

Les marqueurs biologiques protéiques du liquide céphalorachidien : caractéristiques et implications cliniques dans les démences

Audrey Gabelle, S. Roche, Sylvain Lehmann

▶ **To cite this version:**

Audrey Gabelle, S. Roche, Sylvain Lehmann. Les marqueurs biologiques protéiques du liquide céphalorachidien : caractéristiques et implications cliniques dans les démences. Revue Neurologique, 2009, 165 (3), pp.213-222. 10.1016/j.neurol.2008.05.004 . hal-00409885

HAL Id: hal-00409885
https://hal.science/hal-00409885

Submitted on 18 Dec 2017

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

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

Revue générale

Les marqueurs biologiques protéiques du liquide céphalorachidien : caractéristiques et implications cliniques dans les démences

CSF biomarkers: Proteomics investigations and clinical applications in neurodegenerative disorders

A. Gabelle [a,b,*,1], *S. Roche* [a,c,1], *S. Lehmann* [a,c]

[a] *CNRS UPR 1142 « Stem cells and neurodegenerative diseases », institut de génétique humaine, Montpellier, France*
[b] *Unité neurocomportementale, service de neurologie, centre hospitalier universitaire Gui-de-Chauliac, 80, avenue Augustin-Fliche, 34295 Montpellier cedex 5, France*
[c] *Laboratoire de biochimie, centre hospitalier universitaire Saint-Éloi, Montpellier, France*

INFO ARTICLE

Historique de l'article :
Reçu le 7 janvier 2008
Reçu sous la forme révisée le 7 mars 2008
Accepté le 22 mai 2008
Disponible sur Internet le 7 juillet 2008

Mots clés :
Biomarqueurs
LCR
Protéomique
Démences
Prions

Keywords:
CSF biomarkers
Proteomics
Dementia
Prions

RÉSUMÉ

L'exactitude du diagnostic dans le champ des affections neurodégénératives, en particulier à un stade précoce des démences, devient une exigence pour la prise en charge des patients et l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les critères révisés du National Institute of Neurological Disorders and Stroke et du Alzheimer Disease and Related Disorders (NINCDS–ADRDA) pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer proposent dorénavant d'inclure des critères d'imagerie cérébrale et de dosage des marqueurs biologiques dans le LCR. L'analyse des marqueurs biologiques dans le LCR par des approches issues de la protéomique semble, en effet, des plus prometteuses. L'intérêt biologique de l'utilisation du LCR réside dans ses caractéristiques anatomiques et physiopathologiques. L'utilisation de la protéomique comme outil de choix semble se confirmer dans ce champ d'investigation. Nous détaillerons dans cette revue les principaux marqueurs biologiques mis en évidence par cette technique dans les affections neurodégénératives, en particulier, dans la maladie d'Alzheimer.

ABSTRACT

Given the current developments of therapeutic strategies in the field of neurodegenerative disorders, exact diagnosis, especially at an early stage, is becoming increasingly crucial for optimal patient care. Importantly, the new diagnosis criteria of dementia include functional imagery as well as CSF biomarkers. Proteomics investigations of these CSF biomarkers have produced quite promising results. The interest of CSF analysis resides in the anatomical and

* *Auteur correspondant.*
Adresse e-mail : a-gabelle@chu-montpellier.fr (A. Gabelle).
[1] Coauteurs.

pathophysiological characteristics of this fluid. In this article, we will review current proteomics investigations of CSF which have led to the discovery and validation of biomarkers, mainly in the field of neurodegenerative disorders in Alzheimer's disease.

1. Introduction

Une nouvelle ère diagnostique et pronostique des affections neurodégénératives s'ouvre au clinicien de part le développement et la caractérisation d'un champs d'investigation des plus prometteurs, les biomarqueurs. Ces biomarqueurs font référence à la fois aux marqueurs biologiques présents dans les fluides biologiques (plasma, urine, liquide céphalorachidien [LCR]) et aux marqueurs d'imagerie cérébrale morphologique et fonctionnelle. Parmi les avancées dans ce domaine, la détection des marqueurs biologiques dans le LCR par des techniques de protéomique tend à occuper une place de plus en plus importante. Les caractéristiques anatomiques et biologiques du LCR expliquent l'intérêt croissant pour ce liquide biologique. Pour caractériser et suivre les modifications de composition du LCR, les outils de protéomique clinique sont des outils de choix. Dans les affections neurodégénératives, de nombreux marqueurs ont été proposés. Toutefois, la majorité de ces marqueurs biologiques restent issus d'études incluant un petit nombre de patients et ne sont, de ce fait, pas encore validés, ni disponibles, en pratique clinique de routine. Parmi ces candidats marqueurs, nous pouvons citer, sans être exhaustif, les molécules suivantes : ACE, α-1-antitrypsine, Apo-lipoprotéines, β-2-microglobuline, cathépsine D1, cystatine C, fibrinogène, GFAP, hémopexine, kininogène, S100-β, transthyrétine, ubiquitine... (Tableau 1) (Roche et al., 2008). De nombreuses études de marqueurs biologiques dans le LCR sont en cours dans différentes pathologies, telles que la maladie de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique ou la sclérose en plaques. Les données issues de ces recherches permettront d'optimiser nos connaissances diagnostiques, pronostiques, physiopathologiques et la prise en charge thérapeutique des patients. En effet, l'évaluation objective du diagnostic des affections neurodégénératives par des critères quantitatifs semble nécessaire pour adapter les stratégies de prise en charge clinique et thérapeutique. La plupart des efforts de recherche de nouveaux marqueurs biologiques concernent la maladie d'Alzheimer (MA). Ainsi, l'analyse conjointe des protéines Tau totale et sa forme phosphorylée phospho-Tau associée au peptide A-β1–42 dans le LCR permet dorénavant un diagnostic positif de MA. En se basant sur ces données, l'analyse de ces marqueurs biologiques a été proposée comme argument supplémentaire dans les critères révisés du diagnostic des démences du National Institute of Neurological Disorders and Stroke et du Alzheimer Disease and Related Disorders (NINCDS–ADRDA) (Dubois et al., 2007). Ces trois biomarqueurs semblent également intéressants chez les patients à un stade prédémentiel et pour discriminer le diagnostic de MA de ces diagnostics différentiels. Ces dosages tendent donc à se généraliser en pratique clinique hospitalière dans les centres experts des pathologies neurodégénératives.

Dans cette revue, nous décrirons successivement les caractéristiques biologiques du LCR, les méthodes protéomiques de mise en évidence des marqueurs biologiques, les caractéristiques de ces marqueurs dans les dé
applications.

2. LCR et protéomique

2.1. *Caractéristiques anatomiques et physiologiques du LCR*

Le LCR est produit dans le système nerveux central (SNC) par deux mécanismes, la sécrétion constante par les plexus choroïdes des constituants du LCR issus du sang (Spector et Johanson, 1989) et le drainage du liquide interstitiel du parenchyme cérébral vers les structures ventriculaires et sous-arachnoïdiennes. De façon concomitante, il existe une résorption constante du LCR via les granulations arachnoïdiennes situées au niveau des sinus longitudinaux supérieurs et de l'émergence radiculaire des nerfs spinaux. La composition du LCR varie en fait légèrement, en fonction du site de prélèvement (ventriculaire ou lombaire) selon un gradient rostrocaudal.

