

UNIVERSITÉ LILLE NORD DE FRANCE
ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ
FACULTÉ DE MÉDECINE HENRI WAREMBOURG

THÈSE SCIENTIFIQUE POUR L'OBTENTION DU
GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE 2
ÉPIDEMIOLOGIE, ÉCONOMIE DE LA SANTÉ ET PRÉVENTION

ÉTUDES D'ASSOCIATION PANGÉNOMIQUES APPLIQUÉES À LA
RECHERCHE DE NOUVEAUX FACTEURS DE RISQUE GÉNÉTIQUE DE LA
MALADIE D'ALZHEIMER

Présentée et soutenue publiquement le 20 juin 2013

Par Vincent Chouraki

Jury

Directeur : Monsieur le Professeur Philippe Amouyel
Co-directeur : Monsieur le Docteur Jean-Charles Lambert
Rapporteurs : Monsieur le Professeur Christophe Tzourio
Monsieur le Docteur David-Alexandre Tregouet

À Jean Hary

*« Hâtez-vous lentement, et sans perdre courage,
Vingt fois sur le métier remettez votre ouvrage,
Polissez-le sans cesse, et le repolissez,
Ajoutez quelquefois, et souvent effacez. »*
Nicolas Boileau ; De l'Art poétique (Chant I)

*« Si je peux me permettre de te donner un conseil :
oublie que tu n'as aucune chance, vas-y fonce,
on sait jamais, sur un malentendu ça peut marcher. »*
Jean-Claude Dusse ; Les Bronzés font du ski

Remerciements

À **Monsieur le Professeur Philippe Amouyel**, pour m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire et permis de travailler sur les études d'association pangénomiques et la thématique de la maladie d'Alzheimer. Vous m'avez fait réaliser l'importance de la collaboration scientifique et fait l'honneur de diriger ce travail de thèse. Soyez assuré de mon profond respect et de ma reconnaissance.

À **Monsieur le Docteur Jean-Charles Lambert**, pour la confiance que vous m'avez témoignée dès le début de notre collaboration il y a quatre ans et pour avoir accepté de co-diriger ma thèse. Merci pour votre soutien dans les moments de doute et le rush des réunions IGAP.

Aux membres de mon jury, **Monsieur le Professeur Christophe Tzourio et Monsieur le Docteur David-Alexandre Tregouet**, vous me faites l'honneur de juger mes travaux. Soyez assurés de ma profonde reconnaissance et de ma considération respectueuse.

À **Madame le Docteur Florence Richard**, grâce à qui j'ai eu l'opportunité de faire cette thèse. Merci du fond du coeur.

À **Monsieur le Professeur Jean-Louis Salomez**, qui m'a accueilli au sein de son service d'épidémiologie régionale et permis de réaliser cette thèse dans le cadre de mes fonctions hospitalo-universitaires.

À **Benjamin Grenier-Boley et Céline Bellenguez**, pour ces presque quatre ans de cohabitation. Merci pour tous les moments que nous avons partagé, votre soutien et votre aide constante.

À **Madame le Professeur Sudha Seshadri**, pour son énergie, sa bonne humeur et son soutien en ce début de post-doctorat.

Je souhaiterais également remercier toutes les personnes des consortia CHARGE et IGAP avec qui j'ai eu l'occasion de collaborer au cours de ce projet, et l'ensemble des membres de l'UMR744 pour toutes les discussions, scientifiques ou non, que nous avons pu avoir.

Enfin, je tiens à remercier mes proches, qui m'ont soutenus et qui se reconnaîtront.

Résumé

Les démences regroupent un ensemble de pathologies cérébrales affectant progressivement les fonctions cognitives et survenant plus fréquemment chez les personnes âgées. L'augmentation du nombre de cas liée au vieillissement de la population et la lourdeur de la prise en charge font des démences un problème de santé publique important.

La maladie d'Alzheimer (MA) est la plus fréquente des démences. Elle apparaît généralement après 65 ans et possède une forte composante génétique. En dehors de certaines formes familiales précoces liées à des mutations dans les gènes du précurseur de la protéine amyloïde, et des présénilines 1 et 2, la grande majorité des cas résulte de l'interaction de facteurs environnementaux avec divers gènes de susceptibilité.

L'approche gène candidat a permis l'identification de nombreux gènes associés au risque de MA. Cependant, en raison de problèmes techniques et méthodologiques, seul le gène de l'apoprotéine E (APOE) a pu être identifié de manière robuste par cette approche. Les études d'association pangénomiques permettent d'identifier sans a priori des variations génétiques fréquentes associées à une maladie sur l'ensemble du génome. À partir de 2009, plusieurs consortia ayant pour objectif de réaliser ce type d'étude dans le champs de la MA ont identifié quatre nouveaux gènes d'intérêt pour la MA, CLU, PICALM, CR1 et BIN1. Cependant, ces gènes n'expliquent qu'une petite partie de la variabilité génétique de la maladie et de nombreux autres variants restent à découvrir.

Durant cette thèse, nous avons d'abord cherché à répliquer les résultats des principaux gènes identifiés par approche gène candidat en utilisant les données du consortium European Alzheimer's Disease Initiative (EADI). Nous avons pu montrer qu'une grande partie de ces gènes présentait un faible niveau d'association avec la MA. En utilisant l'approche pangénomique, nous avons ensuite pu identifier 19 gènes associés au risque de MA en dehors d'APOE, dont 11 n'ayant pas été identifiés par les précédentes études, via la mise en place d'une collaboration informelle entre consortia puis au sein du International Genomics of Alzheimer's Disease Project (IGAP).

Nous nous sommes également intéressés à plusieurs phénotypes intermédiaires associés à la MA, et en particulier aux taux plasmatiques des peptides amyloïde β ($A\beta$), en partant de l'hypothèse qu'ils pourraient permettre la recherche de variants impliqués dans des mécanismes physiopathologiques pré-symptomatiques. Ce travail a permis l'identification d'une association potentielle entre le gène CTXN3 et les taux plasmatiques d' $A\beta_{1-42}$.

En conclusion, l'utilisation des études d'association pangénomiques a permis d'identifier de nombreux nouveaux gènes associés au risque de MA. Ces gènes ouvrent des voies de recherche intéressantes pour mieux comprendre la physiopathologie de la MA et permettre le développement de traitements efficaces qui font actuellement défaut.

Abstract

Dementia is a syndrom caused by several brain diseases progressively deteriorating cognitive functions and occurs more frequently in the elderly. The increased number of patients with dementia due to the ageing of the general population and the high cost of care add up to make dementia a concerning public health issue.

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia. It is often diagnosed after 65 years old and has a strong genetic component. Familial forms exist and are mainly caused by mutations in the amyloid- β protein precursor, presenilin 1 and presenilin 2 genes. However, the vast majority of cases result from the complex interaction of environmental factors with susceptibility genes.

Using a candidate gene approach, numerous genes associated with AD risk were identified, but due to technical and methodological problems, only the apolipoprotein E (APOE) gene was replicated. Genome-wide association studies (GWAS) aim to identify frequent genetic variants associated with disease risk in a hypothesis-free manner. Starting 2009, several consortia aiming to perform this type of analyses in the field of AD robustly identified four new genes associated with AD risk, CLU, PICALM, CR1 and BIN1. However, these genes put together only explain a small proportion of the total genetic variance of AD and the search for new susceptibility genes remains an important goal for AD research.

In this work, we first tried to replicate the results of the top genes reported using the candidate gene approach, using GWAS data from the European Alzheimer's Disease Initiative (EADI). Most of these genes showed weak levels of association. Using GWAS, we were able to identify 19 new genes associated with AD risk besides APOE, including 11 that had not been reported by previous studies, first through an informal collaboration between consortia, then under the name of International Genomics of Alzheimer's Disease Project (IGAP).

Assuming that use of endophenotypes related to AD would be relevant for the discovery of genetic variants involved in the early pathophysiology of AD, we then performed a GWAS of plasma amyloid- β ($A\beta$) concentrations. This study showed suggestive associations between the CTXN3 gene on chromosome 5 and $A\beta_{1-42}$ plasma levels.

To sum up, using GWAS enabled us to identify new genes associated with AD risk. These genes point to interesting new research hypotheses and hopefully, to a better understanding of AD pathophysiology and development of effective drugs.

Table des matières

I	Introduction générale	1
1	Démences	2
1.1	Définition	2
1.2	Histoire naturelle	3
1.3	Épidémiologie	4
1.3.1	Prévalence	5
1.3.2	Incidence	8
1.3.3	Impact des démences	9
1.3.4	Facteurs de risque modifiables	10
2	Maladie d'Alzheimer	11
2.1	Diagnostic	11
2.1.1	Outils diagnostiques	11
2.1.2	Présentation clinique	13
2.1.3	Diagnostic différentiel	14
2.2	Biomarqueurs	15
2.3	Anatomopathologie	17
2.3.1	Lésions macroscopiques	17
2.3.2	Lésions microscopiques	18
2.3.3	Critères diagnostiques anatomopathologiques	23
2.4	Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer	24
2.4.1	Métabolisme des peptides A β	25
2.4.2	Fonctions physiologiques de l'APP et des peptides A β	28
2.4.3	Rôle des peptides A β dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer	29
2.5	Facteurs de risque modifiables	30
2.6	Génétique	32
2.6.1	Composante génétique de la maladie d'Alzheimer	32
2.6.2	Formes génétiques de la maladie d'Alzheimer	32
3	Identification des facteurs de risque génétique de maladies multifactorielles	34
3.1	Variations génétiques	34
3.1.1	Mesures de la variabilité génétique	35
3.1.2	Marqueurs génétiques	39
3.2	Stratégies d'identification des facteurs de risque génétique	40
3.2.1	Études de liaison génétique	41
3.2.2	Études d'association génétique	42
3.3	Études d'association pangénomiques	43
3.3.1	Contexte	43
3.3.2	Conception	47

3.4	Facteurs de risque génétique de maladie d'Alzheimer	59
3.4.1	Facteurs génétiques impliqués dans les formes familiales de maladie d'Alzheimer	59
3.4.2	Facteurs de risque génétique des formes sporadiques de maladie d'Alzheimer	60
II	Travaux personnels	64
4	Travaux de thèse	65
4.1	Réplication des résultats de l'approche gène candidat	66
4.2	Méta-analyses d'études d'association pangénomiques : études cas-témoins . . .	68
4.3	Méta-analyses d'études d'association pangénomiques : phénotypes intermédiaires	77
5	Discussion	87
III	Appendices	92
A	Publications de thèse	93
A.1	Publications présentées dans cette thèse	93
A.2	Autres publications en rapport avec la thématique de la maladie d'Alzheimer .	93
A.3	Autres publications portant sur des données pangénomiques	94
B	Critères diagnostiques de maladie d'Alzheimer	95
B.1	Critères de diagnostic de démence	95
B.2	Arguments en faveur d'une démence liée à un processus physiopathologique de type Alzheimer	96
B.2.1	Maladie d'Alzheimer probable	96
B.2.2	Maladie d'Alzheimer possible	96
C	Critères diagnostiques de MCI	98
C.1	Critères de diagnostic de MCI	98
C.2	Arguments en faveur d'un MCI lié à un processus physiopathologique de type Alzheimer	98
	Bibliographie	100

Liste des tableaux

1.1	Caractéristiques des principales étiologies de démences	3
1.2	Symptômes couramment retrouvés chez les personnes démentes	4
2.1	Biomarqueurs intégrés dans les derniers critères diagnostiques de maladie d'Alzheimer	16
2.2	Synthèse des facteurs modulant le risque de maladie d'Alzheimer	31
3.1	Choix et contraintes dans la conception d'une étude pangénomique	47
3.2	Éléments de preuve dans une étude d'association pangénomique	57
3.3	Gènes impliqués dans les formes familiales précoces de maladie d'Alzheimer	60
3.4	Risque de maladie d'Alzheimer associé aux allèles du gène APOE	61
3.5	Variants génétiques associés à la maladie d'Alzheimer dans les études pangénomiques	63
4.1	Résumé des étapes de découverte, répliation et de leur combinaison pour les SNPs atteignant le seuil de significativité pangénomique	73
4.2	Résultats de la recherche de SNPs associés à l'expression de gènes parmi les signaux identifiés dans IGAP	74
4.3	Principaux résultats de la méta-analyse des taux plasmatiques de peptides A β	80
4.4	Résultats de l'analyse IPA [®] sur les données pangénomiques des taux plasmatiques d'A β	82

Table des figures

1.1	Prévalence des démences	6
2.1	Aspect macroscopique du cerveau dans la maladie d'Alzheimer	17
2.2	Principales lésions anatomopathologiques de la maladie d'Alzheimer	18
2.3	Répartition spatiotemporelle des plaques amyloïdes	19
2.4	Répartition spatiotemporelle de la dégénérescence neurofibrillaire	21
2.5	Protéolyse de l'APP	25
2.6	Transport et clairance des peptides $A\beta$	27
3.1	Exemple de carte de déséquilibre de liaison	39
3.2	Technologies utilisées dans le génotypage à haut débit	46
3.3	Exemple de graphe d'intensité	50
3.4	Exemple de diagramme quantile-quantile	52
3.5	Exemple de sélection des sujets basée sur le taux d'hétérozygotie et le taux de données manquantes	53
3.6	Exemple d'ACP incluant les données Hapmap	55
3.7	Exemple de Manhattan Plot	56
3.8	Principe de l'imputation génétique	58
4.1	Résultats de l'étape de découverte de Lambert et collaborateurs, 2013	71
4.3	Surexpression de CTXN3 dans des lignées cellulaires HEK et immunofluorescence	84

Première partie
Introduction générale

1

Démences

1.1 Définition

Une définition classique de la démence est donnée dans la 10^e version de la classification internationale des maladies : « La démence (F00-F03) est un syndrome dû à une maladie cérébrale, habituellement chronique et progressive, caractérisé par une altération de nombreuses fonctions corticales supérieures, telles que la mémoire, l'idéation, l'orientation, la compréhension, le calcul, l'apprentissage, le langage et le jugement. Le syndrome ne s'accompagne pas d'un obscurcissement de la conscience. Les déficiences des fonctions cognitives s'accompagnent habituellement (et sont parfois précédées) d'une détérioration du contrôle émotionnel, du comportement social ou de la motivation. Ce syndrome survient dans la maladie d'Alzheimer, dans les maladies vasculaires cérébrales, et dans d'autres affections qui, de manière primaire ou secondaire, affectent le cerveau. »¹

Les principaux sous-types de démences sont par ordre de fréquence, la maladie d'Alzheimer, la démence vasculaire, la démence à corps de Lewy et la démence frontotemporale. Les principales caractéristiques de ces quatre pathologies sont données dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1 – Caractéristiques des principales étiologies de démences (tiré de [2])

Sous-type de démence	Symptômes caractéristiques	Neuropathologie	Proportion des démences
Maladie d'Alzheimer (MA)	Troubles de la mémoire, apathie et dépression Survenue progressive	Plaques amyloïdes et dégénérescences neurofibrillaires	50-75%
Démence vasculaire	Similaire à la MA avec mémoire moins altérée, fluctuation de l'humeur Fragilité physique Progression par à-coup	Maladie cérébro-vasculaire Infarctus isolés ou plus diffus	20-30%
Démence à corps de Lewy	Fluctuations importantes des fonctions cognitives Hallucinations visuelles Syndrome parkinsonien	Corps de Lewy corticaux (alpha-synucléine)	< 5%
Démence frontotemporale	Modifications de la personnalité, de l'humeur Désinhibition Troubles du langage	Pathologie limitée aux lobes frontaux et temporaux	5-10%

1.2 Histoire naturelle des démences

L'évolution des démences est le plus souvent chronique, se déroulant sur une période pouvant couvrir plusieurs années et se décrit classiquement en trois phases, détaillées dans le tableau 1.2 :

- Une phase précoce, souvent ignorée, pendant les deux premières années. Les proches, familles, amis, et parfois les professionnels de santé l'attribuent à un âge avancé et la considèrent comme faisant partie du vieillissement normal. Le début des troubles est difficile à dater en raison du caractère progressif de leur survenue
- Une phase intermédiaire, de la deuxième à la cinquième année. Avec la progression de la maladie, les troubles se manifestent clairement et deviennent plus limitant
- Une phase tardive, à partir de la cinquième année, caractérisée par une dépendance quasi totale et une inactivité. Les troubles de la mémoire sont très importants et les

altérations physiques liées à la maladie deviennent évidentes

Tableau 1.2 – Symptômes couramment retrouvés chez les personnes démentes (tiré de [2; 3])

Phase précoce	Phase intermédiaire	Phase tardive
<ul style="list-style-type: none"> - Oublis concernant des faits récents - Difficulté pour communiquer (trouver des mots) - Se perd dans des endroits familiers - Perte de la notion du temps (heure, mois, année, saison) - Difficulté à prendre des décisions, à gérer ses finances - Difficulté à réaliser des tâches complexes - Humeur et comportement : <ul style="list-style-type: none"> - moins actif, baisse de la motivation, perte d'intérêt dans les loisirs - changement d'humeur, dépression, anxiété - colère ou agressivité inhabituelles 	<ul style="list-style-type: none"> - Oublis importants, concernant les faits récents, les noms des gens - Difficulté de compréhension du temps, des dates, des lieux ; se perd à la maison - Difficultés croissantes de communication (discours et compréhension) - Besoin d'aide pour les soins personnels (toilette, habillage) - Incapable de préparer, cuisiner sa nourriture, de faire les courses, le ménage - Incapable de vivre seul sans aide - Changement de comportement incluant déambulations, questions répétées, troubles du sommeil, hallucinations - Comportement inapproprié à la maison ou en communauté (désinhibition, agression) 	<ul style="list-style-type: none"> - Inconscient du temps et du lieu - Difficulté de compréhension de l'environnement - Incapable de reconnaître ses proches, des objets familiers - Incapable de manger sans assistance - Besoins accrus d'aide pour la toilette - Incontinence - Trouble de la marche, incapacité à se déplacer, confiné au lit ou au fauteuil - Modifications du comportement : agressivité envers les soignants, agitation non-verbale - Incapable de trouver son chemin dans sa maison

Cette évolution peut être très variable d'un individu à l'autre, certaines personnes évoluant très vite vers la troisième phase, d'autres plus lentement.

1.3 Épidémiologie (tiré de [4])

En 2050, on estime que la population âgée de plus de 60 ans sera de 2 milliards dans le monde.⁵ Or, le diagnostic de démence est le plus souvent porté chez une personne âgée. Une conséquence négative du vieillissement de la population est donc l'augmentation du nombre

de cas de démences. Les études épidémiologiques sont donc importantes afin d'estimer au mieux, la prévalence, l'incidence et les principaux facteurs de risque de démence.

1.3.1 Prévalence

1.3.1.1 Démences du sujet âgé

À l'échelle mondiale, une première estimation de la prévalence et de l'incidence des démences a été réalisée en 2005 sur la base d'une revue de la littérature existante et d'un consensus d'experts obtenu par méthode Delphi.⁶ Une revue de la littérature récente réalisée par Alzheimer's Disease International en 2009² a permis de mettre à jour ces données selon les régions définies par le projet Global Burden of Diseases (GBD).⁷ Pour certaines de ces régions, le nombre et la qualité des études étaient devenus suffisants pour permettre la réalisation de méta-analyses.

La figure 1.1 représente la prévalence des démences chez les personnes âgées de plus de 60 ans dans les régions GBD après standardisation sur la population d'Europe de l'Ouest. Dans la plupart des zones GBD, la prévalence est comprise entre 5% et 7% avec un minimum de 2.07% pour la zone « Afrique Sub-saharienne, Ouest » et un maximum de 8.50% pour la zone « Amérique Latine ».

Comme attendu, la prévalence augmente exponentiellement avec l'âge dans chaque région. Elle est multipliée par deux pour chaque augmentation de l'âge de 5.5 ans dans les zones « Pacifique, Asie », « Amérique Latine » et « Amérique du Nord », de 5.6 ans dans la zone « Asie, Est », de 6.3 ans dans les zones « Asie, Sud » et « Europe, Ouest » et de 6.7 ans dans les zones « Australasie » et « Asie, Sud-Est ».

Il existe également une différence liée au genre avec en général une diminution de la prévalence comprise entre 19% et 29% chez les hommes comparé aux femmes.

L'application de ces chiffres de prévalence aux données disponibles sur la population

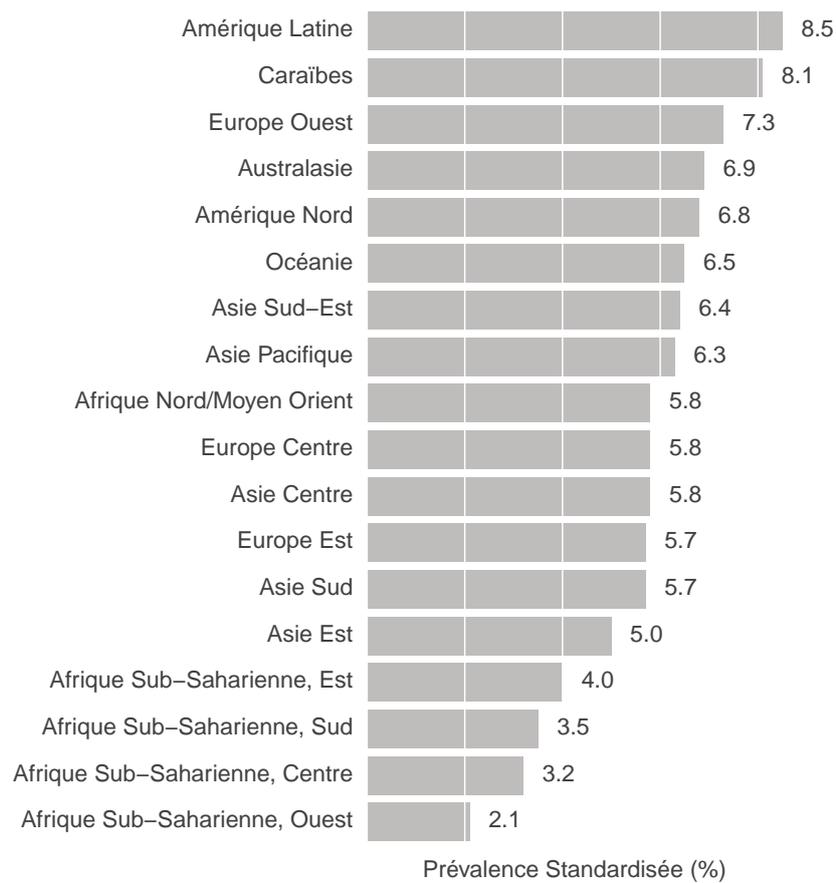


FIGURE 1.1 – Prévalence estimée des démences chez les personnes âgées de 60 ans et plus, standardisée sur la population d'Europe de l'Ouest, selon les régions GBD

mondiale permet d'estimer le nombre de personnes atteintes de démence. En 2010, 35.6 millions de personnes sont atteintes de démence dans le monde. En faisant l'hypothèse d'une prévalence stable durant les prochaines années, le nombre de personnes atteintes de démence sera de 65.7 millions en 2030 et de 115.4 millions en 2050.

1.3.1.2 Démence précoce

La démence peut survenir avant l'âge de 65 ans mais de façon beaucoup plus rare. En conséquence, les études de prévalence sur les démences précoces sont rares et ne permettent pas la réalisation de méta-analyses. Une revue de la littérature portant sur la prévalence des démences précoces a été réalisée en 2006 par le groupe European Collaboration on Dementia (EuroCoDe).⁸ Comme pour les formes tardives, la prévalence des formes précoces de démence augmente avec l'âge, doublant tous les cinq ans de 9/100000 à 30 ans à 156/100000 pour la tranche d'âge 60-64 ans. Les deux tiers des cas ont 55 ans ou plus. Les hommes sont prédominants dans ce sous-groupe, avec un ratio de 1.7 hommes pour 1 femme.

Les cas de démence précoce étant souvent recrutés dans des centres spécialisés, la prévalence de ces formes est vraisemblablement sous-estimée. Ceci est conforté par un travail réalisé en population dans la cohorte de Rotterdam, où la prévalence estimée des démences est de 423/100000 dans la tranche d'âge 55-59 ans et de 418/100000 dans la tranche d'âge 60-64 ans.⁹ Ainsi les formes précoces de démence pourraient représenter 6 à 9% de l'ensemble des cas de démences.

