b> <b>BALLON</b>	0, 1, 2, 3	/3
	<b>Attention/Concentration</b>		
14a	Comptez à partir de 100 en retirant 7 à chaque fois jusqu'à ce que je vous arrête. Il faut retirer chaque fois 7 du résultat. * Notez la réponse. 93 86 79 72 65	0, 1, 2, 3, 4, 5	
14b	Pouvez-vous épeler le mot <b>MONDE</b> à l'envers en commençant par la dernière lettre ? NOTEZ LE SCORE TOTAL LE PLUS ÉLEVÉ OBTENU À L'UN DE CES DEUX ITEMS	0, 1, 2, 3, 4, 5	/5

Figure 6 : Exemple de test MMSE (48)

Il s'agit de l'un des principaux tests d'évaluation cognitive décrivant le niveau de performance cognitive avec un score allant de 0 à 30 (47). Initialement, ce test n'a été conçu ni pour identifier les premiers stades de développement de la démence, ni pour différencier les différentes formes de démence mais uniquement pour établir un diagnostic de démence déjà avancée (48). Les principaux avantages de ce test sont qu'il est disponible en plusieurs langues et qu'il est accepté en tant qu'outil diagnostique par les personnels soignants (48). La présence d'un déclin cognitif est déterminée par le score total avec un seuil de 23/24 en dessous duquel un trouble cognitif est diagnostiqué. Cependant, il a été démontré que des variables socioculturelles, l'âge ainsi que le niveau d'éducation pouvaient influencer le score obtenu (48).

Un autre test standard souvent utilisé pour les essais cliniques est le test ADAS-Cog (Figure 7). Ce test a été développé pour évaluer le niveau de dysfonctionnement cognitif dans la MA. Ce test cognitif exprime la fonction cognitive d'un individu à l'aide d'un score

**ALZHEIMER'S DISEASE ASSESSMENT SCALE  
COGNITIVE ITEMS (ADAS-COG)**

1. Spoken language ability \_\_\_\_\_
2. Comprehension of spoken language \_\_\_\_\_
3. Recall of test instructions \_\_\_\_\_
4. Word-finding difficulty \_\_\_\_\_
5. Following commands \_\_\_\_\_
6. Naming objects, fingers \_\_\_\_\_

Naming:	Objects	Fingers			
High:	1 2	3 4			Fingers: Thumb
Medium:	1 2	3 4			Pinky Index
Low:	1 2	3 4			Middle Ring

7. Constructions: drawings \_\_\_\_\_

Figures correct:	1	2	3	4
Closing in:	Yes _____	No _____		

8. Ideational praxis \_\_\_\_\_

Step correct:	1	2	3	4
---------------	---	---	---	---

9. Orientation \_\_\_\_\_

Day _____	Year _____	Person _____	Time of day _____
Date _____	Month _____	Season _____	Place _____

10. Word recall: mean error score \_\_\_\_\_
11. Word recognition: mean error score \_\_\_\_\_

Cognition total \_\_\_\_\_

Figure 7 : Exemple de test ADAS-Cog (49)

compris entre 0 et 70 (49). Ce test permet d'observer au mieux les différences liées à un traitement. Son utilisation est limitée aux premiers stades de développement de la MA (50).

Toutefois, les tests cognitifs ne mesurent pas de façon individuelle chacune des composantes de la cognition telles que la mémoire ou le langage. Ceci limite la spécificité de ces tests vis-à-vis de la MA puisque ces tests détectent toute forme de déclin cognitif qu'il soit associé ou non à la MA (46). Le développement de test évaluant chacune des composantes cognitives, à savoir la mémoire, l'attention et le langage, permettrait de mieux comprendre comment chacune est affectée lors du développement de la MA et comment chacune répond à un traitement (46). Par ailleurs, les tests cognitifs ne permettent pas d'établir le diagnostic précoce de la MA.

D'autre part, il existe une grande variabilité intra-individuelle et inter-individuelle liée à ces tests. En effet, un même individu, d'un jour à l'autre, du fait de différences de concentration et d'attention, peut obtenir des scores différents. De plus, lorsque le même test est répété, un phénomène d'apprentissage peut être observé avec une amélioration des résultats dont le test ne tient pas compte dans l'évaluation des performances cognitives (46). Une variation inter-individuelle peut également être observée par exemple, lorsque le patient doit se remémorer des mots particuliers dans un test qui a pour but d'évaluer la mémoire, les individus avec des compétences linguistiques élevées sont avantagés sans que cela ne soit lié à la mémoire (46).

Il existe également une variabilité liée à l'évaluateur. En fonction de son comportement et de la façon dont les instructions sont données, l'évaluateur peut influencer le résultat du test cognitif en particulier dans les premiers stades de développement de la MA (46).

Enfin, en fonction de l'étude les performances d'un même test peuvent être très variables (48). Pour le test MMSE, par exemple, en fonction de l'étude, pour le diagnostic d'un trouble cognitif modéré, la sensibilité varie de 23% à 76% et la spécificité de 40% à 94%. De même, pour le diagnostic de la MA, la sensibilité se situe entre 27% et 89% et la spécificité entre 32% et 90% (48).

En conclusion, dans le cadre du diagnostic de la MA, les tests cognitifs souffrent d'un manque de standardisation et d'un défaut de ciblage des composantes cognitives pertinentes dans ce diagnostic. Ils sont également incompatibles avec un diagnostic précoce de la maladie.

### **I.B.2 L'imagerie cérébrale**

L'imagerie cérébrale permet de réaliser des mesures structurales et fonctionnelles du cerveau. Ces deux types de mesures permettent d'identifier les zones cérébrales sujettes à la neurodégénérescence que ce soit avant l'apparition des symptômes ou au cours du développement de la MA (51).

Concernant l'imagerie structurale, celle-ci consiste principalement en des mesures des volumes des différentes zones cérébrales par la technique d'imagerie par résonance magnétique (IRM). Dans le cas du vieillissement physiologique, l'atrophie neuronale, la mort cellulaire ainsi que les modifications vasculaires réduisent globalement le volume cérébral (51). Dans le cas de la MA, cette réduction du volume cérébral est plus importante dans certaines zones du cerveau qui sont les zones avec un rôle central dans les fonctions cognitives. Il s'agit de zones du lobe temporal et du lobe pariétal (52–54).

Par ailleurs, une corrélation a été observée entre les mesures structurales et la perte de mémoire (52–54). En effet, Nho *et al.* ont mesuré les volumes des différentes zones cérébrales en fonction de l'atteinte mnésique (52). Ces volumes sont mesurés sur des IRM par une méthode de traitement d'image générant des volumes standardisés pour la matière grise et la matière blanche. La matière grise correspond à la partie du système nerveux central où sont localisés les corps neuronaux. La mesure de l'atteinte mnésique, quant à elle, est obtenue par un score composite issu de l'évaluation des fonctions cognitives par plusieurs tests dont les tests MMSE et ADAS-Cog. Ce score composite ne tient compte que de la composante mnésique des fonctions cognitives (52). Les individus évalués sont au nombre de 810 dont 188 ont un diagnostic établi de MA, 396 présentent un trouble cognitif modéré et 226 individus sont sains. Les résultats obtenus sont présentés Figure 8 (52).

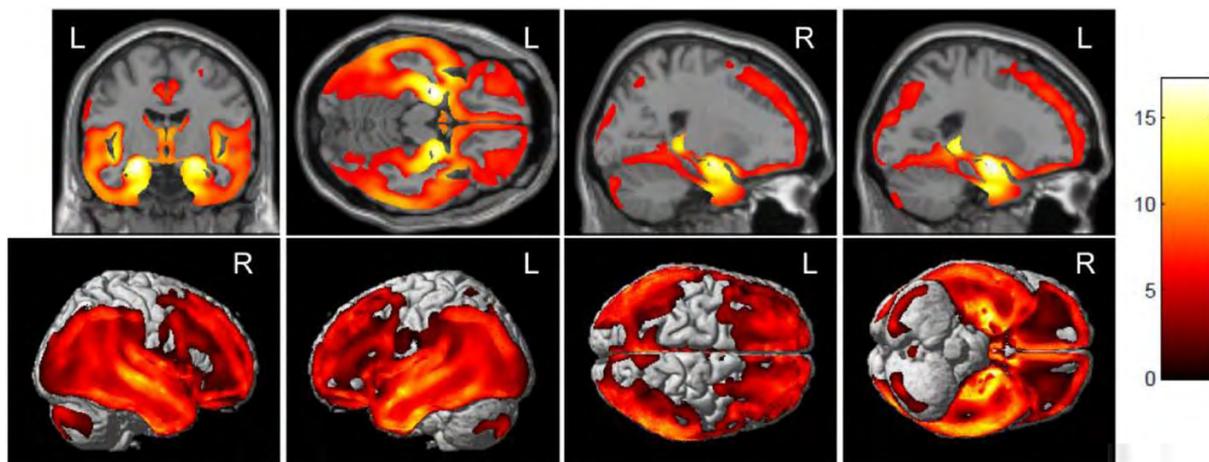


Figure 8 : Corrélation entre la perte mnésique et la densité de matière grise cérébrale (52).

Les images représentées sont obtenues par la combinaison des IRM des 810 individus évalués. Les zones colorées (de rouge à jaune) sont les zones associées à la perte mnésique mesurée. Plus la zone est jaune, plus la corrélation entre la diminution du volume de la matière grise et l'atteinte mnésique est importante.

La Figure 8 montre que la corrélation entre l'atrophie cérébrale et la perte de mémoire est la plus importante au niveau du lobe temporal médial. La mesure du volume de cette zone cérébrale permet donc de poser le diagnostic de MA et de suivre l'évolution de cette maladie (52). D'autres études (55,56), ont démontré que l'atrophie du lobe temporal médial mesurée par IRM permet de prédire le développement d'un trouble cognitif modéré en MA. Ceci fait que l'imagerie cérébrale structurale par IRM permet un diagnostic plus précoce que les tests cognitifs.

L'imagerie cérébrale fonctionnelle correspond à la mesure de la concentration d'un composé donné dans les différentes zones du cerveau ce qui permet de déduire l'activité cérébrale. Ceci se fait par tomographie par émission de positons (TEP) (57). Cette technique consiste à administrer à l'individu un composé émetteur de positons et à suivre cette émission dans le corps humain et en particulier dans le cerveau. Ainsi, en fonction du composé administré, les conclusions de l'imagerie par TEP seront différentes. Dans le cadre du diagnostic de la MA, deux composés émetteurs de positons ont une pertinence suffisamment élevée. Il s'agit du [ $^{18}\text{F}$ ]-fluorodeoxyglucose (FDG) et du [ $^{11}\text{C}$ ]-composé Pittsburgh (PIB) (57,58).

L'imagerie par FDG-TEP permet d'observer la répartition du FDG. Ce dernier ayant des propriétés similaires au glucose, cette technique d'imagerie mesure donc le métabolisme glucidique et la vascularisation des différentes zones cérébrales, tous les deux pouvant être corrélés à la fonction cognitive. Pour la MA, une diminution du métabolisme glucidique a été décrite (Figure 9). Celle-ci survient plusieurs années avant l'apparition des symptômes et peut être mesurée par FDG-TEP (59).



Figure 9 : Les modifications du métabolisme glucidique en fonction de la zone cérébrale entre les patients atteints de MA et les individus sains (57)

Les zones en rouge sur la figure correspondent aux zones où une diminution significative du métabolisme glucidique est observée dans la MA par rapport à des individus sains.

La Figure 9 montre que dans la MA, la diminution du métabolisme glucidique est observée dans les cortex temporal et pariétal. Cette diminution apparait avant les symptômes et, au cours du développement de la maladie, elle est corrélée à la sévérité de la démence (60).

Par ailleurs, l'imagerie TEP avec l'administration du PIB (Figure 10) permet d'observer la répartition des peptides amyloïdes. Le PIB est un radioligand émetteur de positon et capable de se lier spécifiquement aux peptides A $\beta$ , qu'ils soient localisés dans une plaque sénile ou dans une plaque neuritique diffuse (61).

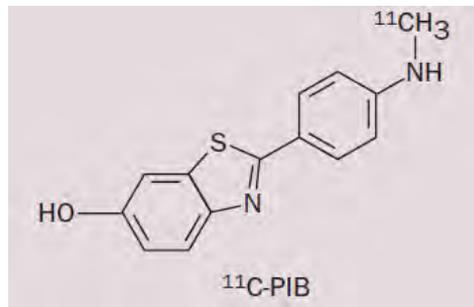


Figure 10 : Structure chimique du [11C] composé Pittsburgh

Ainsi, l'imagerie par PIB-TEP permet d'observer des différences significatives entre les patients atteints de MA et les individus sains (Figure 11) avec un signal plus important dans les cerveaux atteints de MA. Ceci correspond au dépôt de plaques amyloïdes et est en accord la physiopathologie de la maladie (38,57,58).

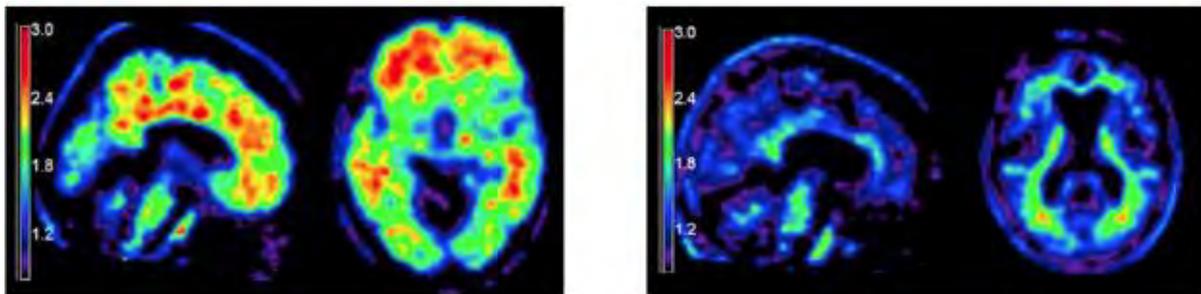


Figure 11 : Imagerie par TEP moléculaire avec un agent d'imagerie permettant de visualiser les peptides **A $\beta$**  (58).

L'image de gauche représente le cerveau d'un patient atteint de MA avec une abondance d'A $\beta$  au niveau cérébral tandis que l'image de droite représente le cerveau d'un individu sain.

La Figure 11 montre que le PIB se répartit dans la quasi-totalité des cerveaux des personnes atteintes de la MA alors qu'il n'est que très peu retenu dans les cerveaux des individus sains. Cette technique d'imagerie permet d'observer des différences liées à la MA dès les premiers stades de développement de la maladie, avant même l'altération du métabolisme glucidique cérébrale et des fonctions cognitives (62). La PIB-TEP permet de ce fait d'établir un diagnostic précoce de la MA.

### I.B.3 Les tests biochimiques

Les tests biochimiques ont pour but de quantifier des biomarqueurs de la MA dans des fluides biologiques en particulier dans le liquide céphalorachidien (LCR). Ces biomarqueurs cérébrospinaux se divisent principalement en deux catégories : les biomarqueurs spécifiques qui reflètent directement la MA en fournissant des preuves de la présence de protéines clés dans la physiopathologie (63) et ceux qui reflètent une atteinte cérébrale non spécifique de la MA (64).

Concernant les biomarqueurs cérébrospinaux spécifiques de la MA, ces derniers reflètent une composante de la physiopathologie de la maladie (46,63,64). En effet, il s'agit du peptide  $A\beta_{1-42}$  dans le LCR (Figure 12) qui fournit des preuves du dépôt de plaques amyloïdes au niveau cérébral et des marqueurs de la formation des enchevêtrements des neurofibrilles. Ces derniers correspondent à la protéine tau (T-tau) totale et la protéine tau hyperphosphorylée (P-tau) (Figure 12).

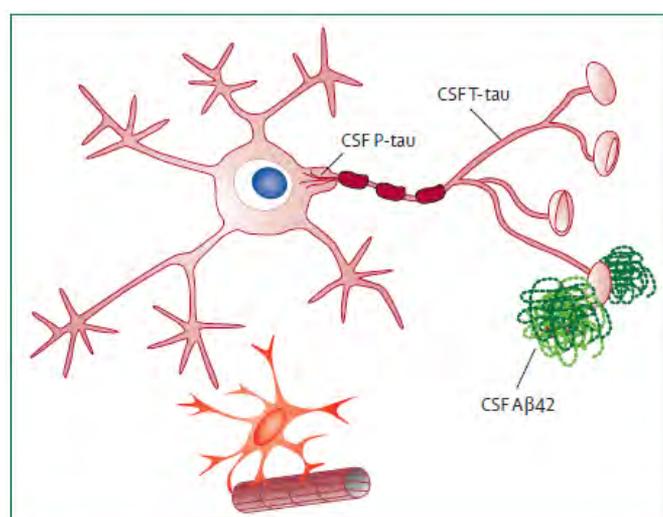


Figure 12 : Les modifications pathologiques associées aux biomarqueurs de la MA dans le LCR (46)

Initialement, une corrélation avait été démontrée entre les concentrations de P-Tau dans le LCR et le développement de la MA, plus précisément avec la formation d'enchevêtrements des neurofibrilles (65). Les concentrations de P-Tau cérébrospinale observées étaient alors augmentées. Cette corrélation est observée chez des patients à un stade avancé de la maladie avec des scores au test MMSE ne dépassant pas 14/30, indiquant la présence d'une

démence (65). Cependant, une augmentation des concentrations cérébrospinales de T-Tau et P-Tau est également observée dans d'autres pathologies avec une perte neuronale, qu'elles soient neurodégénérative, inflammatoire, vasculaire ou tumorale (66,67). Malgré cela, ces deux biomarqueurs dans le LCR présentent une spécificité satisfaisante pour le diagnostic de la MA avec une valeur située entre 80% et 100% en fonction du seuil choisi (67). Ce seuil correspond à la concentration cérébrospinale au-dessus de laquelle le diagnostic de MA est posée. Il distingue le groupe « personnes atteintes de la MA » du groupe « individus sains ». Ceci fait que P-Tau et T-Tau dans le LCR sont des biomarqueurs validés pour la MA.

Un autre biomarqueur reflétant une composante physiopathologique de la MA est le peptide  $A\beta_{1-42}$  dans le LCR (57,62,64,67,68). En effet, une corrélation a été décrite entre le dépôt de plaques séniles au niveau cérébral et le taux de peptide  $A\beta_{1-42}$  dans le LCR (Figure 13). La mesure des plaques amyloïdes se fait par la technique d'imagerie PIB-TEP où la rétention du composé PIB est proportionnelle aux dépôts amyloïdes formés dans le cerveau (68). Le dosage dans le LCR du peptide  $A\beta_{1-42}$  se fait par une technique immunologique (68), la technique ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).

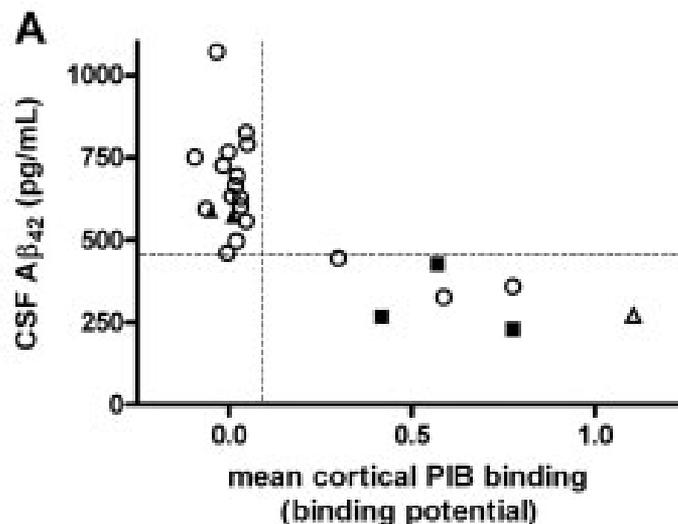


Figure 13 : Corrélation entre la rétention corticale du composé PIB avec les concentrations cérébrospinales de peptide  $A\beta_{1-42}$  (ou  $A\beta_{42}$ ) (68)

Les droites tracées en pointillées correspondent aux valeurs seuils utilisées : la valeur au-dessus de laquelle la rétention du composé PIB est en faveur du diagnostic de MA et la valeur en dessous de laquelle la concentration d' $A\beta_{1-42}$  dans le LCR est en faveur du diagnostic de MA.