Le rôle du LCR est multiple. Il assure, d'une part, une protection mécanique du SNC contre les traumatismes, et d'autre part, une fonction métabolique par le transport de différents constituants (hormones...) et métabolites assurant l'homéostasie cellulaire du SNC. Le LCR non pathologique contient moins de cinq cellules mononuclées par millilitre et aucun globule rouge. La glycorachie correspond généralement aux deux tiers de la glycémie. Le taux de protéines dans le LCR est compris entre 20 et 40 mg pour 100 mL au niveau lombaire (Hemsley et Crook, 2001), soit environ 100 fois plus faible que dans le sang. Pour 80 % des protéines du LCR, l'origine est sanguine, et pour 20 %, elles sont directement issues du SNC (Banks et al., 2005). Une comparaison de la distribution des protéines majoritaires entre le LCR et le plasma est détaillée dans la Fig. 1. Certaines différences entre le LCR et le plasma sont minimes comme pour les immunoglobulines G (IgG), la transferrine et l'α-1-antitrypsine. Des variations plus importantes sont observées pour l'albumine, les immunoglobulines M (IgM) ou la préalbumine (transthyrétine). Quantitativement, ces protéines majoritaires représentent 90 % de la masse globale protéique du sérum mais seulement 80 % dans le LCR ; les autres protéines « minoritaires » représentant donc, respectivement, 10 et 20 % de la masse globale protéique. L'exclusion de ces protéines majoritaires est souvent nécessaire pour accéder, en protéomique clinique, à des protéines présentes en faible concentration (Huhmer et al., 2006 ; Ogata et al., 2005 ; Shores et Knapp, 2007).

Les arguments d'ordre technique (geste invasif, problème d'accessibilité), voire éthique, qui limiteraient la réalisation de

Tableau 1 – Biomarqueurs du LCR
CSF biomarkers

Dénomination	Méthode de détection	Pathologie	Références
14-3-3	2DE	MCJ	Green et al., 2001 ; Zerr et al., 1998, 1996
Anticorps anti-MBP*	Elisa	SEP	Lamers et al., 1995 ; Ohta et al., 2000
Anticorps anti-MOG	Elisa	SEP	Markovic et al., 2003 ; Xiao et al., 1991
ACE	Activité enzymatique	MA	He et al., 2006
Albumine	2DE	MA	Puchades et al., 2003
α-1-antitrypsine	2DE	MA	Puchades et al., 2003
α-2-HS glycoprotéine	2DE	MA	Puchades et al., 2003
Apo-A1	2DE	MA	Castano et al., 2006
Apo-E	2DE, Elisa	MA	Davidsson et al., 2002 ; Finehout et al., 2007 ; Puchades et al., 2003
Apo-J	2DE	MA	Puchades et al., 2003
Attractine	2DE	Néoplasies du SNC	Khwaja et al., 2006a
A-β*	Elisa	MA	Green et al., 2001 ; Sjogren et al., 2001 ; Zerr et al., 1998
BACE1	WB, activité enzymatique	MA	Zhong et al., 2007
β-2-microglobuline	2DE	MA	Davidsson et al., 2002
Anhydrase carbonique	SELDI–TOF©	Néoplasies du SNC	Khwaja et al., 2006b
Cathepsine D1	2DE	MA	Castano et al., 2006
Cytologie du LCR*	Cytologie	Néoplasies du SNC	
Cystatine C	SELDI–TOF©	MA, MCJ Néoplasie du SNC	Carrette et al., 2005 ; Carrette et al., 2003 ; Sanchez et al., 2004
Fibrinogène γ-A	2DE	MA	Lee et al., 2007
GAP	Elisa	AD	Sjogren et al., 2001 ; Sjogren et al., 2000
GFAP	–	AD	Fukuyama et al., 2001 ; Wallin et al., 1996
Hémopexine	2DE	MA	Castano et al., 2006
IgG (intrathécal)*	Electrophorèse	SEP	Thompson, 2005
Kininogène	2DE	MA	Merched et al., 1998
Pigment-derived epithelial factor	2DE	MA	Castano et al., 2006
Prolipoprotéine	2DE	MA	Davidsson et al., 2002
Retinol binding protein	2DE	MA	Davidsson et al., 2002
S100-β	Elisa	MA, MCJ	Peskind et al., 2001 ; Petzold et al., 2003 ; Sheng et al., 1996 ; Nooijen et al., 1997
Soluble Nogo-A	WB	SEP	Jurewicz et al., 2007
Tau*	Elisa	MA, MCJ	Dubois et al., 2007 ; Schoonenboom et al., 2004 ; Sjogren et al., 2001 ; Green et al., 2001
Tau (phospho-)*	Elisa	MA	Dubois et al., 2007 ; Schoonenboom et al., 2004 ; Sjogren et al., 2001
Transthyrétine	2DE, Elisa	MA	Davidsson et al., 2002 ; Merched et al., 1998 ; Puchades et al., 2003
Ubiquitine	2DE	MA	Davidsson et al., 2002
Transferrine	2DE	MA	Puchades et al., 2003
VGF polypeptide	SELDI–TOF©	MA	Carrette et al., 2003

La majorité des biomarqueurs du LCR ont été identifiés grâce aux études de protéomiques cliniques et/ou basée sur la recherche neuropathologique. Les méthodes de découverte et de détection incluent l'électrophorèse bidimensionnelle (2DE), l'*enzyme linked immunosorbent assay* (Elisa), le *western blot* (WB) ou la *surface enhanced laser desorption ionisation – time of flight* (SELDI–TOF©). Les pathologies sont la maladie d'Alzheimer (MA), la maladie de Creuztfeldt-Jakob (MCJ), la sclérose en plaques (SEP). Les biomarqueurs annotés d'un astérisque sont utilisés en pratique clinique. SNC : système nerveux central.
The majority of CSF biomarkers have been identified through clinical proteomics and/or research-based neuropathological investigations. The methods of discovery and detection include two-dimensional electrophoresis (2DE), "enzyme linked immunosorbent assay" (Elisa), western blot (WB) or "surface enhanced laser desorption ionization – time of flight" (SELDI–TOF©). The diseases are Alzheimer's disease (AD), Creuztfeldt-Jakob disease (CJD), multiple sclerosis (MS). The biomarkers marked with an asterisk are used in clinical practice. SNC: central nervous system.

la PL font encore l'objet de discussions. Cependant, les infections post-PL restent rares et le syndrome céphalalgique post-PL est peu fréquent (< 2 %) (Blennow et al., 1993), en particulier chez les patients âgés qui présentent une atrophie cérébrale secondaire aux troubles cognitifs. Les moyens actuels (aiguille orange souple, anesthésies cutanées et gaz anesthésiant de type Calinox®) limitent, pour les patients, l'appréhension du geste et de la douleur.