1.3.1.3 Sous-types de démence

Le diagnostic des sous-types de démence se base sur l'utilisation d'un ensemble de moyens diagnostiques (clinique, biomarqueurs, imagerie, neuropsychologie. . .) dont la disponibilité peut être variable d'une étude à l'autre. De plus, les limites entre ces pathologies sont floues et les formes mixtes pourraient être plus fréquentes que les formes pures, surtout entre ma-

l'adieu d'Alzheimer et d'émence vasculaire¹⁰ et entre maladie d'Alzheimer et d'émence à corps de Lewy. Par ailleurs, les lésions associées à la maladie d'Alzheimer se développent sur une longue période de temps et la relation entre leur sévérité et la présence (ou l'absence) d'un syndrome d'émence n'est pas claire. D'autres pathologies, cérébrovasculaires par exemple, pourraient avoir une grande importance dans l'expression clinique des d'émences.

Il faut donc rester prudent quant aux résultats des études quantifiant la proportion des sous-types de d'émence. Une revue de la littérature réalisée par Dementia UK¹¹ met en évidence que la d'émence frontotemporale est assez fréquente parmi les formes précoces, en particulier chez les hommes de moins de 55 ans où elle est la forme la plus fréquente. La d'émence vasculaire est également plus fréquente chez les hommes âgés de 40 à 75 ans. Alors que la proportion de maladie d'Alzheimer est relativement constante chez les femmes, entre 40 et 60% quel que soit l'âge, celle-ci augmente régulièrement chez les hommes, de 20% à 30 ans à 70% à 95 ans et plus.

1.3.2 Incidence

Une revue de la littérature sur l'incidence des d'émences a été réalisée par l'OMS.⁴ De même que la prévalence, l'incidence des d'émences augmente exponentiellement avec l'âge. Pour l'ensemble des données, l'incidence double avec chaque augmentation de 5.9 ans d'âge, de 3.1/1000 personne-années pour la tranche d'âge 60-64 ans à 175/1000 personne-années pour la tranche d'âge 95 ans et plus. Appliqués aux chiffres de population, on estime à 7.7 millions le nombre de nouveaux cas de d'émences par an, dont 2.3 millions en Europe.

1.3.3 Impact des démences

1.3.3.1 Part attribuable du risque

Dans un rapport de *Dementia UK*, les risques relatifs disponibles dans EURODEM sont utilisés pour calculer la proportion de décès attribuable aux démences selon l'âge.¹¹ Chez les hommes, cette proportion s'élève de 2% à l'âge de 65 ans à 18% entre 85 et 89 ans pour une proportion globale de 10% chez les hommes de 65 ans et plus. Chez les femmes, ces proportions sont de 1%, 23% et 15%, respectivement.

1.3.3.2 Mortalité associée

La présence d'une démence affecte l'espérance de vie et le risque de décès. Une étude américaine de la Cardiovascular Health (CHS) Cognition Study retrouve une survie médiane à partir du début de la démence de 7.1 ans (intervalle de confiance (IC) à 95% : 6.7–7.5) chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer, de 3.9 ans (IC95% : 3.5–4.2) pour la démence vasculaire et de 5.4 ans (IC95% : 5.2–6.0) pour les démences mixtes, comparé à 11 ans (IC95% : 10.5–11.7) chez des témoins appariés sans trouble cognitif.¹² Dans une autre étude américaine, la survie moyenne retrouvée à partir du diagnostic de maladie d'Alzheimer était de 5.9 ans (déviations standard : 3.7).¹³ Une méta-analyse retrouve un risque relatif de décès de 2.63 (IC95% 2.17–3.21) chez les personnes démentes comparé aux personnes non-démentes.¹⁴ Les études du groupe EURODEM rapportent un risque relatif constant de 2.38 jusqu'à l'âge de 89 ans, suivi d'une diminution après 90 ans avec 1.80 chez les femmes et 1.60 chez les hommes.

1.3.3.3 Invalidité et dépendance

Un des indicateurs les plus utilisés pour quantifier l'impact d'une maladie est le nombre de DALYs (disability adjusted life years), somme du nombre d'années de vie perdues (YLL, years

of life lost) et du nombre d'années de vie vécues avec une invalidité (YLD, years lived with disability). En 2004, les démences représentent 0.7% des DALYs dans le monde tous âges confondus et 4.2% chez les personnes âgées de 60 ans et plus.⁷

1.3.3.4 Économique

Le coût des démences pour la société au niveau mondial est estimé à 604 milliards de dollars par an.⁴ Ce coût est supporté à la fois par les structures de soins et par les proches.

1.3.4 Facteurs de risque modifiables

Les études sur les facteurs de risques concernant avant tout la maladie d'Alzheimer, on se réfèrera à la section 2.5.

2

Maladie d'Alzheimer

2.1 Diagnostic

La maladie d'Alzheimer est classiquement définie comme une entité double, clinique et anatomopathologique. Historiquement, ces deux entités sont séparées, l'examen anatomopathologique n'étant accessible qu'après la mort du patient et étant le seul capable d'établir un diagnostic de certitude. Le diagnostic clinique est donc probabiliste et se fait en deux temps — objectivation de l'atteinte des fonctions cognitives puis diagnostic étiologique — et implique une collaboration entre de nombreux acteurs de santé (médecin généraliste, neurologue, gériatre, orthophoniste, psychologue, etc.) et l'utilisation de plusieurs outils d'évaluation.

2.1.1 Outils diagnostiques

2.1.1.1 Entretien

L'entretien avec le patient et/ou un accompagnant proche permet de reconstituer l'histoire de la plainte et de rechercher des antécédents médicaux (antécédents familiaux de mala-

die d'Alzheimer, facteurs de risque cérébro-vasculaires par exemple). Il permet également d'évaluer un éventuel retentissement sur les activités quotidiennes.¹⁵

L'étude de l'historique du patient retrouve une détérioration progressive de la mémoire et des autres fonctions cognitives ainsi que de la capacité à effectuer les tâches de la vie quotidienne.¹⁶

2.1.1.2 Examen clinique

L'examen clinique recherche avant tout la présence de comorbidités et une anomalie de l'examen neurologique, faisant évoquer une cause autre que celle de maladie d'Alzheimer.¹⁵

L'utilisation d'échelles standardisées comme le Mini-Mental State Examination¹⁷ (MMSE) pour les fonctions cognitives globales, la Blessed Dementia Scale pour les symptômes cliniques ou la Hamilton Depression Scale pour la sévérité de la dépression permettent de quantifier l'atteinte des fonctions supérieures et de préciser l'examen clinique.¹⁶

2.1.1.3 Évaluation fonctionnelle

L'évaluation fonctionnelle du patient fait appel aux échelles d'activités instrumentales de la vie quotidienne.

2.1.1.4 Évaluation psychique et comportementale

L'entretien doit rechercher une dépression, qui peut parfois se présenter sous l'aspect d'un syndrome démentiel, mais surtout peut accompagner ou inaugurer un syndrome démentiel. Cet entretien peut être structuré à l'aide d'échelles telles que la Geriatric Depression Scale (GDS).

L'entretien doit apprécier le comportement du patient pendant l'examen et en situation de vie quotidienne, en recherchant des troubles affectifs, comportementaux ou d'expression psychiatrique (troubles du sommeil, apathie, dépression, anxiété, hyperémotivité, irritabilité,

agressivité, hallucinations, idées délirantes, etc.), qui peuvent être observés dans le cadre d'une maladie d'Alzheimer ou d'une maladie apparentée. Cet entretien peut être structuré à l'aide d'échelles telles que le NeuroPsychiatric Inventory ou l'échelle de dysfonctionnement frontal.

2.1.1.5 Évaluation neuropsychologique

Au cours de l'évolution, les patients atteints de maladie d'Alzheimer présentent une perte progressive de la mémoire des faits récents, suivi par des troubles du langage, des praxies ou de la perception visuelle. Dans les critères diagnostiques, l'évaluation neuropsychologique est envisagée principalement pour la confirmation du diagnostic de démence mais un potentiel intérêt pour l'identification de profils particuliers est cependant noté.¹⁶

2.1.2 Présentation clinique

Le processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer s'étend sur plusieurs années voire plusieurs décennies. L'expression clinique coïncide et évolue avec le niveau de mort neuronale. Les symptômes sont souvent regroupés en deux entités cliniques distinctes : syndrome démentiel et trouble cognitif léger (mild cognitive impairment, MCI). Ces deux entités sont non-spécifiques de la maladie d'Alzheimer et de nombreuses études se sont attachées à identifier les profils relevant d'une maladie d'Alzheimer de ceux relevant d'autres causes de démences.

2.1.2.1 Syndrome démentiel

Le diagnostic de maladie d'Alzheimer reste historiquement associé à celui d'un syndrome démentiel dont il est la cause principale chez le sujet âgé. Le diagnostic clinique est donc d'abord celui d'une démence dont les caractéristiques font ensuite évoquer le diagnostic de

maladie d'Alzheimer. Les critères principalement utilisés jusqu'à présent ont été ceux définis par le National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke et l'Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA).¹⁶ Ils ont été récemment mis à jour par le National Institute of Aging et l'Alzheimer's Association (NIA-AA) pour tenir compte de l'évolution des connaissances sur les autres causes neurodégénératives de démence, la temporalité du processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer, l'existence de formes atypiques de maladie d'Alzheimer et l'utilisation potentielle de biomarqueurs¹⁸ (cf. appendice B). Le diagnostic de certitude de la maladie d'Alzheimer ne pouvant être fait que post-mortem, le diagnostic clinique de maladie d'Alzheimer reste probabiliste. Il se fait en deux temps successifs : diagnostic de syndrome démentiel et recueil d'éléments en faveur de démence liée à un processus physiopathologique de type Alzheimer. Ces éléments permettent le cas échéant de poser le diagnostic de maladie d'Alzheimer probable ou possible.

2.1.2.2 Mild cognitive impairment (MCI)

Le MCI correspond à une atteinte objectivable des fonctions cognitives chez une personne, sans que cette atteinte soit suffisamment importante pour impacter sur les tâches de la vie quotidienne. Le diagnostic peut être fait grâce aux critères définis par Petersen et collaborateurs¹⁹⁻²¹ et par le NIA-AA²² (cf. appendice C). Néanmoins la limite entre variation normale de la cognition et MCI et entre MCI et démence n'est pas toujours facile à établir et fait appel au sens clinique du médecin.

2.1.3 Diagnostic différentiel

Un certain nombre de situations peuvent être à l'origine d'un trouble cognitif ou de son aggravation :

- Complication iatrogène
- Prise de toxique
- Dépression
- Anxiété
- Maladie infectieuse (syphilis, maladie de Lyme, SIDA, etc.)
- Maladie inflammatoire
- Trouble métabolique ou carenciel (hyponatrémie, hypercalcémie, hypothyroïdie, hyperglycémie chronique, hypovitaminose B1 et B12)
- Maladie cardio-vasculaire
- Insuffisance rénale
- Processus expansif intracrânien (hématome sous-dural, hydrocéphalie, etc.)
- Apnées du sommeil

Leur recherche est importante car des traitements adaptés et mis en place rapidement peuvent améliorer voire normaliser les troubles cognitifs.

2.2 Biomarqueurs

L'impossibilité de faire un diagnostic de certitude du processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer du vivant du patient ont amené au développement de biomarqueurs spécifiques utilisables in vivo. Ces biomarqueurs peuvent être classés selon leur nature (imagerie, biologie, neuropsychologie), selon le processus de la maladie d'Alzheimer qu'ils mesurent

Marqueurs du dépôt amyloïde	Marqueurs de mort neuronale
PIB PET scan	18-F FDG PET scan
Dosage d'A β dans le LCR	IRM cérébrale
	Augmentation de tau dans le LCR

Tableau 2.1 – Biomarqueurs intégrés dans les derniers critères diagnostiques de maladie d'Alzheimer

(marqueurs du dépôt amyloïde, marqueurs de la mort neuronale) ou selon leur topographie (cerveau, LCR, sang).²³

Ces marqueurs ont plusieurs utilisations. Tout d'abord, à visée diagnostique, ils apportent des éléments supplémentaires pour affirmer qu'un syndrome démentiel ou un MCI a pour origine un processus physiopathologique de type Alzheimer. Malgré le manque de consensus sur les seuils, la séquence ou l'éventuelle combinaison de biomarqueurs à utiliser, ceux ayant été les mieux étudiés ont été intégrés dans les critères diagnostiques de démence et MCI liés à la maladie d'Alzheimer^{18;22;24;25} et sont détaillés dans le tableau 2.1. Ainsi, en cas de biomarqueurs informatifs, trois stades de vraisemblance sont définis (haute, intermédiaire, peu vraisemblable) et peuvent se combiner aux diagnostics de maladie d'Alzheimer probable, possible ou MCI.

Dans un but de recherche, l'étude longitudinale de l'évolution des biomarqueurs chez des sujets sains permettrait de mieux connaître la séquence d'évènements menant à la mort neuronale et à l'expression clinique de la maladie. Une récente étude s'est ainsi attachée à reconstituer sur plusieurs dizaines d'année l'évolution des différents biomarqueurs connus avant et après la survenue des signes cliniques chez des sujets porteurs de mutations autosomiques dominantes pour la maladie d'Alzheimer.²⁶

Les biomarqueurs peuvent également être utilisés pour sélectionner plus finement des sujets en vue d'une inclusion dans un essai thérapeutique. En effet, l'inclusion de personnes démentes ou MCI à cause d'une autre cause que la maladie d'Alzheimer dans un essai thé-



FIGURE 2.1 – Aspect macroscopique du cerveau dans la maladie d'Alzheimer. Tiré de [28]

rapéutique ciblant spécifiquement celle-ci peut expliquer les résultats décevants des récents essais thérapeutiques.²⁷ Une autre explication possible est que le MCI ou la démence correspondent à des processus physiopathologiques irréversibles et à des lésions cérébrales trop avancées pour espérer un quelconque bénéfice du traitement.

Ainsi, à terme, on peut envisager l'utilisation de biomarqueurs chez des sujets sains afin de sélectionner les sujets les plus à risque et leur proposer un traitement ou tout autre intervention à but préventif.

2.3 Anatomopathologie

2.3.1 Lésions macroscopiques

L'examen macroscopique retrouve un profil typique d'atrophie corticale prédominant sur les lobes temporaux internes et épargnant les cortex moteur primaire, sensoriel et visuel chez un patient dément (cf. figure 2.1). En conséquence, les cornes temporales des ventricules latéraux peuvent apparaître dilatées. Ces observations peuvent être retrouvées du vivant du patient sur l'IRM cérébrale.^{29;30}

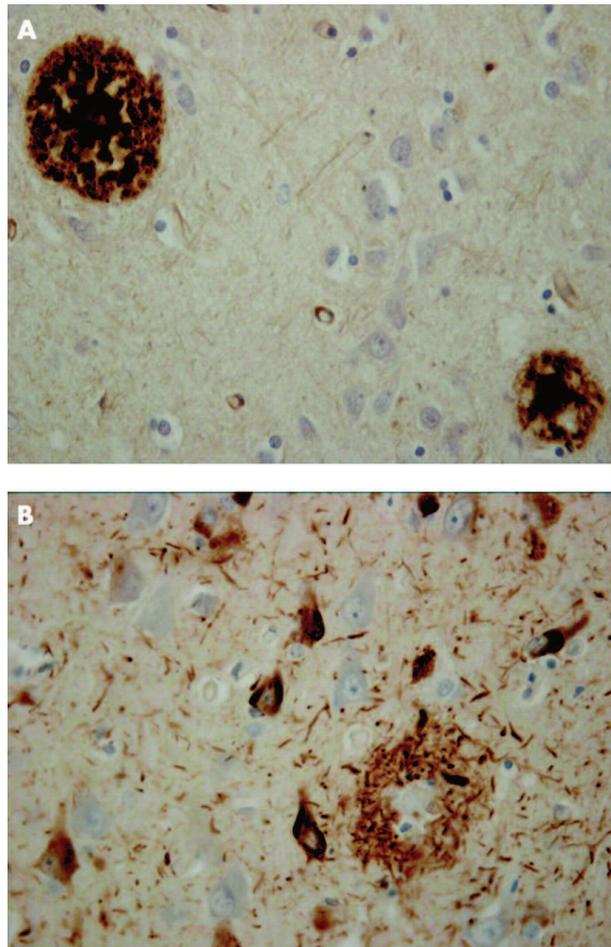


FIGURE 2.2 – Principales lésions anatomopathologiques de la maladie d'Alzheimer : (A) Plaques amyloïdes, (B) Dégénérescences neurofibrillaires. Tiré de [31]

2.3.2 Lésions microscopiques

2.3.2.1 Plaques amyloïdes

Les plaques séniles décrites par Aloïs Alzheimer résultent de l'accumulation et du dépôt extracellulaire anormal des peptides amyloïdes beta ($A\beta$) à 40 ou 42 acides aminés ($A\beta_{1-x-40}$ et $A\beta_{1-x-42}$), deux produits normaux du métabolisme de la protéine précurseur du peptide amyloïde (amyloid precursor protein, APP) après son clivage séquentiel par les enzymes β - et γ -secrétases dans les neurones (cf. figure 2.2 A et section 2.4.1.1 pour plus de détail). À cause de leur taux de fibrillation et de leur insolubilité, les formes $A\beta_{1-x-42}$ sont plus abondantes que

$A\beta_{1-x-40}$ dans les plaques.

La classification la plus utilisée distingue deux types de plaques amyloïdes, diffuse et à coeur dense. Cette classification est pertinente car contrairement aux plaques diffuses, les plaques denses ont des effets délétères sur le neuropile environnant (neurites dystrophiques, pertes synaptiques et neuronales, recrutement et activation d'astrocytes et de cellules microgliales). Les plaques diffuses sont fréquemment retrouvées dans les cerveaux de sujets âgés normaux alors que les plaques denses, surtout accompagnées de neurites dystrophiques, sont plus fréquemment retrouvées chez les patients ayant une démence de type Alzheimer.

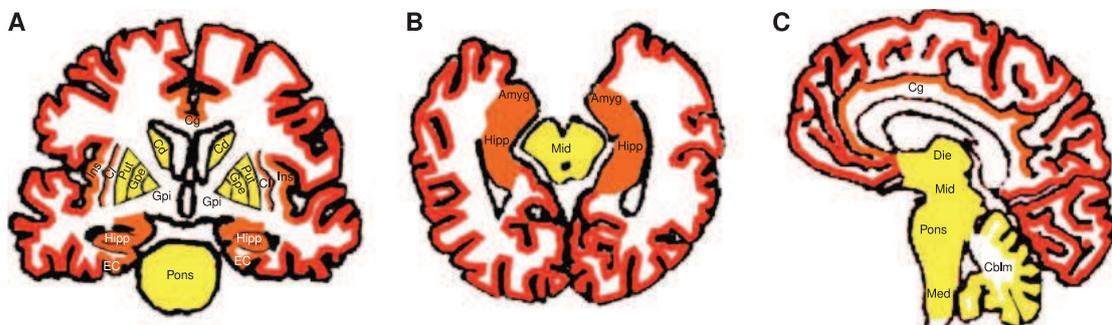


FIGURE 2.3 – Répartition spatiotemporelle des plaques amyloïdes (tiré de [32])

Les plaques amyloïdes s'accumulent principalement dans l'isocortex (cf. figure 2.3). Bien que le schéma de progression spatiotemporel des plaques soit moins prévisible que celui des dégénérescences neurofibrillaires, l'allocortex (cortex entorhinal, hippocampe), les ganglions de la base, les noyaux du tronc cérébral et le cervelet sont impliqués plus tard et dans une moindre mesure que l'isocortex associatif. La dissociation entre plaques amyloïdes et dégénérescences neurofibrillaires est particulièrement notable dans le lobe temporal interne. Malgré cette relative imprévisibilité, des classifications ont été proposées pour mesurer l'importance de la progression des plaques.^{33;34}

Les études clinicopathologiques ont montré que la charge amyloïde (plaques totales, diffuses ou denses) n'était pas corrélée à la sévérité ou la durée de la démence.³⁵ En effet, dans une région de dépôt amyloïde précoce telle que l'isocortex associatif temporal, la

charge amyloïde atteint un plateau peu de temps après le début des symptômes cognitifs ou même dans la phase préclinique de la maladie³⁶ et la taille des plaques n'augmente pas significativement avec la progression de la maladie.³⁷ Cependant, il est possible que la quantité d'amyloïde mesurée sur l'ensemble du manteau cortical augmente pendant l'évolution clinique de la maladie à mesure que la distribution des plaques s'étend selon les phases précédemment décrites, ce qui est supporté par des résultats d'imagerie amyloïde chez des patients vivants.³⁸

2.3.2.2 Dégénérescence neurofibrillaire (DNF)

Composition. La première description de la dégénérescence neurofibrillaire (DNF) est faite par Aloïs Alzheimer, qui la décrit comme des inclusions filamenteuses situées dans le pericaryon des neurones pyramidaux³⁹ (cf. figure 2.2 B). La DNF est principalement composée de paires de filaments appariés en hélices (paired helical filaments, PHFs). Ces filaments, d'un diamètre de 10 nm forment des paires ayant une conformation tridimensionnelle hélicoïdale d'une périodicité régulière d'environ 65 nm. Le composant principal de ces filaments est la protéine τ , habituellement associée aux microtubules, et qui est ici anormalement hyperphosphorylée. Les PHFs sont également observés dans les neurites en dégénérescence dans le neuropile et à la périphérie des plaques amyloïdes. Selon leur morphologie, trois stades sont décrits : Pré-DNF ou DNF diffuse, DNF mature intraneuronale et DNF extraneuronale (fantôme neuronal).

La répartition spatio-temporelle de la progression de la DNF est stéréotypée et prévisible.^{34;40;41} La DNF commence dans l'allocortex du lobe temporal interne (cortex entorhinal et hippocampe) et s'étend dans l'isocortex associatif, épargnant relativement les aires primaires motrices, sensibles et visuelles. Braak distingue 6 stades de progression de la DNF (cf. figure 2.4).

De nombreuses études ont montré que la quantité et la distribution des DNFs étaient

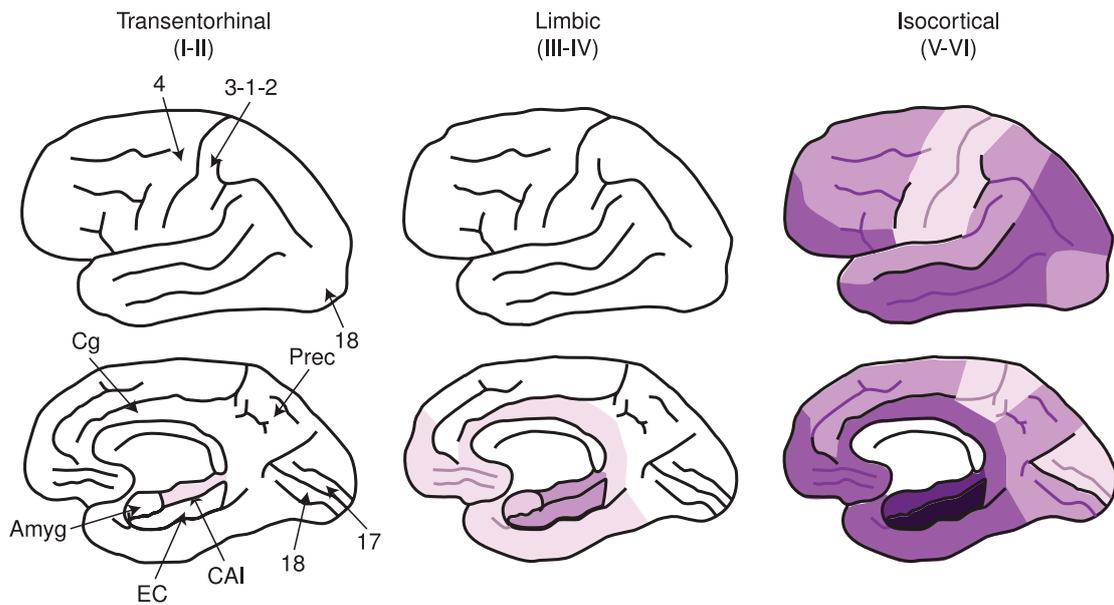


FIGURE 2.4 – Répartition spatiotemporelle de la dégénérescence neurofibrillaire (tiré de [32])

corrélées à la sévérité et la durée de la démence.³⁵ De plus la distribution spatio-temporelle assez spécifique des DNFs correspond à l'évolution typique du profil neuropsychologique du syndrome démentiel de type Alzheimer.