La Figure 13 montre que plus le composé PIB est retenu dans le cortex cérébral lors d'imagerie par PIB-TEP, plus les concentrations cérébrospinales de peptide  $A\beta_{1-42}$  diminuent. Ainsi, plus les dépôts amyloïdes sont importants dans le cerveau, plus les concentrations dans le LCR de ce biomarqueur sont basses (62,68).

Par ailleurs, Jansen *et al.*, dans une étude de cohorte ont observé le lien entre ces variations des concentrations dans le LCR du peptide  $A\beta_{1-42}$  et l'apparition de la MA (69). Cette étude démontre qu'il existe un intervalle de 20 à 30 ans entre l'apparition de la diminution de ces concentrations et le début de la démence liée à la MA (69). Le suivi du peptide  $A\beta_{1-42}$  dans le LCR permet donc d'établir un diagnostic particulièrement précoce de la MA et même d'envisager un traitement préventif.

Ce peptide présente un taux diminué dans le LCR des patients atteints de MA. Il est particulièrement utile pour différencier la MA d'autres démences avec une sensibilité comprise entre 60 et 90% et une spécificité de 85% (67).

De nouvelles stratégies de diagnostic précoce telles que la recherche de nouveaux biomarqueurs de la MA ou le développement de tests sanguins sont actuellement à l'étude pour éviter l'échec des futurs essais cliniques (71).

Il existe principalement deux nouvelles stratégies permettant d'augmenter la puissance diagnostic moléculaire de la MA. La première consiste en la combinaison de plusieurs biomarqueurs et la seconde en la recherche de nouveaux biomarqueurs. Concernant la première stratégie, les biomarqueurs combinés correspondent aux différents  $A\beta$  mais aussi des  $A\beta$  avec la protéine tau ou avec de nouveaux biomarqueurs potentiels identifiés. En effet, plusieurs  $A\beta$  différant en termes de nombre d'acides aminés, sont présents dans le LCR. Bien que la concentration dans le LCR d' $A\beta_{1-42}$  soit la plus altérée dans le cas de la MA, les autres  $A\beta$  à l'image des peptides  $\beta$ -amyloïdes avec la séquence d'acides aminés 1-37, 1-38 et 1-40 acides aminés ( $A\beta_{1-37}$ ,  $A\beta_{1-38}$ ,  $A\beta_{1-40}$ ) présentent des taux différents dans d'autres maladies neurodégénératives telles que la démence vasculaire ou la démence à corps de Lewy.

Aβ1-42: H<sub>2</sub>N-DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA-OH  
Aβ1-40: H<sub>2</sub>N-DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV-OH  
Aβ1-39: H<sub>2</sub>N-DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV-OH  
Aβ1-38: H<sub>2</sub>N-DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG-OH  
Aβ1-37: H<sub>2</sub>N-DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVG-OH

Figure 14 : Séquence primaire du peptide **Aβ**<sub>1-42</sub> et des peptides **Aβ** tronqués (70)

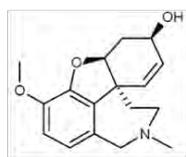
Il en résulte que ces peptides Aβ tronqués (Figure 14) seraient un outil précieux pour le diagnostic différentiel de la MA, en particulier lorsqu'ils sont associés à l'Aβ<sub>1-42</sub> sous la forme d'un rapport des concentrations par exemple (Aβ tronqué / Aβ<sub>1-42</sub>). Ce rapport doit essentiellement refléter les variations physiopathologiques qui se mettent en place dans le cerveau et qui sont à l'origine de la formation des plaques amyloïdes et ce, plus précisément que le taux d'Aβ<sub>1-42</sub>. Par exemple, le rapport Aβ<sub>1-42</sub>/Aβ<sub>1-40</sub> a montré une meilleure concordance avec la charge amyloïde cérébrale mesurée par TEP que le taux d'Aβ<sub>1-42</sub> seul (68). Cependant, la fiabilité des autres rapports reste encore à évaluer notamment pour les stades précoces de développement de la MA, avant l'apparition des plaques amyloïdes (68). La recherche de biomarqueurs a également été réalisée dans le plasma. En effet, il a été démontré qu'un taux d'Aβ1-42 plasmatique élevé est un facteur de risque de MA, tandis qu'un rapport Aβ1-42/Aβ1-40 diminué indique le début de la maladie (68). Les chaînes légères des neurofilaments (NFL) sont des biomarqueurs potentiels de la MA. Un kit ELISA commercial est déjà disponible pour l'analyse quantitative des NFL et a permis d'observer une augmentation de leur concentration plasmatique chez les personnes atteintes de la maladie. Il a par ailleurs été démontré que les NFL plasmatiques sont un biomarqueur particulièrement sensible pour la neurodégénérescence mais ne sont pas spécifiques pour la MA (69).

## **I.C. Les traitements de la maladie d'Alzheimer**

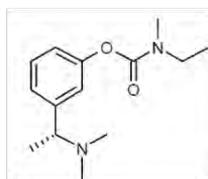
Actuellement, seuls quatre traitements symptomatiques de la MA sont commercialisés en France. Il s'agit des inhibiteurs de l'acétylcholine estérase, à savoir : la galantamine, la rivastigmine et le donépézil et d'un antagoniste des récepteurs NMDA au glutamate, la mémantine. Il existe également plusieurs candidats médicaments à différents stades de développement.

### **I.C.1 Les inhibiteurs de l'acétylcholine estérase**

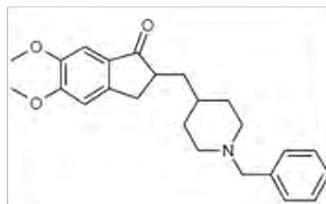
L'acétylcholine est un neurotransmetteur majeur dans la transmission synaptique au niveau des zones cérébrales associées à la mémoire (71–73). Dans la physiopathologie de la MA, une perte importante des neurones cholinergiques est observée, ce qui génère une diminution de la transmission à acétylcholine (71). L'importance de la perte cholinergique au niveau du cerveau est corrélée à la densité de plaques amyloïdes et également à l'intensité du trouble cognitif (74,75). Les agents thérapeutiques existants actuellement pour le traitement de la MA ont pour objectif d'améliorer la fonction cognitive en agissant sur la régulation du système cholinergique *via* l'inhibition de l'acétylcholine estérase, enzyme qui hydrolyse l'acétylcholine dans le cerveau. Cette inhibition entraîne l'augmentation de la concentration en acétylcholine au niveau synaptique, améliorant ainsi la neurotransmission cholinergique (72,73,76). Ces médicaments sont la galantamine, la rivastigmine et le donépézil (Figure 15).



Galantamine



Rivastigmine



Donépézil

Figure 15 : Structures des inhibiteurs de l'acétylcholine estérase utilisés dans le traitement de la MA

Les inhibiteurs de l'acétylcholine estérase se lient à cette dernière et empêchent son activité catalytique (76). Cette enzyme catalyse la réaction d'hydrolyse de l'acétylcholine en choline et en acide acétique ce qui entraîne l'inactivation du neurotransmetteur (73,76). Ainsi, ces médicaments stabilisent les performances cognitives au cours de la première année de traitement et sont indiqués dans les formes légères à modérées de la MA. Les inhibiteurs de l'acétylcholine estérase n'ont qu'un effet symptomatique et non curatif dans le traitement de la MA (73). Effectivement, ils n'ont aucune action sur le ralentissement de la progression de la maladie.

### I.C.2. La mémantine

La mémantine est un antagoniste non compétitif des récepteurs NMDA au glutamate (77). Comme vu précédemment (cf. I.A.4), ces récepteurs ont un rôle majeur dans l'hyperactivation des neurones post-synaptiques et participent ainsi à la perte de plasticité synaptique dans la MA (30). Les récepteurs NMDA sont des récepteurs ionotropes qui, lorsqu'ils sont activés par le glutamate, ouvrent leur canal ionique, entraînant alors l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le neurone post-synaptique (78). Ceci génère une dépolarisation de la cellule correspondant à un potentiel d'action qui est la manifestation de la stimulation du neurone post-synaptique (78). La mémantine agit en inhibant l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le neurone post-synaptique ce qui limite l'excitation de ce dernier, cette excitation étant excessive dans la

MA (77,79,80). La mémantine permet de limiter la perte synaptique et présente ainsi, un effet neuroprotecteur (77,79–81). En effet, ce médicament est indiqué dans le traitement de la démence du type Alzheimer modérée à sévère (81). L'efficacité clinique de la mémantine a été évaluée grâce au score évaluant l'autonomie chez les patients atteints de MA à travers les activités de vie quotidienne, le score ADCS-ADLsev (79). Cette évaluation a été faite dans le cadre d'un essai clinique dont les résultats sont présentés Figure 16.

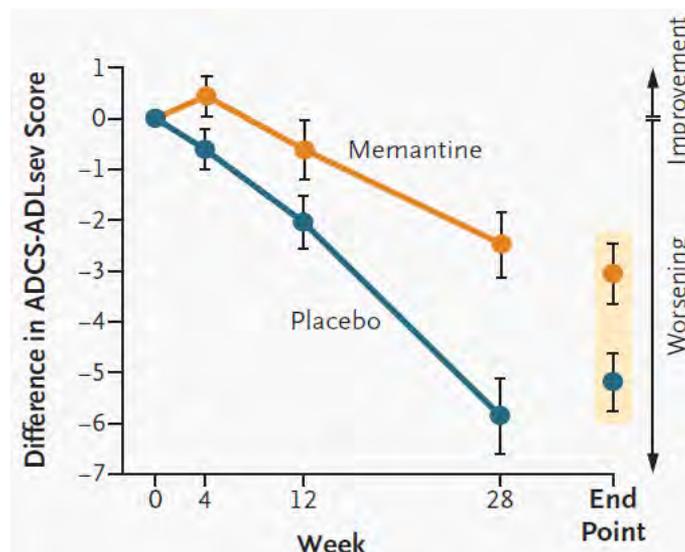


Figure 16 : Evaluation de l'efficacité clinique de la mémantine en comparaison à un placebo (79)

Le graphique représente l'évolution de la moyenne des scores ADCS-ADLsev dans chacun des groupes au cours du temps. La différence par rapport au score au début de l'étude est représentée en ordonnée : si celle-ci est supérieure à 0, cela signifie qu'une amélioration clinique est observée et inversement, si elle est inférieure à 0, cela signifie qu'une détérioration clinique est observée. La durée de traitement est représentée en abscisse.

Il s'agit d'un essai comparatif entre deux groupes de 126 personnes chacun. Ces patients étaient atteints de forme modérée à sévère de MA. Un groupe a été traité avec la mémantine et le second avec un placebo et ce, pendant 28 semaines. Concernant le groupe placebo, la différence du score clinique au score initial est de plus en plus faible au cours du temps ce qui correspond à l'évolution de la MA en l'absence de traitement. Dans le groupe traité avec la mémantine, une légère amélioration est observée à 4 semaines de traitements puis le score ADCS-ADLsev diminue jusqu'à la fin de l'étude. Il est important de souligner que, quel que soit la durée de traitement, la diminution de ce score est significativement supérieure

dans le groupe placebo par rapport au groupe traité avec la mémantine. Ceci indique, qu'à défaut d'améliorer la situation clinique des personnes atteintes de MA, la mémantine ralentit l'évolution des symptômes (79).

### I.C.3. Les candidats médicaments anti-Alzheimer

Il est à noter qu'en 2018, les traitements anti-Alzheimer, à savoir les inhibiteurs de l'acétylcholine estérase et la mémantine, ont été déremboursés par l'assurance maladie en France pour cause d'inefficacité (82). Ainsi, il existe un besoin urgent pour de nouveaux traitements contre la MA et surtout des traitements curatifs et pas seulement symptomatiques comme actuellement. C'est pourquoi de nombreux candidats médicaments sont actuellement en phase clinique (Tableau 1). En effet, ces candidats médicaments résultent principalement d'approches anti-amyloïdes (Tableau 1), en particulier l'augmentation de la clairance cérébrale de ces peptides et les stratégies permettant de limiter l'agrégation des peptides A $\beta$  (81).

Tableau 1 : Récapitulatif des récents candidats médicaments anti-Alzheimer (81)

Candidat médicament	Laboratoire fabricant	Mécanisme d'action	Résultats des essais cliniques
<b>Solanezumab</b>	Eli Lilly	Séquestration des A $\beta$ solubles sous-forme de monomères	Défavorables en phase 3
<b>Bapineuzumab</b>	Pfizer/Johnson & Johnson	Augmentation de la clairance des A $\beta$	Défavorables en phase 3
<b>Crenezumab</b>	Roche/Genentech	Augmentation de la clairance des A $\beta$	Défavorables en phase 2
<b>Gantenerumab</b>	Roche/Genentech	Augmentation de la clairance des A $\beta$	Défavorables en phase 3

Cependant, comme le montre le Tableau 1, les essais cliniques de plusieurs de ces candidats médicaments ont été publiés avec des résultats décevants (83–85) et ce, pour deux raisons :

une erreur dans le diagnostic posé qui fait que les patients inclus dans les essais cliniques ne sont en fait pas atteints de MA et un diagnostic trop tardif avec une irréversibilité des dommages et donc une inefficacité des traitements testés. L'amélioration de la puissance diagnostic de la MA est donc primordiale pour le développement de nouveaux médicaments. Cette amélioration est basée sur les tests biochimiques et plus particulièrement sur le dosage des peptides A $\beta$  dans le LCR.

## **II. Inventaire des techniques actuelles de quantification des peptides $\beta$ -amyloïdes**

---

Le dosage des A $\beta$  dans le LCR est une étape facultative lors du diagnostic de la maladie d'Alzheimer. Il repose actuellement sur la technique de l'ELISA. Plusieurs variantes de cette technique permettent ce dosage.

### **II.A. L'ELISA, méthode standard de quantification des peptides $\beta$ -amyloïdes**

#### **II.A.1. Principe de l'ELISA**

L'ELISA est une méthode analytique quantitative qui montre l'interaction antigène-anticorps en produisant un changement détectable obtenu grâce à la transformation d'un substrat par une enzyme. En effet, quel que soit le type d'ELISA, la technique met toujours en jeu l'interaction spécifique entre un anticorps et l'antigène dont il est spécifique et une réaction enzymatique qui permet de générer un produit détectable (86). Il existe plusieurs types de techniques :

- ELISA direct : cette technique consiste à créer un revêtement sur la surface de la plaque ELISA. Ce revêtement correspondra aux antigènes ou aux anticorps à doser. Dans le cas où le composé à quantifier se comporte comme un antigène, un anticorps marqué avec une enzyme est par la suite ajouté au support solide (Figure 17). Puis le substrat de l'enzyme est ajouté afin qu'il soit transformé en produit. Ce dernier génère un signal qui sera alors mesuré. Le signal mesuré est alors proportionnel à la quantité d'anticorps fixé et donc à la concentration d'antigène. La réaction enzymatique est ensuite arrêtée par l'ajout d'un réactif d'arrêt. Entre les ajouts, plusieurs lavages sont effectués afin d'éliminer toutes contaminations liées à une liaison non spécifiques (86–88).

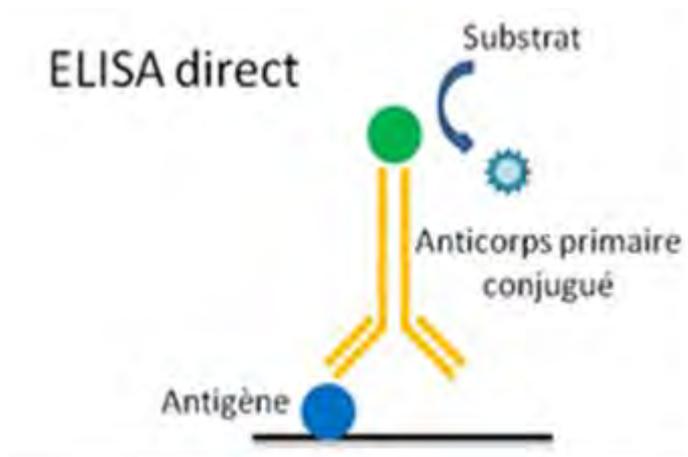


Figure 17 : Schéma de principe de la technique ELISA directe

- ELISA indirecte : la différence avec l'ELISA directe est que l'anticorps spécifique de l'antigène à doser n'est pas conjugué à l'enzyme. Ce type d'ELISA requiert l'ajout d'un deuxième anticorps, dit secondaire, spécifique du fragment commun du premier. Ce second anticorps est, quant à lui, marqué par une enzyme (voir Figure 18). Par la suite, tout comme dans l'ELISA directe, le substrat de l'enzyme est ajouté et le signal généré par le produit obtenu est mesuré (89,90).

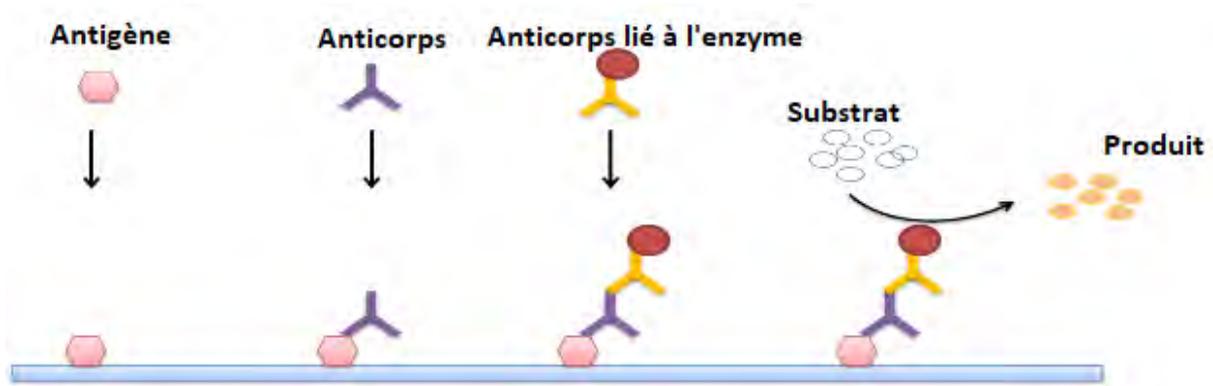


Figure 18 : Principe de la technique ELISA indirecte (88,89)

- ELISA compétitive : dans cette technique, la surface du support solide présente un revêtement composé de l'anticorps spécifique du composé à quantifier (ou de l'antigène spécifique de l'anticorps à doser, dans le cas de la quantification d'anticorps). L'échantillon et un antigène couplé à une enzyme sont ajoutés

simultanément sur le support solide, ce dernier étant ajouté en quantité connue (Figure 19). L'antigène présent dans l'échantillon entre alors en compétition avec l'antigène marqué avec l'enzyme. Le substrat de l'enzyme est ensuite ajouté et transformé en produit détectable. L'intensité du signal mesuré est alors inversement corrélée à la quantité d'antigène dans l'échantillon (91–93).