2.2. *Protéomique clinique*

L'objectif des études protéomiques est généralement l'identification de nouveaux marqueurs biologiques caractéristiques des pathologies sans orientation préalable, ni idée préconçue de leur identité. Le protéome est définit comme étant l'ensemble des protéines d'un fluide biologique, d'une cellule ou d'un tissu à un moment donné dans des conditions

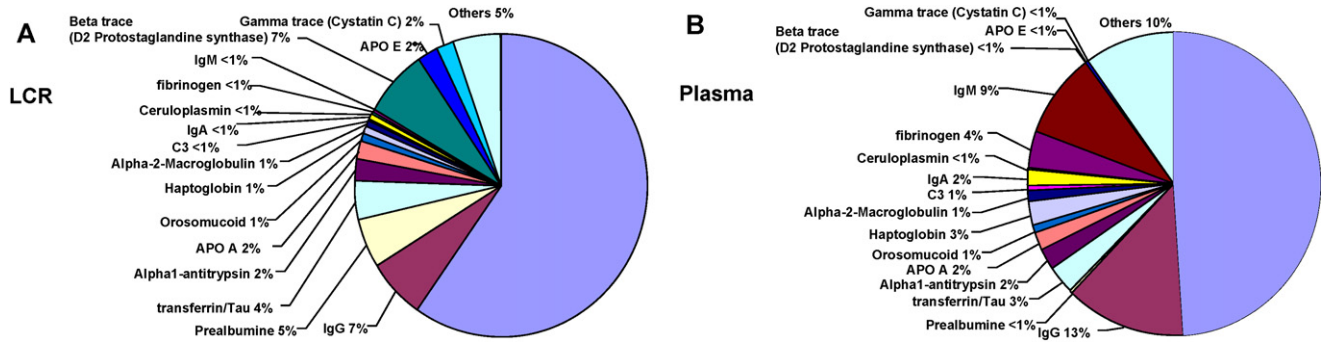


Fig. 1 – Comparaison de la distribution des protéines (A) du plasma et (B) du LCR. Les diagrammes circulaires représentent la distribution différentielle des protéines majoritaires dans le plasma et dans le LCR. Chaque secteur est proportionnel à la part représentative de la protéine indiquée dans la légende en fonction de la quantité de protéine totale dans le plasma ou le LCR. On peut observer que les IgM sont quasiment absentes du LCR et que la part des protéines de faible abondance est plus importante dans le LCR (17 %) que dans le sérum (10 %). On notera également que des protéines, telles que la *D2 protostaglandine synthase* ou l'Apo-E2, représentent une fraction non négligeable dans le LCR par rapport au plasma.
Comparison of protein distribution in plasma* (A) *and CSF* (B). *The pie charts represent the differential distribution of major plasma and CSF proteins. Each sector is proportional to the percentage of total protein represented in the plasma or the CSF by the protein specified in the legend. IgM are virtually absent from the CSF and the proportion of low abundant proteins is greater in the CSF (17%) than in serum (10%). Some proteins, such as D2 protostaglandine synthase or Apo-E2, correspond to a significant fraction in the CSF in comparison to plasma.

physiopathologiques définies. Ce protéome est intrinsèquement dynamique, du fait des modifications post-traductionnelles des protéines et de leur renouvellement continuel.

Parmi les approches protéomiques, l'électrophorèse bidimensionnelle (2D) est la technique historique de référence, permettant de séparer les protéines selon leur masse et leur pH isoélectrique. Bien adaptée aux protéines hydrophiles des fluides biologiques, cette technique présente, cependant, une faible gamme dynamique par rapport aux différences de concentration des protéines présentes dans le sang ou le LCR (de l'ordre de 10^{10}). Depuis plusieurs années, la gamme dynamique a été améliorée par des technologies multidimensionnelles de séparation des protéines. Elles utilisent un système de type chromatographie permettant un sous-fractionnement des protéines, associé à un système d'analyse (gels d'électrophorèse bidimensionnelle ou spectrométrie de masse) qui permet d'obtenir une masse très précise de la protéine et de l'identifier. Récemment, des systèmes protéomiques à haut débit, permettant la réalisation de profils protéiques (*profiling*) sur plusieurs centaines d'échantillons, ont été développés. Ils utilisent en particulier des chromatographies en surface (SELDI–TOF©) ou en billes (ClinProt©, Dynal©) suivies d'une analyse en spectrométrie de masse en temps de vol (*time of flight* : TOF). Des systèmes de moyen ou bas débit de type chromatographie liquide/spectrométrie de masse (LC–MS–MS) peuvent également être utilisés pour la détection et l'identification de peptides ou de protéines en faible concentration, mais sur un nombre plus faible de prélèvements (de l'ordre de la dizaine). Les techniques de puce à protéines ou d'Elisa multiplexe utilisant quelques dizaines de microlitres de LCR ou de plasma (Dupuy et al., 2005 ; Lehmann et al., 2007) permettent également des mesures multiples et combinées de plusieurs protéines, telle que l'analyse conjointe des protéines Tau, phospho-Tau et A-β.

2.3. *Analyse protéomique du LCR « normal »*

Par rapport au sérum ou au plasma, peu d'études ont été conduites pour déterminer la composition protéique normale du LCR. Bien que limitée par des considérations éthiques (prélèvements sur sujets sains) et techniques (faible volume des prélèvements), cette connaissance du protéome normal du LCR est essentielle pour la recherche de nouveaux marqueurs biologiques dans des situations pathologiques.

L'analyse des constituants du LCR « normal » retrouve une majorité de cellules issues du sang et du SNC. Toutefois, de façon minoritaire, certains peptides et protéines dérivent de cellules déjà présentes dans le LCR, tels que les médiateurs de l'immunité (macrophages, lymphocytes) ou les éléments pathogènes (bactéries). La fonction de nombreuses protéines d'origine sanguine reste inchangée dans le LCR (Thompson, 2005). Ainsi, on retrouve des protéines de transport spécifique ou non spécifique (transferrine, haptoglobine, hémoplexine ou albumine), d'enzymes (*prostaglandine D2 synthase*, α-2-macroglobuline, α-1-antitrypsine, céruloplasmine, lysozyme, énolase) et des protéines de la réponse immunitaire et de l'inflammation (IgG, protéines C3 et C4 du complément, *C-reactive protein*, *serum amyloid* A, orosomucoïde…). Des peptides et protéines provenant du SNC sont également présents dans le LCR, comme par exemple, la GFAP, la *myelin binding protein*, la protéine S100, les neuropeptides et neurotransmetteurs. Leur détection est particulièrement utile dans l'évaluation du statut physiopathologique cérébral. Du point de vue du protéome complet du LCR, les analyses protéomiques en 2D, et surtout en LC–MS–MS et autres technologies de pointe, ont permis de détecter plus de 3000 constituants peptidiques et protéiques différents comme l'Apo-E, la cystatine C, mais aussi l'IL-6, la neuromoduline, la GFAP, l'hypocrétine-1 ou la 14-3-3 (Pan et al., 2007 ; Ramstrom et al., 2004 ; Shores et Knapp, 2007 ; Roche et al., 2008).

3. Caractéristiques des marqueurs biologiques du LCR dans les démences

Trois principaux marqueurs biologiques ont été particulièrement étudiés dans le LCR : la protéine Tau totale, sa forme phosphorylée phospho-Tau et le peptide A-β. Témoins des deux lésions histopathologiques de la MA, leur validation est actée pour le diagnostic positif de la MA, et reste à définir pour les stades précoces de l'affection et dans les diagnostics différentiels.