L'atteinte initiale de la mémoire épisodique caractéristique de la maladie d'Alzheimer s'explique par l'isolement des structures du lobe temporal interne de l'isocortex associatif et des noyaux sous-corticaux en raison de la dégénérescence neurofibrillaire massive.

Ensuite, l'implication des aires associatives isocorticales explique l'atteinte progressive des fonctions cognitives — fonctions exécutives (cortex préfrontal), apraxies (cortex pariétal), navigation visuospatiale (cortex occipitopariétal), visuoperceptive (cortex occipitotemporal) et mémoire sémantique (cortex temporal antérieur) — formant le syndrome démentiel complet.

L'atteinte tardive des aires isocorticales primaire motrices, sensibles et visuelles expliquent que les fonctions associées soient épargnées.

2.3.2.3 Autres lésions

Angiopathie amyloïde cérébrale. Le peptide amyloïde ne se dépose pas uniquement dans le parenchyme cérébral sous forme de plaques amyloïdes mais également dans les vaisseaux sous forme d'angiopathie amyloïde cérébrale (AAC). Les constituants principaux de l'AAC sont les formes $A\beta_{1-x-40}$ lesquelles s'accumulent principalement dans l'interstitium entre les cellules musculaires lisses de la media. Bien que l'AAC puisse être isolée, on la retrouve plus souvent dans un contexte de maladie d'Alzheimer, environ 80% des patients Alzheimer présentant une AAC à des degrés divers à l'autopsie.

Selon les critères de Boston, l'AAC devrait être suspectée après une ou plusieurs hémorragies lobaires symptomatiques chez un sujet âgé.⁴² Dans le contexte de la maladie d'Alzheimer, et seulement si elle devient symptomatique suite à une complication hémorragique, l'AAC est souvent diagnostiquée à l'autopsie. Cependant, des études longitudinales post-mortem ont montré qu'une AAC apparemment asymptomatique pouvait contribuer au déclin cognitif de la maladie d'Alzheimer.⁴³⁻⁴⁶

Réponses gliales. Des astrocytes et cellules microgliales activés sont souvent associés aux plaques amyloïdes à coeur dense, indiquant que $A\beta$ est un déclencheur important de cette réaction gliale.⁴⁷⁻⁴⁹ Cependant une augmentation linéaire des astrocytes et cellules microgliales activées a été observée au cours de l'évolution de la maladie malgré un plateau précoce du dépôt amyloïde dans l'isocortex associatif temporal. Une corrélation a été retrouvée entre ces cellules et la charge en dégénérescence neurofibrillaire mais pas avec la charge amyloïde, suggérant que la réaction gliale est également liée à la DNF.^{36;50}

Perte neuronale. La perte neuronale est le substrat anatomopathologique principal de l'atrophie corticale. Le schéma régional et laminaire de la perte neuronale correspond à celui de la DNF mais dans une même région, les pertes neuronales sont plus importantes que le nombre de DNFs, et sont mieux corrélées au déficit cognitif que le nombre de DNFs.^{51;52}

Cette dissociation entre l'étendue des pertes neuronales et des DNFs suggère deux mécanismes de mort neuronale dans la maladie d'Alzheimer : un affectant les neurones en DNFs et un autre affectant les neurones sans DNFs.

Perte synaptique. À côté de la perte neuronale, la perte synaptique est un autre contributeur de l'atrophie cérébrale observée chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer. Le schéma régional et laminaire de perte synaptique correspond à celui de la perte neuronale. La perte synaptique est causée par la perte neuronale mais peut être plus importante que celle-ci dans une aire corticale donnée. Ceci indique que la perte synaptique précède la perte neuronale et que les neurones restant sont moins bien connectés entre eux qu'attendu au vu de leur nombre. Ceci explique que la densité synaptique est le marqueur le plus corrélé au déclin cognitif de la maladie d'Alzheimer.^{36;53-58}

2.3.3 Critères diagnostiques en anatomopathologie

Les plaques amyloïdes et les DNFs restent les lésions les plus caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. Le diagnostic anatomopathologique se base donc sur leur quantité et leur distribution.

Les critères de diagnostic anatomopathologique de la maladie d'Alzheimer actuellement utilisés ont été défini en 1997.⁵⁹ Ils associent un score semiquantitatif de plaque neuritique défini par le CERAD (Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease) et le score de DNF de Braak et Braak des DNFs pour établir trois catégories diagnostiques : (1) vraisemblance élevée, (2) intermédiaire, et (3) faible. Un diagnostic de maladie d'Alzheimer est posé quand la vraisemblance est élevée ou intermédiaire et que le patient présente une histoire clinique de démence.

Ces critères prennent en compte l'évaluation d'autres pathologies, notamment les atteintes cérébrovasculaires et les maladies à corps de Lewy, en raison de la prévalence élevée

des atteintes mixtes en cas de démence chez le sujet âgé.^{43;60} Ainsi les critères NIA-RI (National Institute of Aging and the Reagan Institute) de probabilité intermédiaire de maladie d'Alzheimer ne sont pas seulement basés sur une charge et une distribution modérée des lésions caractéristiques de maladie d'Alzheimer mais aussi sur la coexistence de lésions vasculaires ou de corps de Lewy suffisantes pour participer au syndrome démentiel du patient.

2.4 Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer

Les mécanismes de la maladie d'Alzheimer sont encore méconnus.

Le peptide amyloïde beta ($A\beta$) est le principal constituant des plaques amyloïdes cérébrales⁶¹ et sa production est augmentée dans les formes familiales de maladie d'Alzheimer⁶² et dans la trisomie 21 dans laquelle la survenue d'une démence est quasi-systématique après l'âge de 40 ans.⁶³

Ces observations ont placé le peptide $A\beta$ et son agrégation au centre du processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer en tant qu'élément initiateur.^{64;65}

Néanmoins, la relation entre cette agrégation l'apparition de la démence ne semble pas directe et d'autres mécanismes participent à la souffrance puis à la mort neuronale. Cette séquence d'évènements définit la cascade amyloïde.

Dans cette section nous insisterons sur le métabolisme et les rôles physiologiques et pathologiques des peptides $A\beta$. Nous mentionnerons également les autres mécanismes physiopathologiques, notamment l'hyperphosphorylation de la protéine tau.

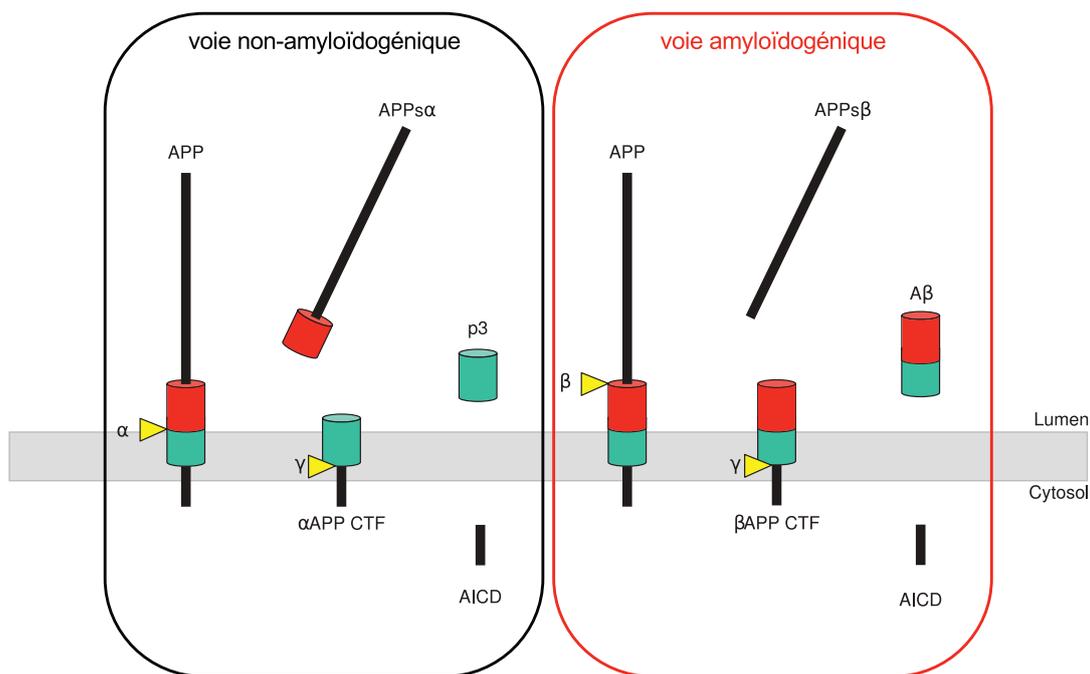


FIGURE 2.5 – Protéolyse de l'APP dans les voies non-amyloïdogénique (gauche) et amyloïdogénique (droite). Tiré de [66]

2.4.1 Métabolisme des peptides A β

2.4.1.1 Synthèse des peptides A β

La production du peptide A β est le résultat du clivage physiologique du précurseur du peptide amyloïde (Amyloid Peptid Precursor, APP).^{66;67} APP est une protéine transmembranaire de type 1 avec un large domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire simple et un court segment cytoplasmique.

Son métabolisme passe par deux voies principales, la voie amyloïdogène, responsable de la production du peptide A β , et la voie non-amyloïdogène. Les deux voies sont en compétition l'une avec l'autre. Ainsi, favoriser la voie non-amyloïdogène est une piste thérapeutique pour diminuer la production d'A β .

Dans la voie non-amyloïdogène, APP est clivé par deux protéases de la famille ADAM (ADAM 10 et ADAM 17) portant une activité α -secrétase, la principale étant ADAM 10, pour

produire la forme soluble, sAPP α , et CTF α . Ce dernier est clivé à son tour par la γ -secrétase pour produire le peptide p3 et le domaine intracellulaire de l'APP (AICD) (cf. figure 2.5). La voie non-amyloïdogène représente la voie principale dans les fibroblastes et les lignées cellulaires non-neurales (HEK293).

Dans la voie amyloïdogène, APP est d'abord clivé par BACE1 qui porte une activité β -secrétase, menant à la sécrétion de la forme soluble des ectodomains, sAPP β et un fragment carboxy-terminal, CTF β . Ce dernier est ensuite clivé par un complexe protéique composé de la préséniline 1 ou 2, de la nicastrine, de APH-1a ou APH-1b et de PEN-2 et portant une activité γ -secrétase pour produire le peptide A β et le domaine intracellulaire de l'APP (AICD). La variabilité du site de coupure par la γ -secrétase est à l'origine de plusieurs espèces de peptides A β de longueurs différentes, dont les plus fréquentes sont A β 40 et A β 42. Ces différences de longueurs sont associées à des différences dans les propriétés physico-chimiques des peptides A β .

APP et BACE1 sont ubiquitaires mais avec une forte expression dans le cerveau, ce qui explique que le cerveau soit le lieu principal de production d'A β . Néanmoins, il est possible que la production périphérique de peptides A β ait une influence sur leurs concentrations dans le cerveau.

2.4.1.2 Dégradation des peptides A β

Une fois synthétisés, les peptides A β peuvent être dégradés par de nombreuses protéases.⁶⁸ Ces protéases agissent dans différents compartiments intra- et extra-cellulaires et potentiellement à distance des sites de production des peptides A β . Cette dégradation est catalytique et irréversible, ce qui souligne l'importance de cette voie d'élimination dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer et son potentiel en tant que voie thérapeutique.

FIGURE 2.6 – Transport et clairance des peptides A β (tiré de [69])

2.4.1.3 Transport et élimination des peptides A β

En plus de la dégradation catalytique, les peptides A β peuvent être éliminés via d'autres mécanismes associant transport actif ou passif et clairance médiée par des cellules (cf figure 2.6).⁶⁹⁻⁷¹

Un mécanisme d'échange important a lieu au niveau de la barrière hématoencéphalique et associe RAGE (receptor for advanced glycation end products (RAGE)) et LRP-1 (low-density lipoprotein receptor-related protein-1). Ce couple régule l'influx et l'efflux des peptides A β cérébraux.

Les apolipoprotéines E et J sont également impliquées dans le transport des peptides A β hors du cerveau en se liant directement avec ces derniers et via une interaction avec LRP-1 et LRP-2.

Une fois dans le plasma, les peptides A β peuvent se lier à de nombreuses molécules (albumine, HDL, apolipoprotéine E. . .). Les formes solubles de LRP-1 jouerait un rôle important dans ce transport plasmatique. Les peptides A β sont ensuite éliminés au niveau du foie et des reins.

2.4.2 Fonctions physiologiques de l'APP et des peptides A β

Les fonctions physiologiques de l'APP sont difficiles à étudier en raison des nombreux produits actifs issus de sa dégradation et du fait qu'APP fait partie d'une famille de gènes incluant APP-like 1 et 2 (APLP1 et 2) dont les fonctions se recoupent.⁷²⁻⁷⁴ Les formes monomériques des peptides A β ainsi que sAPP α partagent des propriétés de stimulation de la formation des neurites, de neuroprotection et de stimulation de la croissance des progéniteurs neuronaux. sAPP β a également des propriétés neurotrophiques similaires à sAPP α . Le fragment intracellulaire AICD est lui impliqué dans la signalisation cellulaire et l'apoptose. Enfin, diverses autres propriétés ont été décrites à concentrations physiologiques (antioxy-

dante, antimicrobienne, vasoconstrictrice et modulatrice de l'agrégation plaquettaire).⁷⁵⁻⁷⁹

2.4.3 Rôle des peptides A β dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer

Selon l'hypothèse de la cascade amyloïde, l'agrégation des peptides A β sous forme d'oligomères toxiques est l'évènement déclencheur du processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer. La constitution des plaques amyloïdes est un marqueur de ce processus d'agrégation pathologique et dépend de nombreux paramètres. En effet, les différentes espèces de peptides A β ont des propriétés d'agrégation différentes et forment un ensemble hétérogène sensible à des variations qualitatives ou quantitatives. À partir des formes monomériques de peptides A β , plusieurs étapes complexes d'agrégation mènent à la formation des plaques amyloïdes. Parmi tous ces intermédiaires, l'identification précise des formes neurotoxiques est difficile et leur impact sur la perte neuronale reste à démontrer.⁸⁰

Les mécanismes de toxicité des oligomères de peptides A β semblent liés à des mécanismes spécifiques (liaison à des récepteurs) et à une toxicité plus générale, liée à leur capacité à se lier aux protéines et aux lipides membranaires.

Si l'agrégation pathologique des peptides A β est considérée comme l'évènement initial de la cascade amyloïde, d'autres mécanismes sont ensuite impliqués⁸¹ :

- Hyperphosphorylation de tau⁸²⁻⁸⁴
- Inflammation⁸⁵⁻⁸⁷
- Lésions vasculaires^{69;88;89}
- Action de l'apolipoprotéine E⁹⁰⁻⁹⁴

2.5 Facteurs de risque modifiables

Retarder l'apparition de la maladie d'Alzheimer ne serait-ce que d'un an permettrait de diminuer fortement sa prévalence.⁹⁵

Les revues systématiques et méta-analyses résultats suggèrent que la réserve cognitive — un concept combinant les bénéfices de l'éducation, du travail et des activités intellectuelles — une activité physique régulière, l'obésité chez les personnes d'âge moyen, la consommation d'alcool et le tabagisme sont les plus importants facteurs modifiables de maladie d'Alzheimer.^{96;97} Les accidents vasculaires cérébraux, le diabète et l'hypercholestérolémie et l'hypertension chez les personnes d'âge moyen sont eux associés à un risque augmenté de maladie d'Alzheimer. Selon une autre étude, 50% des cas de maladie d'Alzheimer dans le monde pourrait être prévenu par la suppression de sept facteurs de risque : diabète, hypertension et obésité chez les personnes d'âge moyen, dépression, sédentarité, tabagisme et bas niveau d'éducation.⁹⁸ Néanmoins, l'étude des facteurs de risque associés au risque de maladie d'Alzheimer est complexe et difficile.⁹⁹ Ainsi de récentes études concluent à l'insuffisance de preuve concernant l'association entre hypertension et maladie d'Alzheimer.^{100;101}

Plus généralement, une synthèse réalisée par le National Institutes of Health (NIH) dont les résultats sont résumés dans le tableau 2.2 conclut à l'insuffisance de preuve quant à l'efficacité d'une intervention pour l'ensemble des facteurs de risque modifiables étudiés jusqu'à présent.^{102;103} En conséquence, aucune mesure de prévention ne peut être proposée à l'heure actuelle.¹⁰⁴

Ces résultats soulignent la nécessité de poursuivre les études et notamment les études à plus haut niveau de preuve scientifique afin d'évaluer au mieux l'efficacité de mesures de prévention ciblant ces facteurs en terme de diminution du risque de maladie d'Alzheimer.

Tableau 2.2 – Synthèse des facteurs modulant le risque de maladie d'Alzheimer (tiré de [102])

Sens de l'association	Facteurs	Niveau de preuve
Augmentation du risque	Allèle $\epsilon 4$ de l'APOE	Modéré
	Association œstrogène conjugué équin / methyl-progestérone	Bas
	Certains anti-inflammatoires non-stéroïdiens	
	Dépression	
	Diabète de type 2	
	Hyperlipidémie en milieu de vie	
	Lésion cérébrale traumatique chez les hommes	
	Exposition aux pesticides	
	Jamais marié, bas support social	
Tabagisme actif		
Diminution du risque	Régime méditerranéen	Bas
	Acide folique	
	Inhibiteurs de la HMG-CoA reductase (statines)	
	Haut niveau d'éducation	
	Consommation basse à modérée d'alcool	
	Activités intellectuelles	
Activités physiques		
Pas d'association	Ginkgo Biloba	Élevé
	Vitamine E	Modéré
	Inhibiteurs de la cholinestérase	Bas
	Traitement antihypertenseur	
	Œstrogènes conjugués équins	
	Acides gras $\omega 3$	
	Vitamines B12, C, β -carotène	
	Homocystéine	
	Hypertension	
	Obésité	
	Syndrôme métabolique	
	Facteurs précoces de l'enfance	
	Catégorie socio-professionnelle	
Plomb		
Manque de preuves	Acide gras saturés	(Non applicable)
	Apport en fruits et légumes	
	Métaux	
	Apports caloriques élevés	
	Mémantine	
	Apnée du sommeil	
	Troubles anxieux	
	Résilience	
	Loisirs	
	Agent orange, syndrome de la guerre du Golfe	
	Solvants, aluminium	
Facteurs génétiques autres que APOE		

2.6 Génétique

2.6.1 Composante génétique de la maladie d'Alzheimer

Après l'âge, les antécédents familiaux de maladie d'Alzheimer représentent un des ses plus importants facteurs de risque. Le risque de développer la maladie d'Alzheimer est ainsi deux fois plus élevé chez les sujets apparentés au premier degré à des patients atteints de la maladie d'Alzheimer comparé au risque en population générale.¹⁰⁵ Dans une étude réalisée chez 11884 paires de jumeaux, l'héritabilité de la maladie d'Alzheimer est estimée entre 58% et 79%.¹⁰⁶ Ces résultats sont en faveur d'une composante génétique importante de la maladie d'Alzheimer.

2.6.2 Formes génétiques de la maladie d'Alzheimer

Sur le plan génétique, deux formes de maladie d'Alzheimer sont classiquement identifiées, même si en réalité, les différences sont loin d'être aussi marquées.

Les formes familiales représentent moins de 1% des cas de maladie d'Alzheimer. Elles sont caractérisées par un âge de survenue précoce, avant 60 ans, et un mode de transmission mendélien, autosomique dominant le plus souvent. Ces formes sont causées par des mutations rares, à pénétrance élevée, situées dans trois gènes, APP, PSEN1 et PSEN2 codant respectivement pour la protéine précurseur du peptide amyloïde et les présénilines 1 et 2 (cf. section 3.4.1).

Les formes dites « sporadiques » constituent la grande majorité des cas de maladie d'Alzheimer. Survenant après l'âge de 60 ans, ces formes n'ont pas de mode de transmission précis ni d'agrégation familiale. En raison de leur composante génétique supposée forte, on préfère actuellement parler de formes à mode de transmission complexe ou non-mendélien plutôt que de formes sporadiques. Leur survenue implique également une interaction avec

des facteurs environnementaux, bien que celle-ci reste difficile à établir.¹⁰⁷

L'identification de ces facteurs de risque génétique constitue un enjeu important à plusieurs titres : apporter de nouvelles connaissances sur la physiopathologie de la maladie, identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux modes d'intervention et développer de nouveaux marqueurs diagnostiques et de dépistage.

3

Identification des facteurs de risque génétique de maladies multifactorielles

3.1 Variations génétiques

Toute forme de vie est le produit de son code génétique. Celui-ci est supporté physiquement par la succession des bases composant l'acide désoxyribonucléique (ADN). La partie dite codante de l'ADN est transcrite en ARN qui est lui-même traduit en protéine. Toute altération, même mineure de ce code peut produire des modifications majeures dans un organisme. Même si ces variations représentent moins de 1% du génome humain, elles sont à l'origine de beaucoup de différences phénotypiques entre individus, comme la couleur des yeux et des cheveux, les groupes sanguins, etc. La plupart des polymorphismes influencent les caractéristiques normales des sujets ; certains peuvent également donner un avantage en terme de survie et d'adaptation ou moduler le risque de certaines maladies. L'analyse des variations de l'ADN est donc importante en biologie.

3.1.1 Mesures de la variabilité génétique

3.1.1.1 Variabilité en un point

Une mutation est une modification permanente survenant en un point, ou locus, du génome. Celle-ci peut se transmettre si elle touche les cellules germinales. Après une mutation, un locus peut donc se présenter sous plusieurs formes, ou allèles, dans la population. Une des mesures de la variabilité génétique d'une population est la fréquence allélique. Si la mutation est délétère, sa fréquence dans la population sera basse, en partie à cause de la sélection. Si les modifications ne sont pas trop importantes, la mutation pourra devenir fréquente dans la population. Quand la fréquence dans la population est supérieure à 1%, on parle de polymorphisme. Si la fréquence est inférieure à 1%, on parle de variant rare. En pratique, on parle souvent de variant ou de polymorphisme indifféremment de leur fréquence. Dans le cas d'un locus bi-allélique, on définit l'allèle le moins fréquent comme étant l'allèle mineur, et sa fréquence comme la fréquence de l'allèle mineur ou minor allele frequency (MAF).

Les humains étant diploïdes, ils possèdent deux allèles pour chaque locus, un d'origine paternelle et un d'origine maternelle, à l'exception des chromosomes sexuels. Un génotype se réfère à la combinaison des deux allèles sur un même locus. Si ce dernier est présent sous k formes alléliques dans une population, les individus peuvent être porteurs de $\frac{1}{2} \times k \times (k + 1)$ génotypes différents. Dans le cas d'un locus bi-allélique (allèles A et a), trois génotypes différents peuvent être envisagés : deux génotypes homozygotes, AA et aa, et un génotype hétérozygote, Aa. Pour caractériser la distribution des allèles dans les génotypes, on utilise la proportion d'individus hétérozygotes, ou hétérozygotie H . Si une population est composée de N individus dont N_H sont hétérozygotes, alors $H = \frac{N_H}{N}$.

Les fréquences génotypiques peuvent être déterminées à partir des fréquences alléliques, sous certaines hypothèses décrites dans le modèle de Hardy-Weinberg : taille de population infinie, absence de migration, sélection ou mutation et unions au hasard (panmixie). Dans

une population respectant les hypothèses 1 et 2, les fréquences alléliques ne varient pas au cours des générations. Une population vérifiant également la 3^e hypothèse est dite en équilibre de Hardy-Weinberg. Dans ce cas, les fréquences génotypiques ne dépendent que des fréquences alléliques et restent constantes d'une génération à l'autre. Ainsi, dans le cas d'un locus bi-allélique (allèles A et a) de fréquence p et $q = 1 - p$, les fréquences des génotypes AA, Aa et aa valent p^2 , $2pq$ et q^2 , respectivement. L'équilibre de Hardy-Weinberg peut également se tester statistiquement.

3.1.1.2 Variabilité en plusieurs points

Recombinaison En dehors des mutations, la fréquence des variations génétiques évoluent également grâce aux recombinaisons survenant pendant la méiose. Pendant cette phase, les chromosomes autologues s'apparient et peuvent s'échanger des segments d'ADN. Sur plusieurs générations, les segments des chromosomes ancestraux sont ainsi mélangés. Le taux de recombinaison est la probabilité qu'un tel évènement se produise et est proportionnel à la distance qui sépare deux loci.