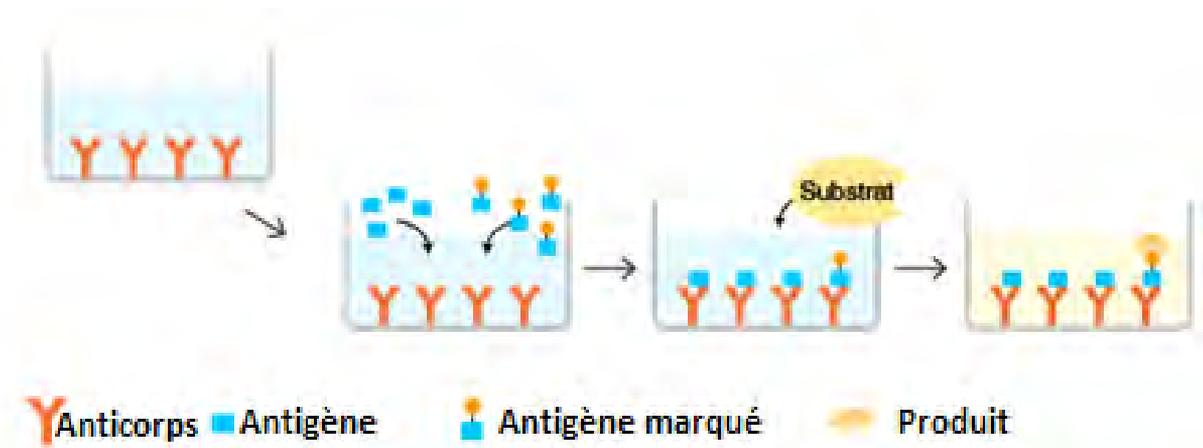


Figure 19 : Principe de la technique ELISA compétitive (91–93)

- ELISA sandwich : dans cette technique, comme le montre la Figure 20, les anticorps sont d'abord fixés par adsorption sur le support solide (étape 1). Ensuite, la solution contenant les antigènes est ajoutée (étape 2). Ces derniers vont alors se lier aux anticorps et ce, avec une spécificité élevée. Un deuxième anticorps spécifique des antigènes est alors ajouté, pour augmenter la spécificité de la méthode vis-à-vis du composé à doser (étape 3). Un anticorps secondaire lié à une enzyme est par la suite ajouté (étape 4). Lors de l'étape 5, le substrat de l'enzyme permet de révéler la présence et la quantité d'antigène. La réaction enzymatique est ensuite arrêtée et la détection du produit obtenue est effectuée (94–96).

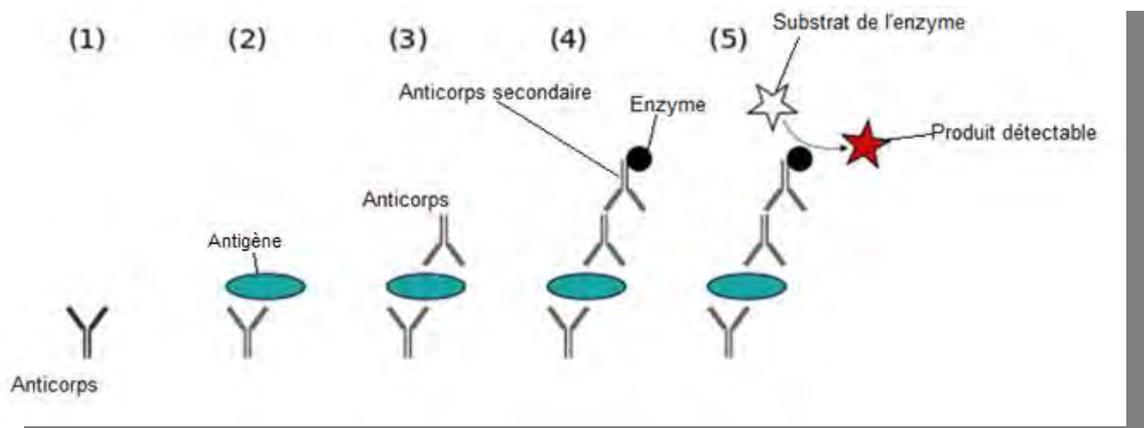


Figure 20 : Principe de l'ELISA sandwich

L'ELISA sandwich est la principale variante utilisée pour la quantification des peptides  $A\beta$  en raison des avantages que cela comporte. En effet, l'utilisation de deux anticorps primaires spécifiques des peptides permet de réduire les détections croisées et d'obtenir une spécificité supérieure vis-à-vis de ces analytes (Figure 20). De plus, le second anticorps spécifique de l'antigène présente plusieurs sites de liaison à l'anticorps secondaire ce qui permet, pour une même concentration de composé à doser, d'avoir une réaction enzymatique plus importante, améliorant par là même, la sensibilité de la technique. Ainsi la technique ELISA sandwich permet de quantifier des concentrations plus basses d'analyte comparée aux autres variantes de cette technique. Il est à noter que le second anticorps primaire peut être marqué par l'enzyme, évitant ainsi l'utilisation d'un anticorps secondaire.

Actuellement, pour le dosage des peptides  $A\beta$ , il existe principalement trois kits ELISA (86,97–100). Un kit ELISA correspond à l'ensemble des réactifs permettant d'effectuer un dosage, à savoir : le support sur lequel seront accrochés les anticorps, les anticorps primaires, les anticorps secondaires marqués avec une enzyme et le substrat de cette enzyme dont la transformation permet de mettre en évidence la présence de l'analyte.

## II.A.2 Les kits ELISA pour le dosage des peptides A $\beta$

Trois kits ELISA permettant le dosage des peptides A $\beta$  existent à l'heure actuelle : le Quanterix, le kit MSD (mesoscale discovery) et le kit Innotest. Ces kits diffèrent principalement par la nature du support de fixation des anticorps primaires et par le mode de détection du produit de la réaction enzymatique (97–99). Ceci génère des différences dans les performances analytiques obtenues notamment en termes de sensibilité. Cette dernière est exprimée par deux grandeurs qui sont : les limites basses de quantification (LLOQ) et de détection (LLOD).

Tout d'abord, le kit Innotest repose sur l'utilisation d'un support fréquemment utilisé pour les dosages en ELISA, à savoir une microplaque en polypropylène. Comme l'indique la Figure 21, les deux anticorps primaires utilisés sont différents et reconnaissent deux épitopes distincts ce qui permet de réduire le risque de réaction croisées, en particulier avec d'autres peptides A $\beta$ . Le premier anticorps, 21F12, est fixé à la microplaque tandis que le second, 3D6, ne l'est pas. Ce dernier est biotinylé c'est-à-dire qu'il comporte des biotines sur son fragment commun. Ceci permet que cet anticorps, *via* ces biotines (Bio), peuvent se conjuguer à l'enzyme de détection, la (HRP). En effet, elle comporte des groupements streptavidine (SV) qui présente une grande affinité pour les biotines. Ainsi, par formation de complexe streptavidine-biotine, le deuxième anticorps primaire se conjugue à l'enzyme HRP (Figure 21).

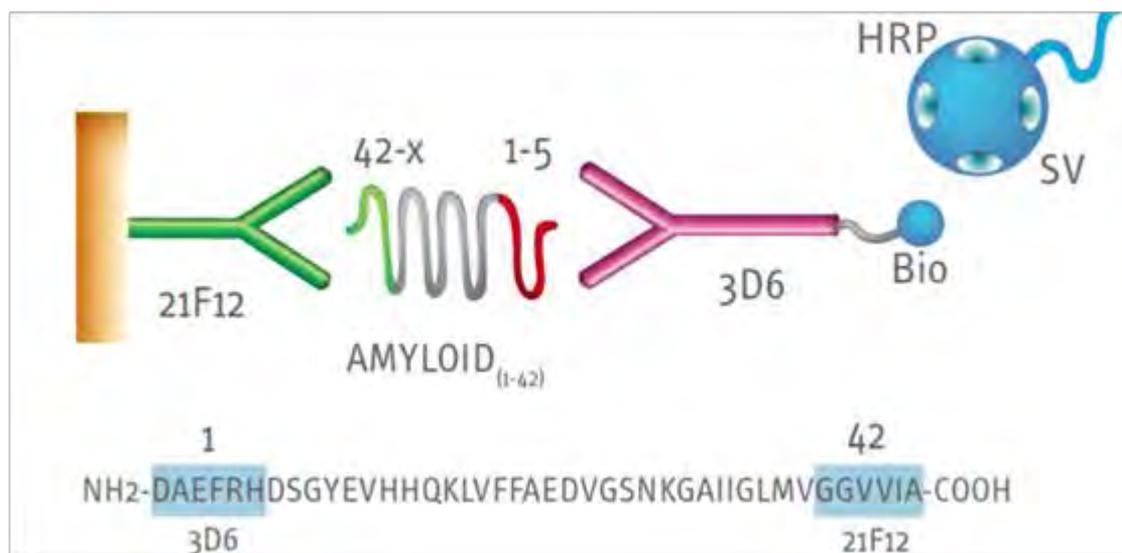


Figure 21 : Schéma récapitulatif du principe de fonctionnement du kit Innotest pour le dosage des peptides  $A\beta_{1-42}$  (101)

Les zones surlignées dans la séquence du peptide  $A\beta_{1-42}$  correspondent aux zones 1 et 42 reconnues respectivement par le deuxième et le premier anticorps primaires.

La HRP transforme ensuite un substrat incolore en un produit coloré dont l'absorbance est mesurée et corrélée à la concentration de peptides  $A\beta_{1-42}$  de départ. Il s'agit donc d'une détection colorimétrique. Le volume d'échantillon nécessaire au dosage est de 300  $\mu$ L (101).

Concernant le kit Quanterix (99), il consiste en l'utilisation de microbilles magnétiques comme support. Les mêmes anticorps primaires que pour le kit Innotest sont utilisés : 21F12 et 3D6. L'anticorps 3D6 est fixé aux microbilles grâce à une réaction de couplage mettant en jeu le 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDAC). D'autre part, l'anticorps 21F12 est biotinylé. Ceci lui permet de se conjuguer à la galactosidase qui est couplée à la SV et qui est utilisée comme enzyme de détection (99). Le substrat de la réaction enzymatique est le  $\beta$ -D-galactopyranoside qui est transformé en un produit fluorescent. Ainsi, le mode de détection utilisée est la mesure de fluorescence (99,102). L'utilisation des microbilles magnétiques permet de réduire le volume d'échantillon de LCR nécessaire au dosage, ce dernier étant de 100  $\mu$ L (103).

Enfin, le kit MSD est également référencé comme un kit ELISA (97,102). En réalité, il s'agit d'un immunodosage et non d'une technique ELISA. En effet, le kit met en jeu des

anticorps mais, à aucun moment, une enzyme n'intervient dans la détection des peptides A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Pour le dosage avec ce kit, le premier anticorps primaire se fixe sur un support en carbone correspondant à une électrode de travail (102,104). Le deuxième anticorps primaire présente un marquage électrochimiluminescent. Par la suite, une tension est appliquée sur l'électrode de travail générant une émission de lumière par l'étiquette des anticorps liés à l'analyte. L'émission de lumière est alors mesurée et permet de déterminer la concentration de peptides A $\beta$ . Le volume d'échantillon utilisée est de 60  $\mu$ L au plus (dans le cas où aucune dilution supplémentaire n'est nécessaire) par dosage (104). Le principal avantage de ce kit est qu'il permet un dosage simultané de trois peptides A $\beta$  différents, à savoir les peptides A $\beta$  1-42, A $\beta$  1-40 et A $\beta$  1-38.

Les caractéristiques techniques ainsi que les principes de chaque kit sont résumées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Récapitulatif des caractéristiques de chaque kit de dosage des peptides A $\beta$

<b>Kit de dosage</b>	<b>Nature du support</b>	<b>Mode de détection</b>	<b>Principe du dosage</b>
<i>Innotest</i>	Plaque 96 puits en polypropylène	Mesure de la densité optique	ELISA sandwich réalisée au fond de chaque puits
<i>Quanterix</i>	Microbilles magnétiques	Mesure de la fluorescence	ELISA sandwich réalisée à la surface de chaque microbille magnétique
<i>MSD</i>	Electrode de travail en carbone	Chimiluminescence mesurée après excitation électrique	Immunoréaction effectuée à la surface de l'électrode de travail

Par ailleurs, pour ce qui est des performances analytiques, plusieurs paramètres permettent de différencier les kits d'immunodosage. Il s'agit de la sensibilité, qui est

représentée par la LLOQ, le volume d'échantillon nécessaire, le temps d'analyse et la possibilité de multiplexage c'est-à-dire de doser plusieurs peptides A $\beta$  simultanément. Ces performances sont décrites pour chaque immunodosage dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Résumé des performances de chaque kit d'immunodosage (97,99,101–104)

Kit de dosage	LLOQ pour le peptide A $\beta$ 1-42 (picomolaires)	Volume d'échantillon	Temps d'analyse	Possibilité de multiplexage
Innotest	14	300 $\mu$ L	4 h	Non
Quanterix	0,04	100 $\mu$ L	5 h	Oui, en utilisant plusieurs anticorps greffés sur les microbilles
MSD	0,6	60 $\mu$ L	4 h	Oui, en fixant différents anticorps à des emplacements spécifiques au fond de chaque puits

Le Tableau 3 montre que le kit Innotest est le moins performant des trois. En effet, il présente la LLOQ la plus élevée, donc la sensibilité la plus faible. De plus, le volume d'échantillon nécessaire est relativement important. Enfin il n'offre pas la possibilité de multiplexage. Concernant les deux autres kits, le Quanterix est le plus sensible, bien qu'il consomme plus de volume d'échantillon (100  $\mu$ L contre 60  $\mu$ L pour le kit MSD) et que le temps d'analyse soit plus élevé (5 h contre 4 h pour le kit MSD). Enfin les deux offrent la possibilité de multiplexage (102). Cependant, il est à noter que, afin de réaliser un dosage simultané de plusieurs peptides A $\beta$  avec le kit Quanterix, il est nécessaire de préparer plusieurs lots de microbilles greffés avec différents anticorps spécifiques des peptides à doser. Ceci correspond à une étape longue, fastidieuse et qui peut être une source d'erreur importante (102). Le kit MSD étant conçu spécialement pour le multiplexage, ce dernier y est plus simple et moins source d'erreur. Par ailleurs, concernant la LLOQ, le plus important est qu'elle permette un diagnostic dans le LCR. Les concentrations les plus faibles pouvant être retrouvées dans le

LCR d'individus atteints de MA sont de l'ordre de 0,7 picomolaires (97–99,102). Ceci fait que la LLOQ du kit MSD, bien que plus élevée que celle du kit Quanterix, est suffisante pour établir un diagnostic de MA. Enfin, le temps d'analyse est en faveur du kit MSD. Ainsi, ce dernier apparait comme le plus performant pour le dosage des peptides A $\beta$  dans le LCR dans le cadre du diagnostic de la MA.

### II.A.3. Avantages et inconvénients des immunodosages

Les immunodosages permettent la quantification des peptides A $\beta$  dans le LCR de façon fiable. Cependant, ce dosage présente des avantages ainsi que des inconvénients qui sont récapitulés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Avantages et inconvénients des techniques de dosage immunologique **pour les peptides A $\beta$**

Avantages des immunodosages	Inconvénients des immunodosages
LLOQ suffisamment faible pour le diagnostic	Volume d'échantillon (LCR) nécessaire important
Spécificité importante grâce à la double reconnaissance par deux anticorps différents	Possibilité d'interférences dues à des interactions croisées des anticorps avec des peptides A $\beta$ tronqués
Possibilité de multiplexage pour certains kits	Temps d'analyse important
Déjà en place pour le dosage dans le LCR (97,98,100)	Variabilité des résultats obtenus

Le principal inconvénient des techniques de dosage immunologique correspond à la variabilité des résultats générés. En effet, d'un kit à l'autre, le dosage dans un même échantillon peut générer des résultats très différents (97). Janelidze *et al.* ont mis en évidence cette variabilité sur une cohorte. Ils ont réalisé le dosage des peptides A $\beta$  1-42, 1-40 et 1-38 dans les LCR de 215 individus avec les kits MSD et Quanterix. L'objectif est, après comparaison aux résultats de l'imagerie des plaques amyloïdes par TEP, d'identifier une

valeur seuil permettant de déterminer si une personne est atteinte ou non de la MA. Par exemple, pour le peptide A $\beta$ 1-42, la valeur seuil retrouvée avec le kit Quanterix est de 385,9 picomolaires tandis qu'elle est de 109,9 picomolaires avec le kit MSD (97). Ceci indique que la variabilité inter-kit est importante. Par ailleurs, il existe également une variabilité inter-laboratoire particulièrement grande (105,106). Effectivement, les coefficients de variation (CV) inter-laboratoires sont compris entre 20 et 30% (105). Ceci fait que pour un même kit, le dosage d'un peptide A $\beta$  dans le même échantillon effectué dans deux laboratoires différents peut générer des résultats très différents qui risquent d'être contradictoires en termes de diagnostic de la MA.

Malgré leurs différents inconvénients, les immunodosages restent, à ce jour, les seules techniques ayant permis d'observer une corrélation entre la concentration cérébrospinale en peptides A $\beta$  et les dépôts amyloïdes au niveau cérébral (97).

## **II.B. La spectrométrie de masse pour le dosage des peptides $\beta$ -amyloïdes**

La spectrométrie de masse (MS) est une technique analytique permettant l'identification et le dosage d'un composé dans un milieu donné. Elle permet également de générer des informations sur la structure ainsi que la masse moléculaire d'un composé.

### **II.B.1. Principe de la spectrométrie de masse**

Un spectromètre de masse est constitué principalement de quatre modules : un système d'introduction d'échantillon, une source d'ionisation, un analyseur et un détecteur, l'ensemble étant piloté par un ordinateur (Figure 22). Le principe de fonctionnement est l'application d'un champ électrique ou magnétique sur une particule chargée afin de séparer les ions contenu dans cette particule (107) en fonction du rapport  $m/z$ . L'analyse par spectrométrie de masse nécessite une ionisation à l'état gazeux de l'échantillon. La Figure 22 présente le schéma récapitulatif des éléments constitutifs d'un spectromètre de masse (107) :

- Le système d'introduction d'échantillon a pour but de faire pénétrer l'échantillon dans le spectromètre de masse. Son fonctionnement dépend de l'état physique de l'échantillon (liquide, solide ou gaz).
- La source d'ionisation a pour rôle d'ioniser l'échantillon introduit. Ceci se fait par ionisation directe si l'échantillon est déjà à l'état gazeux. Si l'échantillon est à l'état liquide, comme c'est le cas pour l'analyse d'échantillons biologiques tels que le LCR, la source d'ionisation a une double fonction, à savoir l'ionisation et la vaporisation de l'échantillon. Ceci se fait généralement par nébulisation suivi d'une désolvatation. La source d'ionisation a également pour rôle d'acheminer les ions formés à l'état gazeux à l'analyseur. Actuellement, plusieurs sources d'ionisation existent, chacune étant appropriée pour certaines natures d'échantillons et certains analyseurs.
- L'analyseur permet de séparer les ions en fonction de leur rapport masse / charge ( $m/z$ ). Ceci se fait par le balayage d'un champ magnétique ou électrique.

- Le détecteur recueille les ions triés par l'analyseur et produit un courant électrique proportionnel au nombre d'ions.

Certaines sources d'ionisation, l'analyseur et le détecteur sont maintenus sous vide par un dispositif de pompage.

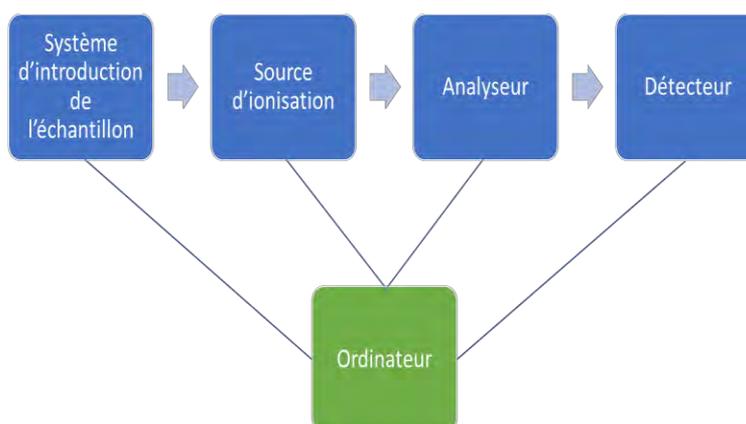


Figure 22 : Schéma récapitulatif du principe d'un spectromètre de masse

Dans le cadre de la quantification des peptides A $\beta$ , la MS est soit couplée à une technique séparative, à savoir, la chromatographie liquide ou l'électrophorèse capillaire (108–110), soit couplée à une méthode de préparation d'échantillon telle que l'immunoprécipitation (IP) (111).