3.1. *Dosage de la protéine Tau et de sa forme phosphorylée*

La protéine Tau est une protéine associée aux microtubules, favorisant leur assemblage et leur stabilisation. Suite à des épissages alternatifs de son ARN messager, sont générées six isoformes de 352 à 441 acides aminés en fonction de l'épissage des exons 2, 3 ou 10 et du nombre de répétition 3 ou 4 des *microtubule binding domains*. L'expression des différentes isoformes de Tau est variable selon les tissus et l'âge (formes embryonnaires). Le terme de Tau totale inclut l'ensemble des différentes isoformes de la protéine Tau. La fonction de Tau est essentielle pour le maintien des transports antéro- et rétrogrades neuronaux. Cette fonction est régulée par des mécanismes de phosphorylation. Lorsque la protéine Tau est hyperphosphorylée, elle perd sa fonction stabilisatrice et s'agrège au niveau neuronal sous forme de dégénérescences neurofibrillaires (DNF) (Buerger et al., 2006 ; Delacourte et al., 2002). Initialement, les premiers dosages de concentration de la protéine Tau totale ont été effectués par des techniques Elisa-sandwich utilisant des anticorps polyclonaux (Vandermeeren et al., 1993). Le développement des Elisa, basé sur des anticorps monoclonaux, a permis un dosage de l'ensemble des différentes isoformes de la protéine Tau dans le LCR, dépendant ou non, de leur état phosphorylé. Ainsi, l'anticorps HT7 sur l'épitope Tau 159–163 est spécifique de l'ensemble des isoformes de Tau indépendamment de leur état de phosphorylation. L'anticorps BT2 sur l'épitope Tau 194–198 est, lui, spécifique de toutes les isoformes non phosphorylées de Tau. Les concentrations de la protéine Tau varient avec l'âge de façon physiologique comme suit :

- 136 ± 89 pg/mL entre 21 et 50 ans ;
- 243 ± 127 pg/mL entre 50 et 70 ans ;
- 341 ± 171 pg/mL au dessus de 70 ans (Sjogren et al., 2001).

Dans les affections neurologiques chroniques de type tauopathie ou non, la concentration de Tau totale dans le LCR semble refléter l'intensité globale de la mort neuronale (Blennow et Hampel, 2003) (Tableau 2). Les valeurs « seuil » pathologiques correspondent à une concentration de Tau supérieure à 400 pg/ml (valeurs de référence du test Elisa et Hulstaert et al. (1999)).

L'une des avancées dans le champ des marqueurs biologiques dans le cadre de la MA restent la possibilité de doser de façon indépendante les formes phosphorylées de Tau ou phospho-Tau (P-Tau). Ainsi, les différentes P-Tau peuvent être analysés par Elisa sur différents épitopes dont principalement les thréonines 181, 231 et les sérines 199, 235, 396 et 404. Le dosage le plus couramment utilisé est celui développé par la société Innogenetics® dirigé contre l'épitope en thréonine en 181. Les valeurs de référence varient avec l'âge. La valeur seuil pathologique de ce dosage est supérieure à 60 pg/ml (valeurs de référence du test Elisa et Vanderstichele et al. (2006)).

3.2. *Dosage du peptide amyloïde A-β*

Les peptides amyloïdes A-β1–40 et A-β1–42 composent principalement les plaques séniles. Ces peptides résultent du clivage protéolytique de l'*amyloid precursor protein* (APP) par la voie de la β-sécrétase (Selkoe, 1994). En situation pathologique, l'activation de la voie γ-sécrétase conduirait à l'accumulation des peptides amyloïdes, induisant alors la formation d'oligomères neurotoxiques, puis de protofibrilles et fibrilles amyloïdes (Selkoe, 1994). Dans les études physiopathologiques, les peptides A-β sont détectables dans le parenchyme cérébral après électrophorèse et immunoréplique. Dans le domaine du diagnostic biologique, des techniques Elisa de type sandwich avec des couples d'anticorps de capture et de détection permettant de distinguer les deux types de peptides A-β1–40 et 1–42 ont été développées. De nombreux kits sont disponibles commercialement mais les plus couramment utilisés sont ceux de la société Innogenetics®. La détection des

Tableau 2 – Variation attendue des biomarqueurs en fonction du diagnostic (Blennow et al., 2001)
***Expected biomarkers variations depending on the diagnosis* (Blennow et al., 2001)**

Situation	Tau	P-Tau (181)	Peptide A-β1–42
Sénescence normal (N)	< 450 pg/mL	< 60 pg/mL	> 500 pg/mL
MA	↗ modérée	↗ modérée	↘
Dépression	N	N	N
Parkinson	N	N	N
Alcoolique	N	N	N
Démence frontotemporale	N ou ↗ modérée	N ou ↘ modérée	N ou ↘ modérée
Démence à corps de Lewy	N ou ↗ modérée	N	↘ modérée
MCJ	↗↗↗	N ou ↗	↘
Accident vasculaire cérébral	↗↗ transitoire	N	N
Démence vasculaire	Variable	N	N ou ↘ modérée

MA : maladie d'Alzheimer ; MCJ : maladie de Creutzfeldt-Jakob.
AD: Alzheimer disease; CDJ: Creutzfeldt-Jakob disease.

peptides A-β1–40 et 1–42, mais également de peptides plus courts, tronqués en amino-terminal et qui pourraient avoir un intérêt diagnostique (Sergeant et al., 2003), a été adaptée à la technologie liquide de type Luminex®. Cette technique permet notamment de combiner le dosage des peptides A-β à ceux des protéines Tau (Hansson et al., 2006). Des valeurs de référence sur des populations non atteintes d'affection dégénérative ont été calculées et s'élèvent pour A-β1–42 à 794 ± 218 pg/mL (Sjogren et al., 2001). Lors de la MA, les formes A-β1–42 qui sont les plus amyloïdogènes s'agrègent avant les formes A-β1–40 plus impliquées à des stades évolués de la maladie. Dans le LCR, les peptides amyloïdes en formant les plaques amyloïdes induisent une diminution de la concentration d'A-β1–42. Les résultats combinés de 13 études réalisées sur un total de 600 patients et sur 450 témoins montrent pour ce dosage d'A-β1–42 une sensibilité et une spécificité pour la MA de plus de 80 % (Andreasen et Blennow, 2005). Ces taux faibles d'A-β1–42 dans le LCR semblent corrélés à l'intensité des dépôts d'A-β au niveau des plaques amyloïdes dans le néocortex et l'hippocampe dans les cerveaux autopsiés. Cependant, un taux faible de ce marqueur biologique est également retrouvé dans des pathologies souvent dépourvues de plaques amyloïdes, telles que la maladie de Creutzfeldt-Jakob, la sclérose latérale amyotrophique et l'atrophie multisystématisée. Ainsi, le ratio A-β1–42/A-β1–40 semble d'un plus grand intérêt que le peptide A-β1–42 seul pour le diagnostic positif de MA (Graff-Radford et al., 2007). L'augmentation du ratio A-β1–40/A-β1–42 semble également intéressante pour diagnostiquer les patients prédémentiels avec un risque de progression vers la MA, voire pour prédire une MA chez des sujets cognitivement normaux.