Notion d'haplotype Un haplotype est une combinaison de plusieurs bases sur le même chromosome. Les haplotypes existent donc par paires. Souvent, les haplotypes sont des combinaisons de bases présentant des variations dans la population. À partir de m loci ayant chacun k_i allèles, on peut théoriquement former $\prod_{i=1}^m k_i$ haplotypes différents. Par exemple dans le cas de deux loci bi-alléliques M_A (allèles A et a) et M_B (allèles B et b), quatre haplotypes différents sont envisageables, AB, ab, Ab et aB. Si les allèles des loci sont répartis aléatoirement dans les gamètes, les loci sont dits en équilibre de liaison et les fréquences haplotypiques sont obtenues à partir des fréquences alléliques. Dans ce cas les fréquences haplotypiques sont égales au produit des fréquences alléliques des loci qui les constituent. Dans l'exemple précédent, si on définit les fréquences alléliques, p_A , p_a , p_B et p_b et que les

loci sont en équilibre de liaison, alors les fréquences haplotypiques f_{AB} , f_{Ab} , f_{aB} et f_{ab} se calculent comme suit :

$$\left\{ \begin{array}{l} f_{AB} = p_A p_B \\ f_{Ab} = p_A p_b \\ f_{aB} = p_a p_B \\ f_{ab} = p_a p_b \end{array} \right.$$

Déséquilibre de liaison Le déséquilibre de liaison (linkage disequilibrium, LD) caractérise l'association entre des allèles de deux ou plusieurs loci dans une population. Le LD décrit une situation où un haplotype survient plus ou moins souvent que ne le voudrait le simple hasard. Dans ce cas, les fréquences haplotypiques ne peuvent être estimées qu'en considérant conjointement les loci qui les composent. On peut alors mesurer l'écart par rapport à l'état d'équilibre et le LD se définit comme la différence entre les fréquences haplotypiques observées et celles attendues à l'équilibre. Dans la suite de notre exemple on pose :

$$\left\{ \begin{array}{l} D_{AB} = f_{AB} - p_A p_B \\ D_{Ab} = f_{Ab} - p_A p_b \\ D_{aB} = f_{aB} - p_a p_B \\ D_{ab} = f_{ab} - p_a p_b \end{array} \right.$$

On montre que $D_{AB} = -D_{aB} = -D_{Ab} = D_{ab} = D$. D est une mesure du LD. En pratique, elle est difficilement utilisable pour mesurer l'étendue du déséquilibre de liaison ou comparer l'intensité du déséquilibre de liaison selon les populations car cette mesure est fortement dépendante des fréquences alléliques. Deux mesures "normalisées" sont utilisées à la place : le D' de Lewontin et Kojima et le r^2 .

$$D' = \begin{cases} \frac{D}{\min(p_A p_B, p_a p_b)} & \text{si } D < 0 \\ \frac{D}{\min(p_A p_b, p_a p_B)} & \text{si } D \geq 0 \end{cases}$$

Le D' varie entre 1 et -1, valeurs correspondantes à un déséquilibre de liaison complet entre les loci.

$$r^2 = \frac{D^2}{p_A p_a p_B p_b}$$

Le r^2 varie entre 0 et 1 et correspond au coefficient de corrélation entre les allèles des deux loci. Le LD peut donc également être interprété en terme de prédiction. Si la connaissance d'un allèle à un locus permet de prédire l'allèle à un second locus, alors il y a déséquilibre de liaison entre les allèles. Sinon il y a équilibre de liaison.

Chaque mesure a ses avantages et inconvénients.¹⁰⁸ Le D' est lié à la recombinaison et est utile pour sélectionner un haplotype particulier. Cependant, il est dépendant des fréquences alléliques. Le r^2 est moins lié à la recombinaison mais meilleur en terme de prédiction et peut donc être utilisé pour sélectionner un variant parmi un ensemble de variants corrélés.

Le LD varie en fonction de la distance et du temps. En effet, les recombinaisons surviennent plus fréquemment entre deux positions éloignées qu'entre deux positions proches. La probabilité d'un évènement de recombinaison entre deux loci augmente également avec le temps, permettant ainsi un retour à l'équilibre de liaison. Néanmoins, si le LD n'était fonction que de la distance et du temps, la structure du génome devrait être régulière et l'ensemble des variations génétiques indépendantes entre elles. En 2002, Gabriel et collaborateurs suggèrent que les taux de recombinaison ne sont pas réguliers sur le génome mais qu'il existe des blocs haplotypiques, segments où la recombinaison est moins fréquente et où les loci sont donc en fort LD, entrecoupés de points chauds de recombinaison.¹⁰⁹ Ces structures de corrélation sont différentes entre populations en fonction de leur ancienneté

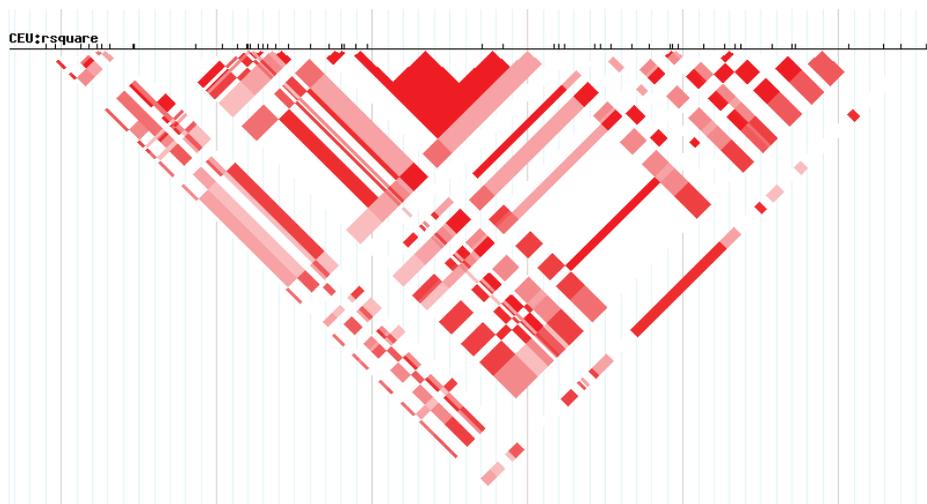


FIGURE 3.1 – Exemple de carte de déséquilibre de liaison

et de la survenue d'évènements modifiant la répartition des variations génétiques au sein de celles-ci, par exemple goulot d'étranglement en cas de famine, d'épidémie ou d'isolement d'une petite partie d'une population (effet fondateur). Des profils particuliers peuvent ainsi être établis entre populations européennes, africaines, asiatiques, etc.

L'étude de ces blocs haplotypiques nécessite de disposer de l'ensemble des mesures de LD entre chaque couple de loci constituant le bloc. La représentation tabulaire du LD entre un grand nombre de loci est difficile. Une façon habituelle de représenter un grand nombre de LD entre loci est d'utiliser des cartes de LD dans lesquelles la valeur du LD est remplacée par un code couleur. Un exemple est donné dans la figure 3.1 qui est centrée sur le gène de la lactase. Plus la couleur tend vers le rouge, plus le LD est important.

3.1.2 Marqueurs génétiques

L'étude de la variabilité génétique est liée à la notion de marqueur génétique. Les marqueurs génétiques sont des séquences d'ADN polymorphes dont la localisation sur le génome est connue. Plusieurs types de marqueurs existent, les plus utilisés étant des variations d'une base nucléotidique (Single Nucleotide Polymorphisms ; SNPs). En théorie, les SNPs peuvent

être observés sous quatre formes différentes, correspondant à chacune des quatre bases azotées qui composent l'ADN : A, C, G et T. Cependant, ils sont en grande majorité bi-alléliques dans les populations humaines. Ces polymorphismes sont répartis sur tout le génome et représentent la grande majorité des variations du génome humain : la base dbSNP qui les recense en compte actuellement près de 40 millions.¹¹⁰

Ces connaissances permettent la construction de cartes génétiques, dans lesquelles l'ensemble des marqueurs connus sont positionnés les uns par rapport aux autres grâce à une mesure de la distance, physique ou génétique, les séparant.

En pratique, il n'est pas nécessaire de génotyper l'ensemble des marqueurs. En effet, au sein d'un bloc haplotypique, l'information génétique peut être considérée comme redondante : si plusieurs SNPs sont en fort déséquilibre de liaison entre eux ($r^2 > 0.8$), la connaissance du génotype d'un seul est suffisante. Un SNP ainsi sélectionné dans un bloc haplotypique est appelé tagSNP car il porte une information sur l'ensemble du bloc. La sélection de tagSNPs permet la définition de panels de marqueurs utilisés en routine dans de nombreuses applications.

Grâce aux progrès techniques initiés entre 2000 et 2005, le génotypage de ces marqueurs est devenu plus fiable et moins coûteux. Cela a permis le développement de panels très denses de SNPs, composés aujourd'hui de près de 5 millions de SNPs et offrant une bonne couverture de l'ensemble du génome.

3.2 Stratégies d'identification des facteurs de risque génétique

L'épidémiologie génétique a pour but d'identifier les facteurs de risque génétique des maladies humaines. Les premiers d'entre eux ont été découverts pour des maladies dites monogéniques ou mendéliennes, c'est-à-dire liées à la présence d'une mutation dans un seul gène.

Aujourd'hui, les études portent également sur des maladies dites multifactorielles résultant de la combinaison complexe de facteurs multiples, à la fois génétiques et environnementaux. Ce sont les maladies humaines les plus fréquentes, comme l'asthme, le diabète, les maladies cardiovasculaires, les maladies psychiatriques ou la maladie d'Alzheimer.

Pendant longtemps, le schéma classique d'identification des gènes associés aux maladies a été le suivant :

- Recherche d'arguments en faveur du caractère héritable de la maladie (agrégation familiale, étude de jumeaux, facteurs génétiques décrits sur des modèles animaux de maladie proche de la maladie étudiée, existence de groupes de familles dans lesquelles une mutation dans un seul gène a été identifiée comme facteur nécessaire et suffisant au développement de la maladie)
- Analyses de ségrégation permettant d'établir le mode de transmission le plus probable (dominant, récessif, etc), le nombre gènes attendus et la pénétrance via l'analyse de données familiales
- Analyse de liaison pangénomique réalisée sur des données familiales
- Génotypage des régions identifiées par analyse de liaison ou des gènes candidats contenus dans celles-ci dans un nombre plus important de familles ou en population et réalisation d'une étude d'association
- Si des gènes sont trouvés, caractérisation de ces derniers (modèles animaux)

3.2.1 Études de liaison génétique

Par définition, des individus apparentés ont des corrélations génétiques fortes, mesurables entre autres par les coefficients d'apparentement. De plus, lorsque des variations du génome

sont facteurs de risque pour une maladie, elles induisent une corrélation entre les statuts cliniques des apparentés dans les familles.

Le but de l'analyse de liaison génétique est de localiser un ou des gènes impliqués dans une maladie dans une région chromosomique via l'étude de la ségrégation conjointe entre un ou plusieurs marqueurs et la maladie. À partir de données familiales, elle permet de tester l'indépendance de transmission entre les marqueurs et la maladie dans les familles et, si ce n'est pas le cas, de localiser le locus maladie par rapport aux marqueurs. En effet, si le locus maladie est proche d'un marqueur, ce dernier se transmet préférentiellement avec la maladie dans les familles. Montrer que la transmission de ces deux loci est liée permet donc de positionner approximativement le locus maladie sur le génome grâce à la localisation connue du marqueur.

Le caractère familial des données implique un petit nombre d'évènements de recombinaison. En conséquence, la résolution de ce type d'étude est faible et les régions chromosomiques identifiées peuvent potentiellement contenir des centaines de gènes. Par ailleurs, cette stratégie est efficace pour les maladies dont la pénétrance suggère un modèle mendélien simple, c'est-à-dire où des mutations peu fréquentes sur un seul gène ou un petit nombre d'entre eux ont un effet fort sur le risque de maladie dans la population (p.ex. maladie de Huntington, mucoviscidose, certaines formes de cancers du sein, etc). Pour des maladies complexes — où un grand nombre de gènes à effets modestes interagissent entre eux et avec l'environnement — cette approche est beaucoup moins puissante.

3.2.2 Études d'association génétique

Les études d'association comparent la distribution des allèles ou des génotypes de marqueurs génétiques chez des individus malades et témoins d'une population de sujets non apparentés. On s'attend en effet à ce que la fréquence d'un variant impliqué dans une maladie soit significativement différente dans l'échantillon de malades comparativement aux témoins. La

détection d'une association entre un marqueur et la maladie suggère que le marqueur est soit directement impliqué dans la maladie (variant causal), soit en déséquilibre de liaison avec un variant causal. En effet, en cas de déséquilibre de liaison entre ces deux loci, la variation génétique du marqueur est corrélée à celle du variant fonctionnel. Les études d'association sont réalisées dans la plupart des cas à partir de méthodes utilisées en épidémiologie classique : test du χ^2 , test de rapport de vraisemblance ou régression logistique par exemple.

Ce type d'étude a été initialement limitée par les coûts et les capacités du génotypage. Les premières études d'association ont donc été réalisées en complément des études de liaison, avec des variants situés dans un pic de liaison génétique et à proximité de gènes dont la fonction supposée suggérait leur implication dans le développement de la maladie. On parle alors de stratégie « gène candidat ».

À partir de 2005, les connaissances apportées dans les modèles génétiques et la structure du génome humain et les progrès réalisés dans les techniques de génotypage ont permis la réalisation d'études d'association pangénomiques à des coûts raisonnables.¹¹¹ Ces dernières, mieux adaptées à la recherche de variants fréquents supposés impliqués dans les maladies multifactorielles, ont remplacé les analyses de liaison pour la recherche de loci d'intérêt dans les maladies complexes.

3.3 Études d'association pangénomiques

3.3.1 Contexte

3.3.1.1 Modèle maladie fréquente, variant fréquent

Deux articles fondateurs publiés en 1996 sont à l'origine de l'intérêt et de l'utilisation des études d'association pangénomiques.^{112;113} Le but est alors de déterminer les caractéristiques des variants génétiques impliqués dans les maladies multifactorielles. En effet, les premiers

facteurs de susceptibilité génétique identifiés pour ces maladies, tel APOE dans le cas de la maladie d'Alzheimer, ont des caractéristiques différentes des mutations rares impliquées dans les maladies monogéniques (cf. section 3.4.2). De plus, les études de liaison se sont révélées décevantes pour beaucoup de maladies multifactorielles.

L'article de Risch suggère que l'échec de cette approche est prévisible si les variants recherchés sont des variants fréquents ($MAF > 10\%$). L'hypothèse est donc faite que les maladies fréquentes sont liées à des variants fréquents et que ces derniers seront plus facilement détectés en utilisant des études d'association en population plutôt que des études de liaison.

En effet, les études d'association permettent d'avoir une puissance plus grande que les études de liaison pour des variants fréquents. De plus, pour des variants associés à une modulation du risque faible à modérée, seule une étude d'association est possible. En effet, les effectifs nécessaires pour obtenir une puissance statistique équivalente dans une étude de liaison seraient de l'ordre du million de sujets.

Ces calculs de puissance sont basés sur un nombre important de marqueurs. L'utilisation de cartes denses de SNPs basées sur le déséquilibre de liaison est proposée pour limiter le nombre de SNPs nécessaires tout en assurant une couverture complète du génome. Ces pré-requis sont techniquement hors de portée en 1996. Néanmoins, l'hypothèse « maladie fréquente, variant fréquent » (“Common Disease Common Variant”) prend forme et entraîne des réorientations stratégiques en vue de rendre possible la réalisation d'études d'association pangénomiques.

3.3.1.2 Identification des variants fréquents : le projet Hapmap

Lancé en octobre 2002, le projet HapMap a pour objectif d'identifier les polymorphismes fréquents présents sur le génome ainsi que les structures de déséquilibre de liaison entre ces polymorphismes afin d'aider à la planification et à l'analyse des études génétiques sur les maladies humaines.¹¹⁴ Un des buts recherchés est de permettre la réalisation d'études

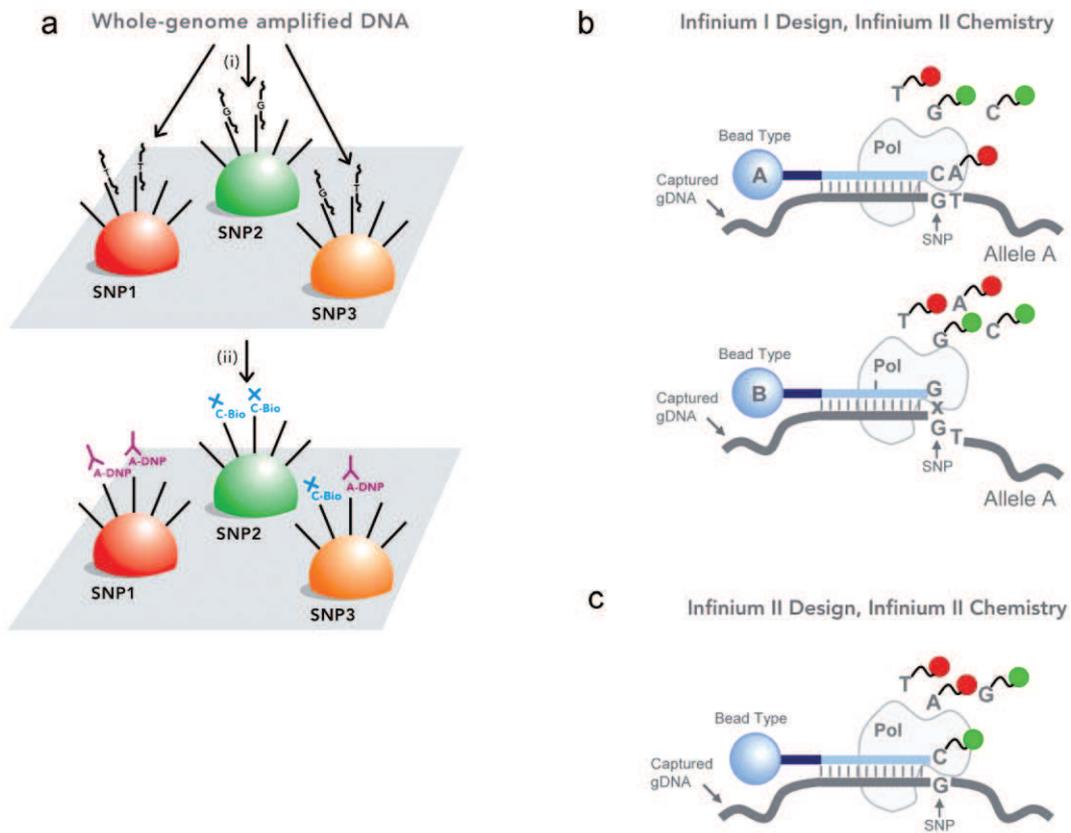
pangénomiques grâce à la sélection de tagSNPs sur l'ensemble du génome.

L'objectif initial est de génotyper 1 million de SNPs de MAF > 5% chez 269 individus appartenant à 4 populations différentes, européenne, africaine, chinoise et japonaise. En complément, une étude plus exhaustive sur certaines régions du génome (régions ENCODE) par séquençage est réalisée. Les SNPs identifiés dans ces régions sont ensuite génotypés dans l'ensemble de l'échantillon HapMap. L'objectif est atteint en 2005.¹¹⁵

Les principaux résultats étendent les connaissances sur la structure du génome à l'ensemble de celui-ci. Ainsi, le LD est hétérogène sur l'ensemble du génome, les événements de recombinaison survenant dans 80% des cas dans des points chauds de recombinaison. Par ailleurs, des millions de nouveaux SNPs sont identifiés et la faisabilité des études d'association pangénomiques est démontrée. Le projet HapMap se poursuit avec la publication régulière de nouvelles cartes des blocs haplotypiques.^{116;117} Plus récemment, ces efforts ont été rejoints par le projet 1000 Genomes.^{118;119}

3.3.1.3 Puces de génotypage

Les résultats du projet HapMap ont ouvert un marché à long terme pour les études pangénomiques, ce qui a stimulé l'industrie et a permis une amélioration des techniques de génotypage et une diminution des coûts. Le génotypage utilisé dans les études pangénomiques se base sur les puces à ADN et des technologies comme Infinium et BeadArray¹²⁰ développées par la compagnie Illumina¹²¹ (cf. figure 3.2). Le coût du génotypage d'un SNP est passé de 1 dollar par échantillon en 2001 à 0.05 dollar en 2008. Actuellement, le coût du génotypage de 2.5 millions de SNPs coûte environ 500 dollars par échantillon, soit 0.0002 dollar par SNP.



(a) Technologie Infinium

(b) Technologie BeadArray

(c) Exemples de puces

FIGURE 3.2 – Exemple de technologies utilisées dans le génotypage à haut débit (tiré de [120])

Tableau 3.1 – Choix et contraintes dans la conception d’une étude pangénomique

Choix		Contrainte
Puissance maximale	↔	Coût
Taille d’échantillon	↔	Limite supérieure (temps et coût)
Quels SNPs géotyper	↔	Disponibilité des puces commerciales
Analyses statistiques	↔	

3.3.2 Conception

Une étude d’association pangénomique est une étude cas-témoin réalisée dans une population de sujets non apparentés. Le but est d’identifier les loci dont la fréquence allélique est significativement différente entre cas et témoins. En ce sens, elle diffère peu de l’approche gène candidat. Ses spécificités sont liées à son caractère de recherche systématique, sans à priori, de loci associés aux maladies et au grand nombre de marqueurs génétiques testés qui en découle.

Certaines contraintes résumées dans le tableau 3.1 doivent être prises en compte dans la conception d’une étude d’association pangénomique.¹²² L’étude doit être conçue en terme d’effectifs et de couverture du génome afin d’assurer une puissance statistique suffisante à la détection de variants fréquents ayant un effet modeste. Ces choix sont contrebalancés par les limitations imposées par les effectifs disponibles, le coût du génotypage et les panels de marqueurs utilisés dans les puces commerciales. Le volume de données à analyser et l’équipement informatique peuvent également limiter le choix des analyses statistiques.

3.3.2.1 Collecte des échantillons

La première étape d’une étude pangénomique consiste à collecter des échantillons adéquats, le plus souvent des cas et des témoins. Si le trait est quantitatif, un tirage au sort en population ou la sélection des valeurs extrêmes d’une distribution peuvent être envisagés.

Assurer une puissance statistique suffisante est un enjeu capital des études d’association

pangénomiques. Celle-ci dépend de la taille d'effet et de la fréquence allélique du variant fonctionnel, paramètres inconnus avant la réalisation de l'étude. L'effet et la fréquence attendues du variant causal peuvent être estimées par les études antérieures. Par exemple, pour un variant causal ayant un odds ratio de 1.25 et une MAF de 40%, une erreur de type I $\alpha = 5 \times 10^{-7}$ et un marqueur ayant un LD = 0.8, 3125 cas et 3125 témoins sont nécessaires pour obtenir une puissance de 80%. De plus, il est vraisemblable que le variant fonctionnel recherché ne soit pas génotypé sur les puces commerciales. On utilise donc un SNP en déséquilibre de liaison ce qui diminue d'autant plus la puissance et augmente la taille de l'échantillon requis par un facteur proportionnel à l'inverse de la corrélation, mesurée par le r^2 , entre le marqueur et le variant causal. Cette corrélation dépend également de la couverture du génome par la plateforme de génotypage utilisée.