### II.B.2. Le dosage des peptides $\beta$ -amyloïdes par LC-MS

Lame *et al.* (109) ont proposé une méthode de quantification des peptides A $\beta$  dans le LCR basée sur une extraction sur phase solide (SPE) hors-ligne, suivie d'une analyse par chromatographie liquide ultrahaute performance (UHPLC) couplées à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

La SPE est une technique de traitement d'échantillon consistant à percoler l'échantillon sur une phase stationnaire adaptée pour retenir spécifiquement les analytes (112,113). Ces derniers sont par la suite élués et analysés. La SPE permet d'une part d'améliorer la sensibilité par la préconcentration de l'échantillon et de réduire d'éventuels effets matrices (112,113). Dans la méthode proposée par Lame *et al.* (109), la phase stationnaire choisie correspond à une Oasis MCX. Il s'agit d'une phase combinant des effets hydrophobes et des interactions électrostatiques d'échange de cations. La rétention des peptides A $\beta$  dans le LCR se fait donc par un mode mixte impliquant ces deux types d'interactions. Les échantillons de LCR sont

préalablement acidifiés avec une solution d'acide phosphorique ( $H_3PO_4$ ) à 4% (77 mmol/L), permettant d'obtenir des peptides  $A\beta$  sous-forme cationique. L'éluion se fait par la suite grâce à un mélange 75/15/10 (v/v/v) acétonitrile/eau/solution concentrée d'ammoniaque ( $NH_4OH$ ) (109).

La solution obtenue est injectée dans un système UHPLC-MS/MS, dont les conditions chromatographiques sont récapitulés dans le Tableau 5 (109).

Tableau 5 : Conditions chromatographiques de la méthode de Lame et al. (109)

<b>Colonne chromatographique</b>	ACQUITY UPLC BEH300 C18 (150 x 2,1 mm ; 1,7 $\mu$ m)
<b>Mode d'éluion</b>	Gradient
<b>Phase mobile</b>	Solvant A : $NH_4OH$ 0.3% dans l'eau Solvant B : Acétonitrile/Solvant A 90/10 (v/v)
<b>Débit de phase mobile</b>	0,2 mL/min
<b>Durée de l'analyse</b>	8 minutes

La MS/MS est faite en mode multiple reaction monitoring (MRM) sur un analyseur de type triple quadripôle. Elle consiste à isoler un ion précurseur dans le premier quadripôle. Ce dernier est alors fragmenté par collision avec un gaz inerte dans le deuxième quadripôle pour générer un ou plusieurs ions fragments qui seront isolés dans le troisième quadripôle. Ainsi, pour chaque composé, une ou plusieurs transitions MRM correspondant au passage d'un ion précurseur à un ion fragment sont décrites. Ce mode de détection permet d'obtenir une spécificité importante vis-à-vis des composés analysés. Il permet également d'atteindre des limites de quantification très basses. Dans le cas de la méthode de Lame *et al.* (109), trois peptides  $A\beta$  sont quantifiés dans le LCR :  $A\beta_{1-38}$ ,  $A\beta_{1-40}$  et  $A\beta_{1-42}$ . Ces trois analytes sont ionisés en électronebulisation en mode positif. Pour chacun de ces peptides, une transition MRM a été identifiée correspondant à la fragmentation du peptide protoné quatre fois. Les rapports m/z des ions précurseurs sont 1033, 1083 et 1129 pour  $A\beta_{1-38}$ ,  $A\beta_{1-40}$  et  $A\beta_{1-42}$ , respectivement. Sur la base des spectres de fragmentation (Figure 23), l'ion fragment le plus

abondant a été identifié et utilisé pour la détection et la quantification de ces peptides dans le LCR.

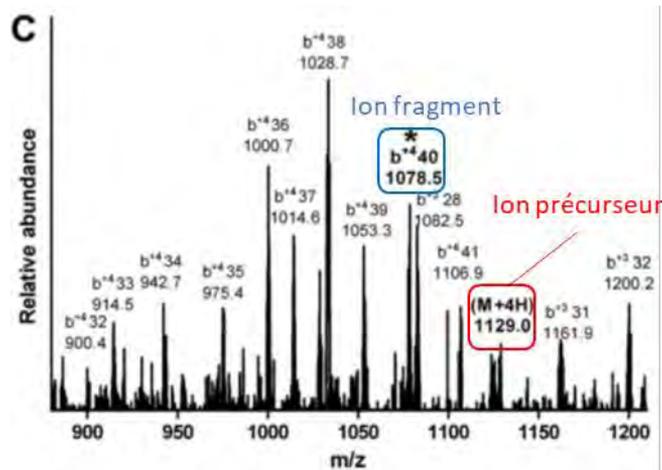


Figure 23 : Spectre de fragmentation du peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Adapté de (109)  
Des étalons internes correspondant aux peptides A $\beta$ <sub>1-38</sub>, A $\beta$ <sub>1-40</sub> et A $\beta$ <sub>1-42</sub> marqués avec des <sup>15</sup>N sont utilisés dans cette méthode. En termes de performances, la méthode proposée par Lame *et al.* (109) permet d'atteindre des LLOQ de l'ordre de 20 picomolaires, compatibles avec le diagnostic précoce de la MA.

### II.B.3. Le dosage des peptides $\beta$ -amyloïdes par IP-MS

La méthode proposée par Nakamura *et al.* (111) repose sur l'IP suivi d'une analyse par MS basée sur une Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI) et un analyseur à temps de vol (TOF). L'IP est une technique de préparation d'échantillon consistant à isoler un antigène par liaison à un anticorps spécifique greffé sur une matrice non soluble. Le complexe antigène-anticorps forme alors un précipitât et peut être isolé du reste de l'échantillon. L'antigène est par la suite resolubilisé par rupture des interactions antigène-anticorps (114). Dans la méthode proposée par Nakamura *et al.* (111), les peptides A $\beta$ <sub>1-40</sub> et A $\beta$ <sub>1-42</sub> sont ainsi immunoprécipités. La solution obtenue est par la suite déposée avec une matrice d'ionisation sur une plaque MALDI avant analyse par le TOF. Cette méthode présente des LLOQ de 10 picomolaires et 2,5 picomolaires pour les peptides A $\beta$ <sub>1-40</sub> et A $\beta$ <sub>1-42</sub>, respectivement. Elle est de ce fait adaptée pour le diagnostic précoce de la MA.

## II.C. Le dosage des peptides $\beta$ -amyloïdes par électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire (CE) est une technique analytique séparative. Il en existe différentes variantes et celle qui est principalement utilisée pour l'analyse de peptides A $\beta$  dans le LCR est l'électrophorèse capillaire de zone (CZE).

### II.C.1 Principe de l'électrophorèse capillaire de zone

La CZE permet la séparation de composés présents dans une même matrice. La séparation se fait dans un capillaire rempli de tampon, également appelé électrolyte ou BGE (BackGround Electrolyte). Ce dernier présente un pH et une force ionique fixés. Pour que la séparation se fasse, les deux extrémités du capillaire doivent être plongées dans deux flacons d'électrolyte. Une électrode est immergée dans chacun des flacons et les deux sont reliées à un générateur haute tension. La séparation commence au moment où la haute tension est appliquée (115). Les analytes migrent alors à des vitesses différentes en fonction de leur charge et de leur taille, ce qui permet leur séparation. L'instrumentation de la CZE est résumée dans le schéma de la Figure 24.

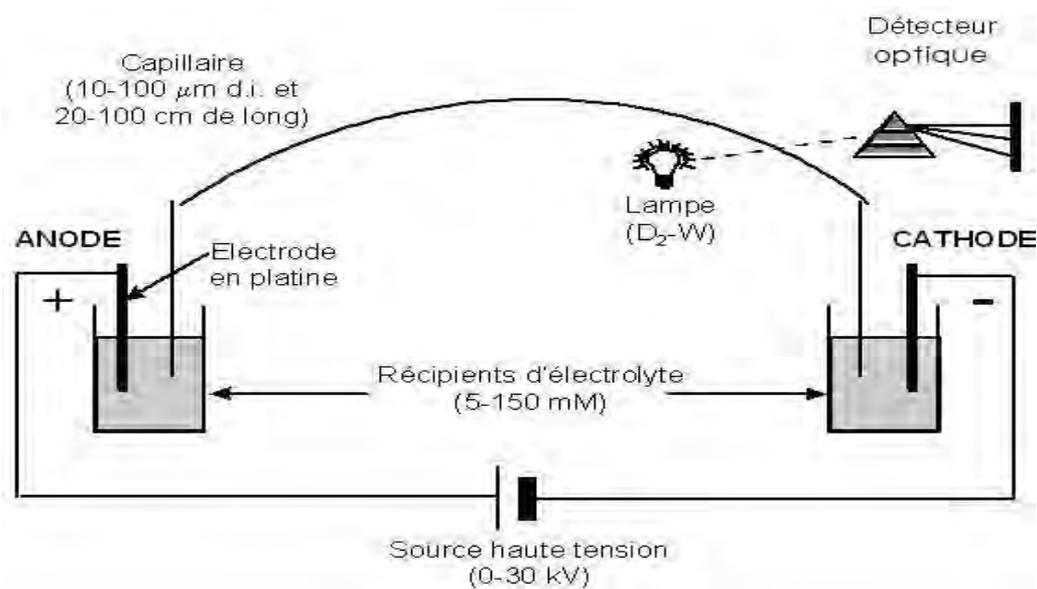


Figure 24 : **Schéma de l'instrumentation de l'électrophorèse capillaire de zone**

La vitesse de migration d'un composé donné correspond alors à la somme de sa vitesse électrophorétique et de la vitesse du flux électroosmotique (EOF) comme le montre l'équation ci-dessous.

$$v_{totale} = v_{\text{électroosmotique}} + v_{\text{électrophorétique}}$$

La vitesse correspond au produit de la mobilité ( $\mu$ ) et du voltage du champ électrique appliqué (E) (116,117) :

$$v_{\text{électroosmotique}} = E \mu_{\text{électroosmotique}} \quad v_{\text{électrophorétique}} = E \mu_{\text{électrophorétique}}$$

A la surface interne du capillaire de silice, sont présents des groupements silanol (Si-OH). Au contact du BGE, une partie de ces groupements silanols devient chargée négativement sous la forme de silanolate (Si-O<sup>-</sup>). Ces charges de surface attirent alors un nuage d'ions libres de charges positives. Ces derniers créent alors une fine couche (1-10 nm) à la surface du capillaire (Figure 25), appelée la double couche de Debye (118,119). En présence, d'un champ électrique externe parallèle à cette double couche de Debye, le fluide contenu dans cette double couche acquiert une dynamique. Cette dynamique est par la suite transmise à la couche suivante par effet de viscosité. Ceci se poursuit dans tout le diamètre du capillaire générant alors un écoulement du fluide (118,119). Il s'agit du flux électroosmotique (Figure 25).

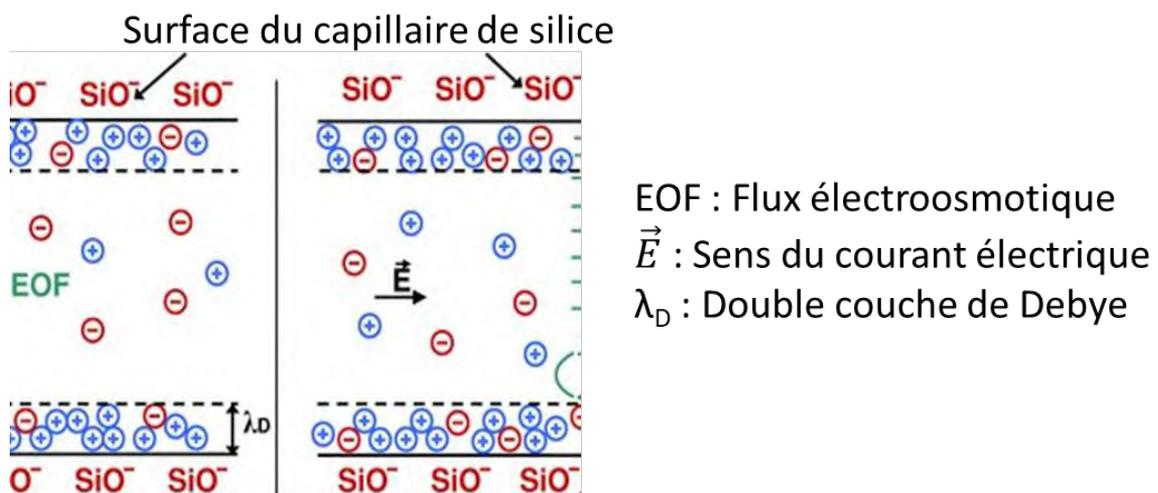


Figure 25 : Principe du flux électroosmotique

L'EOF dépend principalement du BGE et du capillaire utilisé et plus précisément de ses charges de surfaces. Ainsi, au cours d'une analyse, pour un capillaire donné et avec un BGE

donné, l'EOF est relativement constant. La mobilité électroosmotique ( $\mu_{eo}$ ) s'applique donc à toutes les molécules du mélange de la même façon et ne permet pas de les différencier (118).

En fait, la séparation en CZE est basée sur les différences de mobilités électrophorétiques. La mobilité électrophorétique ( $\mu_{ep}$ ) d'un composé dépend de sa charge et de sa taille comme le montre l'équation ci-dessous (116,117), où  $q$  est la charge du composé,  $\eta$  la viscosité du BGE et  $r$  le rayon hydrodynamique du composé en supposant la molécule sphérique :

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

$\mu_{ep}$  est donc proportionnelle à la charge d'un composé et inversement proportionnelle à son rayon hydrodynamique. Il est à noter que la charge d'un ion est conditionnée par le pH et la force ionique du BGE. Ceci fait que, pour un mélange de composés donné, en fonction du BGE choisi, la séparation obtenue peut être satisfaisante ou non.

Les modes de détection les plus utilisés correspondent aux détections optiques par spectrophotométrie UV-visible ou par fluorescence. Dans le cadre du dosage des peptides A $\beta$  dans le LCR, les deux modes de détection ont été envisagés.

### II.C.2. L'analyse par CE-UV

Une méthode d'électrophorèse capillaire couplée à une détection par spectrophotométrie UV (CE-UV) a été développée par Verpillot *et al.* (70). Cette méthode est fondée sur l'utilisation d'un revêtement dynamique de la paroi du capillaire en silice. Cela consiste en l'ajout d'un composé dans le BGE, composé qui se dépose sur la paroi du capillaire grâce à des interactions le plus souvent de type électrostatique avec la silice. La molécule utilisée dans cette méthode est le 1,4-diaminobutane (DAB) dont la structure est présentée dans la Figure 26.

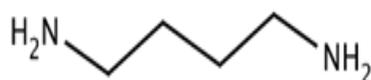


Figure 26 : Structure chimique du 1,4-diaminobutane

Le principe de ce revêtement dynamique repose sur le fait que le DAB dans le BGE présente une de ses deux fonctions amines chargée. Ceci rend possible des interactions électrostatiques avec les silanolates à la surface du capillaire, neutralisant par là même leur charge négative. Ainsi, l'écoulement électroosmotique est très fortement diminué. Par ailleurs, le DAB joue également un rôle d'agent d'appariement d'ions. En effet, les peptides A $\beta$  sont analysés dans un tampon borate à pH 9. Ce pH fait que la charge globale des peptides est négative. L'ajout de DAB qui présente une charge positive, fait que, par interactions électrostatiques plusieurs molécules de DAB s'apparient à un peptide A $\beta$ , neutralisant ainsi plusieurs charges négatives du peptide. La charge globale est alors réduite (70). De plus, du fait de cet appariement d'ion, le rayon hydrodynamique du peptide augmente. La baisse de la charge et l'augmentation du rayon hydrodynamique du peptide entraînent une diminution de la mobilité électrophorétique comme le montre la Figure 27 (70).

La Figure 27 montre que plus la concentration de DAB dans le BGE augmente, plus les mobilités électrophorétiques des peptides A $\beta_{1-40}$  et A $\beta_{1-42}$  diminuent. Ceci fait que lors de l'analyse par CE-UV, les temps de migrations de ces peptides diminuent et la résolution de leurs pics s'en trouve améliorée (70). Ainsi, la séparation de cinq peptides A $\beta$  a pu être possible par cette méthode. Il s'agit des peptides A $\beta_{1-42}$ , A $\beta_{1-40}$ , A $\beta_{1-39}$ , A $\beta_{1-38}$ , A $\beta_{1-37}$ .

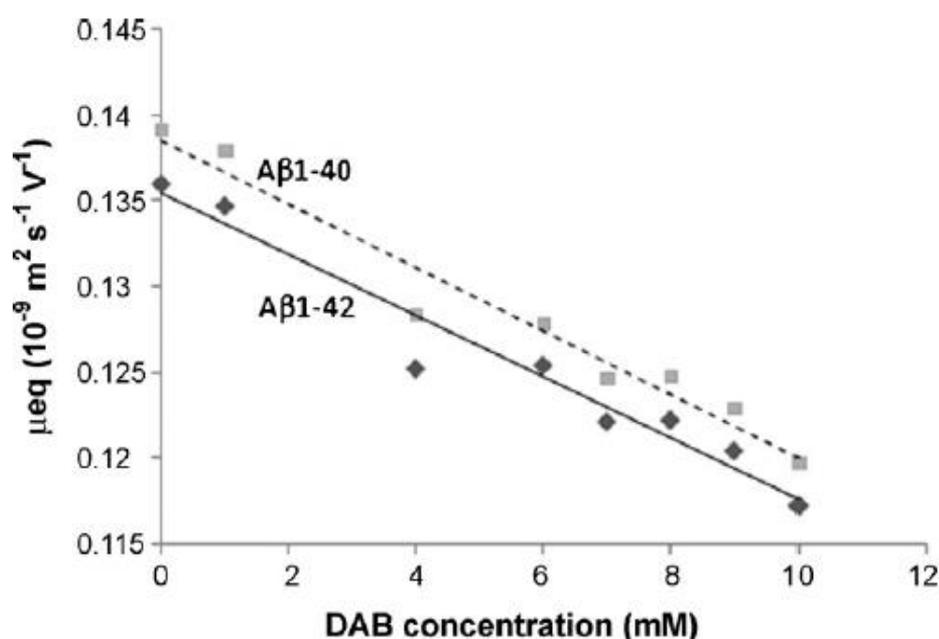


Figure 27 : Evolution de la mobilité électrophorétique ( $10^{-9} m^2.s^{-1}.V^{-1}$ ) des peptides A $\beta_{1-40}$  et A $\beta_{1-42}$  en fonction de la concentration de DAB dans le BGE (70)

Les conditions de séparation de la méthode de Verpillot *et al.* sont résumées dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Récapitulatif des conditions d'analyse de la méthode de Verpillot *et al.* (70)

<b>Tampon de séparation</b>	<b>Borate 40 mM pH 9,0 + 3 mM de DAB</b>
<b>L, l et d<sub>i</sub></b>	<b>57 cm, 50 cm et 50 µm</b>
<b>Conditionnement du capillaire</b>	<b>5 cycles, chaque cycle comprenant :</b> <ol style="list-style-type: none"> <li><b>1. Rinçage à 138 kPa avec le tampon (10 min)</b></li> <li><b>2. Application d'une haute tension de 30 kV (15 min)</b></li> <li><b>3. Rinçage à l'eau (10 min)</b></li> <li><b>4. Rinçage avec une solution de NaOH 0,1 M</b></li> </ol>
<b>Injection hydrodynamique</b>	<b>3,4 kPa, 20 s</b>
<b>Tension appliquée</b>	<b>30 kV</b>
<b>Longueur d'onde de détection</b>	<b>214 nm</b>

En termes de performance, cette méthode a permis de séparer de façon satisfaisante les différents peptides A $\beta$  avec par exemple une résolution de 1,58 entre l'A $\beta$ <sub>1-42</sub> et l'A $\beta$ <sub>1-40</sub> (70). Elle a permis d'atteindre une limite de détection (LLOD) entre 300 et 500 nM selon le peptide pour un temps d'analyse de moins de 15 min. Or, les concentrations ciblées pour un diagnostic efficace dans le LCR sont situées entre 0,1 nM et 1 nM. La détection UV n'est donc pas adaptée pour le dosage des peptides A $\beta$  dans le LCR dans le cadre du diagnostic de la MA.