4. Intérêt des marqueurs biologiques dans le diagnostic des démences

4.1. *Intérêt des marqueurs biologiques dans le diagnostic de MA*

Chez les patients atteints de MA comparés aux sujets témoins, les concentrations de Tau et de P-Tau dans le LCR augmentent alors que celles du peptide A-β1–42 diminuent (Blennow et Hampel, 2003). Les résultats combinés de nombreuses études sur 2500 patients MA et 1300 témoins ont rapporté une élévation de Tau dans le LCR avec une sensibilité et une spécificité de 82 et 88 %, respectivement, pour le diagnostic positif de MA (Andreasen et Blennow, 2005). La mesure de P-Tau, quelle que soit la méthode choisie, montre une augmentation dans le LCR des sujets atteints de MA avec une spécificité qui semble meilleure que pour la Tau totale (souvent supérieure à 90 %). Pris isolément, A-β, Tau et P-Tau apportent une aide diagnostique significative malgré leur faible sensibilité. Afin d'optimiser le diagnostic, il est possible de combiner ces trois biomarqueurs pour obtenir une meilleur sensibilité et spécificité (Tableau 2). L'utilisation du ratio A-β1–42/A-β1–40 (Graff-Radford et al., 2007), de la combinaison

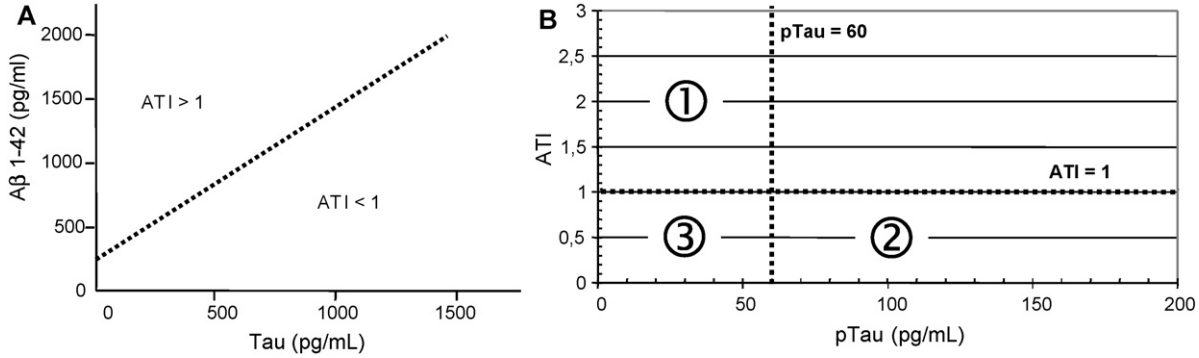


Fig. 2 – Combinaison des trois biomarqueurs pour le diagnostic positif de la MA (d'après Hulstaert et al., 1999). A : il est possible de représenter sur un même graphique l'A-β1–42 et la Tau totale et d'établir un seuil variable discriminant d'A-β1–42 selon la formule établie empiriquement en utilisant les kits Innogenetics® : A-β1–42 = 240 + 1,18 × Tau. Il est alors possible d'utiliser un index « A-β1–42 – Tau » ou ATI = A-β42/(240 + 1,18 × Tau) qui, lorsqu'il est inférieur à 1 (partie sous la courbe pointillée), est en faveur du diagnostic de MA. B : il est également possible de combiner graphiquement les trois marqueurs en représentant l'ATI en fonction de la valeur de P-Tau. Cela permet de définir trois secteurs d'intérêt : ① avec un ATI normal et une valeur de P-Tau inférieure à 60 pg/mL, on est dans des conditions physiologiques normales ; ② dans ce secteur, on retrouve les caractéristiques classiques de la MA avec un ATI inférieur à 1 et surtout une P-Tau élevée. Cette combinaison permet d'obtenir une grande spécificité pour le diagnostic de MA ; ③ sont présents dans cette section les formes associant une augmentation significative de Tau et/ou une diminution de A-β1–42 en l'absence d'accroissement de P-Tau. On y retrouve toutes les formes de neurodégénérescence ainsi que certaines MA.

Combination of three biomarkers for the positive diagnosis of AD (Hulstaert et al., 1999). A: Innogenetics® kits use an empiric formula (A-β1–42 = 240 + 1.18 × Tau) to draw A-β1–42 and total Tau on the same chart and to establish a discriminating threshold ofA- β1 –42. This formula produces an index "A-β1–42 – Tau" or ATI = A-β42/(240 + 1.18 × Tau). An index below 1 (part under the dotted curve) is in favor of the diagnosis of AD. B: graphically combining the three markers by representing ATI as a function of P-Tau defines three areas: ① normal physiological condition with a normal ATI and P-Tau less than 60 pg/mL, ② classical characteristics of AD with ATI less than 1 and evelated P-Tau. This combination is highly specific for AD diagnosis, ③ significant increase of Tau and/or a decrease of A-β1-42 without increased P-Tau. This area includes all forms of neurodegeneration and some AD.

de P-Tau et de l'index ATI (Hansson et al., 2006) (Fig. 2) semble également très intéressante.

4.2. *Marqueurs biologiques du LCR à un stade précoce de la MA (mild cognitive impairment [MCI]), intérêt comme facteur pronostic de l'évolution de la maladie ?*

L'intérêt porté depuis ces dernières années aux critères diagnostiques de MCI et aux facteurs de « conversion » à la phase d'état prédémentielle reflète l'importance d'un diagnostic précoce. L'organisation des soins, les mesures médicosociales et la prise en charge plurimodale sont d'autant plus efficaces que le diagnostic est réalisé précocement. De plus, le développement de nouvelles stratégies symptomatiques (correction des facteurs de risque), cognitives (stimulation cognitive multidomaine) et médicamenteuses visant à ralentir, voire à stopper le processus dégénératif en cours, nécessitent des outils diagnostiques à la fois objectifs et précoces. Les dosages de Tau totale, P-Tau et A-β dans le LCR semblent particulièrement intéressants comme potentiels marqueurs du pronostic de l'évolution vers la MA. En effet, le taux pathologique d'au moins deux de ces marqueurs suffirait pour prédire les patients prédémentiels (MCI) qui vont « convertir » vers une MA des patients qui vont rester stables (Parnetti et al., 2006). Dans une large série de MCI suivis sur six ans, l'association de Tau et de A-β1–42 permet de discriminer les patients qui vont rester stables de ceux qui vont évoluer vers une MA avec une sensibilité de 95 % et une spécificité de 83 % (Herukka et al., 2007). Ces biomarqueurs semblent même plus discriminants que l'âge, le sexe, le niveau socioculturel, le génotype Apo-E et le taux d'homocystéine plasmatique dans cette conversion. Ainsi, les patients MCI avec une réduction de la concentration dans le LCR de l'A-β1–42 ont un risque 5,5 fois supérieur de développer une démence par rapport aux patients avec un dosage normal d'A-β1–42. L'augmentation de la concentration de Tau et de P-Tau accroît ce risque de conversion, respectivement, de 9,5 et de 8,7 fois (Hansson et al., 2006). De même, l'utilisation du ratio A-β1–42/A-β1–40 (Graff-Radford et al., 2007), de la combinaison de P-Tau et de l'index ATI (Hansson et al., 2006) (Fig. 2) peut également être utilisée pour le diagnostic précoce de conversion en MA des patients prédémentiels (Parnetti et al., 2006).

4.3. *Marqueurs biologiques du LCR dans les autres démences non MA, intérêt pour le diagnostic différentiel*

L'analyse combinée de ces trois biomarqueurs permet également une évaluation des diagnostics différentiels (démence frontotemporal, démence à corps de Lewy, démence vasculaire). Les caractéristiques de ces biomarqueurs dans les diagnostics différentiels sont représentées dans le Tableau 2. Par exemple, la concentration de P-Tau dans le LCR est normale dans les démences vasculaires, frontotemporales et à corps de Lewy, le syndrome dépressif et la maladie de Parkinson.