La sélection des échantillons se fait normalement lors de la conception de l'étude. Cependant, les impératifs de puissance statistique imposant une taille d'étude importante, on utilise l'ensemble des échantillons à disposition. En conséquence, la gestion de certains problèmes spécifiques des études d'association génétique est transférée à la partie « analyse » de l'étude. Le plus important d'entre eux est la structure de la population. Celle-ci survient quand la population d'étude est composée de sous-populations entre lesquelles il y a peu d'unions. Dans ce cas, des différences de fréquences alléliques peuvent survenir au hasard entre les sous-populations. Si les sous-populations ne sont pas échantillonnées également chez les cas et les témoins (p.ex. une population est sous-représentée chez les témoins, l'autre sur-représentée chez les cas), tous les loci qui diffèrent en terme de fréquence allélique entre ces sous-populations pourront apparaître comme associés avec le risque de maladie. L'échantillonnage différentiel peut survenir à cause d'une mauvaise conception de l'étude, de variations aléatoires, ou parce qu'une sous-population a une incidence plus élevée de maladie (pour des raisons culturelles, environnementales ou génétiques). Par exemple, en Europe, les unions ont tendance à survenir dans des zones géographiques restreintes, ce

qui peut entraîner des variations dans les fréquences alléliques. Si celles-ci sont trop petites pour avoir affecté les études réalisées jusqu'ici, elles pourraient être à l'origine de faux positifs si on s'intéresse à des variants ayant des effets faibles. Un appariement devrait donc être réalisé au moins par pays et si possible, sur des zones géographiques plus petites. Ceci implique une information sur l'origine des sujets contenue dans les bases plus précise que, par exemple, « de descendance européenne ». Néanmoins, des techniques existent pour détecter la stratification et en tenir compte dans les analyses.

L'enrichissement génétique consiste en la sélection de cas qui présentent en plus de la maladie considérée, d'autres caractéristiques à forte composante génétique, comme un âge d'apparition plus bas, des antécédents familiaux, ou une forme plus grave de la maladie. L'avantage de cette méthode est un gain de puissance statistique. Néanmoins, les inconvénients sont nombreux. L'information est plus difficile à retrouver et souvent de moins bonne qualité. Le gain de puissance attendu est donc contrebalancé par la taille plus faible des échantillons. De plus, rien ne garantit que la caractéristique considérée apporte un enrichissement génétique. Enfin, la généralisation des résultats peut être compromise.

3.3.2.2 Génotypage

Une fois que les échantillons ont été collectés, l'étape suivante est de les génotyper. Après traitement du signal, les résultats des puces indiquent pour chaque SNP, le génotype des individus en terme d'intensité des deux allèles du SNP. Si on représente graphiquement les deux intensités pour tous les individus, on voit apparaître, dans le meilleur des cas, trois groupes correspondant aux génotypes (deux homozygotes, un hétérozygote) (cf. figure 3.3). L'utilisation de « calling algorithms » permet d'attribuer un génotype aux groupes définis par l'intensité.^{123;124}

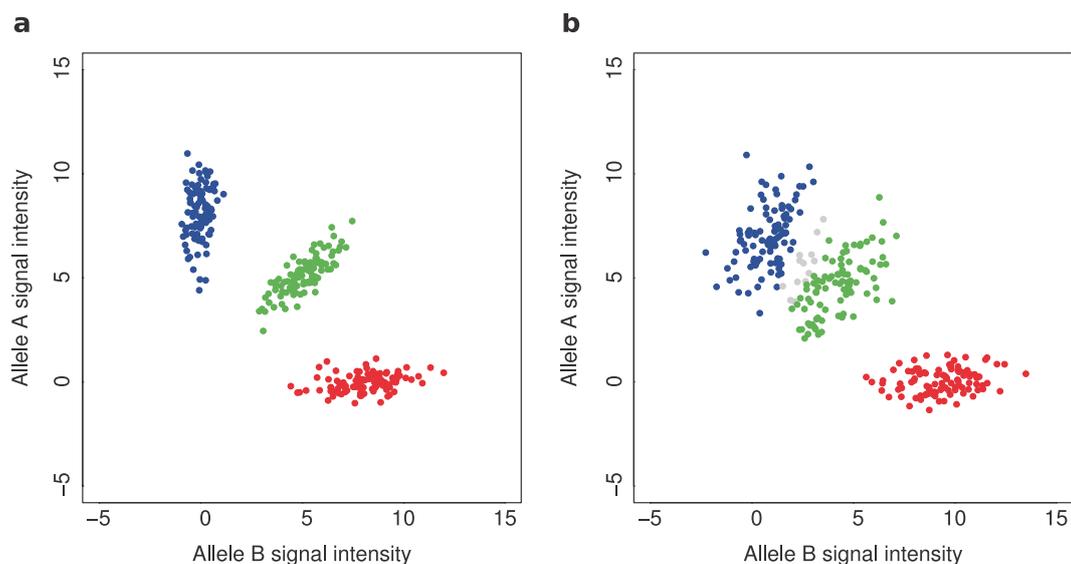


FIGURE 3.3 – Exemple de graphe d’intensité. (a) Les trois génotypes apparaissent distinctement et l’algorithme attribue correctement les génotypes. (b) En raison de leur proximité, une partie des groupes AA et AB est classée en données manquantes par l’algorithme (en gris). Tiré de [125]

3.3.2.3 Contrôle qualité

De nombreux problèmes, d’ordre technique ou statistique, peuvent être à l’origine de résultats faussement positifs et perturber la détection des marqueurs génétiques associés à la maladie considérée. Ces problèmes étaient déjà connus dans les études d’association gènes candidats mais ont été exacerbés par la taille des études d’association pangénomiques. Afin de limiter au maximum ces faux positifs, des critères qualité doivent être systématiquement appliqués.^{125–129} Les critères utilisés pour les SNPs visent à détecter d’éventuelles erreurs de génotypage. Les critères utilisés chez les individus cherchent à identifier une mauvaise qualité de l’ADN ou une structure cachée de la population (stratification, apparemment).

Contrôle qualité sur les SNPs.

- **Taux de données manquantes (Call Rate).** Les SNPs ayant un pourcentage élevé de données manquantes peuvent avoir une mauvaise qualité pour les données non

manquantes

- **Équilibre de Hardy-Weinberg (HWE).** Une déviation de l'HWE peut être observée en cas de stratification de la population, d'apparentement entre individus ou d'erreur de génotypage ce qui permet d'identifier des SNPs à problèmes. Une association positive entre un marqueur et une maladie pouvant être à l'origine d'un léger déséquilibre, des seuils de significativité très bas sont utilisés ($p < 1 \times 10^{-6}$)
- **Fréquence Allélique.**
 - Pour les SNPs ayant une MAF basse, l'attribution des génotypes par les algorithmes est plus difficile en raison des faibles effectifs potentiels dans les différentes catégories (le groupe homozygote pour l'allèle mineur peut être manquant et le groupe hétérozygote de faible taille) et le risque de données manquantes et d'erreurs de génotypage est plus élevé
 - Enfin, les SNPs ayant une MAF basse ne permettent pas d'obtenir une puissance statistique suffisante à leur détection
 - En conséquence, les SNPs ayant une MAF basse sont exclus des résultats
- Tout autre donnée à disposition (chronologie des plaques de génotypage ou différence de call rate entre cas et témoins par exemple) doit être utilisée en cas d'observation inhabituelle

Le contrôle qualité sur les SNPs peut se faire avant ou après l'analyse statistique. Les seuils choisis n'étant pas fixes, il est intéressant de faire une comparaison avant-après des résultats de l'analyse. Ceci peut être réalisé par l'utilisation de graphiques quantile-quantile qui comparent la distribution des statistiques de tests observée à celle attendue sous l'hypothèse nulle (cf. figure 3.4). Enfin, l'analyse des graphes d'intensité des SNPs les plus associés au trait d'intérêt permet de valider l'absence de problème d'attribution des génotypes.

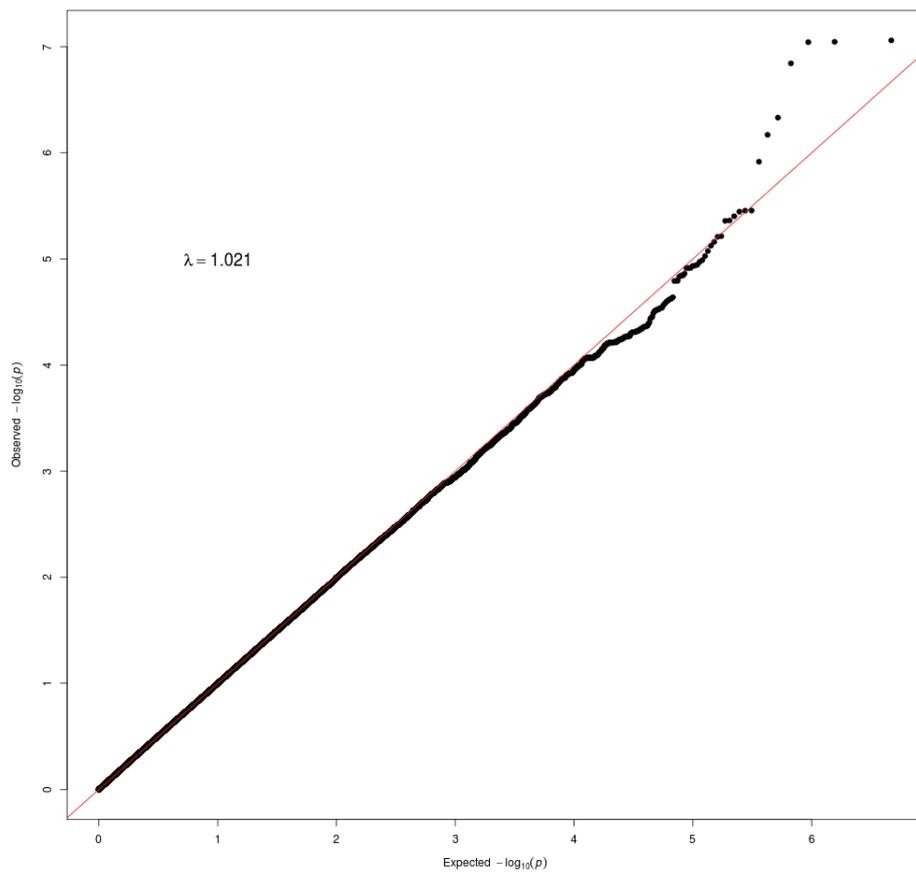


FIGURE 3.4 – Exemple de diagramme quantile-quantile

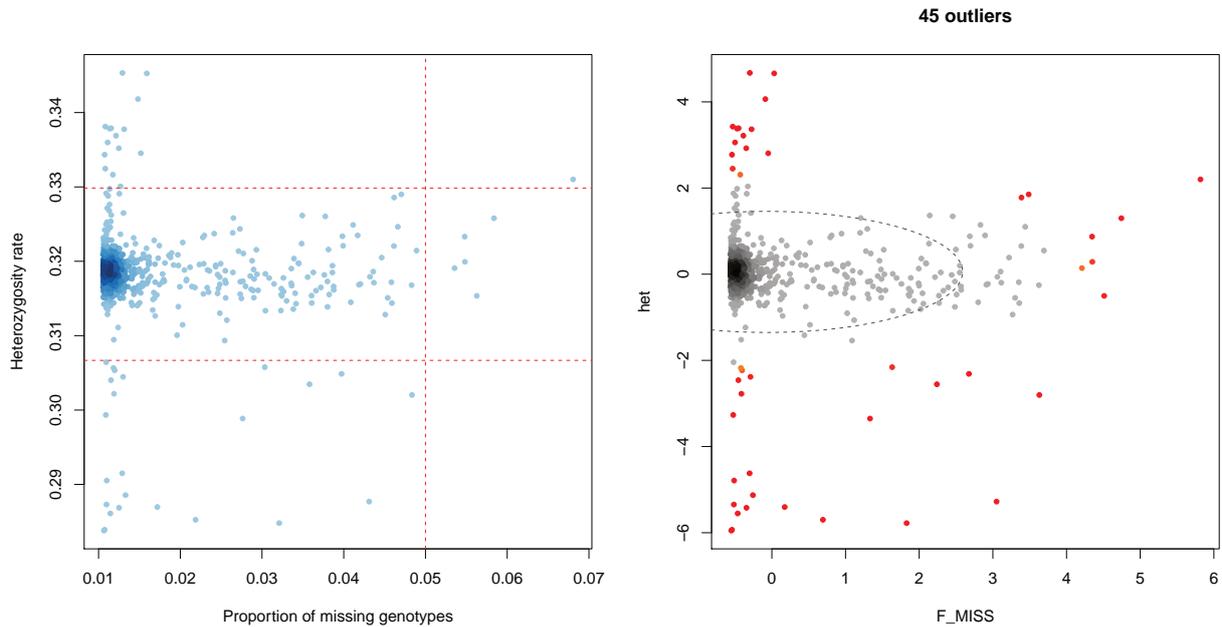


FIGURE 3.5 – Exemple de sélection des sujets basée sur le taux d’hétérozygotie et le taux de données manquantes

Contrôle qualité chez les individus. Une mauvaise qualité de l’ADN peut être suspectée en cas de valeurs anormales de mesures comme le taux de génotypes manquants par individu ou le taux d’hétérozygotie par individu (cf. figure 3.5). Le contrôle du sexe des individus se fait via la comparaison des informations entre données cliniques et données génétiques. L’apparement entre individus peut s’estimer à partir de scores de proximité génétique.

Comme mentionné section 3.3.2.1, une sous-structure de la population peut entraîner des faux positifs. Un contrôle de cette stratification est idéalement réalisé lors de la constitution de l’échantillon. Néanmoins, il n’est pas toujours possible d’apparier sur le groupe ethnique ou la situation géographique. De plus, une stratification n’est pas identifiable via les données phénotypiques et doit être recherchée dans les données génétiques.

La méthode la plus simple est de tester l’équilibre de Hardy-Weinberg mais la capacité de ce test à détecter une stratification modeste est faible. Un excès de résultats significatifs représentés sur un graphe quantile-quantile peut également indiquer une stratification de

la population. Cette inflation est quantifiée par le λ .^{130;131} D'autres approches attribuent les individus à des sous-populations théoriques mais celles-ci supposent qu'il existe une stratification de la population, ce qui n'est pas toujours le cas. De plus, leur application requiert des moyens informatiques importants. L'approche la plus utilisée pour détecter une structure de population est l'analyse en composante principale (ACP). La population peut être combinée avec les données d'une population de référence — par exemple HapMap — ce qui permet d'obtenir un aperçu des grandes structures de population (européenne, asiatique, africaine) (cf figure 3.6). L'ACP peut ensuite être utilisée pour détecter des structures plus fines de population. Ces mesures permettent la prise en compte d'une structure de population dans les analyses statistiques, d'une part via l'exclusion d'une partie de la population avant analyse — par exemple, les études pangénomiques se sont surtout intéressées aux individus de descendance européenne et ont exclu les individus de descendance asiatiques et africaines — et d'autre part via l'ajustement sur les composantes principales dans l'analyse et la pondération des statistiques de test par le λ .

3.3.2.4 Analyse statistique

Les tests statistiques utilisés dans les études d'association pangénomiques peuvent être similaires à ceux utilisés en épidémiologie classique ou prendre en compte les spécificités des données génétiques. Pour les GWAS, le volume de données à analyser et l'équipement informatique disponible limitent souvent le choix aux tests les plus simples.

L'approche la plus couramment utilisée consiste en l'analyse individuelle de tous les SNPs disponibles. On considère souvent les allèles dans un modèle génétique additif. Dans ce cas, le nombre de copies d'un des deux allèles d'un SNP est utilisé en tant que variable quantitative, et testé par un test du χ^2 de tendance ou dans une régression logistique.

D'autres analyses sont possibles. Dans les GWAS, les signaux d'association significatifs sont situés dans des régions génétiques de petite taille. Les différents loci portant ces signaux

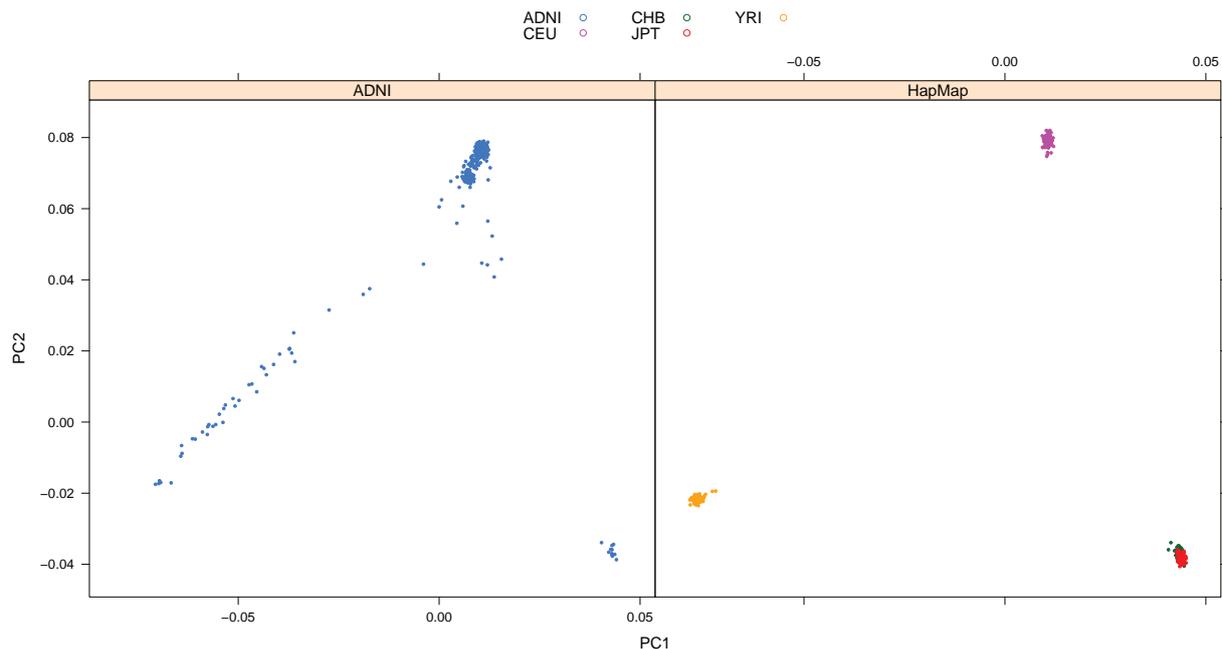


FIGURE 3.6 – Exemple d’ACP incluant les données Hapmap

sont souvent corrélés entre eux mais peuvent parfois être des variants causals indépendants. Le modèle multi-locus consiste à ajuster sur les SNPs significativement associés d’une même région pour tester l’indépendance entre loci. Néanmoins, l’inclusion de SNPs potentiellement corrélés entre eux peut poser des problèmes de colinéarité.

Les SNPs peuvent également être utilisés sous formes d’haplotypes. Les avantages par rapport à l’analyse d’un SNP seul sont une meilleure couverture de l’information du génome et une identification plus facile des variants rares. Ces analyses nécessitent des techniques statistiques spécifiques car les haplotypes des sujets sont inconnus et doivent donc être inférés à partir des génotypes. Ces analyses peuvent porter sur l’ensemble du génome via l’utilisation de fenêtres mobiles, mais posent des problèmes de charge de calcul et de tests multiples.

Une étude d’association pangénomique peut également chercher à identifier des gènes qui influencent des traits quantitatifs (quantitative trait loci, QTL). Ces études sont alors

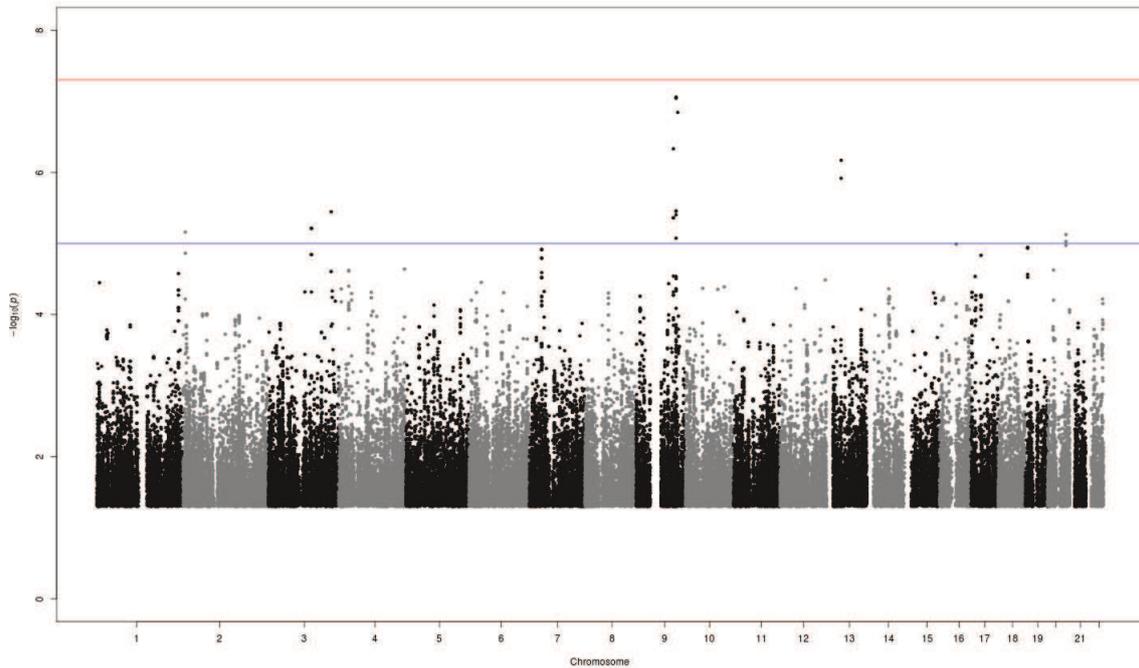


FIGURE 3.7 – Exemple de Manhattan Plot

basées sur des échantillons aléatoires réalisés en population. Comme dans les études cas-témoins, l'association dépend du LD entre un marqueur et un locus impliqué dans un trait. Elles peuvent être indépendantes ou complémentaires d'une étude cas-témoin. L'analyse fait alors appel à une régression linéaire.

L'interprétation du test se fait classiquement via le calcul de la P-value et sa comparaison à un seuil de significativité. Les seuils utilisés sont souvent bas en raison du nombre important de tests réalisés. Une simple correction de Bonferroni est conservatrice, les tests n'étant pas tous indépendants en raison du LD. On choisit donc souvent un seuil entre 10^{-5} et 10^{-8} . La présentation des résultats des tests se fait sous la forme d'un « Manhattan Plot » représentant en abscisse les positions chromosomiques et en ordonnée, $-\log_{10}(P)$, de sorte que plus un test est significatif, plus il apparait haut (cf. figure 3.7).

En cas de résultats significatifs, trois interprétations possibles peuvent être faites :

- Le locus est causal et influence directement le risque de maladie. Des études fonction-

Tableau 3.2 – Éléments de preuve dans une étude d'association pangénomique

Preuve Forte	Preuve Faible
L'association n'est pas liée à un artefact (erreur de génotypage, stratification)	SNP suspicieux
P-value faible	P-value haute
Puissance de l'étude élevée	Puissance faible
MAF élevé	MAF faible
Gène candidat	Région intergénique
SNP connu pour être associé	SNP inconnu

nelles sont nécessaires

- Les allèles sont corrélés aux allèles à risque via le LD mais n'influencent pas directement le risque de maladie
- Le résultat est un faux positif

Il est intéressant d'estimer le risque via le calcul d'un odds ratio, d'une mesure d'impact comme la fraction de risque attribuable en population ou d'un pourcentage de variance génétique expliquée. Néanmoins, ces mesures sont difficiles à interpréter et dépendent de la population étudiée. Ces éléments et d'autres résumés dans le tableau 3.2 permettent de discuter de la crédibilité des résultats obtenus.