### II.C.3. L'analyse par CE-LIF

Dans le but d'améliorer la sensibilité, une méthode de dosage des peptides A $\beta$  par électrophorèse capillaire couplée à une détection par fluorescence induite par Laser (CE-LIF) a été développée (120). Une différence majeure par rapport aux méthodes CE-UV correspond au fait qu'une étape de marquage fluorescent est ajoutée. En effet, les peptides A $\beta$  présentent une fluorescence intrinsèque trop faible pour permettre une quantification à de faibles concentrations. Une méthode CE-LIF très proche de la méthode CE-UV détaillée ci-dessus a également été développée par Verpillot *et al.* (120). Le marquage fluorescent se fait grâce au

marqueur FluoProbe 488 NHS ester qui réagit avec les amines primaires des peptides et ce, dans un tampon borate 40 mM pH 10,5 en utilisant un ratio molaire 200:1 (fluorophore : A $\beta$ ). La réaction de dérivation se fait en 5 minutes à température ambiante. Une étape d'IP permettant de préconcentrer les échantillons de LCR, en plus du marquage fluorescent des peptides A $\beta$ , a également été réalisée. Cette méthode a permis d'atteindre une LLOD proche de 35 nM pour l'A $\beta$ <sub>1-42</sub> ce qui est toujours insuffisant pour un dosage dans le LCR (120). Par ailleurs, cette méthode CE-LIF développée par Verpillot *et al.* (120) a été validée en termes de linéarité et de répétabilité des temps de migration et des aires pour cinq peptides A $\beta$  : A $\beta$ <sub>1-37</sub>, A $\beta$ <sub>1-38</sub>, A $\beta$ <sub>1-39</sub>, A $\beta$ <sub>1-40</sub> et A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Tableau 7)

Tableau 7 : Validation de la linéarité et de la répétabilité des temps de migration et des aires des pics obtenues par la méthode CE-LIF de Verpillot *et al.* Adapté de (120).

peptides	calibration curve ( $r^2$ )	RSD migration times (%)	RSD peak areas (%)
A $\beta$ <sub>1-42</sub>	0.996	0.69	1.76
A $\beta$ <sub>1-40</sub>	0.997	0.72	3.46
A $\beta$ <sub>1-39</sub>	0.999	0.73	3.54
A $\beta$ <sub>1-38</sub>	0.997	0.76	4.3
A $\beta$ <sub>1-37</sub>	0.997	0.77	4.9

Ainsi, bien que cette méthode atteint des LLOD trop élevées pour le diagnostic précoce de la MA, elle présente une linéarité et une répétabilité satisfaisantes (120).

#### II.C.4. L'analyse par ITP-CE-MS

Très récemment, une méthode développée par Crosnier *et al.* (110) couplant l'isotachophorèse (ITP) comme méthode de préconcentration à la CE-MS a été reportée. L'ITP est un mode de préconcentration électrocinétique consistant en l'injection de l'échantillon derrière un électrolyte meneur et devant un électrolyte terminal afin de permettre sa préconcentration (121,122). L'électrolyte meneur se caractérise par une mobilité supérieure à celle de tous les ions à séparer et inversement, l'électrolyte terminal présente une mobilité inférieure à celle de tous les ions à séparer. Lors de l'application du champ électrique, un état

stable se met en place avec un enchaînement des zones correspondant à chacun des composés de l'échantillon en fonction de leurs mobilités respectives (121,122). Plusieurs cycles d'ITP peuvent être mis en place afin d'obtenir des zones de plus en plus concentrées en composés (121,122).

Dans la méthode développée par Crosnier *et al.* (110), les échantillons de LCR sont tout d'abord filtrés sur des membranes retenant tous composés de masse moléculaire supérieure à 10 kDa. Le filtrat est alors récupéré et subit une étape de marquage fluorescence telle que décrite par Verpillot *et al.* (120). La solution obtenue est alors filtrée deux fois successives sur des membranes retenant tous composés de masse moléculaire supérieure à 3 kDa. Le retentât est alors resolubilisé dans l'eau et analysé par ITP-CE-MS (110). Les conditions d'analyse de cette méthode sont récapitulées dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Conditions d'analyse de la méthode ITP-CE-MS décrite par Crosnier *et al.* (110)

<b>Traitement d'échantillon</b>	Milieu de marquage	Tampon borate 40 mM pH 10,5
	Fluorophore	FluoProbe 488 NHS ester
	Ratio molaire	200:1 (fluorophore : A $\beta$ )
	Filtration	1 fois sur filtre 10 kDa et 2 fois sur filtres 3 kDa
	Solubilisation du rétentat	Tampon ammonium tétraborate, force ionique 147 mM pH 9,56
<b>Conditions de séparations et de préconcentration</b>	Capillaire	Silice sans revêtement
	L et d <sub>i</sub>	100 cm et 100 $\mu$ m
	Electrolyte meneur	Acétate d'ammonium, force ionique 20 mM, pH 9,6
	Electrolyte terminal	Ammonium tétraborate, force ionique 147 mM, pH 9, 6
	Courant appliqué	12 $\mu$ A
<b>Détection</b>	MS	ESI-TOF

La détection se fait par MS avec une ionisation en électronébulisation en polarité positive et avec un analyseur de type TOF. L'interface entre la CE et la MS est de type « sheath flow » c'est-à-dire qu'un liquide additionnel correspondant à un mélange 50/50 (v/v) acétate

d'ammonium 5 mM/Acétonitrile, est ajouté entre la sortie du capillaire et l'arrivée dans la source d'ionisation. Ceci permet d'obtenir un débit suffisant pour le bon fonctionnement de la source. En termes de performances, cette méthode présente des LLOQ de 0,2 nM, 3 nM et 0,06 nM pour les peptides  $A\beta_{1-38}$ ,  $A\beta_{1-40}$  et  $A\beta_{1-42}$ , respectivement (110). Ceci fait qu'elle est tout à fait adaptée au diagnostic précoce de la MA.

### III. Partie expérimentale

---

#### III.A. Présentation de la méthode à améliorer

Une autre méthode CE-LIF développée par le groupe PNAS repose sur une préconcentration électrocinétique en plusieurs cycles d'accumulation d'un grand volume d'échantillon grâce à une préconcentration appelée « large volume sample stacking with an electroosmotic flow pump » (LVSEP) (123).

Chaque cycle consiste à injecter un grand volume d'échantillon solubilisé dans une matrice de faible conductivité, dans le capillaire (étape 1, Figure 28) générant ainsi un EOF non négligeable malgré l'utilisation d'un capillaire possédant un revêtement neutre en PVA (polyvinyl alcool). Après la phase d'injection d'un volume correspondant à 100% du capillaire, une tension ainsi qu'une pression sont appliquées (étape 2, Figure 28). Les A $\beta$  étant chargés négativement, leur  $\mu_{ep}$  est négative et leur mobilité est orientée dans le sens opposé à l'EOF. Ces peptides, du fait de leur  $\mu_{ep}$ , migrent vers l'anode alors que l'EOF et la pression les poussent vers la cathode. Ceci entraîne un phénomène d'accumulation ou de « stacking » des A $\beta$  entre la zone d'échantillon et la zone de tampon.

Par ailleurs, l'EOF ainsi que la pression permettent de pousser la matrice de l'échantillon vers l'entrée du capillaire, permettant ainsi de l'éliminer et de réduire considérablement les effets de matrice lors de la séparation. Puis, une seconde injection d'un grand volume de capillaire est réalisée et la préconcentration est mise en place une seconde fois. Plusieurs cycles peuvent être mis en place successivement. En effet, dans la méthode développée, huit cycles successifs de PA-LVSEP sont nécessaires avant l'étape de séparation pour atteindre une sensibilité suffisante pour doser les peptides A $\beta$  dans le LCR. Concernant les sept cycles suivants, les étapes 3 et 4 de la Figure 28 sont répétées et le volume injecté correspond à 40% du capillaire à chaque cycle.

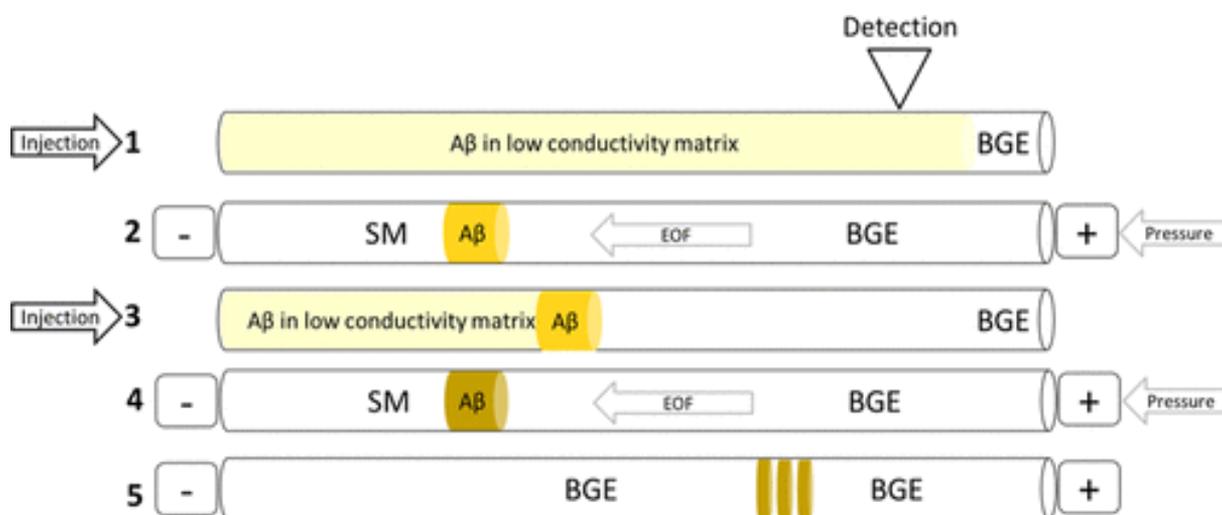


Figure 28 : **Schéma des différentes étapes d'un cycle de LVSEP**. Adapté de (123)

SM : Matrice d'échantillon

BGE : Electrolyte de séparation

A l'issue du dernier cycle de préconcentration, au fur et à mesure que la matrice est éliminée, l'EOF diminue jusqu'à arriver à une valeur proche de  $1.10^{-5} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}.\text{V}^{-1}$ . La pression n'est alors plus appliquée et la tension est maintenue : il s'agit du début de la séparation. Les peptides A $\beta$  marqués migrent alors exclusivement grâce à leurs mobilités électrophorétiques. Cette méthode est récapitulée dans le Tableau 9.

Concernant le traitement d'échantillon, il comporte une étape de marquage fluorescent des A $\beta$  présents dans l'échantillon de LCR identique à celle décrite dans la partie II.C.3. Par la suite, afin d'éliminer les protéines présentes dans l'échantillon de LCR et qui peuvent interférer dans la séparation des A $\beta$ , une filtration sur une membrane Nanosep 10 kDa (filtres qui retiennent tous composés possédant une masse moléculaire supérieure à 10 kDa) est mise en place. Les A $\beta$  marqués ayant une masse moléculaire comprise en 3,5 et 6 kDa, sont donc filtrés. Le filtrat est alors récupéré et il s'ensuit une étape comportant deux filtrations successives sur deux filtres Nanosep 3 kDa différents. Cela permet l'élimination du fluorophore libre (masse moléculaire de l'ordre de 1 kDa) et des ions présents dans le LCR. Le retentât correspondra alors à l'échantillon dessalé, dont l'excès de fluorophore a été éliminé et qui sera utilisé pour la préconcentration.

Tableau 9 : Résumé des conditions de la méthode à améliorer (123)

<b>Traitement d'échantillon</b>	<b>Milieu de marquage</b>	<b>Tampon borate 40 mM pH 10,5</b>
	Fluorophore	FluoProbe 488 NHS ester
	Ratio molaire	200:1 (fluorophore : A $\beta$ )
	Filtration*	1 fois sur filtre 10 kDa et 2 fois sur filtres 3 kDa
<b>Conditions de séparations</b>	Capillaire	Revêtement en PVA
	L, l et d <sub>i</sub>	90 cm, 80 cm et 50 $\mu$ m
	BGE	Tricine/NaOH 120 mM pH 8,2
	Tension haute	-30 kV
<b>Préconcentration</b>	Nombres de cycles de PA-LVSEP	8 cycles
<b>Détection</b>	LIF	$\lambda_{\text{excitation}} = 488 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{émission}} = 520 \text{ nm}$

Les principaux points forts de cette méthode sont : sa sensibilité avec une LLOQ de 60 pM pour l'A $\beta_{1-42}$ , la concordance des résultats obtenus avec la méthode ELISA pour le dosage du peptide A $\beta_{1-42}$  dans le LCR, le fait qu'elle permette de quantifier les A $\beta$  tronqués sans biais de détection contrairement aux méthodes reposant sur l'utilisation d'anticorps, la rapidité de sa mise en place comparée à l'ELISA et le fait qu'elle soit complètement automatisée.

Cependant, cette méthode présente également quelques axes d'amélioration, les principaux étant la reproductibilité et la robustesse, la méthode peut également être simplifiée pour une meilleure transférabilité en clinique. En effet, lors de tentatives de reproduire la méthode, les résultats obtenus n'ont été que faiblement comparables à ceux obtenus initialement. Les autres points clés à améliorer sont la sensibilité, l'objectif étant de détecter et quantifier davantage de peptides A $\beta$  tels que les formes tronquées en N et C-terminal et qui sont présents à des concentrations plus basses que les peptides A $\beta_{1-42}$  et A $\beta_{1-40}$ . Afin de

faciliter la transférabilité de cette méthode en routine clinique, il est envisagé de diminuer le nombre de cycles de LVSEP. Ainsi, les paramètres expérimentaux à optimiser correspondent à la méthodologie de séparation, la préparation d'échantillon et la préconcentration par LVSEP. Ces trois types d'amélioration ont constitué les étapes du travail expérimental.

### III.B. Optimisation de l'instrumentation

Pour commencer, une optimisation de l'instrumentation est mise en place afin que celle-ci soit pleinement efficace pour la préconcentration par LVSEP et la séparation des peptides A $\beta$ . Une double détection UV-LIF offre l'avantage de mesurer à la fois le signal fluorescent des peptides A $\beta$  marqués *via* le détecteur LIF et une mesure de l'EOF ainsi que l'analyse d'un éventuel étalon interne grâce au détecteur UV, c'est pourquoi, le montage Figure 29 a été mis en place. Il n'est pas facile de trouver un marqueur d'EOF fluorescent aux longueurs d'onde du détecteur (480-516 nm), la détection UV permet donc de s'affranchir de ce problème par l'utilisation d'un marqueur d'EOF absorbant en UV. Il s'agit là d'un montage inédit qui a été effectué en modifiant un appareil SCIEX de type P/ACE MDQ. En effet, l'appareil de départ présente un détecteur UV intégré et un détecteur de fluorescence induite par diode électroluminescente (LEDIF) Zetalif de Picometrics y a été ajouté.

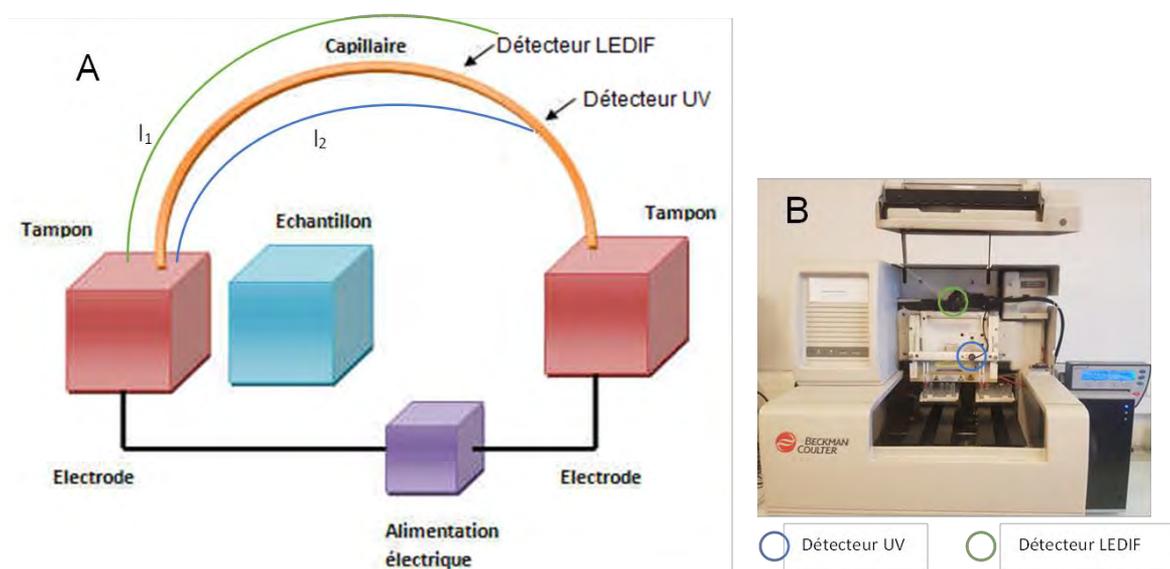


Figure 29 : (A) Schéma et (B) photo du montage de la double détection mis en place sur un instrument SCIEX

### III.C. Optimisation de la méthodologie CE-LIF

#### III.C.1. Modification de la géométrie et du revêtement du capillaire

Quelques paramètres de la méthode initiale ont été modifiés afin de faciliter sa transférabilité et permettre éventuellement d'atteindre une meilleure sensibilité. Tout d'abord, des modifications concernant le capillaire ont été effectuées et sont résumées dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Récapitulatif des modifications effectuées sur le capillaire

Méthode de Crosnier <i>et al.</i> (123)	Modification	Avantages attendus de la modification
Revêtement en PVA	Pas de revêtement	- Pas de dégradation du revêtement : meilleure stabilité du capillaire - Capillaire moins coûteux
Diamètre interne du capillaire $d_i = 50 \mu\text{m}$	$d_i = 75 \mu\text{m}$	- Plus grande longueur du chemin optique et volume du capillaire plus élevé ( $2,6 \mu\text{L} > 1,8 \mu\text{L}$ ) ➔ meilleure sensibilité - Réduction du nombre de cycles de LVSEP
Longueurs totale et effective $L = 90 \text{ cm}$ $l = 80 \text{ cm}$	$L = 60 \text{ cm}$ $l = 50 \text{ cm}$	Analyse plus rapide

Le nouveau capillaire utilisé n'ayant pas de revêtement, il s'agit de trouver un moyen de réduire l'EOF, ce qui était le rôle du revêtement en PVA. Pour cela, il est possible d'augmenter la force ionique du tampon (124). Toutefois, la composante inorganique de ce BGE tricine/NaOH fait qu'une augmentation de la force ionique entraîne une augmentation importante de l'intensité du courant générée lors de l'application de la tension, générant un effet joule trop important. Ce dernier n'est pas souhaitable car il peut être à l'origine de la dégradation de l'A $\beta$  marqué et de la diminution de l'efficacité de la séparation. L'augmentation de la force ionique de ce tampon conventionnel pour diminuer l'EOF n'a donc pas été envisagée et nous avons opté pour un changement de tampon.

### III.C.2. Optimisation de la séparation

Le nouveau tampon doit générer peu d'effet joule même à des forces ioniques très élevées. Sur la base, de ce critère, le choix s'est porté sur le tampon tris(hydroxyméthyl) aminométhane / acide N-cyclohexyl-2-aminoéthanesulfonique (TRIS/CHES) à un pH de 8,2-8,7. En effet, il s'agit d'un tampon organique où les deux composés sont hautement solubles ( $> 1 \text{ M}$ ) dans l'eau et où le courant généré lors de l'application de la tension est très faible. Les résultats d'EOF obtenus sont représentés dans la Figure 30.

Le courant généré par ce tampon a également été mesuré et comparé à celui généré par un tampon borate pH 9, tampon plus traditionnellement utilisé en CE (Figure 31).