Le dosage des marqueurs biologiques dans le LCR, en particulier la protéine 14-3-3 et la protéine Tau, est également essentiel pour le diagnostic de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ). La protéine 14-3-3 comme protéine ubiquitaire particulièrement abondante dans les neurones a fait l'objet de

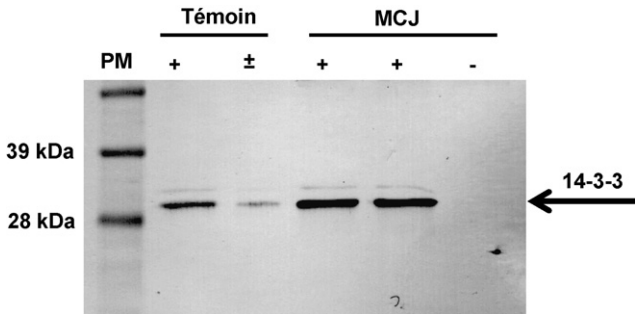


Fig. 3 – *Western blot* de la protéine 14-3-3 dans le LCR. La détection de la protéine 14-3-3 par *western blot* dans le LCR a été réalisée avec un anticorps dirigé contre toutes les isoformes de la protéine 14-3-3. Des témoins positif (+) et « douteux » (±) sont comparés aux bandes obtenues avec des LCR de patients MCJ + et –. PM : poids moléculaire. *Western blot of the 14-3-3 protein in CSF. The detection of the 14-3-3 protein by western blot in the CSF was performed with an antibody directed against all isoforms of the 14-3-3 protein. Positive (+) and "doubtful" (±) samples are compared to the bands obtained with CSF from patients with CJD + and −. PM: molecular weight.*

nombreux travaux confirmant son intérêt pour le diagnostic clinique (Harrington et al., 1986 ; Hsich et al., 1996 ; Zerr et al., 1996). La détection de la protéine 14-3-3 par *western blot* permet, en effet, un diagnostic positif d'une MCJ sporadique avec une sensibilité et une spécificité de plus de 90 % (Fig. 3). Ce diagnostic est actuellement réalisé en France par cinq laboratoires, dont nous faisons partie, fonctionnant en réseau (Paris, Reims, Lyon, Bordeaux et Montpellier). Toutefois, son augmentation peut être mise en évidence dans d'autres affections associées à un dommage cellulaire rapidement évolutif du tissu cérébral (encéphalites virales, métaboliques, toxiques, auto-immunes, état de mal épileptique, accident vasculaire ou sclérose en plaque d'évolution rapide). Ainsi, même si leur utilité est moindre que la 14-3-3 avec des sensibilités et spécificités inférieures à 80 %, la *neuron specific enolase* (NSE), la protéine S100 et la protéine Tau totale ont été considérées pour le diagnostic de MCJ (Beaudry et al., 1999). Les résultats du dosage la Tau totale dans le CDJ sont bien supérieurs à ceux mis en évidence dans la MA et peuvent dépasser 6000 pg/ml. Le seuil pathologique pour la Tau totale est estimé à plus de 1000 pg/ml (Satoh et al., 2006). De plus, la protéine Tau en association avec la 14-3-3 permet une optimisation du diagnostic de la forme infectieuse ou acquise de la « vache folle », dit du « nouveau variant » de la MCJ, en majorant la sensibilité du diagnostic de 50 à 90 % (Peoc'h et al., 2006a).

5. Applications des marqueurs biologiques du LCR dans les démences

5.1. *Application en pratique clinique dans les centres experts*

Basés sur les différents intérêts de l'utilisation des marqueurs biologiques du LCR dans le champs d'investigation des

démences, le dosage des trois principaux marqueurs biologiques du LCR tendent à se généraliser dans les certains centres experts mémoire ressources et recherches. Toutefois, l'ensemble des données des marqueurs biologiques ne doit en aucun cas être interprété de façon isolée. Ces marqueurs biologiques représentent une aide au diagnostic en association avec les données cliniques, neuropsychologiques, d'imagerie morphologique et fonctionnelle. De plus, la réalisation du dosage de ces biomarqueurs nécessite des conditions préanalytiques standardisées qui ont été définies. Par exemple, les peptides A-β, particulièrement hydrophobes, requièrent des tubes de prélèvement et de stockage en polypropylène (Schoonenboom et al., 2005) et un stockage à −80 °C. En effet, leur stabilité est bien meilleure à −80 °C qu'à −20 °C ou 4 °C, et leur dosage peut être altéré après plusieurs cycles de congélation/décongélation. Il est également conseillé de respecter les mêmes recommandations pour la protéine Tau même si son risque d'absorption sur les tubes est moindre et que sa stabilité aux cycles de congélation/décongélation est supérieure.

5.2. *Avancées en recherche*

Basés sur les investigations de protéomique clinique, d'autres marqueurs biologiques sont en cours d'analyse (Tableau 1) en tant que marqueur diagnostique de la MA et comme facteur prédictif de conversion MCI/MA. Certains semblent prometteurs, toutefois, leur réel intérêt clinique nécessite des validations ultérieures avant une éventuelle utilisation en pratique clinique. Par exemple, l'activité de *beta site APP cleaving enzyme 1* (BACE1) dans le LCR est augmentée dans la MA et la MCJ sporadique (Peoc'h et al., 2006b). Le dosage de S100-β, marqueur de la glie radiaire, semble aussi encourageant en recherche, mais il n'est pas utilisé en pratique diagnostique. Une analyse en 2D sur les LCR de 34 patients atteints de MA comparés à 34 sujets témoins matchés en âge a récemment mis en évidence 23 « spots » différentiels. Ils correspondent à des protéines impliquées dans le transport du peptide A-β, la réponse inflammatoire, l'inhibition protéolytique et la fonction cellulaire neuronale. Ce panel de protéines peut être utilisé pour la différenciation des sujets MA et témoins avec une sensibilité de 93 % et une spécificité de 90 % (Finehout et al., 2006). D'autres biomarqueurs ont également été détectés par d'autres techniques de protéomique, comme la cystatine C, les deux isoformes de la β-2-microglobuline et le polypeptide du VGF de 4,8 kDa. Ces marqueurs biologiques pourraient permettre un diagnostic de MA avec une forte sensibilité et spécificité (Carrette et al., 2003).

Un panel de 17 marqueurs biologiques potentiels ont été mis en évidence par la technique de SELDI–TOF©–MS, en comparant 57 sujets MCI converteurs et 56 MCI stables sur quatre ans de suivi. Parmi les 17 protéines, cinq ont pu être identifiées, elles correspondent au fragment C-terminal de l'ostéopontine phosphorylée, à l'ubiquitine, à la β-2-microglobuline, aux C3a et C4a anaphylatoxine des arginines (Simonsen et al., 2007). Bien que la valeur diagnostique réelle de ces marqueurs biologiques nécessite leur confirmation sur des études en population, l'identification de nouvelles protéines optimise nos connaissances sur le processus physiopathologique de l'affection.

6. Conclusion

L'analyse clinique protéomique du LCR représente un outil majeur dans la découverte de marqueurs biologiques dans le champ des affections neurologiques. L'intérêt d'un diagnostic précoce et valide s'est avéré croissant, en particulier dans les affections neurodégénératives comme la MA. Les marqueurs biologiques du LCR apparaissent comme des outils essentiels en terme de diagnostic, de pronostic et de valeur prédictive de l'état présymptomatique ; ils permettent également d'approcher les mécanismes physiopathologiques des affections neurologiques. Malgré les difficultés inhérentes à l'analyse protéomique du LCR (traitements préanalytiques rigoureux, variations physiologiques, complexité qualitative et quantitative), la majorité des études avancent des applications cliniques significatives. L'apport des méthodes de préfractionnement et de nouvelles techniques de protéomique contrôlées par des conditions préanalytiques rigoureuses pourra permettre, prochainement, de nouvelles avancées dans le domaine des marqueurs biologiques du LCR. En parallèle, l'étude de ces marqueurs biologiques est en cours de validation dans d'autres fluides biologiques, et en particulier, dans le plasma.