Malgré les précautions prises pendant la conception de l'étude et la collecte, le nettoyage et l'analyse des données, le risque de faux-positifs reste élevé. La meilleure validation reste donc la réplication des résultats obtenus dans une population indépendante. Cette étape permet également d'estimer plus précisément le risque associé au SNP, celui-ci ayant tendance à être initialement surestimé (« winner's curse »).^{132;133}

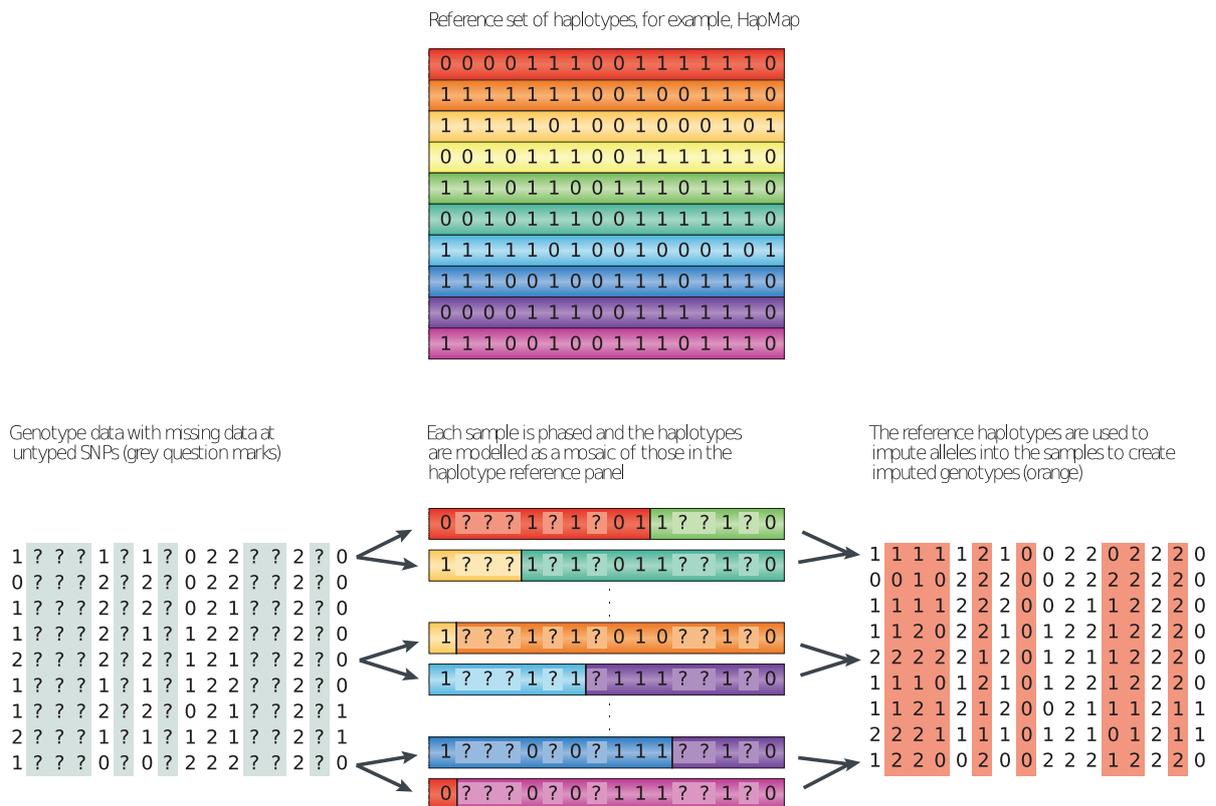


FIGURE 3.8 – Principe de l'imputation génétique (tiré de [139])

3.3.2.5 Imputation et méta-analyses

La méta-analyse d'études d'association pangénomiques permet d'augmenter considérablement la taille de l'étude et la puissance statistique et améliore la détection de variants à effet faible.^{134–138} Celle-ci se fait SNP par SNP et ne diffère pas de celle utilisée en épidémiologie classique. Le problème principal provient du manque de recoupement entre les marqueurs utilisés dans les différentes puces de génotypage. L'imputation des génotypes est une technique statistique permettant d'inférer les génotypes manquants à partir d'un panel de référence — par exemple, HapMap ou 1000 Genomes¹³⁹ (cf. figure 3.8). Chaque étude dispose ainsi d'un panel de marqueurs commun, ce qui permet de réaliser une méta-analyse.

3.4 Facteurs de risque génétique de maladie d'Alzheimer

3.4.1 Facteurs génétiques impliqués dans les formes familiales de maladie d'Alzheimer

Historiquement, l'identification des premières mutations responsables de maladie d'Alzheimer fait suite à la découverte du peptide $A\beta$ et le constat que ce peptide est retrouvé à la fois chez des patients atteints de maladie d'Alzheimer et chez des sujets trisomiques 21, qui présentent presque systématiquement un syndrome démentiel à partir de 40 ans.^{61;63} L'hypothèse que des mutations d'un gène situé sur le chromosome 21 sont responsables de la maladie d'Alzheimer est alors émise.⁶³

En 1987, le gène APP codant pour le précurseur du peptide amyloïde est identifié.¹⁴⁰⁻¹⁴³ Ce gène constitue un bon candidat car situé à proximité d'un pic de liaison avec des formes familiales de maladie d'Alzheimer.¹⁴⁴ Ceci est confirmé par l'identification des premières mutations causant la maladie d'Alzheimer dans le gène de l'APP.¹⁴⁵⁻¹⁴⁸

Les mutations du gène APP n'expliquent qu'une partie des formes familiales de maladie d'Alzheimer. En 1995, d'autres mutations associées à ces formes sont découvertes dans les gènes PSEN1¹⁴⁹ et PSEN2¹⁵⁰, codant respectivement pour les présénilines 1 et 2.

Actuellement, 32 mutations sont recensées dans le gène APP, 185 dans le gène PSEN1 et 13 dans le gène PSEN2 (voir tableau 3.3, Alzheimer Disease and Frontotemporal Dementia Mutation Database ; <http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations>).¹⁵¹ Ces mutations à l'exception d'une, sont à transmission autosomique dominante et à pénétrance complète. Elles sont à l'origine de modifications dans la production du peptide $A\beta$ (augmentation globale ou augmentation du ratio $A\beta_{1-x-42}/A\beta_{1-x-40}$) ou d'une modification du peptide responsable d'une augmentation de son agrégation. Aucun autre gène n'a pour le moment été identifié comme associé aux formes familiales de maladie d'Alzheimer. Par ailleurs, ces gènes ne sont

Tableau 3.3 – Gènes impliqués dans les formes familiales précoces de maladie d’Alzheimer et leurs effets pathogènes (tiré de [62] et de [151])

Gène Protéine	Localisation génomique	Mutations (clinique/ indéterminée/ bénigne)	Familles ou individus	Phénotype moléculaire
APP Précurseur du peptide amyloïde β	21q21.2	32/1/6	90	Ratio $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ augmenté Production d’ $A\beta$ augmentée Agrégation d’ $A\beta$ augmentée
PSEN1 Préséniline 1	14q24.3	185/8/4	411	Ratio $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ augmenté
PSEN2 Préséniline 2	1q42.13	13/7/5	34	Ratio $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ augmenté

pas ou peu impliqués dans les formes tardives de maladie d’Alzheimer. Ainsi, une seule étude a récemment identifié dans une population islandaise une mutation protectrice des formes tardives de maladie d’Alzheimer sur le gène de l’APP.¹⁵²

3.4.2 Facteurs de risque génétique des formes sporadiques de maladie d’Alzheimer

Les mutations impliquées dans les formes familiales précoces ne semblent pas moduler le risque des formes tardives en dehors de celle décrite dans [152]. La recherche de facteurs de susceptibilité génétique dans les formes tardives représente donc un enjeu important au vu des avancées permises par la découverte des gènes impliqués dans les formes précoces.

Historiquement, le gène APOE codant pour l’apolipoprotéine E a été un des premiers candidats à être étudié. En effet, un pic de liaison avait été détecté dans la région correspondante sur le chromosome 19.¹⁵³ De plus, une colocalisation de APOE dans les plaques amyloïdes avait déjà été retrouvée.^{154;155}

Les deux variants les plus fréquents du gène de l’APOE déterminent un haplotype à trois allèles, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$. Ces allèles sont responsables de modifications dans la séquence d’acides aminés de la protéine et de la synthèse de trois isoformes de l’APOE : APOE2 (cys112,

Tableau 3.4 – Risque de maladie d’Alzheimer associé aux allèles du gène APOE chez des sujets de descendance européenne (tiré de [158])

Génotype APOE	Études hospitalière/autopsique			Études en population		
	N	OR	(CI 95%)	N	OR	(CI 95%)
ε3/ε3	2854	1.0	(référence)	2683	1.0	(référence)
ε2/ε2	21	0.6	(0.2-2.0)	36	0.9	(0.3-2.8)
ε2/ε3	447	0.6	(0.5-0.8)	568	0.6	(0.5-0.9)
ε2/ε4	141	2.6	(1.6-4.0)	152	1.2	(0.8-2.0)
ε3/ε4	2171	3.2	(2.8-3.8)	1226	2.7	(2.2-3.2)
ε4/ε4	671	14.9	(10.8-20.6)	193	12.5	(8.8-17.7)

cys158), APOE3 (cys112, arg158) et APOE4 (arg112, arg158).

En 1993, l’allèle ε4 du gène de l’APOE est identifié comme un facteur de risque important de maladie d’Alzheimer.^{156;157} Les porteurs d’un allèle ε4 ont un risque multiplié par 4 et les porteurs de deux allèles ε4 un risque multiplié par 12 comparativement aux non-porteurs¹⁵⁸⁻¹⁶⁰ (cf tableau 3.4). Le risque à long terme de maladie d’Alzheimer a également été évalué en fonction des génotypes de l’APOE. Comparativement à un risque global à long terme de 11% et 14% chez des hommes et femmes âgés de 85 ans, les risques étaient de 51% et 60% chez les hommes et femmes APOE44 et 23% et 30% chez les hommes et femmes APOE34.¹⁶⁰ L’allèle ε2 est quant à lui protecteur.^{161;162} Au total, la fraction attribuable de risque de l’APOE dans la maladie d’Alzheimer est estimée entre 20% et 70%, les estimations réalisées dans les études longitudinales, potentiellement plus fiables, étant de 20%.¹⁶³

Sur la base de ces premiers résultats prometteurs, de nombreux travaux recherchant des associations entre gènes candidats et formes tardives de maladie d’Alzheimer sont initiés. Entre 1996 et 2005, plus de 1000 articles portant sur plus de 500 gènes sont publiés. Devant cette masse de résultats, la base Alzgene est créée afin d’évaluer chaque gène-candidat selon des critères reproductibles et réaliser si possible des méta-analyses.¹⁵⁹ Cette démarche confirme l’APOE comme plus important facteur de risque génétique des formes tardives de

la maladie d'Alzheimer. Elle permet également d'objectiver l'absence de répliation de la plupart des autres gènes-candidats. Plusieurs raisons peuvent expliquer ce manque de reproductibilité.¹⁶³

Jusqu'au milieu des années 2000, APOE est donc le seul facteur de risque génétique de maladie d'Alzheimer identifié avec certitude. À partir de 2005, l'émergence des études d'association pangénomiques et leurs premiers succès^{164;165} permet d'espérer des avancées majeures dans le champs de la génétique des maladies multifactorielles et de la maladie d'Alzheimer. Les premières études réalisées sont cependant décevantes en ce sens que, même si elles apportent une confirmation supplémentaire du rôle du gène APOE, elles ne permettent pas d'identifier de façon robuste de nouveaux facteurs de risque génétique de maladie d'Alzheimer. Ceci peut s'expliquer par les faibles tailles des populations d'étude utilisées, qui se traduisent comme dans les études gènes-candidats par un manque de puissance statistique en regard des tailles d'effet attendues. Il faut attendre la constitution de consortia internationaux permettant de disposer de milliers d'individus pour voir enfin l'identification de nouveaux variants associés au risque de maladie d'Alzheimer. En 2009, l'European Alzheimer's Disease Initiative (EADI) et le consortium Genetic and Environmental Risk in Alzheimer's Disease (GERAD), deux consortia européens, identifient les gènes CLU, CR1 et PICALM comme nouveaux facteurs de risque de maladie d'Alzheimer.^{166;167} En 2010, le groupe de travail « neurologie » du consortium Cohorts for Heart and Aging in Genomic Epidemiology (CHARGE) identifie également le gène BIN1.¹⁶⁸

Ces derniers se basent tous sur une conception d'étude classique cas-témoins, sur l'utilisation d'imputations génétiques et la réalisation de méta-analyses. L'utilisation de phénotypes intermédiaires permet également de mettre en évidence de nouveaux marqueurs. Ces différents résultats sont résumés dans le tableau 3.5.

Tableau 3.5 – Principaux variants génétiques significativement associés à la maladie d'Alzheimer dans les études pangénomiques ($P < 5 \times 10^{-8}$)

Phénotype	Auteur	Année de publication	Gènes proches	Région chromosomique	Meilleur SNP -allèle à risque	P
Maladie d'Alzheimer						
	Lambert JC ¹⁶⁶	2009	CR1	1q32.2	2-SNP haplotype	3e-10
	Naj AC ¹⁶⁹	2010	Intergenic	2q12.3	rs4676049-A	4e-08
	Hu X ¹⁷⁰	2011	BIN1	2q14.3	rs12989701-?	3e-10
	Hu X ¹⁷⁰	2011	BIN1	2q14.3	rs744373-?	1e-10
	Naj AC ¹⁶⁹	2010	MTHFD1L	6q25.1	rs11754661-A	2e-10
	Harold D ¹⁶⁷	2009	CLU	8p21.1	rs11136000-?	9e-10
	Lambert JC ¹⁶⁶	2009	CLU	8p21.1	3-SNP haplotype	6e-10
	Reiman EM ¹⁷¹	2007	GAB2	11q14.1	rs2373115-G	1e-10
	Harold D ¹⁶⁷	2009	PICALM	11q14.2	rs3851179-?	1e-09
	Abraham R ¹⁷²	2008	APOE, PVRL2, TOMM40	19q13.32	rs6859-A	6e-14
	Feulner TM ¹⁷³	2010	APOE, TOMM40	19q13.32	rs157580-?	1e-40
	Harold D ¹⁶⁷	2009	APOE, TOMM40	19q13.32	rs2075650-?	2e-157
	Lambert JC ¹⁶⁶	2009	APOE	19q13.32	rs2075650-?	2e-16
	Heinzen EL ¹⁷⁴	2010	APOE, TOMM40	19q13.32	rs2075650-?	3e-11
	Seshadri S ¹⁶⁸	2010	APOE	19q13.32	rs2075650-G	1e-295
	Naj AC ¹⁶⁹	2010	APOE, TOMM40	19q13.32	rs2075650-G	5e-36
	Coon KD ¹⁷⁵	2007	APOE	19q13.32	rs4420638-?	1e-39
	Webster JA ¹⁷⁶	2008	APOE	19q13.32	rs4420638-?	1e-39
	Li H ¹⁷⁷	2008	APOC1, APOE	19q13.32	rs4420638-?	2e-44
Biomarqueurs (LCR)						
AB1-42	Han MR ¹⁷⁸	2010	CYP19A1	15q21.2	rs2899472-A	2e-09
T-tau	Han MR ¹⁷⁸	2010	Intergenic	12q24.23	rs1997111-T	1e-08
Imagerie (IRM)						
Atrophie cérébrale	Furney SJ ¹⁷⁹	2011	ZNF292	6q14.3	rs1925690-?	3e-08
Volume cérébral	Seshadri S ¹⁸⁰	2007	CDH4	20q13.33	rs1970546-?	4e-08
Vieillessement						
	Lunetta KL ¹⁸¹	2007	Intergenic	2p12	rs10496265-?	1e-08
	Poduslo SE ¹⁸²	2010	LRP1B	2q22.1	rs12474609-?	6e-09

Deuxième partie

Travaux personnels

4

Travaux de thèse

Durant cette thèse, j'ai d'abord cherché à acquérir les compétences informatiques et statistiques nécessaires à la réalisation des différentes étapes d'une étude d'association pangénomique — manipulation de grands jeux de données, contrôle qualité, analyse, méta-analyse, annotation... Ces compétences m'ont permis d'intégrer des projets d'épidémiologie génétique d'importance croissante au sein de l'unité INSERM U744, du consortium EADI, puis du consortium IGAP (International Genomics of Alzheimer's Project).

Dans un premier temps, j'ai participé à une étude de répliation des résultats produits par l'approche gène-candidat en utilisant des données pangénomiques.¹⁸³ Une des explications à l'échec relatif de cette approche dans le champs de la maladie d'Alzheimer est que les résultats initialement publiés sont des faux-positifs, conséquence de faibles tailles d'échantillon. Les études d'association pangénomiques étant généralement menées chez un nombre important de participants, leur utilisation dans une étude de répliation paraissent intéressante.

Par la suite, j'ai participé aux travaux d'identification de nouveaux facteurs de risque génétique de maladie d'Alzheimer.

Tout d'abord nous avons cherché à augmenter la puissance statistique de l'approche pangénomique classique (cas-témoin) en augmentant les tailles d'échantillon étudiées. Grâce à des collaborations internationales, nous avons ainsi pu disposer de plusieurs dizaines de milliers de cas et de témoins et réaliser la plus grande étude d'association pangénomique de la maladie d'Alzheimer à ce jour (Lambert et collaborateurs, 2013, Nat Genet. Soumis).

Je me suis ensuite intéressé à l'étude de plusieurs phénotypes intermédiaires associés à la maladie d'Alzheimer. Le diagnostic de maladie d'Alzheimer est un diagnostic probabiliste, et le résultat de plusieurs dizaines d'années d'activité du processus physiopathologique initial, en interaction avec d'autres processus modulant le risque de maladie d'Alzheimer (diabète, facteur de risque cérébrovasculaire, accidents vasculaires cérébraux, etc.). Ainsi, la recherche de facteurs de risque génétique par approche cas-témoin peut être perturbée par l'hétérogénéité des événements ayant conduit au diagnostic de maladie d'Alzheimer. L'utilisation de phénotypes intermédiaires chez des sujets non-déments permet de focaliser la recherche vers des mécanismes physiopathologiques pré-symptomatiques, augmentant potentiellement la puissance statistique.¹⁸⁴ En raison de mon implication importante dans ce projet, je présenterai les résultats d'une méta-analyse d'études d'association pangénomiques portant sur les taux plasmatiques des peptides A β (Chouraki et collaborateurs, 2013, Mol Psychiatry. Soumis).

Chacun de ces travaux sera découpé en trois parties : présentation des travaux, contribution personnelle et article.

4.1 Réplication des résultats de l'approche gène candidat

- Laumet G, Chouraki V, Grenier-Boley B, Legry V, Heath S, Zelenika D, et al. Systematic analysis of candidate genes for Alzheimer's disease in a French, genome-wide association study. *J Alzheimers Dis.* 2010;20(4):1181–1188. Available from:

Présentation des travaux

Les mutations survenant dans les gènes du précurseur du peptide A β (APP) et des présénilines 1 et 2 sont responsables de la majorité des formes autosomiques dominantes de la maladie d'Alzheimer. Cependant, ces formes représentent moins de 1% des cas de maladie d'Alzheimer. La génétique des formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer est plus complexe.

Malgré un nombre important de publications utilisant l'approche gène candidat, seul le gène codant pour l'apolipoprotéine E (APOE) a été identifié de manière robuste comme facteur de risque génétique. Celui-ci expliquerait 20 à 25% des formes non-Mendéliennes de la maladie, laissant à penser que d'autres facteurs de risque génétique restent à découvrir.

La base de données AlzGene a été créée dans le but de synthétiser et de méta-analyser les données d'association publiées dans le champ de la génétique de la maladie d'Alzheimer. Trois grands résultats ont émergés de ce travail :

- En dehors de l'APOE, les méta-analyses ont identifié une trentaine de gènes associés à un risque faible à modéré de maladie d'Alzheimer
- En dehors de quelques variants, la plupart des gènes ont été étudiés dans un petit nombre d'échantillons indépendants
- Un nombre limité de variants a été étudié dans chaque gène avec des variations d'une étude à l'autre

En plus de la base de données AlzGene, la recherche en génétique s'est tournée vers les technologies de génotypage à haut débit. Ainsi, des centaines de milliers de variants peuvent être étudiés, le plus souvent dans une étude cas-témoin, dans un grand nombre

de participants. Dans ce travail, ces données ont été utilisées pour réaliser une étude de réplication des données de la base AlzGene.

En utilisant deux approches de réplication, locale et exacte, nous avons tenté de répliquer les associations décrites dans la base AlzGene pour les 20 « meilleurs » gènes candidats en utilisant les données de 2032 cas atteints de maladie d'Alzheimer et 5328 témoins issus du consortium EADI.

Dans l'approche locale, des associations significatives étaient retrouvés pour seulement 10 des 20 gènes de AlzGene. Pour l'approche exacte, seul un SNP situé dans le gène TFAM présentait une association significative à la fois dans AlzGene et dans EADI, et des Odds Ratios allant dans le même sens. Ces résultats étaient pour nous, une indication que les signaux générés par approche gène candidat étaient pour la plupart, soit des faux-positifs, soit présentaient des tailles d'effet extrêmement faibles. Nous en avons conclu que l'augmentation de la puissance statistique, via la réalisation de méta-analyses d'études d'association pangénomiques, serait une étape indispensable à l'identification de nouveaux facteurs de risque génétique de la maladie d'Alzheimer.

Contribution

Dans ce travail, j'ai réalisé l'ensemble des analyses statistiques. J'ai également participé à la rédaction de la partie « matériels et méthodes » et à la relecture de l'article.

4.2 Méta-analyses d'études d'association pangénomiques : études cas-témoins

- Hollingworth P, Harold D, Sims R, Gerrish A, Lambert JC, Carrasquillo MM, et al. Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associa-

ted with Alzheimer's disease. Nat Genet. 2011 May;43(5):429–435. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.803>

- Lambert JC et collaborateurs. Extended meta-analysis of 74,538 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. Nat Genet. 2013 (sous presse)

Présentation des travaux

Les données de la littérature ont démontré qu'en dehors d'APOE, les facteurs de risque génétique de la maladie d'Alzheimer ont un effet faible à modéré sur le risque de maladie. Augmenter la taille des échantillons disponibles permet d'augmenter la puissance statistique et d'améliorer la détection de ces facteurs de risque. En 2009 et 2010, trois consortia, EADI, GERAD et CHARGE ont mis en évidence de manière robuste 4 nouveaux facteurs de risque génétique de maladie d'Alzheimer, CLU, CR1, PICALM et BIN1.^{166–168} Cependant, malgré la découverte de ces nouveaux facteurs de risque génétique, une part importante de la variabilité génétique de la maladie d'Alzheimer reste inconnue.

En 2011, une étude d'association pangénomique basée sur la collaboration de ces trois consortia a été menée, permettant de disposer de 19870 cas et 39846 témoins.¹⁸⁵ La conception de cette étude comportait une phase de découverte et deux phases de réplification successives. Elle a permis de confirmer les résultats concernant BIN1 (meta $P = 3.7 \times 10^{-14}$) et CR1 (meta $P = 2.6 \times 10^{-14}$) et d'identifier deux nouveaux loci associés au risque de maladie d'Alzheimer situés à proximité de ABCA7 (rs3764650, meta $P = 4.5 \times 10^{-17}$) et du cluster de gènes MS4A (rs610932, meta $P = 1.8 \times 10^{-14}$).

Par ailleurs, ces données ont également été utilisées pour répliquer les associations suggestives identifiées par un consortium américain, le Alzheimer's Disease Genetics Consortium (ADGC).¹⁸⁶ En combinant ces résultats, trois loci supplémentaires ont ainsi été identifiés à proximité des gènes CD2AP ($P = 8.6 \times 10^{-9}$), CD33 ($P = 1.6 \times 10^{-9}$) et EPHA1

($P = 6.0 \times 10^{-10}$).

Néanmoins, ces gènes expliquent moins de 35% du risque génétique attribuable de la maladie d'Alzheimer. Afin de disposer de la puissance statistique nécessaire à l'identification de nouveaux facteurs de risque génétique de la maladie d'Alzheimer, nous avons donc décidé de regrouper les populations des quatre grands consortia dans un projet commun, IGAP. L'ensemble des études pangénomiques composant ces consortia représentait 17008 cas et 37646 témoins. Dans chaque étude, les données génétiques ont été imputées sur le panel de référence européen du projet 1000 Genomes. La méta-analyse de ces études d'association pangénomiques a constitué la phase de découverte de ce travail (étape 1). 11632 SNPs ayant un niveau d'association modéré ($P < 10^{-3}$) dans cette méta-analyse ont ensuite été génotypés dans une population de réplication indépendante (étape 2). Celle-ci incluait 8572 cas et 11392 témoins de descendance européenne originaires d'Autriche, Belgique, Finlande, Allemagne, Grèce, Hongrie, Italie, Espagne, Suède, du Royaume Uni et des USA.