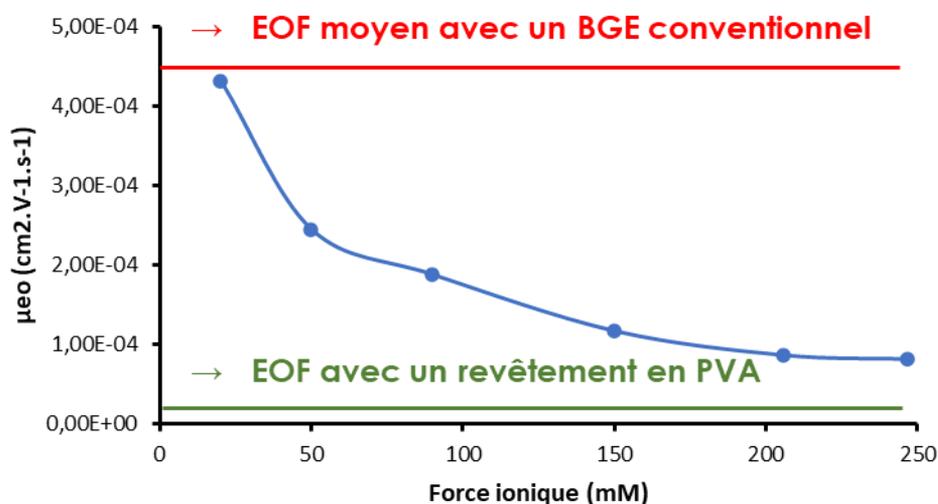


Figure 30 : Evolution de la mobilité électroosmotique en fonction de la force ionique du tampon TRIS/CHES

Conditions d'analyse : capillaire avec  $d_i$ ,  $l$  et  $L$  de  $75 \mu\text{m}$ ,  $50 \text{ cm}$  et  $60 \text{ cm}$  ; HV :  $30 \text{ kV}$  ; injection à  $48,3 \text{ mbar}$  pendant  $10 \text{ s}$  ; température ;  $25^\circ\text{C}$  ; détection UV à  $200 \text{ nm}$ . Avant chaque analyse, rinçage du capillaire avec une solution de NaOH à  $1 \text{ M}$ , de l'eau et avec le tampon à  $1,38 \text{ bar}$  pendant respectivement  $5$ ,  $5$  et  $15 \text{ min}$ . Mesures d'EOF avec une solution de diméthylsulfoxyde (DMSO) à  $1\%$

Chaque point sur les graphiques Figure 30 et Figure 31 correspond à une moyenne de trois mesures. Il s'agit de la première utilisation de ce tampon à des forces ioniques aussi élevées et l'EOF mesuré ( $8 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) est extrêmement bas pour un capillaire sans revêtement.

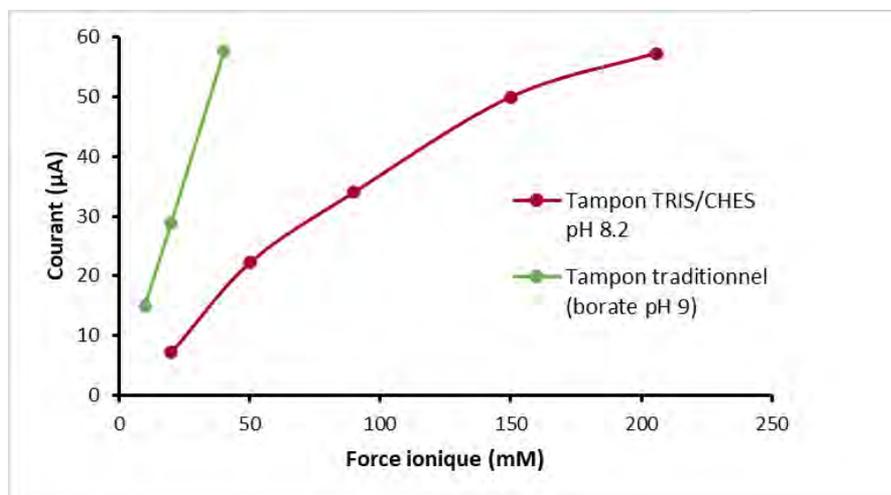


Figure 31 : **Comparaison de l'é**volution du courant en fonction de la force ionique pour le tampon TRIS/CHES et le tampon borate.

Cette valeur est très proche de celle obtenue avec un capillaire en PVA commercial ( $1 - 2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Une telle suppression d'EOF ne serait pas possible avec un tampon inorganique traditionnel (phosphate ou borate). Par ailleurs, même à des forces ioniques très élevées (200 mM), le courant mesuré n'excède pas les 60  $\mu\text{A}$ , limite au-delà de laquelle un effet joule est observé à une tension supérieure à 25 kV (125). Toutefois, nous avons observé que la mobilité électroosmotique pouvait varier d'une mesure à une autre surtout lorsque le capillaire n'est pas thermostaté ce qui est le cas du fait de la double détection. Or, pour la séparation des peptides A $\beta$ , un bon contrôle de l'EOF est primordial. Grâce à la double détection UV-LIF, la mesure de l'EOF ne nécessite l'ajout d'aucune molécule. En effet, le tampon TRIS/CHES, présente une absorbance en UV à 200 nm, de ce fait lorsqu'une molécule neutre n'absorbant pas à cette longueur d'onde, telle que l'eau arrive au détecteur (dans le cas où l'échantillon de peptides A $\beta$  est préparé dans l'eau), elle génère une diminution de l'absorbance et donc un pic négatif qui permet la mesure de l'EOF.

L'optimisation de la séparation a été réalisée par l'analyse de standard d'A $\beta$ 1-42 marqué (2  $\mu\text{M}$ ), filtré et stocké à  $-20^\circ\text{C}$  et ce, avec différents tampons TRIS/CHES de force ionique (30-120 mM) et pH (8,2-8,7). Ainsi, aucune préconcentration n'a été réalisée dans le cadre de cette optimisation. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 32. L'identification des pics a été faite au préalable et est confirmée sur ces analyses grâce à l'analyse d'un blanc ne contenant que le fluorophore et grâce aux mobilités électrophorétiques des composés. En

effet, dans les conditions d'analyse de la Figure 32, la mobilité électrophorétique de l'A $\beta$ 1-42 marqué est de  $-22.10^{-5} \text{ cm}^2.V^{-1}.s^{-1}$ .

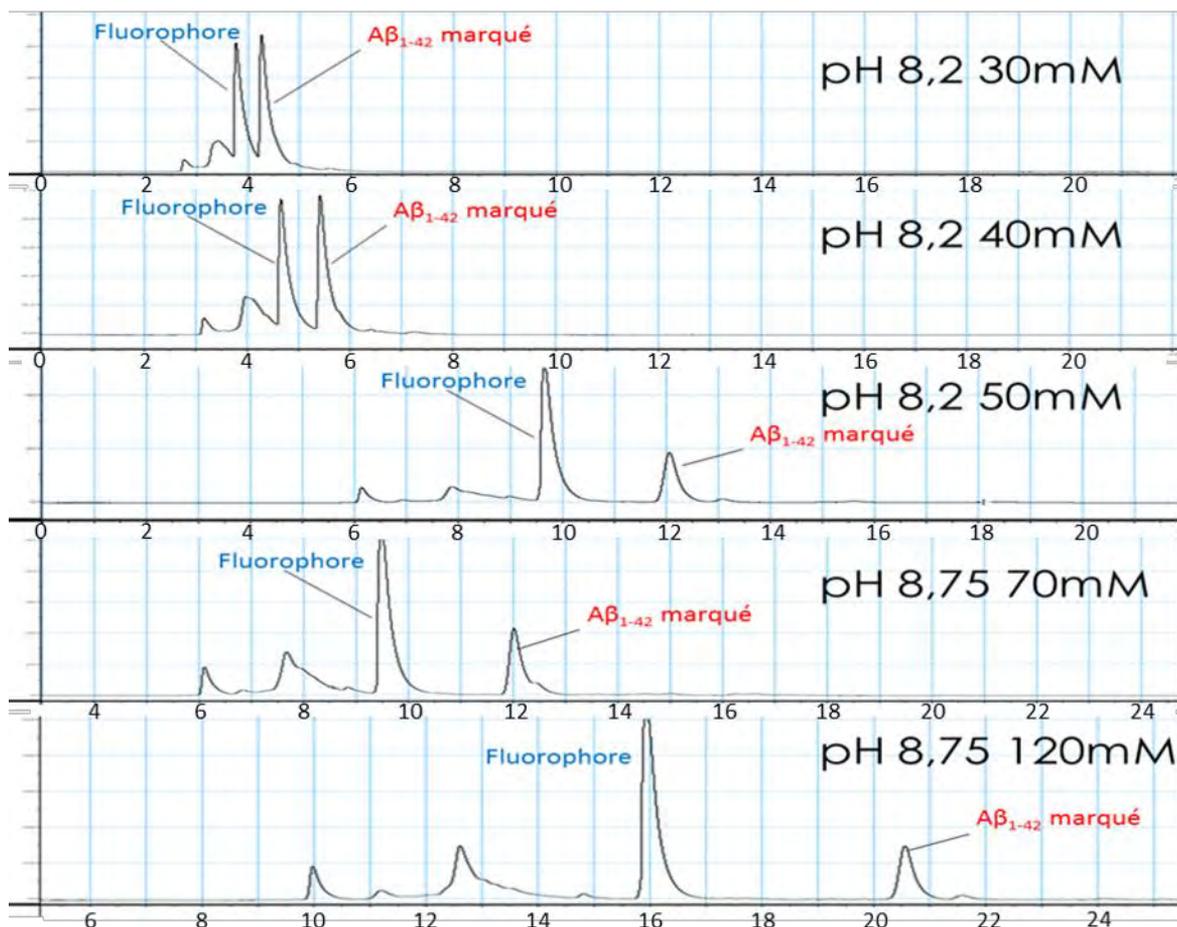


Figure 32 : Electrophorégrammes de l'A $\beta$  42 marqué obtenu avec les différents tampons TRIS/CHES

Conditions d'analyse : capillaire avec  $d_i$ ,  $l$  et  $L$  de 75  $\mu\text{m}$ , 35 cm et 60 cm ; tension haute appliquée : 18 kV ; Injection à 48,3 mbar pendant 5 s ; température : 31°C

Au fur et à mesure que la force ionique du tampon augmente, le temps de migration de l'A $\beta$ 1-42 marqué augmente ce qui est dû à la diminution de l'EOF. Cela permet d'augmenter la résolution entre les pics du fluorophore (bleu) et du peptide marqué (rouge). En effet, en passant de 30 mM à 120 mM de force ionique, la résolution passe de 0,53 à 7,34. Ainsi, la résolution entre les pics augmente avec la force ionique, c'est pourquoi le tampon possédant la force ionique la plus élevée a été sélectionné pour la suite de l'optimisation.

### **III.D. Optimisation du traitement d'échantillon**

Le traitement d'échantillon actuel consiste en un marquage fluorescent (voir **III.A.**) ainsi que deux filtrations consécutives ayant pour but d'éliminer l'excès de fluorophore. La nature du marqueur fluorescent ainsi que le ratio fluorophore : peptide A $\beta$  ont déjà fait l'objet d'optimisation au cours des travaux précédents de l'équipe PNAS et n'ont, par conséquent, pas été modifiés (110,120).

#### **III.D.1. Protocole de traitement d'échantillon**

Dans une optique d'amélioration de la précision de la méthode, un protocole de traitement d'échantillon de peptides A $\beta$  doit être rédigé avec le maximum de détails. Tout d'abord, la même préparation d'échantillon que celle développée précédemment (123) a été répétée plusieurs fois afin de disposer d'un point de départ. Ces tentatives n'ont pas permis d'observer le pic de l'A $\beta_{1-42}$  marqué en CE-LIF. Il se peut que la dérivation n'ait pas fonctionné ou que les étapes de filtrations aient conduit à une perte du peptide. Ainsi, des informations non détaillées dans la publication et susceptibles d'être à l'origine de cette absence de pics ont été identifiées notamment au niveau des étapes de filtration. Il s'agit des paramètres suivants :

- la concentration d'A $\beta_{1-42}$  avant le marquage dans le standard utilisé
- le volume de l'échantillon après le marquage et avant la filtration
- les volumes ajoutés lors des étapes de filtrations
- le mode de collecte des rétentats
- l'aspect du filtre si la filtration s'est bien déroulée
- l'aspect de la solution finale qui doit être obtenu

Ces différents paramètres nous sont apparus comme critiques. Des investigations ont alors été menées auprès des auteurs de la publication. Les informations manquantes ont pu être retrouvées et précisées (Tableau 11).

Tableau 11 : Récapitulatif des informations supplémentaires à prendre en compte **pour la préparation des échantillons d'A $\beta$  marqués**

Concentration d'A $\beta$ avant marquage	<b>2 mg/mL</b>
Volume d'échantillon après marquage	<b>500 <math>\mu</math>L</b>
Volumes ajoutés lors des étapes de filtrations	<b>180 <math>\mu</math>L puis 90 <math>\mu</math>L</b>
Mode de collecte optimale du rétentat	<b>Rinçage des quatre coins du filtre</b>
Aspect du filtre	<b>Présence d'un liserai orange sur le filtre (A<math>\beta</math> marqué)</b>
Aspect de la solution finale	<b>Transparente</b>

Disposant désormais de ces informations, un protocole a pu être rédigé. Les performances de ce protocole ont par la suite été testées.

### **III.D.2. Les performances du protocole de traitement d'échantillon**

Les performances du protocole détaillé ont été évaluées, notamment en ce qui concerne la répétabilité et la fidélité intermédiaire. Trois lots d'A $\beta_{1-42}$  à 1  $\mu$ M ont été préparés en suivant scrupuleusement le protocole. Ces trois lots ont été analysés par CE-LIF et l'aire du pic de l'A $\beta_{1-42}$  marqué a été mesurée pour chacun des trois lots. En termes de répétabilité entre les lots, les résultats obtenus sont satisfaisants (coefficient de variation de 6% sur 3 mesures). En effet, s'agissant d'échantillons hautement sensibles avec des peptides susceptibles de s'agréger et compte tenu du nombre important d'étapes (marquage + deux filtrations), notre objectif initial était d'atteindre un coefficient de variation inférieur à 10%. Par ailleurs, afin d'évaluer la fidélité intermédiaire, trois autres lots ont été préparés un autre jour. La moyenne des aires des pics correspondant à l'A $\beta$  marqué a été calculée et comparée à celle obtenu le jour précédent.

L'aire du pic est légèrement plus faible le jour 2 (- 12,5%). Afin de comparer ces deux moyennes, un test statistique a été utilisé. Il s'agit du test d'analyse des variances ou ANOVA. Ce test montre que la différence entre les deux moyennes n'est pas statistiquement significative. Le changement de jour n'a donc pas une influence significative sur l'aire du pic de l'A $\beta$  marqué. Sur la base de la répétabilité inter-jour, la fidélité intermédiaire est donc vérifiée pour ce protocole de préparation d'échantillon.

Enfin, l'exactitude de la méthode n'a pas pu être évaluée. En effet, cela nécessiterait un standard de peptide A $\beta$  marqué mais non filtré car la filtration entraîne une diminution du taux de peptide A $\beta$  qui s'adsorbe sur le filtre. Or, le peptide A $\beta$  non filtré contient le fluorophore en quantité trop importante pour pouvoir être analysé par CE-LIF puisque le pic du fluorophore est alors trop intense pour maintenir la résolution avec le peptide marqué. En conclusion, des pertes d'A $\beta$  sur les filtres sont bien présentes mais ces pertes sont suffisamment répétables pour qu'une quantification fiable soit effectuée. L'estimation de ces pertes de peptides est complexe c'est pourquoi, nous nous sommes orientés vers l'amélioration de cette préparation d'échantillon.

### III.D.3. Optimisation du traitement d'échantillon

Disposant désormais d'un point de départ grâce au protocole de traitement d'échantillon, il est possible d'explorer des axes d'optimisation du traitement d'échantillon. L'objectif principal de cette optimisation est de réduire les pertes d'A $\beta$  marqué sur les filtres tout en maximisant l'élimination du fluorophore. Pour cela, une réduction de l'adsorption du peptide sur les filtres est tentée. Pour limiter l'adsorption, un conditionnement des filtres (constitués de polypropylène) est testé. Récemment Pica-Mendez *et al.* ont mis en évidence le fait qu'une solution de tween 20, un tensioactif neutre, à 0,05% (v/v) dans l'eau inhiberait complètement l'adsorption des A $\beta$  sur le polypropylène par la passivation du polymère (126). Ainsi, cette solution de tween 20 à 0,05% a été testée pour le conditionnement de la membrane. Trois lots d'A $\beta_{1-42}$  marqués et filtrés sont alors préparés en utilisant ce conditionnement (Figure 33). Nous avons observé que la répétabilité ne s'en trouvait pas significativement améliorée avec ce conditionnement puisque le coefficient de variation passe de 6 à 5,9%. Cependant, la Figure 33 montre qu'une légère hausse statistiquement non significative de l'aire du pic du peptide A $\beta$  est observée pour les filtres conditionnés.

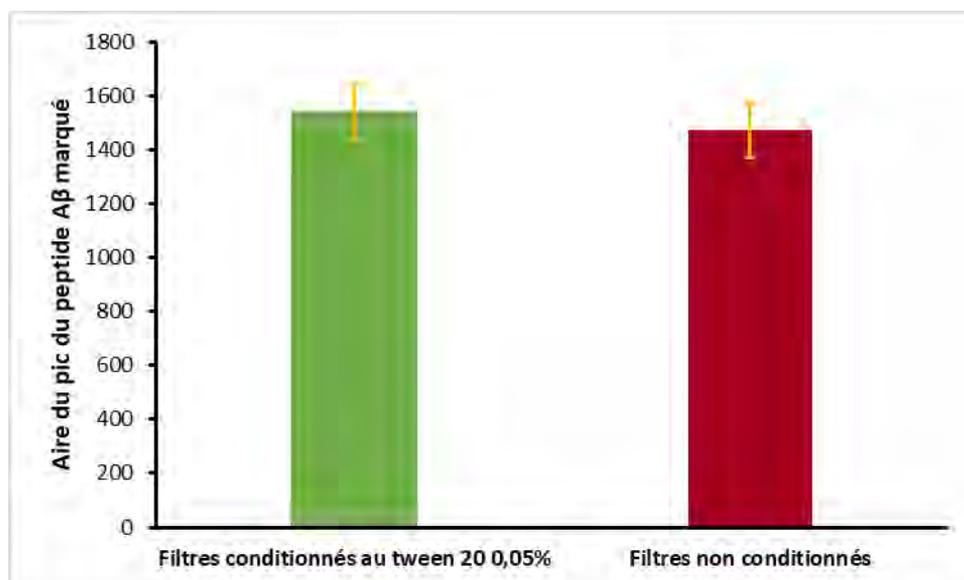


Figure 33 : **Diagramme représentant les moyennes des aires du pic de l'Aβ marqué** obtenues avec et sans conditionnement des filtres, les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 95%

### III.E. Autres axes d'optimisation explorés

D'autres axes d'optimisation ont été explorés sans que des résultats très concluants ne puissent être obtenus. Ces axes d'optimisation concernent principalement les modalités de pré-concentration et la recherche d'un étalon interne qui permettraient d'améliorer la répétabilité ainsi que la robustesse de la méthode. Des résultats préliminaires ont tout de même été obtenus.

#### III.E.1 Modalités de pré-concentration

La pré-concentration par LVSEP consiste à injecter un grand volume d'échantillon dans le capillaire. Ceci entraîne une augmentation de la mobilité électroosmotique qui pousse l'Aβ marqué dans le sens opposé à celui de sa mobilité électrophorétique. Dans la configuration initiale, le capillaire utilisé possédait un revêtement en PVA avec un EOF n'apparaissant que lorsque le capillaire était rempli à 40% par une matrice de faible conductivité. Désormais, avec l'utilisation d'un capillaire en silice sans revêtement et d'un tampon TRIS/CHES de force ionique très élevée, les modalités d'augmentation de l'EOF en fonction de la fraction du capillaire remplie d'échantillon ont dû être réévaluées. Pour cela, étant donné que l'Aβ marqué est solubilisé dans l'eau à l'issue des filtrations, de l'eau milliQ

est utilisée pour mimer l'échantillon. Ainsi, le capillaire est rempli de fractions d'eau variables (0-100%), puis une solution aqueuse de DMSO à 1% (v/v) est injectée pendant quelques secondes. Cette fraction injectée est comptabilisée dans la fraction d'eau. L'EOF est mesuré grâce au pic du DMSO. La

Figure 34 montre l'évolution de la mobilité électroosmotique en fonction de la fraction du capillaire remplie d'eau. Chaque point correspond à la moyenne de trois mesures de mobilité électroosmotique. La mobilité électrophorétique de l'A $\beta$ <sub>1-42</sub> marqué correspond au seuil au-delà duquel l'EOF suffit pour faire migrer le peptide vers la cathode ce qui est requis pour la pré-concentration.