Remerciements

Ce travail est soutenu par le CHU de Montpellier (AOI 2005), les programmes européens EC FP6 cNEUPRO et Neuroprion, l'INCA, le CNRS et la Société française de biologie clinique (groupes de travail : « Préanalytique et analyses multiplexes en protéomique » et « Phase préanalytique du dosage de biomarqueurs de démences dans le LCR »). Nous remercions également les professeurs Jean-Paul Cristol, chef du service de biochimie du CHU de Montpellier et Jacques Touchon, chef de service de neurologie du CHU de Montpellier.

RÉFÉRENCES

Andreasen N, Blennow K. CSF biomarkers for mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. Clin Neurol Neurosurg 2005;107:165–73.

Banks RE, Stanley AJ, Cairns DA, Barrett JH, Clarke P, Thompson D, et al. Influences of blood sample processing on low-molecular-weight proteome identified by surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry. Clin Chem 2005;51:1637–49.

Beaudry P, Cohen P, Brandel JP, Delasnerie-Laupretre N, Richard S, Launay JM, et al. 14-3-3 protein, neuron-specific enolase, and S-100 protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. Dement Geriatr Cogn Disord 1999;10:40–6.

Blennow K, Hampel H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. Lancet Neurol 2003;2:605–13.

Blennow K, Vanmechelen E, Hampel H. CSF total Tau, A-beta42 and phosphorylated Tau protein as biomarkers for Alzheimer's disease. Mol Neurobiol 2001;24:87–97.

Blennow K, Wallin A, Hager O. Low frequency of post-lumbar puncture headache in demented patients. Acta Neurol Scand 1993;88:221–3.

Buerger K, Ewers M, Pirttila T, Zinkowski R, Alafuzoff I, Teipel SJ, et al. CSF phosphorylated Tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. Brain 2006;129:3035–41.

Carrette O, Burkhard PR, Hughes S, Hochstrasser DF, Sanchez JC. Truncated cystatin C in cerebrospiral fluid: technical [corrected] artefact or biological process? Proteomics 2005;5:3060–5.

Carrette O, Demalte I, Scherl A, Yalkinoglu O, Corthals G, Burkhard P, et al. A panel of cerebrospinal fluid potential biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease. Proteomics 2003;3:1486–94.

Castano EM, Roher AE, Esh CL, Kokjohn TA, Beach T. Comparative proteomics of cerebrospinal fluid in neuropathologically-confirmed Alzheimer's disease and non-demented elderly subjects. Neurol Res 2006;28:155–63.

Davidsson P, Westman-Brinkmalm A, Nilsson CL, Lindbjer M, Paulson L, Andreasen N, et al. Proteome analysis of cerebrospinal fluid proteins in Alzheimer patients. Neuroreport 2002;13:611–5.

Delacourte A, Sergeant N, Champain D, Wattez A, Maurage CA, Lebert F, et al. Nonoverlapping but synergetic Tau and APP pathologies in sporadic Alzheimer's disease. Neurology 2002;59:398–407.

Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, et al. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS–ADRDA criteria. Lancet Neurol 2007;6:734–46.

Dupuy AM, Lehmann S, Cristol JP. Protein biochip systems for the clinical laboratory. Clin Chem Lab Med 2005;43: 1291–302.

Finehout EJ, Franck Z, Choe LH, Relkin N, Lee KH. Cerebrospinal fluid proteomic biomarkers for Alzheimer's disease. Ann Neurol 2007;61:120–9.

Finehout EJ, Franck Z, Relkin N, Lee KH. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid changes related to postmortem interval. Clin Chem 2006;52:1906–13.

Fukuyama R, Izumoto T, Fushiki S. The cerebrospinal fluid level of glial fibrillary acidic protein is increased in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients and correlates with severity of dementia. Eur Neurol 2001;46:35–8.

Graff-Radford NR, Crook JE, Lucas J, Boeve BF, Knopman DS, Ivnik RJ, et al. Association of low plasma A-beta42/A-beta40 ratios with increased imminent risk for mild cognitive impairment and Alzheimer disease. Arch Neurol 2007;64:354–62.

Green AJ, Thompson EJ, Stewart GE, Zeidler M, McKenzie JM, MacLeod MA, et al. Use of 14-3-3 and other brain-specific proteins in CSF in the diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2001;70:744–8.

Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Londos E, Blennow K, Minthon L. Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. Lancet Neurol 2006;5:228–34.

Harrington MG, Merril CR, Asher DM, Gajdusek DC. Abnormal proteins in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. N Engl J Med 1986;315: 279–83.

He M, Ohrui T, Maruyama M, Tomita N, Nakayama K, Higuchi M, et al. ACE activity in CSF of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer disease. Neurology 2006;67:1309–10.

Hemsley H, Crook D. Bacterial meningitis. In: Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons; 2001.

Herukka SK, Helisalmi S, Hallikainen M, Tervo S, Soininen H, Pirttila T. CSF A-beta42, Tau and phosphorylated Tau, Apo-E epsilon4 allele and MCI type in progressive MCI. Neurobiol Aging 2007;28:507–14.

Hsich G, Kenney K, Gibbs CJ, Lee KH, Harrington MG. The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. N Engl J Med 1996;335:924–30.

Huhmer AF, Biringer RG, Amato H, Fonteh AN, Harrington MG. Protein analysis in human cerebrospinal fluid: physiological aspects, current progress and future challenges. Dis Markers 2006;22:3–26.

Hulstaert F, Blennow K, Ivanoiu A, Schoonderwaldt HC, Riemenschneider M, De Deyn PP, et al. Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid(1–42) and Tau levels in CSF. Neurology 1999;52:1555–62.

Jurewicz A, Matysiak M, Raine CS, Selmaj K. Soluble Nogo-A, an inhibitor of axonal regeneration, as a biomarker for multiple sclerosis. Neurology 2007;68:283–7.

Khwaja FW, Duke-Cohan JS, Brat DJ, Van Meir EG. Attractin is elevated in the cerebrospinal fluid of patients with malignant astrocytoma and mediates glioma cell migration. Clin Cancer Res 2006;12:6331–6.

Khwaja FW, Nolen JD, Mendrinos SE, Lewis MM, Olson JJ, Pohl J, et al. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid discriminates malignant and nonmalignant disease of the central nervous system and identifies specific protein markers. Proteomics 2006;6:6277–87.

Lamers KJ, van Engelen BG, Gabreels FJ, Hommes OR, Borm GF, Wevers RA. Cerebrospinal neuron-specific enolase, S100 and myelin basic protein in neurological disorders. Acta Neurol Scand 1995;92:247–51.

Lee JW, Namkoong H, Kim HK, Kim S, Hwang DW, Na HR, et al. Fibrinogen gamma-A chain precursor in CSF: a candidate biomarker for Alzheimer's disease. BMC Neurol 2007;7:14.

Lehmann S, Dupuy A, Peoc'h K, Roche S, Baudin B, Quillard M, et al. Present possibilities and future development of clinical proteomics. Ann Biol Clin (Paris) 2007;65:463–71.

Markovic M, Trajkovic V, Drulovic J, Mesaros S, Stojsavljevic N, Dujmovic I, et al. Antibodies against myelin oligodendrocyte glycoprotein in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. J Neurol Sci 2003;211:67–73.