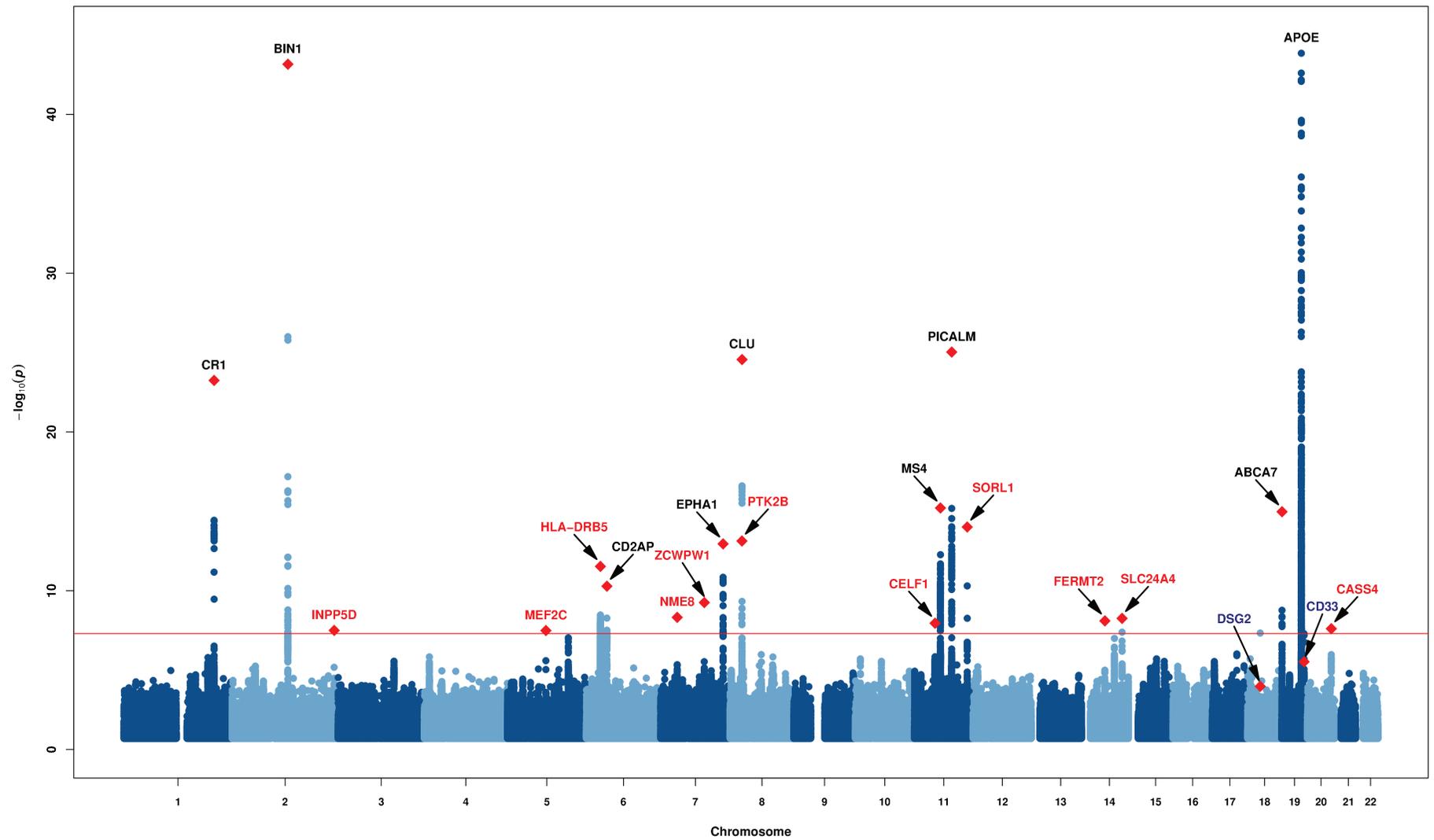


FIGURE 4.1 – Résultats de l'étape de découverte de Lambert et collaborateurs, 2013. Les losanges rouges indiquent les résultats après analyse combinée des étapes de découverte et de répliation

Dans l'étape 1, en plus du locus de l'APOE, 14 loci atteignaient le seuil de significativité pangénomique (cf. figure 4.1). Neuf avaient déjà été identifiés comme facteur de risque génétique de maladie d'Alzheimer et cinq (HLA-DRB5/HLA-DRB1, PTK2B, SORL1, SLC24A4/RIN3 and DSG2) étaient des nouveaux loci. SORL1 avait déjà été identifié comme facteur de risque génétique de maladie d'Alzheimer via une approche gène candidat et dans une GWAS combinant les données ADGC avec une population asiatique.

Les résultats des étapes 1 et 2 et de leur combinaison sont présentés dans le tableau 4.1. À l'exception de CD33 et DSG2, nous avons répliqué tous les autres loci qui étaient significatifs à l'étape 1. De plus, 7 nouveaux loci atteignaient le seuil de significativité pangénomique dans l'analyse combinée. Aucun locus en dehors de celui de DSG2 ne présentait d'hétérogénéité significative entre études. Afin de mieux identifier d'éventuels gènes causals, nous avons également recherché des associations avec l'expression de gènes pour les SNPs situés à moins de 500 kb des meilleurs SNPs et ayant une p-value inférieure à 5×10^{-8} (cf. tableau 4.2). Nous avons pour cela utilisé les données disponibles en ligne sur le site du Pritchard Lab (<http://eqtl.uchicago.edu/All.individual.tracks.gff.v3.gz>).

Tableau 4.1 – Résumé des étapes de découverte, réplication et de leur combinaison pour les SNPs atteignant le seuil de significativité pangénomique

SNP	Chr.	Position	Closest gene	Major/Minor alleles	Type of mutation	MAF (SE)	Discovery		Replication		Overall		I2 (%), P-value
							OR (95% CI)	Meta P-value	OR (95% CI)	Meta P-value	OR (95% CI)	Meta P-value	
Known GWAS-defined genes													
rs6656401	1	207,692,049	CR1	G/A	Intronic	0.197 (0.012)	1.17 (1.12-1.22)	7.7×10^{-15}	1.21 (1.14-1.28)	7.9×10^{-11}	1.18 (1.14-1.22)	5.7×10^{-24}	$0, 7.8 \times 10^{-1}$
rs6733839	2	127,892,810	BIN1	C/T	Intergenic	0.409 (0.017)	1.21 (1.17-1.25)	1.7×10^{-26}	1.24 (1.18-1.29)	3.4×10^{-19}	1.22 (1.18-1.25)	6.9×10^{-44}	$28, 6.1 \times 10^{-2}$
rs10948363	6	47,487,762	CD2AP	A/G	Intronic	0.266 (0.010)	1.10 (1.07-1.14)	3.1×10^{-8}	1.09 (1.04-1.15)	4.1×10^{-4}	1.10 (1.07-1.13)	5.2×10^{-11}	$0, 9 \times 10^{-1}$
rs11771145	7	143,110,762	EPHA1	G/A	Intergenic	0.338 (0.010)	0.90 (0.87-0.93)	8.8×10^{-10}	0.90 (0.86-0.95)	2.8×10^{-5}	0.90 (0.88-0.93)	1.1×10^{-13}	$14, 2.4 \times 10^{-1}$
rs9331896	8	27,467,686	CLU	T/C	intronic	0.379 (0.010)	0.86 (0.84-0.89)	9.6×10^{-17}	0.86 (0.82-0.90)	4.5×10^{-10}	0.86 (0.84-0.89)	2.8×10^{-25}	$0, 4.9 \times 10^{-1}$
rs983392	11	59,923,508	MS4A6A	A/G	intergenic	0.403 (0.012)	0.90 (0.87-0.93)	2.8×10^{-11}	0.90 (0.86-0.94)	4.5×10^{-6}	0.90 (0.87-0.92)	6.1×10^{-16}	$1, 4.5 \times 10^{-1}$
rs10792832	11	85,867,875	PICALM	G/A	Intergenic	0.358 (0.008)	0.88 (0.85-0.91)	6.5×10^{-16}	0.85 (0.81-0.89)	1.1×10^{-11}	0.87 (0.85-0.89)	9.3×10^{-26}	$0, 9.8 \times 10^{-1}$
rs4147929	19	1,063,443	ABCA7	G/A	intronic	0.190 (0.012)	1.14 (1.10-1.20)	1.7×10^{-9}	1.17 (1.10-1.24)	9.9×10^{-8}	1.15 (1.11-1.19)	1.1×10^{-15}	$0, 9.4 \times 10^{-1}$
rs3865444	19	51,727,962	CD33	C/A	intergenic	0.307 (0.011)	0.91 (0.88-0.94)	5.1×10^{-8}	0.99 (0.94-1.04)	6.9×10^{-1}	0.94 (0.91-0.96)	3.0×10^{-6}	$0, 6.9 \times 10^{-1}$
New loci reaching genome-wide significant level in the discovery analysis													
rs9271192	6	32,578,530	HLA-DRB5/HLA-DRB1	A/C	intergenic	0.276 (0.012)	1.11 (1.07-1.16)	1.6×10^{-8}	1.12 (1.06-1.18)	4.2×10^{-5}	1.11 (1.08-1.15)	2.9×10^{-12}	$0, 5.4 \times 10^{-1}$
rs28834970	8	27,195,121	PTK2B	T/C	intronic	0.366 (0.012)	1.10 (1.07-1.14)	3.3×10^{-9}	1.11 (1.06-1.17)	4.3×10^{-6}	1.10 (1.08-1.13)	7.4×10^{-14}	$10, 3.0 \times 10^{-1}$
rs11218343	11	121,435,587	SORL1	T/C	intronic	0.039 (0.004)	0.76 (0.70-0.83)	5.0×10^{-11}	0.78 (0.70-0.88)	4.0×10^{-5}	0.77 (0.72-0.82)	9.7×10^{-15}	$0, 8.3 \times 10^{-1}$
rs10498633	14	92,926,952	SLC24A4/RIN3	G/T	intronic	0.217 (0.009)	0.90 (0.87-0.94)	1.5×10^{-7}	0.93 (0.88-0.98)	7.8×10^{-3}	0.91 (0.88-0.94)	5.5×10^{-9}	$0, 6.3 \times 10^{-1}$
rs8093731	18	29,088,958	DSG2	C/T	intronic	0.017 (0.009)	0.54 (0.43-0.67)	4.6×10^{-8}	1.01 (0.80-1.28)	9.0×10^{-1}	0.73 (0.62-0.86)	1.0×10^{-4}	$38, 3.9 \times 10^{-2}$
New loci reaching genome-wide significant level in the combined discovery and replication analysis													
rs35349669	2	234,068,476	INPP5D	C/T	intronic	0.488 (0.018)	1.07 (1.03-1.10)	9.6×10^{-5}	1.10 (1.05-1.15)	5.7×10^{-5}	1.08 (1.05-1.11)	3.2×10^{-8}	$0, 8.0 \times 10^{-1}$
rs190982	5	88,223,420	MEF2C	A/G	Intergenic	0.408 (0.010)	0.92 (0.89-0.95)	2.5×10^{-6}	0.93 (0.89-0.98)	3.4×10^{-3}	0.93 (0.90-0.95)	3.2×10^{-8}	$0, 6.4 \times 10^{-1}$
rs2718058	7	37,841,534	NME8	A/G	intergenic	0.373 (0.012)	0.93 (0.90-0.96)	1.3×10^{-5}	0.91 (0.87-0.95)	6.3×10^{-5}	0.93 (0.90-0.95)	4.8×10^{-9}	$0, 9.2 \times 10^{-1}$
rs1476679	7	100,004,446	ZCWPW1	T/C	intronic	0.287 (0.016)	0.92 (0.89-0.96)	7.4×10^{-6}	0.89 (0.85-0.94)	9.7×10^{-6}	0.91 (0.89-0.94)	5.6×10^{-10}	$0, 7.0 \times 10^{-1}$
rs10838725	11	47,557,871	CELF1	T/C	intronic	0.316 (0.022)	1.08 (1.04-1.11)	6.7×10^{-6}	1.09 (1.04-1.14)	4.0×10^{-4}	1.08 (1.05-1.11)	1.1×10^{-8}	$0, 7.6 \times 10^{-1}$
rs17125944	14	53,400,629	FERMT2	T/C	intronic	0.092 (0.009)	1.13 (1.07-1.19)	1.0×10^{-5}	1.17 (1.08-1.26)	1.6×10^{-4}	1.14 (1.09-1.19)	7.9×10^{-9}	$10, 3.0 \times 10^{-1}$
rs7274581	20	55,018,260	CASS4	T/C	intronic	0.083 (0.006)	0.87 (0.82-0.92)	1.6×10^{-6}	0.89 (0.82-0.96)	4.1×10^{-3}	0.88 (0.84-0.92)	2.5×10^{-8}	$0, 9.9 \times 10^{-1}$

Tableau 4.2 – Résultats de la recherche de SNPs associés à l'expression de gènes parmi les signaux identifiés dans IGAP

Top SNP ¹	Chr.	Position	Closest Gene ²	Nb of Significant SNPs ³	QTL Gene	QTL Type	Nb of reported QTL SNPs ^{3,4}	Best QTL SNP			
								SNP rs ID	Position	P-value	Act in Cis/Trans
rs6733839	2	127,892,810	BIN1	76	BIN1	eQTL	5	rs10200967	127,841,769	2.24x10 ⁻³⁵	cis
rs9271192	6	32,578,530	HLA-DRB5/HLA-DRB1	201	AOAH	eQTL	1	rs3957146	32,681,530	6.57x10 ⁻³⁰	trans
					FLJ20186	eQTL	1	rs3957146	32,681,530	2.23x10 ⁻²⁹	trans
					HLA-DQA1	eQTL	1	rs3957146	32,681,530	9.72x10 ⁻⁵³	cis
					HLA-DQA1	exon-QTL	7	rs6927022	32,612,397	2.96x10 ⁻¹⁴	cis
					HLA-DQA1	transcript-QTL	2	rs6927022	32,612,397	7.42x10 ⁻¹¹	cis
					HLA-DQA2	eQTL	9	rs3957146	32,681,530	1.06x10 ⁻¹⁰	cis
					HLA-DQA2	transcript-QTL	1	rs6927022	32,612,397	1.58x10 ⁻⁰⁵	cis
					HLA-DQB1	eQTL	14	rs9272545	32,606,885	1.07x10 ⁻⁵⁸	cis
					HLA-DQB1	exon-QTL	7	rs6927022	32,612,397	1.29x10 ⁻¹⁴	cis
					HLA-DQB1	transcript-QTL	4	rs6927022	32,612,397	8.08x10 ⁻¹⁴	cis
					HLA-DRA	transcript-QTL	1	rs6927022	32,612,397	2.03x10 ⁻⁰⁵	cis
					HLA-DRB1	eQTL	51	rs2395166	32,388,275	2.57x10 ⁻¹⁹⁰	cis
					HLA-DRB1	exon-QTL	8	rs3135344	32,395,036	2.59x10 ⁻¹⁰	cis
					HLA-DRB1	transcript-QTL	2	rs6927022	32,612,397	9.09x10 ⁻⁰⁸	cis
					HLA-DRB4	eQTL	12	rs2760980	32,565,201	4.03x10 ⁻⁵¹	cis
					HLA-DRB5	eQTL	45	rs2395166	32,388,275	3.73x10 ⁻⁷⁷	cis
					HLA-DRB5	exon-QTL	1	rs3135344	32,395,036	3.89x10 ⁻⁰⁵	cis
					HLA-DRB6	eQTL	2	rs3957146	32,681,530	8.62x10 ⁻³¹	cis
					LIMS1	eQTL	1	rs2395166	32,388,275	3.64x10 ⁻³⁶	trans
					PSMB9	eQTL	1	rs2395166	32,388,275	1.05x10 ⁻¹⁶	cis
SSRP1	eQTL	1	rs3957146	32,681,530	2.47x10 ⁻¹²	trans					
rs1476679	7	100,004,446	ZCWPW1	6	GATS	eQTL	1	rs1476679	100,004,446	4.45x10 ⁻²¹	cis
					PILRB	eQTL	1	rs1476679	100,004,446	9.06x10 ⁻²⁰	cis
					TRIM4	eQTL	1	rs1476679	100,004,446	1.37x10 ⁻¹⁷	cis
rs28834970	8	27,195,121	PTK2B	35	DPYSL2	exon-QTL	1	rs17057043	27,220,310	6.46x10 ⁻⁰⁵	cis
					PTK2B	eQTL	2	rs17057043	27,220,310	2.13x10 ⁻²⁰	cis
rs9331896	8	27,467,686	CLU	35	DPYSL2	exon-QTL	1	rs17057043	27,220,310	6.46x10 ⁻⁰⁵	cis
					PTK2B	eQTL	2	rs17057043	27,220,310	2.13x10 ⁻²⁰	cis
rs10838725	11	47,557,871	CELF1	12	C1QTNF4	eQTL	6	rs7933019	47,509,137	1.08x10 ⁻¹⁰	cis
					MYBPC3	eQTL	2	rs12292911	47,449,072	1.72x10 ⁻²⁵	cis
					SPI1	eQTL	2	rs1534576	47,419,663	1.42x10 ⁻²¹	cis
rs9833392	11	59,923,508	MS4A6A	135	MS4A4A	eQTL	18	rs1026255	60,029,949	4.53x10 ⁻¹⁸	cis

¹ Are presented the SNPs showing the best level of association after meta-analysis of the stage 1 and stage 2

² ± 100kb

³ ± 500kb

⁴ For that QTL gene and that QTL type

Nous avons enfin identifié 13 loci ayant un niveau de significativité suggestif ($P < 10^{-6}$) dans l'analyse combinée. Parmi ceux-ci, nous avons détecté un signal sur rs9381040 ($p = 6.3 \times 10^{-7}$), à environ 5,5 kb de TREML2 et 24 kb de TREM2. Un variant rare (R47H) associé à un risque de maladie d'Alzheimer multiplié par 3-4 a récemment été découvert dans ce dernier.^{187;188} Nous n'avons pas été capable de déterminer si ce variant rare peut expliquer le signal que nous avons observé. Cependant, il est vraisemblable qu'à cause de la faible fréquence de R47H (MAF=0.3%), d'autres variants fonctionnels indépendants puissent expliquer l'association avec rs9381040. Cette région a également été retrouvée dans une étude des taux de phospho-Tau dans le liquide céphalorachidien, un biomarqueur de la maladie d'Alzheimer.

Au total, onze nouveaux loci ont été identifiés à proximité de possibles gènes candidats. Ces nouveaux gènes renforcent l'importance de certaines voies métaboliques déjà suspectées dans la maladie d'Alzheimer comme celles liées à APP (SORL1, CASS4) et Tau (CASS4, FERMT2).

Plusieurs de ces gènes sont impliqués dans des voies métaboliques ayant déjà montré un enrichissement en signaux associés à la maladie d'Alzheimer comme la réponse immunitaire et l'inflammation (HLA-DRB5/DRB1, INPP5D, MEF2C) — également supporté par la description récente d'une association entre TREM2 et maladie d'Alzheimer — la migration cellulaire (PTK2B) et le transport et l'endocytose des lipides (SORL1). Nos résultats suggèrent également l'existence de nouvelles voies métaboliques impliquées dans la maladie d'Alzheimer. Ces nouvelles voies métaboliques pourraient inclure le fonctionnement synaptique hippocampique (MEF2C, PTK2B), le fonctionnement du cytosquelette et le transport axonal (CELF1, NME8, CASS4), la régulation de l'expression des gènes et de la modification post-translationnelle des protéines et le fonctionnement des cellules myéloïdes et microgliales (INPPD5). Ces données renforcent l'implication de certains processus déjà connus pour leur rôle dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer et soulignent de nouvelles voies de

recherche, notamment pour le développement de nouveaux traitements.

La part génétique attribuable à ces nouveaux gènes candidats en dehors d'APOE étaient comprise entre 1 et 8% dans l'étape de réplification. Des efforts de séquençage et d'analyses post-GWAS sont maintenant nécessaires pour caractériser les variants fonctionnels responsables de l'association entre ces loci et le risque de maladie d'Alzheimer et comprendre leur rôle exact dans sa physiopathologie.

Contribution

Pour [185], j'ai réalisé les analyses de réplification des signaux suggestifs retrouvés par le ADGC, à proximité des gènes EPHA1, CD2AP et CD33, dans le consortium EADI.

Pour (Lambert et collaborateurs, 2013), j'ai réalisé l'analyse pangénomique des données génétiques imputées sur différents panels de référence 1000 Genomes dans le consortium EADI. J'ai également réalisé les premières méta-analyses à partir des données des quatre consortia. Les résultats de ces analyses exploratoires, ont été présentés par le Docteur Jean-Charles Lambert et moi-même dans les différentes réunions du IGAP. Associé à ma participation active dans les différents groupes de travail d'IGAP, ces travaux ont permis de finaliser le plan d'analyse et de consolider la place de leader de l'UMR744 dans ce projet. Par la suite, j'ai participé au contrôle qualité des jeux de résultats produits par les différents consortia, et à la méta-analyse de l'étape de découverte. Enfin, j'ai participé à la relecture de l'article, et à la production des forest plot et des tableaux de risque attribuable et eQTL.

4.3 Méta-analyses d'études d'association pangénomiques : phénotypes intermédiaires

- Chouraki V et collaborateurs. A genome-wide association meta-analysis of plasma A β peptide concentrations. *Mol Psychiatry*. 2013 (soumis)

Présentation des travaux

Les peptides amyloïde β (A β) sont les principaux composants des plaques séniles, une des lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. Des taux anormaux d'A β et l'agrégation des oligomères d'A β dans le cerveau sont à l'origine d'une cascade d'évènements menant à la perte synaptique et neuronale, la détérioration cognitive progressive et la démence.

Les deux principales espèces d'A β (x-40 et x-42) sont produites par endoprotéolyse séquentielle de la protéine précurseur amyloïde (APP) par les complexes β - et γ -secrétase. L'APP peut également passer par une voie non-amyloïdogénique via l' α -secrétase qui la coupe au milieu de la séquence de l'A β et prévient sa synthèse.¹⁸⁹ Bien que le métabolisme de l'APP ait été étudié intensivement, il est vraisemblable que certains facteurs impliqués dans ce processus complexe restent à identifier.