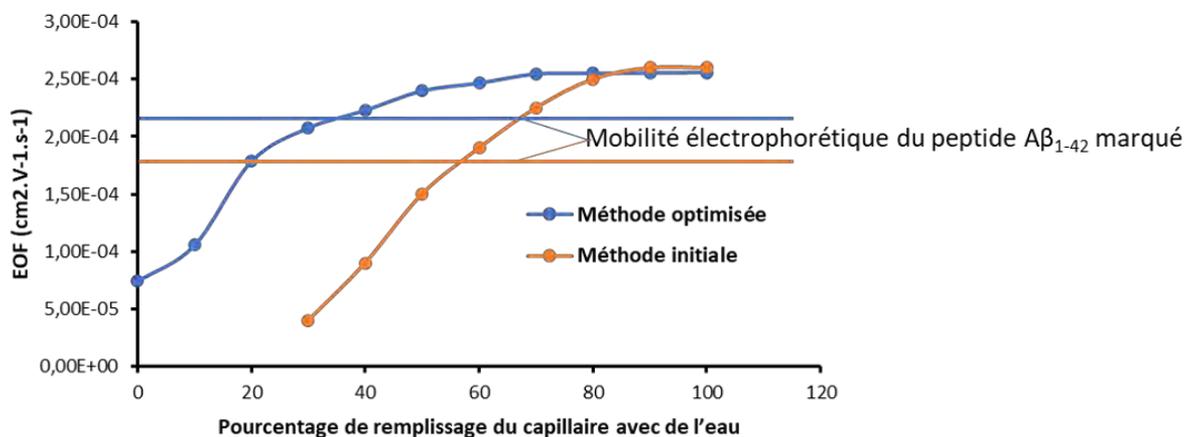


Figure 34 : Variation de l'EOF en fonction de la fraction du capillaire remplie d'eau dans un capillaire de silice avec le tampon TRIS/CHES 240mM pH 8,8 (en bleu) et dans les conditions initiales publiées (en orange).

La mobilité électrophorétique l'A $\beta$ <sub>1-42</sub> en valeur absolue est représentée en bleu pour les nouvelles conditions et en orange pour les conditions initiales.

La mobilité électroosmotique dépasse la mobilité électrophorétique de l'A $\beta$  marqué dès que la fraction du capillaire remplie d'eau est supérieure à 40% (courbe bleue,

Figure 34) alors que, dans les conditions initiales, cela ne se faisait qu'à partir de 60% (courbe orange,

Figure 34). Ainsi, lors des cycles de LVSEP dans un capillaire en PVA, la fraction minimale de remplissage du capillaire par l'échantillon est de 60%, pour que la mobilité électroosmotique soit supérieure à la mobilité électrophorétique du peptide  $A\beta_{1-42}$  marqué. Avec les nouvelles conditions, à 40% de remplissage, la mobilité électroosmotique est bien supérieure à la mobilité électrophorétique du peptide  $A\beta$ . Les fractions du capillaire rempli d'échantillon sont de ce fait plus modulables. Par ailleurs, la LVSEP étant basée sur l'accumulation (ou le stacking) générée par le passage des composés d'une matrice de faible conductivité à une matrice de forte conductivité, il peut être envisagé que le fait d'avoir un tampon de force ionique et donc de conductivité plus élevées entraîne une accumulation plus importante et par là même des pics plus fins et plus intenses ce qui permettrait d'améliorer la

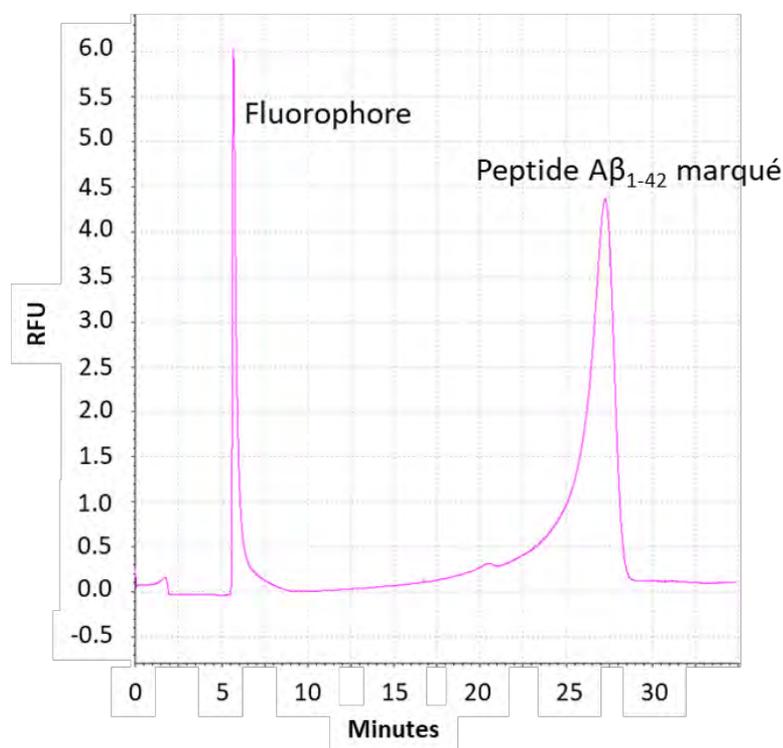


Figure 35 : **Electrophorégramme de l' $A\beta$  marqué à 1 nM obtenu après injection de l'échantillon dans 60% du capillaire**

Conditions d'analyse : capillaire avec di, l et L de 75  $\mu$ m, 35 cm et 60 cm ; tension haute appliquée : 18 kV ; Tampon TRIS/CHES 240 mM pH 8,8 ; température : 25°C

sensibilité de la méthode tout en réduisant le nombre de cycles de pré-concentration. Ainsi, des résultats préliminaires ont été obtenus avec l'analyse d'un échantillon d' $A\beta$  marqué à une concentration de 1 nM et avec un seul cycle de LVSEP en remplissant le capillaire à 60% d'échantillon (Figure 35).

Le pic de l'A $\beta$ <sub>1-42</sub> a été identifié après l'analyse d'un blanc ayant la même composition que l'échantillon mais ne contenant pas le peptide. Il est à noter que la limite de quantification (LOQ) de l'A $\beta$ <sub>1-42</sub> obtenue avec la méthode publiée précédemment est de 0,6 nM après un cycle de LVSEP. Or, avec les nouvelles modalités de pré-concentration, la LLOQ, correspondant à un rapport signal/bruit de 10, est inférieure à 0,02 nM pour l'A $\beta$ <sub>1-42</sub> et ce, après seulement un cycle de pré-concentration. Ainsi, l'hypothèse de l'accumulation accrue du fait de la plus grande force ionique est bel et bien confirmée puisque la LLOQ obtenue avec un seul cycle est inférieure à celle obtenue après huit cycles avec la méthode publiée. Enfin, le pic de l'A $\beta$ <sub>1-42</sub> marqué obtenu présente une largeur à la base qui est relativement élevée (supérieure à 7 minutes), c'est pourquoi il s'agit d'un paramètre qui devra être optimisé par la suite, avant qu'un mélange de plusieurs peptides A $\beta$  ne puisse être analysé.

### III.E.2. Recherche d'un étalon interne

Etant donné le caractère variable du traitement d'échantillon discuté précédemment et ce, malgré les améliorations apportées au protocole et compte tenu de la présence d'un nombre important d'étapes critiques, il a été décidé d'utiliser un étalon interne. Ce composé aurait le même comportement que les peptides d'intérêt et permettrait donc de normaliser l'aire du pic du peptide A $\beta$  et ce, par l'utilisation d'un rapport des aires des deux pics. L'instrumentation mise en place pour ce projet et en particulier la double détection fait que l'étalon interne envisagé n'est pas obligatoirement une molécule fluorescente. Ainsi, les critères de choix de ce composé sont : une masse moléculaire proche de celle de l'A $\beta$ <sub>1-42</sub> de façon à ce qu'il soit retenu ou filtré sur les filtres de la même manière, au moins une charge négative pour qu'il puisse être sujet à la pré-concentration en même temps que les A $\beta$ , l'absence de groupement qui puissent être marqué (amine primaire) pour que l'étape de dérivatisation du peptide ne soit pas influencée par l'étalon interne. Par ailleurs, le composé doit, soit présenter une absorbance importante à 200 nm (longueur d'onde de détection utilisée en UV), soit une absorbance très faible auquel cas il générera un pic négatif puisque le tampon TRIS/CHES absorbe fortement à cette longueur d'onde. En respectant ces critères, un premier

composé a été testé : l'acide polyacrylique avec une masse moléculaire moyenne de 4000 Da (proche de celle de l'A $\beta$ <sub>1-42</sub> à savoir 4531 Da). Cependant, ce composé n'a pas pu être solubilisé dans l'eau. Ceci fait qu'un critère supplémentaire a été ajouté : le composé doit avoir une grande solubilité dans l'eau. Ainsi, un autre polymère a été testé : le polyvinylsulfonate avec une masse moléculaire moyenne de 4000 Da. Ce composé est bien soluble dans l'eau mais l'inconvénient est que son pic était trop proche du pic négatif de l'eau correspondant à la mobilité électroosmotique. Ce pic est donc impossible à intégrer rendant l'utilisation du PVS comme étalon interne impossible. La dernière piste envisagée et qui sera potentiellement testée par la suite est l'utilisation d'un fragment d'acide désoxyribonucléique (ADN) qui remplirait tous les critères énoncés.

## Conclusion

---

Une méthode sans anticorps pour le dosage des peptides A $\beta$  a été mise en place. La méthode CE-LIF avec une pré-concentration par LVSEP de départ a été améliorée. En effet, la rédaction d'un protocole pour le traitement de solution de standards a permis non seulement d'identifier les étapes critiques mais aussi d'améliorer la répétabilité avec un coefficient de variation de 6% et d'avoir une procédure bien établie, relue et approuvée par les utilisateurs de la méthode.

Par ailleurs, une instrumentation basée sur une double détection UV-LIF a été mise en place. Celle-ci présente un intérêt majeur pour la suite du projet puisqu'elle permet simultanément la séparation des peptides A $\beta$  et la mesure de l'EOF. La double détection facilitera également la recherche d'un étalon interne.

D'autre part, les innovations majeures de ce projet correspondent à l'utilisation du tampon TRIS-CHES à des forces ioniques jamais atteintes auparavant et à la modulation de l'EOF avec ce tampon dans un capillaire en silice sans revêtement. Cela a permis d'obtenir un meilleur « stacking » des peptides A $\beta$  lors de la pré-concentration sans qu'un effet joule notable ne soit observé. En effet, même s'il ne s'agit que de résultats préliminaires, la pré-concentration dans les nouvelles conditions nous a permis d'obtenir une sensibilité supérieure à celle de la méthode initiale, après seulement un cycle de LVSEP.

Cependant, plusieurs axes d'optimisation restent à explorer. Il s'agit tout d'abord d'appliquer le protocole rédigé à un mélange de peptides A $\beta$  et à des échantillons réels de LCR afin d'évaluer les performances de la méthode vis-à-vis de ces peptides. Il s'agit également de trouver un étalon interne qui permettra de corriger la répétabilité moyenne de l'étape de traitement d'échantillon. Un dernier axe à explorer concerne la pré-concentration. En effet, d'autres fractions de remplissage du capillaire pourraient être testées et éventuellement l'utilisation de cycles supplémentaires de LVSEP.

Ainsi, à l'heure actuelle, la nouvelle méthode mise en place n'est pas encore transférable pour une utilisation en routine mais des avancées majeures ont été faites dans ce sens.

## Références bibliographiques

---

1. **Définition et chiffres de la maladie d'Alzheimer [Internet]**. Fondation pour la Recherche sur Alzheimer. [cité 26 oct 2020]. Disponible sur: <https://alzheimer-recherche.org/la-maladie-alzheimer/quest-maladie-dalzheimer/definition-et-chiffres/>
2. De-Paula VJ, Radanovic M, Diniz BS, Forlenza OV. **Alzheimer's disease. Subcell Biochem.** 2012;65:329-52.
3. Denver P, McClean PL. Distinguishing normal brain aging from the development of Alzheimer's disease: inflammation, insulin signaling and cognition. **Neural Regen Res.** oct 2018;13(10):1719-30.
4. Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. **EMBO Molecular Medicine.** 1 juin 2016;8(6):595-608.
5. Lu Q, Wood J. Functional studies of Alzheimer's disease tau protein. **The Journal of Neuroscience.** 1 févr 1993;13(2):508-15.
6. Johnson GVW. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. **Journal of Cell Science.** 15 nov 2004;117(24):5721-9.
7. Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. **Neurology.** mars 1992;42(3 Pt 1):631-9.
8. Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. **Nat Rev Neurosci.** juin 2015;16(6):358-72.
9. Shankar GM, Walsh DM. Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and A $\beta$ . **Mol Neurodegeneration.** 23 nov 2009;4(1):48.
10. Robinson JL, Molina-Porcel L, Corrada MM, Raible K, Lee EB, Lee VM-Y, et al. **Perforant path synaptic loss correlates with cognitive impairment and Alzheimer's disease in the oldest-old. Brain.** 1 sept 2014;137(9):2578-87.
11. **2020 Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimers Dement.** 10 mars 2020;
12. **2019 Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's & Dementia.** 2019;15(3):321-87.
13. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Cummings JL, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, et al. **Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. Lancet Neurol.** nov 2010;9(11):1118-27.
14. OMS | La démence: priorité de santé publique [Internet]. WHO. World Health Organization; [cité 29 oct 2020]. Disponible sur: [http://www.who.int/mental\\_health/neurology/dementia/fr/](http://www.who.int/mental_health/neurology/dementia/fr/)

15. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 10 avr 1992;256(5054):184-6.
16. Karran E, Mercken M, Strooper BD. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*. sept 2011;10(9):698-712.
17. Reitz C. Alzheimer's Disease and the Amyloid Cascade Hypothesis: A Critical Review. *International Journal of Alzheimer's Disease*. 2012;2012:1-11.
18. Mi K, Johnson GVW. The Role of Tau Phosphorylation in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*. 1 déc 2006;3(5):449-63.
19. Heneka MT, Carson MJ, Khoury JE, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*. 1 avr 2015;14(4):388-405.
20. Chen W-W, Zhang X, Huang W-J. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Molecular Medicine Reports*. 1 avr 2016;13(4):3391-6.
21. Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*. 19 août 2016;353(6301):777-83.
22. Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Szternfeld R, Ulland TK, et al. A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell*. 15 juin 2017;169(7):1276-1290.e17.
23. Forner S, Baglietto-Vargas D, Martini AC, Trujillo-Estrada L, LaFerla FM. Synaptic Impairment in Alzheimer's Disease: A Dysregulated Symphony. *Trends in Neurosciences*. 1 juin 2017;40(6):347-57.
24. Zhang H, Ma Q, Zhang Y, Xu H. Proteolytic processing of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid precursor protein. *Journal of Neurochemistry*. 2012;120(s1):9-21.
25. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *PNAS*. 1 juin 1985;82(12):4245-9.
26. Sandbrink R, Masters CL, Beyreuther K. Beta A4-amyloid protein precursor mRNA isoforms without exon 15 are ubiquitously expressed in rat tissues including brain, but not in neurons. *J Biol Chem*. 14 janv 1994;269(2):1510-7.
27. Cole SL, Vassar R. The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. *Mol Neurodegener*. 15 nov 2007;2:22.
28. Rhein V, Eckert A. Effects of Alzheimer's amyloid-beta and tau protein on mitochondrial function -- role of glucose metabolism and insulin signalling. *Arch Physiol Biochem*. juin 2007;113(3):131-41.

29. Canevari L, Clark JB, Bates TE. beta-Amyloid fragment 25-35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria. *FEBS Lett.* 20 août 1999;457(1):131-4.
30. Swerdlow RH, Kish SJ. Mitochondria in Alzheimer's disease. *Int Rev Neurobiol.* 2002;53:341-85.
31. Keil U, Bonert A, Marques CA, Scherping I, Weyermann J, Strosznajder JB, et al. Amyloid  $\beta$ -induced Changes in Nitric Oxide Production and Mitochondrial Activity Lead to Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry.* 26 nov 2004;279(48):50310-20.
32. De Strooper B, Karran E. The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell.* 11 févr 2016;164(4):603-15.
33. Olabarria M, Noristani HN, Verkhratsky A, Rodríguez JJ. Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Glia.* mai 2010;58(7):831-8.
34. Kulijewicz-Nawrot M, Verkhratsky A, Chvátal A, Syková E, Rodríguez JJ. Astrocytic cytoskeletal atrophy in the medial prefrontal cortex of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Anat.* sept 2012;221(3):252-62.
35. Yeh C-Y, Vadhvana B, Verkhratsky A, Rodríguez JJ. Early astrocytic atrophy in the entorhinal cortex of a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *ASN Neuro.* 19 déc 2011;3(5):271-9.
36. Rodrigues EM, Scudder SL, Goo MS, Patrick GN. A $\beta$ -Induced Synaptic Alterations Require the E3 Ubiquitin Ligase Nedd4-1. *J Neurosci.* 3 févr 2016;36(5):1590-5.
37. Reinders NR, Pao Y, Renner MC, da Silva-Matos CM, Lodder TR, Malinow R, et al. Amyloid- $\beta$  effects on synapses and memory require AMPA receptor subunit GluA3. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 18 oct 2016;113(42):E6526-34.
38. Jang S-S, Chung HJ. Emerging Link between Alzheimer's Disease and Homeostatic Synaptic Plasticity. *Neural Plast.* 2016;2016:7969272.
39. Megill A, Tran T, Eldred K, Lee NJ, Wong PC, Hoe H-S, et al. Defective Age-Dependent Metaplasticity in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci.* 12 août 2015;35(32):11346-57.
40. Zempel H, Mandelkow E. Lost after translation: missorting of Tau protein and consequences for Alzheimer disease. *Trends in Neurosciences.* 1 déc 2014;37(12):721-32.
41. Usardi A, Pooler AM, Seereeram A, Reynolds CH, Derkinderen P, Anderton B, et al. Tyrosine phosphorylation of tau regulates its interactions with Fyn SH2 domains, but not SH3 domains, altering the cellular localization of tau. *The FEBS Journal.* 2011;278(16):2927-37.
42. Liao D, Miller EC, Teravskis PJ. Tau acts as a mediator for Alzheimer's disease-related synaptic deficits. *European Journal of Neuroscience.* 2014;39(7):1202-13.