Merched A, Serot JM, Visvikis S, Aguillon D, Faure G, Siest G. Apolipoprotein E, transthyretin and actin in the CSF of Alzheimer's patients: relation with the senile plaques and cytoskeleton biochemistry. FEBS Lett 1998;425:225–8.

Nooijen PT, Schoonderwaldt HC, Wevers RA, Hommes OR, Lamers KJ. Neuron-specific enolase, S100 protein, myelin basic protein and lactate in CSF in dementia. Dement Geriatr Cogn Disord 1997;8:169–73.

Ogata Y, Charlesworth MC, Muddiman DC. Evaluation of protein depletion methods for the analysis of total-, phospho- and glycoproteins in lumbar cerebrospinal fluid. J Proteome Res 2005;4:837–45.

Ohta M, Ohta K, Ma J, Takeuchi J, Saida T, Nishimura M, et al. Clinical and analytical evaluation of an enzyme immunoassay for myelin basic protein in cerebrospinal fluid. Clin Chem 2000;46:1326–30.

Pan S, Zhu D, Quinn JF, Peskind ER, Montine TJ, Lin B, et al. A combined dataset of human cerebrospinal fluid proteins identified by multi-dimensional chromatography and tandem mass spectrometry. Proteomics 2007;7:469–73.

Parnetti L, Lanari A, Silvestrelli G, Saggese E, Reboldi P. Diagnosing prodromal Alzheimer's disease: role of CSF biochemical markers. Mech Ageing Dev 2006;127:129–32.

Peoc'h K, Delasnerie-Laupretre N, Beaudry P, Laplanche JL. Diagnostic value of CSF 14-3-3 detection in sporadic CJD diagnosis according to the age of the patient. Eur J Neurol 2006;13:427–8.

Peoc'h K, Hebert M, Chasseigneaux S, Léandre S, Lenne M, Beaudry P, et al. Diagnostic des maladies à prions humaines : quel rôle pour le biologiste ? Immunoanal Biol Spec 2006;21:369–74.

Peskind ER, Griffin WS, Akama KT, Raskind MA, Van Eldik LJ. Cerebrospinal fluid S100-β is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease. Neurochem Int 2001;39:409–13.
Petzold A, Jenkins R, Watt HC, Green AJ, Thompson EJ, Keir G, et al. Cerebrospinal fluid S100-β correlates with brain atrophy in Alzheimer's disease. Neurosci Lett 2003;336: 167–70.
Puchades M, Hansson SF, Nilsson CL, Andreasen N, Blennow K, Davidsson P. Proteomic studies of potential cerebrospinal fluid protein markers for Alzheimer's disease. Brain Res Mol Brain Res 2003;118:140–6.
Ramstrom M, Ivonin I, Johansson A, Askmark H, Markides KE, Zubarev R, et al. Cerebrospinal fluid protein patterns in neurodegenerative disease revealed by liquid chromatography-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. Proteomics 2004;4:4010–8.
Roche S, Gabelle A, Lehmann S. Clinical proteomics of the cerebrospinal fluid: towards the discovery of new biomarkers. Proteomics Clin Appl 2008;2:428–36.
Sanchez JC, Guillaume E, Lescuyer P, Allard L, Carrette O, Scherl A, et al. Cystatin C as a potential cerebrospinal fluid marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. Proteomics 2004;4:2229–33.
Satoh K, Shirabe S, Eguchi H, Tsujino A, Eguchi K, Satoh A, et al. 14-3-3 protein, total Tau and phosphorylated Tau in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease and neurodegenerative disease in Japan. Cell Mol Neurobiol 2006;26:45–52.
Schoonenboom NS, Mulder C, Vanderstichele H, Van Elk EJ, Kok A, Van Kamp GJ, et al. Effects of processing and storage conditions on amyloid beta(1–42) and Tau concentrations in cerebrospinal fluid: implications for use in clinical practice. Clin Chem 2005;51:189–95.
Schoonenboom NS, Pijnenburg YA, Mulder C, Rosso SM, Van Elk EJ, Van Kamp GJ, et al. Amyloid beta(1–42) and phosphorylated Tau in CSF as markers for early-onset Alzheimer disease. Neurology 2004;62:1580–4.
Selkoe DJ. Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease. Annu Rev Cell Biol 1994;10:373–403.
Sergeant N, Bombois S, Ghestem A, Drobecq H, Kostanjevecki V, Missiaen C, et al. Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach. J Neurochem 2003;85:1581–91.
Sheng JG, Mrak RE, Rovnaghi CR, Kozlowska E, Van Eldik LJ, Griffin WS. Human brain S100-beta and S100-beta mRNA expression increases with age: pathogenic implications for Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 1996;17:359–63.
Shores KS, Knapp DR. Assessment approach for evaluating high abundance protein depletion methods for cerebrospinal fluid (CSF) proteomic analysis. J Proteome Res 2007;6:3739–51.
Simonsen AH, McGuire J, Hansson O, Zetterberg H, Podust VN, Davies HA, et al. Novel panel of cerebrospinal fluid biomarkers for the prediction of progression to Alzheimer dementia in patients with mild cognitive impairment. Arch Neurol 2007;64:366–70.
Sjogren M, Davidsson P, Gottfries J, Vanderstichele H, Edman A, Vanmechelen E, et al. The cerebrospinal fluid levels of Tau, growth-associated protein-43 and soluble amyloid precursor protein correlate in Alzheimer's disease, reflecting a common pathophysiological process. Dement Geriatr Cogn Disord 2001;12:257–64.
Sjogren M, Minthon L, Davidsson P, Granerus AK, Clarberg A, Vanderstichele H, et al. CSF levels of Tau, beta-amyloid(1–42) and GAP-43 in frontotemporal dementia, other types of dementia and normal aging. J Neural Transm 2000;107:563–79.
Spector R, Johanson C. The mammalian choroid plexus. Sci Am 1989;261:68–74.
Thompson EJ. The roster of CSF proteins. In: Proteins of the Cerebrospinal Fluid. Oxford: Academic Press; 2005. p. 13–31.
Vandermeeren M, Mercken M, Vanmechelen E, Six J, van de Voorde A, Martin JJ, et al. Detection of Tau proteins in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. J Neurochem 1993;61:1828–34.
Vanderstichele H, De Vreese K, Blennow K, Andreasen N, Sindic C, Ivanoiu A, et al. Analytical performance and clinical utility of the Innotest Phospho-Tau181P assay for discrimination between Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. Clin Chem Lab Med 2006;44:1472–80.
Wallin A, Blennow K, Rosengren LE. Glial fibrillary acidic protein in the cerebrospinal fluid of patients with dementia. Dementia 1996;7:267–72.
Xiao BG, Linington C, Link H. Antibodies to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis and controls. J Neuroimmunol 1991;31:91–6.
Zerr I, Bodemer M, Gefeller O, Otto M, Poser S, Wiltfang J, et al. Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. Ann Neurol 1998;43:32–40.
Zerr I, Bodemer M, Otto M, Poser S, Windl O, Kretzschmar HA, et al. Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by two-dimensional gel electrophoresis of cerebrospinal fluid. Lancet 1996;348:846–9.
Zhong Z, Ewers M, Teipel S, Burger K, Wallin A, Blennow K, et al. Levels of beta-secretase (BACE1) in cerebrospinal fluid as a predictor of risk in mild cognitive impairment. Arch Gen Psychiatry 2007;64:718–26.