43. Moreno H, Morfini G, Buitrago L, Ujlaki G, Choi S, Yu E, et al. **Tau pathology-mediated presynaptic dysfunction.** *Neuroscience.* 14 juin 2016;325:30-8.
44. Reitsma JB, Glas AS, Rutjes AWS, Scholten RJPM, Bossuyt PM, Zwinderman AH. **Bivariate analysis of sensitivity and specificity produces informative summary measures in diagnostic reviews.** *J Clin Epidemiol.* oct 2005;58(10):982-90.
45. Rabin LA, Paré N, Saykin AJ, Brown MJ, Wishart HA, Flashman LA, et al. **Differential memory test sensitivity for diagnosing amnesic mild cognitive impairment and predicting conversion to Alzheimer's disease.** *Neuropsychol Dev Cogn B Aging Neuropsychol Cogn.* mai 2009;16(3):357-76.
46. Winblad B, Amouyel P, Andrieu S, Ballard C, Brayne C, Brodaty H, et al. **Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society.** *Lancet Neurol.* avr 2016;15(5):455-532.
47. **Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state": A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician.** *Journal of Psychiatric Research.* 1 nov 1975;12(3):189-98.
48. **Arevalo-Rodriguez I, Smailagic N, Roqué i Figuls M, Ciapponi A, Sanchez-Perez E, Giannakou A, et al. Mini-Mental State Examination (MMSE) for the detection of Alzheimer's disease and other dementias in people with mild cognitive impairment (MCI).** *Cochrane Database Syst Rev [Internet].* 5 mars 2015 [cité 29 oct 2020];2015(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6464748/>
49. Kueper JK, Speechley M, Montero-Odasso M. **The Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive Subscale (ADAS-Cog): Modifications and Responsiveness in Pre-Dementia Populations. A Narrative Review.** *J Alzheimers Dis.* 2018;63(2):423-44.
50. Wessels AM, Dowsett SA, Sims JR. **Detecting Treatment Group Differences in Alzheimer's Disease Clinical Trials: A Comparison of Alzheimer's Disease Assessment Scale - Cognitive Subscale (ADAS-Cog) and the Clinical Dementia Rating - Sum of Boxes (CDR-SB).** *J Prev Alzheimers Dis.* 2018;5(1):15-20.
51. **Braskie MN, Thompson PM. A focus on structural brain imaging in the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative.** *Biol Psychiatry.* 1 avr 2014;75(7):527-33.
52. Nho K, Risacher SL, Crane PK, DeCarli C, Glymour MM, Habeck C, et al. **Voxel and Surface-Based Topography of Memory and Executive Deficits in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease.** *Brain Imaging Behav.* déc 2012;6(4):551-67.
53. Stonnington CM, Chu C, Klöppel S, Jack CR, Ashburner J, Frackowiak RSJ. **Predicting Clinical Scores from Magnetic Resonance Scans in Alzheimer's Disease.** *Neuroimage.* 15 juill 2010;51(4):1405-13.
54. Evans MC, Barnes J, Nielsen C, Kim LG, Clegg SL, Blair M, et al. **Volume changes in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: cognitive associations.** *Eur Radiol.* 1 mars 2010;20(3):674-82.

55. Lehmann M, Koedam EL, Barnes J, Bartlett JW, Barkhof F, Wattjes MP, et al. Visual ratings of atrophy in MCI: prediction of conversion and relationship with CSF biomarkers. *Neurobiol Aging*. janv 2013;**34(1):73-82**.
56. Eskildsen SF, Coupé P, García-Lorenzo D, Fonov V, Pruessner JC, Collins DL. **Prediction of Alzheimer's disease in subjects with mild cognitive impairment from the ADNI cohort using patterns of cortical thinning.** *Neuroimage*. 15 janv 2013;**65:511-21**.
57. Nordberg A, Rinne JO, Kadir A, Långström B. The use of PET in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*. févr 2010;**6(2):78-87**.
58. Jagust WJ, Bandy D, Chen K, Foster NL, Landau SM, Mathis CA, et al. The ADNI PET Core. *Alzheimers Dement*. mai 2010;**6(3):221-9**.
59. Mosconi L, Mistur R, Switalski R, Tsui WH, Glodzik L, Li Y, et al. FDG-PET changes in brain glucose metabolism from normal cognition to pathologically verified Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. mai 2009;**36(5):811-22**.
60. Mosconi L. Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease. FDG-PET studies in MCI and AD. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. avr 2005;**32(4):486-510**.
61. Jagust W. Mapping Brain  $\beta$ -Amyloid. *Curr Opin Neurol*. août 2009;**22(4):356-61**.
62. Forsberg A, Almkvist O, Engler H, Wall A, Langstrom B, Nordberg A. High PIB Retention in Alzheimer's Disease is an Early Event with Complex Relationship with CSF Biomarkers and Functional Parameters. *Current Alzheimer Research*. 1 févr 2010;**7(1):56-66**.
63. Selkoe DJ. Defining molecular targets to prevent Alzheimer disease. *Arch Neurol*. févr 2005;**62(2):192-5**.
64. Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. mai 2011;**7(3):270-9**.
65. Buerger K, Ewers M, Pirttilä T, Zinkowski R, Alafuzoff I, Teipel SJ, et al. CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain*. nov 2006;**129(Pt 11):3035-41**.
66. Buerger K, Otto M, Teipel SJ, Zinkowski R, Blennow K, DeBernardis J, et al. Dissociation between CSF total tau and tau protein phosphorylated at threonine 231 in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Aging*. janv 2006;**27(1):10-5**.
67. Jellinger KA, Janetzky B, Attems J, Kienzl E. Biomarkers for early diagnosis of Alzheimer disease: 'ALzheimer ASSociated gene'– a new blood biomarker? *J Cell Mol Med*. août 2008;**12(4):1094-117**.

68. Fagan AM, Mintun MA, Mach RH, Lee S-Y, Dence CS, Shah AR, et al. Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans. *Ann Neurol.* mars 2006;59(3):512-9.
69. Jansen WJ, Ossenkoppele R, Knol DL, Tijms BM, Scheltens P, Verhey FRJ, et al. Prevalence of cerebral amyloid pathology in persons without dementia: a meta-analysis. *JAMA.* 19 mai 2015;313(19):1924-38.
70. Verpillot R, Otto M, Klafki H, Taverna M. Simultaneous analysis by capillary electrophoresis of five amyloid peptides as potential biomarkers of Alzheimer's disease. *Journal of Chromatography A.* 19 déc 2008;1214(1):157-64.
71. Mangialasche F, Solomon A, Winblad B, Mecocci P, Kivipelto M. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *The Lancet Neurology.* juill 2010;9(7):702-16.
72. McGleenon BM, Dynan KB, Pasmore AP. Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Br J Clin Pharmacol.* oct 1999;48(4):471-80.
73. Herrmann N, Chau SA, Kircanski I, Lanctôt KL. Current and Emerging Drug Treatment Options for Alzheimer's Disease. *Drugs.* 1 oct 2011;71(15):2031-65.
74. Perry EK, Tomlinson BE, Blessed G, Bergmann K, Gibson PH, Perry RH. Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *Br Med J.* 25 nov 1978;2(6150):1457-9.
75. Sims NR, Bowen DM, Allen SJ, Smith CCT, Neary D, Thomas DJ, et al. Presynaptic Cholinergic Dysfunction in Patients with Dementia. *Journal of Neurochemistry.* 1 févr 1983;40(2):503-9.
76. Holzgrabe U, Kapková P, Alptüzün V, Scheiber J, Kugelmann E. Targeting acetylcholinesterase to treat neurodegeneration. *null.* 1 févr 2007;11(2):161-79.
77. Robinson DM, Keating GM. Memantine. *Drugs.* 1 août 2006;66(11):1515-34.
78. Kemp JA, McKernan RM. NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat Neurosci.* nov 2002;5(11):1039-42.
79. Reisberg B, Doody R, Stöffler A, Schmitt F, Ferris S, Möbius HJ. Memantine in Moderate-to-Severe Alzheimer's Disease. *N Engl J Med.* 3 avr 2003;348(14):1333-41.
80. Rogawski MA, Wenk GL. The Neuropharmacological Basis for the Use of Memantine in the Treatment of Alzheimer's Disease. *CNS Drug Reviews.* 1 sept 2003;9(3):275-308.
81. Scheltens P, Blennow K, Breteler MMB, de Strooper B, Frisoni GB, Salloway S, et al. Alzheimer's disease. *Lancet.* 30 juill 2016;388(10043):505-17.
82. ARICEPT, EBIXA, EXELON et REMINYL: Agnès Buzyn annonce leur déremboursement, premières réactions [Internet]. VIDAL. [cité 30 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/>

83. Doody RS, Raman R, Farlow M, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, et al. A Phase 3 **Trial of Semagacestat for Treatment of Alzheimer's Disease**. *N Engl J Med*. 24 juill 2013;369(4):341-50.
84. Doody RS, Thomas RG, Farlow M, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, et al. Phase 3 Trials of Solanezumab for Mild-to-Moderate **Alzheimer's Disease**. *N Engl J Med*. 22 janv 2014;370(4):311-21.
85. Salloway S, Sperling R, Fox NC, Blennow K, Klunk W, Raskind M, et al. Two Phase 3 Trials of Bapineuzumab in Mild-to-Moderate **Alzheimer's Disease**. *N Engl J Med*. 22 janv 2014;370(4):322-33.
86. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*. 1 oct 2015;72:4-15.
87. Van Weemen B k., Schuurs A h. w. m. Immunoassay using antigen—enzyme conjugates. *FEBS Letters*. 24 juin 1971;15(3):232-6.
88. Hornbeck P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Current Protocols in Immunology*. 1992;1(1):2.1.1-2.1.22.
89. Lindström P, Wager O. IgG Autoantibody to Human Serum Albumin Studied by the ELISA-Technique. *Scandinavian Journal of Immunology*. 1 mai 1978;7(5):419-25.
90. Koenig R. Indirect ELISA Methods for the Broad Specificity Detection of Plant **Viruses**. *Journal of General Virology*,. 1981;55(1):53-62.
91. Yorde DE, Sasse EA, Wang TY, Husa RO, Garancis JC. Competitive enzyme-linked immunoassay with use of soluble enzyme/antibody immune complexes for labeling. I. Measurement of human choriogonadotropin. *Clinical Chemistry*. 1 août 1976;22(8):1372-7.
92. Kolosova AY, Shim W-B, Yang Z-Y, Eremin SA, Chung D-H. Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B1. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples. *Anal Bioanal Chem*. 1 janv 2006;384(1):286-94.
93. Zhao M-P, Li Y-Z, Guo Z-Q, Zhang X-X, Chang W-B. A new competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of estrogenic bisphenols. *Talanta*. 19 juill 2002;57(6):1205-10.
94. Yamazaki Y, Imura A, Urakawa I, Shimada T, Murakami J, Aono Y, et al. Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 30 juill 2010;398(3):513-8.
95. Katsurada A, Hagiwara Y, Miyashita K, Satou R, Miyata K, Ohashi N, et al. Novel sandwich ELISA for human angiotensinogen. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 1 sept 2007;293(3):F956-60.

96. Ueda H, Tsumoto K, Kubota K, Suzuki E, Nagamune T, Nishimura H, et al. Open sandwich ELISA: A novel immunoassay based on the interchain interaction of **antibody variable region**. *Nat Biotechnol.* **déc 1996;14(13):1714-8.**
97. Janelidze S, Zetterberg H, Mattsson N, Palmqvist S, Vanderstichele H, Lindberg O, et al. CSF A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42/A $\beta$ 38 ratios: better diagnostic markers of Alzheimer disease. *Annals of Clinical and Translational Neurology.* 1 mars **2016;3(3):154-65.**
98. Klafki H-W, Hafermann H, Bauer C, Haussmann U, Kraus I, Schuchhardt J, et al. Validation of a Commercial Chemiluminescence Immunoassay for the Simultaneous Measurement of Three Different Amyloid- $\beta$  Peptides in Human Cerebrospinal Fluid and Application to a Clinical Cohort. *J Alzheimers Dis.* 6 sept **2016;54(2):691-705.**
99. Song L, Lachno DR, Hanlon D, Shepro A, Jeromin A, Gemani D, et al. A digital enzyme-linked immunosorbent assay for ultrasensitive measurement of amyloid- $\beta$  1–42 peptide in human plasma with utility for studies of Alzheimer’s disease therapeutics. *Alz Res Therapy.* 15 déc 2016;8(1):58.
100. Chiasserini D, Biscetti L, Farotti L, Eusebi P, Salvadori N, Lisetti V, et al. **Performance Evaluation of an Automated ELISA System for Alzheimer’s Disease Detection in Clinical Routine.** *J Alzheimers Dis.* 22 juill **2016;54(1):55-67.**
101. INNOTEST\_Alzheimer\_brochure\_2.pdf [Internet]. [cité 6 avr 2021]. Disponible sur: [https://www.fujirebio.com/sites/default/files/2019-09/INNOTEST\\_Alzheimer\\_brochure\\_2.pdf](https://www.fujirebio.com/sites/default/files/2019-09/INNOTEST_Alzheimer_brochure_2.pdf)
102. Lista S, Zetterberg H, Dubois B, Blennow K, Hampel H. Cerebrospinal fluid **analysis in Alzheimer’s disease: technical issues and future developments.** *J Neurol.* 1 juin **2014;261(6):1234-43.**
103. Simoa\_Ab42\_Data\_Sheet\_HD-1\_HD-X.pdf [Internet]. [cité 6 avr 2021]. Disponible sur: [https://www.quantex.com/wp-content/uploads/2020/12/Simoa\\_Ab42\\_Data\\_Sheet\\_HD-1\\_HD-X.pdf](https://www.quantex.com/wp-content/uploads/2020/12/Simoa_Ab42_Data_Sheet_HD-1_HD-X.pdf)
104. abeta peptide panel -1.pdf [Internet]. [cité 6 avr 2021]. Disponible sur: <https://www.mesoscale.com/~ /media/files/product%20inserts/abeta%20peptide%20panel%20-1.pdf>
105. Mattsson N, Andreasson U, Persson S, Carrillo MC, Collins S, Chalbot S, et al. **CSF biomarker variability in the Alzheimer’s Association quality control program.** *Alzheimer’s & Dementia.* **2013;9(3):251-61.**
106. Bastard NL, Deyn PDD, Engelborghs S. Importance and impact of preanalytical variables on Alzheimer disease biomarker concentrations in cerebrospinal fluid. *Clinical chemistry.* 2015;
107. Bouchoux G, Sablier M. Spectrométrie de masse - Principe et appareillage. 2005;35.

108. Grasso G. Mass spectrometry is a multifaceted weapon to be used in the battle against Alzheimer's disease: Amyloid beta peptides and beyond. *Mass Spectrometry Reviews*. 2019;38(1):34-48.
109. Lame ME, Chambers EE, Blatnik M. Quantitation of amyloid beta peptides A $\beta$ 1–38, A $\beta$ 1–40, and A $\beta$ 1–42 in human cerebrospinal fluid by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*. 15 déc 2011;419(2):133-9.
110. Crosnier de Lassichère C, Duc Mai T, Taverna M. Antibody-free detection of amyloid beta peptides biomarkers in cerebrospinal fluid using capillary isotachopheresis coupled with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 13 sept 2019;1601:350-6.
111. Nakamura A, Kaneko N, Villemagne VL, Kato T, Doecke J, Doré V, et al. High performance plasma amyloid- $\beta$  biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature*. 1 févr 2018;554(7691):249-54.
112. Poole CF. Chapter 12 Principles and practice of solid-phase extraction. In: *Comprehensive Analytical Chemistry* [Internet]. Elsevier; 2002 [cité 10 oct 2021]. p. 341-87. (Sampling and Sample Preparation for Field and Laboratory; vol. 37). Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166526X02800496>
113. Poole CF. New trends in solid-phase extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1 juin 2003;22(6):362-73.
114. Bonifacino JS, Dell'Angelica EC, Springer TA. Immunoprecipitation. *Current Protocols in Molecular Biology*. 1999;48(1):10.16.1-10.16.29.
115. Taverna M, Potier IL, Morin P. Électrophorèse capillaire - Applications. 2003;18.
116. Taverna M, Potier IL, Morin P. Électrophorèse capillaire - Principe. 2003;15.
117. Delaunay N. Électrophorèse capillaire - Principes. 2019;25.
118. Wang W, Zhou F, Zhao L, Zhang J-R, Zhu J-J. Measurement of electroosmotic flow in capillary and microchip electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2 nov 2007;1170(1):1-8.
119. Williams BA, Vigh G. Determination of Accurate Electroosmotic Mobility and Analyte Effective Mobility Values in the Presence of Charged Interacting Agents in Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry*. nov 1997;69(21):4445-51.
120. Verpillot R, Esselmann H, Mohamadi MR, Klafki H, Poirier F, Lehnert S, et al. Analysis of Amyloid- $\beta$  Peptides in Cerebrospinal Fluid Samples by Capillary Electrophoresis Coupled with LIF Detection. *Analytical Chemistry*. mars 2011;83(5):1696-703.
121. Gebauer P, Boček P. Recent progress in capillary isotachopheresis. *ELECTROPHORESIS*. 2002;23(22-23):3858-64.

122. Holloway CJ, Trautschold I. Principles of isotachopheresis. *Z Anal Chem.* 1 janv **1982;311(2):81-93.**
123. Crosnier de Lassichère C, Mai TD, Otto M, Taverna M. Online Preconcentration in Capillaries by Multiple Large-Volume Sample Stacking: An Alternative to Immunoassays for Quantification of Amyloid Beta Peptides Biomarkers in Cerebrospinal Fluid. *Anal Chem.* 20 févr 2018;**90(4):2555-63.**
124. Corradini D, Spreccacenero L. Dependence of the Electroosmotic Flow in Bare Fused-Silica Capillaries from pH, Ionic Strength and Composition of Electrolyte Solutions Tailored for Protein Capillary Zone Electrophoresis. *Chromatographia.* 1 nov 2003;**58(9):587-96.**
125. Morani M, Taverna M, Mai TD. A fresh look into background electrolyte selection for capillary electrophoresis-laser induced fluorescence of peptides and proteins. *ELECTROPHORESIS.* 2019;**40(18-19):2618-24.**
126. Pica-Mendez AM, Tanen M, Dallob A, Tanaka W, Laterza OF. Nonspecific binding of A $\beta$ 42 to polypropylene tubes and the effect of Tween-20. *Clin Chim Acta.* 11 nov 2010;**411(21-22):1833.**

## Résumé en français

---

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative entraînant la perte progressive des fonctions cognitives. La physiopathologie de cette maladie consiste en la convergence de plusieurs facteurs, à savoir, le dépôt de plaques amyloïdes dans le cerveau, la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires, la neuroinflammation et la perte synaptique. Actuellement, le diagnostic de la maladie d'Alzheimer est principalement fondé sur l'apparition des signes cliniques. Ces derniers étant irréversibles, le diagnostic est trop tardif pour pouvoir envisager une approche thérapeutique efficace. Pour remédier à cela, des méthodes de diagnostic précoce sont établies. Il s'agit tout d'abord de l'imagerie cérébrale, que ce soit l'imagerie par résonance magnétique ou la tomographie par émission de positons. Une autre méthode de diagnostic précoce envisagée correspond à la quantification de biomarqueurs spécifiques de la maladie d'Alzheimer dans le liquide céphalorachidien. Les biomarqueurs cérébrospinaux validés sont les différents peptides  $\beta$ -amyloïdes et la protéine tau. La technique de référence pour la quantification des peptides  $\beta$ -amyloïdes est l'ELISA (« Enzyme-linked immunosorbent assay »). Cependant, cette technique présente plusieurs inconvénients tels que son manque de reproductibilité et son coût très élevé. Dans la présente thèse, une méthode de dosage « sans anticorps », basée sur une pré-concentration électrocinétique suivie d'une séparation en électrophorèse capillaire de zone, est proposée.

---

## Titre et résumé en Anglais

---

Novel “antibody-free” analytical approach for the quantification of amyloid peptides:  
toward the improvement of the molecular diagnosis of Alzheimer’s disease

Alzheimer’s disease is a neurodegenerative disease causing a progressive loss of the cognitive functions. The pathophysiology of this illness consists in four converging parameters, namely, amyloid plaque deposition in the brain, neurofibrillary tangles, neuroinflammation and synaptic loss. Currently, Alzheimer’s disease diagnosis is mainly based on clinical symptom appearance. The latter being irreversible, diagnosis is posed too late to consider an efficient therapeutic approach. In order to improve that, early diagnosis methods are established. They consist first in cerebral imaging, specifically, magnetic resonance imaging and positron emission tomography. Another way of early diagnosis corresponds to the quantification of Alzheimer’s disease specific biomarkers in cerebrospinal fluid. Validated cerebrospinal biomarkers are  $\beta$ -amyloid peptides and tau protein. Currently, gold standard technique for  $\beta$ -amyloid peptides quantification is enzyme-linked immunosorbent assay. Nevertheless, this technique has many drawbacks such as its lack of reproducibility and its high cost. In the present work, a novel “antibody-free” method based on an electrokinetic preconcentration followed by a separation in capillary zone electrophoresis, is proposed.

---

DISCIPLINE administrative : Chimie analytique

---

## MOTS-CLES

---

Maladie d'Alzheimer, Diagnostic, Biomarqueurs, Peptides amyloïdes, Electrophorèse capillaire.

---

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :  
Institut Galien Paris Saclay UMR CNRS 8612  
5 rue Jean-Baptiste Clément  
92290 Châtenay-Malabry

Directeur de thèse (Nom et Prénom) : Cécile ARELLANO