En dehors du rôle des peptides A β dans la maladie d'Alzheimer, leur rôle physiologique est méconnu. Pourtant, plusieurs études suggèrent que les peptides A β ont un spectre de fonctions biologiques étendu : ils sont produits par de nombreux types cellulaires, sont présents dans le cerveau mais également dans les tissus périphériques, ils pourraient agir en tant que ligands pour de nombreux récepteurs et pour d'autres molécules^{190;191} et enfin, ils ont diverses propriétés à concentrations physiologiques (neurotrophique, antioxydante, antimicrobienne, vasoconstrictrice et modulatrice de l'agrégation plaquettaire).⁷⁵⁻⁷⁹

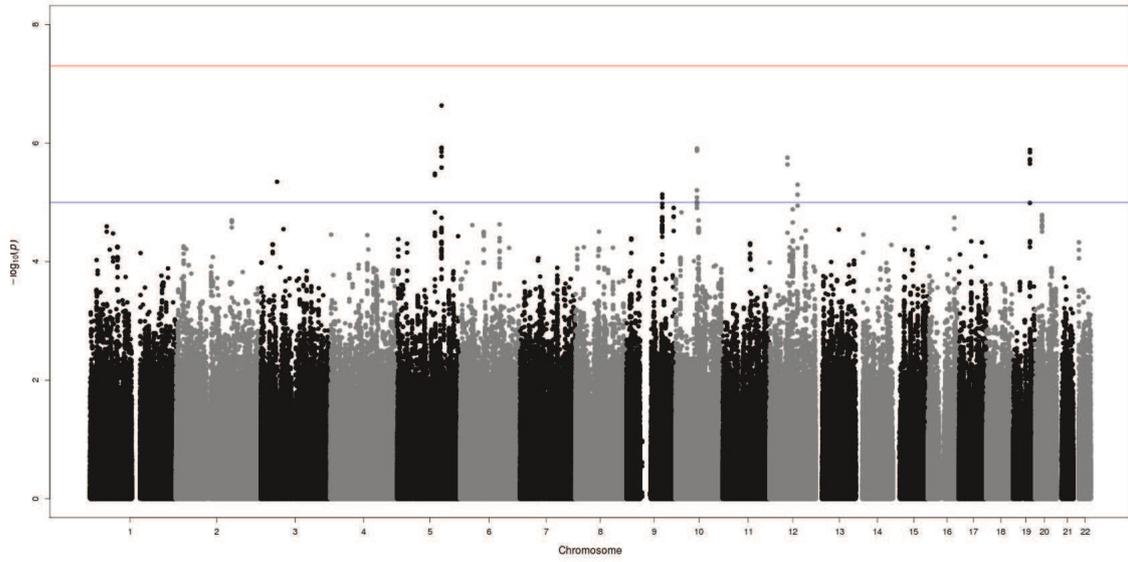
Afin d'identifier de nouveaux facteurs impliqués dans le métabolisme de l'APP et mieux caractériser les processus physiologiques et physiopathologiques impliquant les peptides A β ,

nous avons fait l'hypothèse que les concentrations de peptides $A\beta$ dans les fluides biologiques pourraient constituer un phénotype intermédiaire adapté pour une étude d'association pangénomique. Nous avons décidé de nous focaliser sur les concentrations plasmatiques de peptides $A\beta$ pour plusieurs raisons : les échantillons plasmatiques sont faciles à collecter ce qui permet la réalisation de méta-analyse de taille importante ; les taux plasmatiques d' $A\beta$ sont associés au risque de démence incidente et d'hypertension ;¹⁹²⁻¹⁹⁵ les taux plasmatiques d' $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$ sont des traits héréditaires.¹⁹⁶

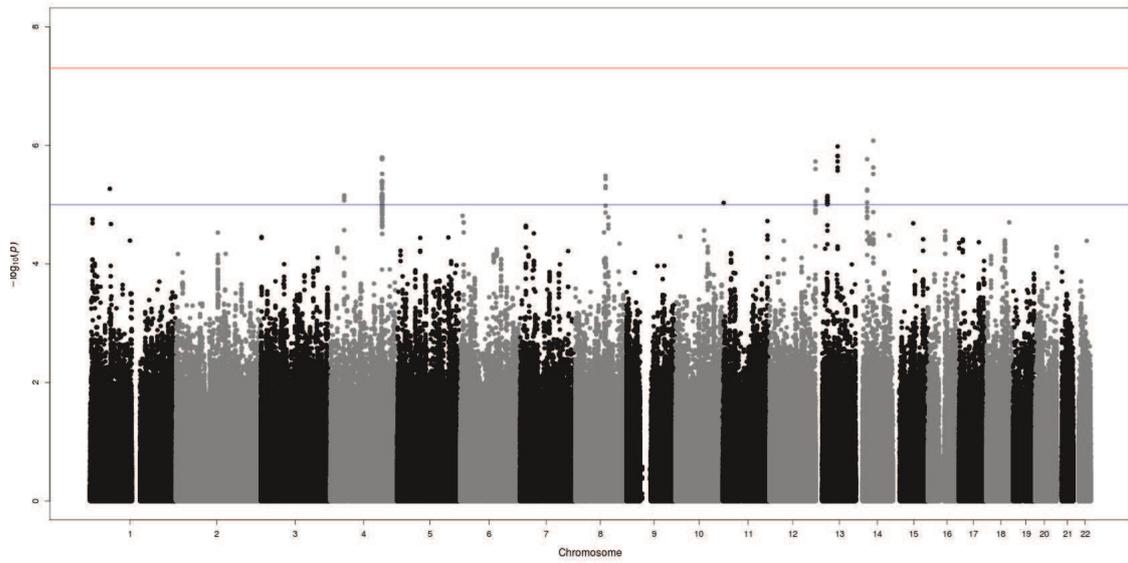
Dans ce contexte, nous avons développé une méta-analyse de quatre études d'association pangénomiques chez des individus d'origine européenne, indemnes de démence et pour lesquels les taux plasmatiques de peptides $A\beta$ avaient été mesurés.

L'échantillon était composé de 3713 participants provenant de l'étude des Trois Cités (n=1829), la Rotterdam Study (n=1465), la Cardiovascular Health Study - Cognition Study (n=274) et l'Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (n=145). Dans chaque population, les SNPs ont été imputés sur le panel de référence Hapmap 2 CEU. Les associations entre taux plasmatiques d' $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$ et SNPs ont été évalués dans des modèles de régressions linéaires ajustés pour l'âge, le sexe et les composantes principales si nécessaire.

Après avoir exclus les SNPs ayant une MAF basse ou une mauvaise qualité d'imputation dans chaque étude, 2316178 SNPs présents au moins dans 3C et RS ont été méta-analysés en utilisant une pondération par l'inverse de la variance. À ce stade, nous avons également exclus certains SNPs présentant un P très bas et une hétérogénéité forte entre études (n=1725 pour $A\beta_{1-42}$ et n=1744 pour $A\beta_{1-40}$), ces résultats étant portés uniquement par CHS-CS. Des diagrammes quantiles-quantiles ont ensuite été réalisés. Aucune inflation génomique n'a été observée pour $A\beta_{1-40}$ ou $A\beta_{1-42}$. Les facteurs d'inflation génomique (λ) étaient de 1,02 pour $A\beta_{1-42}$ et 0,99 pour $A\beta_{1-40}$. Les manhattan plots correspondant sont présentés dans la figure 4.2. Bien qu'aucun signal significatif au seuil pangénomique n'ait été observé, plusieurs signaux suggestifs ont été relevés. Les SNPs ayant le P le plus bas dans chacun de ces loci sont



(a) $A\beta_{1-42}$



(b) $A\beta_{1-40}$

FIGURE 4.2 – Manhattan plot des taux plasmatiques de peptides $A\beta$

présentés dans le tableau 4.3.

Tableau 4.3 – Principaux résultats de la méta-analyse des taux plasmatiques de peptides A β

SNP	Chr.	Position	Intragenic	Closest Gene (50kb)	Minor/Major Alleles	MAF (%)	A β ₁₋₄₂					A β ₁₋₄₀				
							Effect Size	SE	I2 (%)	P for Cochran's Q	P in GWAS	Effect Size	SE	I2 (%)	P for Cochran's Q	P in GWAS
A β ₁₋₄₂																
rs11241936	5	127006007	No	CTXN3	C/T	31.2	0.08	0.02	38	0.17	2.32 × 10 ⁻⁰⁷	0.03	0.02	27	0.24	1.22 × 10 ⁻⁰¹
rs12761450	10	61555898	Yes	ANK3	T/G	41.5	-0.07	0.02	0	0.83	1.24 × 10 ⁻⁰⁶	-0.01	0.02	0	0.52	7.51 × 10 ⁻⁰¹
rs12611088	19	48764642	Yes	XRCC1	A/G	37.1	0.07	0.02	0	0.54	1.30 × 10 ⁻⁰⁶	0.07	0.02	22	0.28	7.58 × 10 ⁻⁰⁴
rs17655565	12	50978225	Yes	KRT86	C/T	10.9	0.12	0.02	0	0.61	1.76 × 10 ⁻⁰⁶	0.07	0.03	0	0.79	3.74 × 10 ⁻⁰²
rs12656502	5	108009646	No	None	A/G	22.8	0.08	0.02	22	0.28	3.27 × 10 ⁻⁰⁶	0.04	0.02	53	0.07	1.45 × 10 ⁻⁰¹
rs2176862	3	46625997	No	LOC100132146	T/C	5.4	0.15	0.03	34	0.19	4.49 × 10 ⁻⁰⁶	0.05	0.04	6	0.37	2.74 × 10 ⁻⁰¹
rs7138951	12	79999764	Yes	ACSS3	G/A	9.4	0.12	0.03	0	0.56	5.03 × 10 ⁻⁰⁶	0.10	0.04	15	0.32	1.06 × 10 ⁻⁰²
rs10819795	9	102408184	No	MURC	A/T	2.5	0.23	0.05	34	0.19	7.36 × 10 ⁻⁰⁶	0.09	0.07	37	0.17	2.18 × 10 ⁻⁰¹
A β ₁₋₄₀																
rs3015469	14	50226910	No	SAV1	G/A	31.4	0.04	0.02	34	0.19	2.39 × 10 ⁻⁰²	0.11	0.02	54	0.07	8.35 × 10 ⁻⁰⁷
rs1335688	13	62292794	No	None	C/T	15.3	0.07	0.02	44	0.13	1.14 × 10 ⁻⁰³	0.14	0.03	0	0.69	1.04 × 10 ⁻⁰⁶
rs1995809	4	148063874	Yes	TTC29	G/A	5.4	0.04	0.03	15	0.32	2.71 × 10 ⁻⁰¹	0.22	0.05	51	0.08	1.60 × 10 ⁻⁰⁶
rs7151302	14	32753868	Yes	NPAS3	C/T	13.6	-0.08	0.02	65	0.02	3.08 × 10 ⁻⁰⁴	-0.14	0.03	0	0.57	1.71 × 10 ⁻⁰⁶
rs12422267	12	131167549	No	EP400NL	G/A	9.5	0.04	0.02	23	0.27	1.04 × 10 ⁻⁰¹	0.17	0.03	29	0.23	1.87 × 10 ⁻⁰⁶
rs2403083	8	86295401	Yes	E2F5	C/A	26.1	-0.04	0.02	0	0.72	3.44 × 10 ⁻⁰²	-0.11	0.02	0	0.96	3.27 × 10 ⁻⁰⁶
rs1341320	1	57739116	Yes	DAB1	G/A	6.4	-0.09	0.03	0	0.88	2.33 × 10 ⁻⁰³	-0.18	0.04	0	0.56	5.40 × 10 ⁻⁰⁶
rs4263408	4	39461671	No	UBE2K	T/C	43.0	-0.03	0.02	62	0.03	5.76 × 10 ⁻⁰²	-0.09	0.02	47	0.11	6.98 × 10 ⁻⁰⁶
rs8001893	13	33120261	Yes	STARD13	A/C	2.5	0.14	0.05	0	0.87	8.52 × 10 ⁻⁰³	0.30	0.07	0	0.61	7.11 × 10 ⁻⁰⁶
rs108961	11	2714561	Yes	KCNQ1	T/C	47.4	0.03	0.02	72	0.007	2.85 × 10 ⁻⁰²	0.09	0.02	34	0.20	9.34 × 10 ⁻⁰⁶

Il est vraisemblable que notre étude ait présenté un manque de puissance statistique. De plus, nous avons été dans l'impossibilité de mettre en place une étape de réplication en raison d'un faible nombre de cohortes disponibles ayant à la fois des données pangénomiques et d'A β plasmatique. Nous avons donc décidé d'appliquer un ensemble d'approches complémentaires afin d'évaluer la pertinence de nos résultats.

Nous avons dans un premier temps fait l'hypothèse que les déterminants génétiques des concentrations plasmatiques d'A β étaient regroupés dans des voies métaboliques particulières, plutôt que distribués aléatoirement. Ce type d'analyse permet de distinguer des ensembles de gènes potentiellement impliqués dans la modulation du métabolisme de l'APP et de fournir des informations sur les fonctions des peptides A β et de l'APP. Nous avons donc généré une liste de 1762 gènes contenant au moins un SNP associé aux concentrations d'A β_{1-40} et A β_{1-42} ($p < 0.05$) et ayant le même sens d'association. En utilisant l'Analyse de Pathway Ingenuity (IPA), nous avons observé 27 voies canoniques significativement enrichies sur les 287 disponibles après correction pour tests multiples (cf. tableau 4.4). Certaines de ces voies avaient déjà été décrites comme impliquées dans le métabolisme de l'APP (p.-ex. les voies de signalisation de la protéine kinase A ou de la nétrine).¹⁹⁷⁻²⁰⁰ D'autres voies apparaissaient associées à des fonctions physiologiques potentielles de l'APP dans le cerveau (guidance axonale)^{74;201} ou directement associées à des propriétés des peptides A β comme par exemple la modulation de la pression artérielle (voie rénine-angiotensine).¹⁹³

Nous avons ensuite étudié l'influence du gène ayant l'association la plus significative avec les taux d'A β_{1-42} , CTXN3, sur le métabolisme de l'APP. Les résultats sont présentés dans la figure 4.3. Nous avons testé l'effet de la surexpression de CTXN3 sur la sécrétion de peptides A β dans une lignée cellulaire HEK exprimant de façon stable l'isoforme 695wt de l'APP. Après surexpression de CTXN3, la sécrétion d'A β_{1-42} était significativement plus basse que chez les contrôles (-37%, $p=0.02$). Une tendance similaire était observée pour la sécrétion d'A β_{1-40} (-27%, $p=0.10$). De plus, nous avons observé une colocalisation d'APP et de CTXN3 dans

Tableau 4.4 – Résultats de l'analyse IPA[®] sur les données pangénomiques des taux plasmatiques d'A β

Pathways canonique Ingenuity	P-value corrigée ¹
Protein Kinase A Signaling	3.72×10^{-06}
Axonal Guidance Signaling	2.00×10^{-05}
Synaptic Long Term Potentiation	3.47×10^{-04}
Melatonin Signaling	1.07×10^{-03}
Role of NFAT in Cardiac Hypertrophy	2.34×10^{-03}
Corticotropin Releasing Hormone Signaling	2.34×10^{-03}
Dopamine-DARPP32 Feedback in cAMP Signaling	2.88×10^{-03}
ErbB Signaling	2.88×10^{-03}
Fc γ Receptor-mediated Phagocytosis in Macrophages and Monocytes	3.02×10^{-03}
Synaptic Long Term Depression	3.09×10^{-03}
CREB Signaling in Neurons	3.16×10^{-03}
GNRH Signaling	3.16×10^{-03}
Cellular Effects of Sildenafil (Viagra)	3.80×10^{-03}
Netrin Signaling	7.24×10^{-03}
Neuregulin Signaling	8.13×10^{-03}
Hepatic Cholestasis	1.15×10^{-02}
Renin-Angiotensin Signaling	1.38×10^{-02}
...	

¹ Benjamini-Hochberg Correction

des cellules HEK293 surexprimant les deux protéines. Ces données suggèrent que CTXN3 pourrait induire une diminution de la production de peptide A β en modulant directement le métabolisme de l'APP.

À notre connaissance, la présente étude constitue la première étude d'association pangénomique des concentrations plasmatiques d'A β chez des sujets non-déments.

Des associations génétiques avec les taux plasmatiques d'A β ont été décrites en utilisant l'approche gène-candidat, principalement dans des loci proches des gènes IDE²⁰²⁻²⁰⁵ et MMP3.²⁰⁶ En utilisant les mêmes SNPs comme référence, nous n'avons pas répliqué ces résultats dans notre étude. Récemment, deux GWAS ont décrit des associations génétiques avec les taux d'A β_{1-42} dans le liquide céphalorachidien (LCR).^{178;207} Seul un SNP associé aux concentrations d'A β_{1-42} dans le LCR était associé de façon nominale avec les concentrations plasmatiques d'A β_{1-42} (rs2075650, $p = 2.81 \times 10^{-2}$). Ce SNP est situé dans le locus de l'APOE qui est connu pour influencer la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer via une altération de la clairance des peptides A β hors du cerveau.

La mise en place de cette étude a été sujette à plusieurs limites méthodologiques et techniques. Tout d'abord, les concentrations plasmatiques ont été mesurées par des méthodes différentes qui ne sont pas totalement comparables et peuvent introduire des biais de mesure. Nous avons tenté de limiter ce biais en transformant les données en variables centrées réduites dans chaque étude. Deuxièmement, un petit nombre d'études avaient à la fois des données sur les taux plasmatiques d'A β et pangénomiques au moment de ce travail, ce qui a limité la puissance statistique de notre méta-analyse. De plus, il est possible qu'un grand nombre de déterminants génétiques aux effets individuels modérés à faibles agissent de concert pour moduler les concentrations plasmatiques des peptides A β ce qui a rendu leur détection plus difficile. Enfin, la principale limite de notre étude est l'absence d'étape de réplification, rendant impossible la discrimination entre vrais et faux positifs. Une option aurait été de séparer nos données en jeu de découverte et jeu de réplification. Cependant, nous

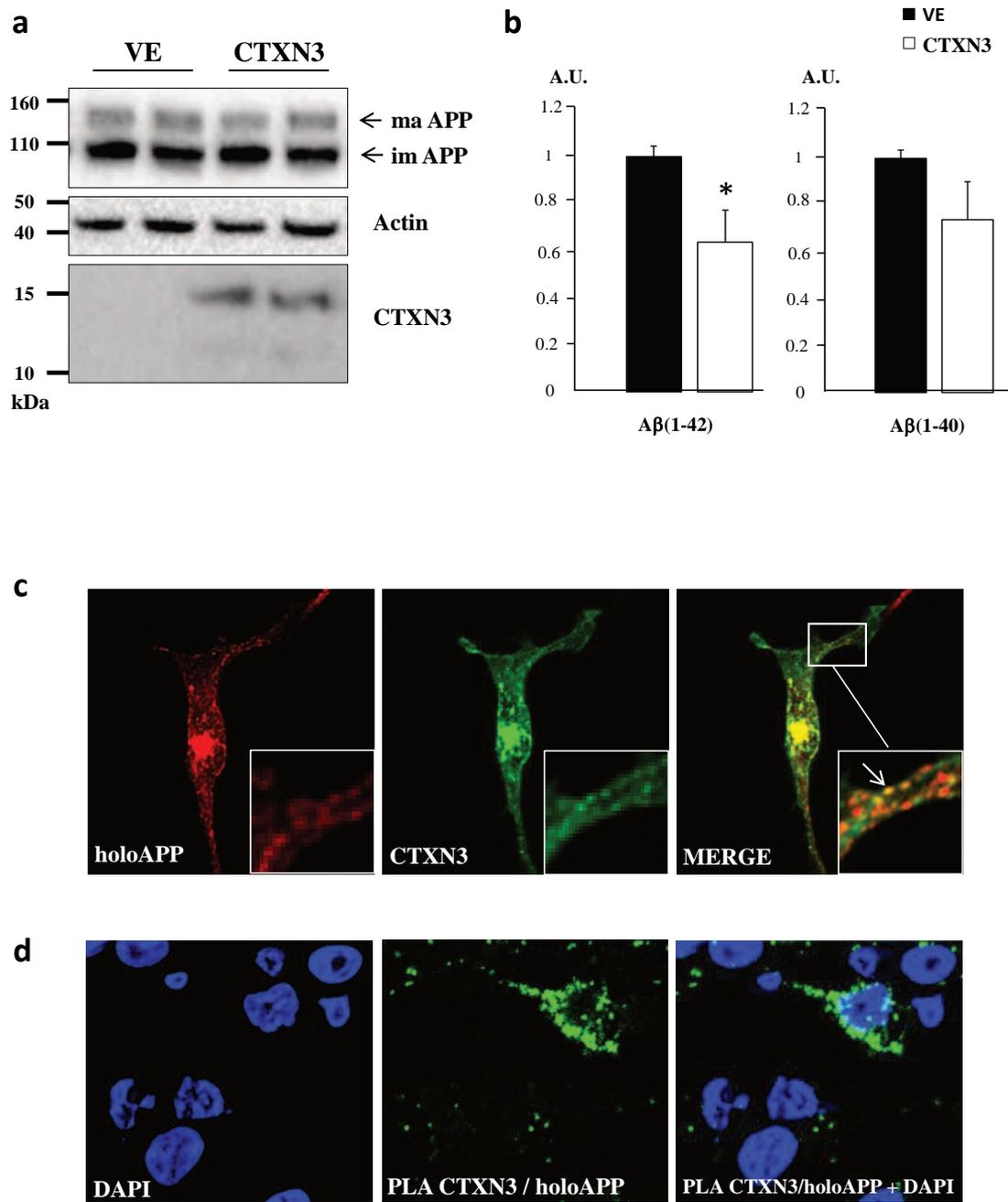


FIGURE 4.3 – Surexpression de CTXN3 dans des lignées cellulaires HEK et immunofluorescence

avons considéré qu'une étape de découverte ayant trop peu d'effectif aurait conduit à un nombre important de faux positifs.

Compte tenu de ces limites, nous avons décidé d'utiliser deux approches complémentaires.

La première basée sur l'analyse de voies canoniques, via IPA, a retrouvé une surreprésentation de gènes impliqués dans la voie de signalisation de la protéine kinase A, qui a déjà été décrite comme modulant le métabolisme de l'APP.^{198;200} Nous avons également retrouvé une grande proportion de voies impliquées dans le développement et les fonctions neuronales ainsi que dans la voie de signalisation rénine-angiotensine. Ceci est intéressant au vu de l'implication d'APP et de ses métabolites dans la neuro- et la synaptogenèse^{73;74;201} ainsi qu'au regard du rôle supposé des peptides A β dans la modulation physiologique de la pression artérielle.^{78;193}

Notre seconde approche était basée sur la pertinence biologique et l'étude de l'implication directe des gènes proches des signaux d'association génétique dans le métabolisme de l'APP. Nous avons ainsi noté que le gène DAB1 était associé avec les concentrations plasmatiques d'A β dans notre GWAS. La protéine correspondante est un partenaire d'APP et a été décrite comme un modulateur de son métabolisme.^{208;209} Nous nous sommes également intéressé au gène proche du meilleur signal pour l'A β_{1-42} , CTXN3, qui n'avait pas été décrit comme un modulateur du métabolisme de l'APP. Nous avons montré que la surexpression de ce gène était associée à une sécrétion plus faible d'A β_{1-42} et que la cortexine pourrait être colocalisée avec l'APP. Cependant, les connaissances sur cette protéine décrite récemment restent partielles : un seul domaine transmembranaire et une expression limitée au rein et au cerveau.²¹⁰

L'identification d'une implication potentielle de CTXN3 dans le métabolisme de l'APP *in vitro* indique que notre méta-analyse a été capable d'identifier de nouveaux facteurs impliqués dans cette voie. En conséquence, un screening systématique des autres loci pourrait

être envisagé. Il est cependant important de noter que cette étude a porté sur des individus non-déments et que les loci identifiés pourraient ne pas être impliqués dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. Ainsi, nous n'avons pas retrouvé d'association significative entre CTXN3 et risque de maladie d'Alzheimer dans la population EADI. Nous avons également recherché des associations entre les facteurs de risque génétique connus de maladie d'Alzheimer et les taux plasmatiques d'A β ₁₋₄₂^{166;168;185} en dehors d'APOE qui présentait une association nominale avec les taux plasmatiques d'A β ₁₋₄₂, aucun résultat significatif n'était retrouvé.

En conclusion, notre étude suggère que les taux plasmatiques d'A β représentent un phénotype intéressant pour étudier le métabolisme et les fonctions d'APP et de ses métabolites.

Contribution

Pour ce travail, j'ai participé avec le Docteur Jean-Charles Lambert à la rédaction du plan d'analyse. J'ai également pris contact avec l'étude ADNI afin d'avoir accès à leurs données, et effectué dans cette dernière, la sélection des individus et des SNPs avant imputation. J'ai réalisé les analyses pangénomiques dans les populations 3C et ADNI ainsi que la méta-analyse. Enfin, j'ai été le principal rédacteur de l'article.

5

Discussion

Durant cette thèse, j'ai participé à l'identification de nouveaux facteurs de risque génétique de la maladie d'Alzheimer. Dans ce but, trois approches différentes ont été envisagées. En utilisant les données pangénomiques pour répliquer les résultats produits par l'approche gène candidat, nous avons pu montrer qu'une grande partie de ces gènes présentait un faible niveau d'association avec la maladie d'Alzheimer. Ensuite, en réalisant des méta-analyses d'études d'association pangénomiques, nous avons confirmé les associations précédemment décrites pour CLU, CR1, PICALM et BIN1 et identifié 16 nouveaux facteurs de risque génétique de maladie d'Alzheimer. Enfin, l'utilisation de phénotypes intermédiaires nous a permis d'identifier plusieurs signaux suggestifs associés aux taux plasmatiques de peptides $A\beta$.

Ce travail de recherche de facteurs de risque génétique de maladie d'Alzheimer illustre la nécessité de disposer de tailles de population importantes et l'importance de la réplication des résultats dans des populations indépendantes. L'approche gène candidat a ainsi généré de nombreux signaux qui n'ont pas été répliqués en raison d'une taille de population initiale insuffisante. Les premières études d'association pangénomiques se sont heurtées aux mêmes problèmes et il a fallu attendre la création de consortia pour identifier et répliquer de nou-

veaux facteurs de risque de maladie d'Alzheimer de manière fiable.²¹¹ Au delà des progrès techniques, la collaboration scientifique a ainsi été le véritable moteur de l'identification de nouveaux facteurs de risque génétique de maladie d'Alzheimer.²¹²

La réplication des résultats dans des populations indépendantes apporte une preuve forte de la « réalité » d'un signal statistique. Celle-ci a été intégrée directement dans la conception des études d'association pangénomiques en raison du grand nombre de tests statistiques. De plus, d'autres études pangénomiques^{170;213-215} et des efforts de réplication focalisés sur les gènes découverts ont également permis de les valider.²¹⁶⁻²²⁷ Ces résultats ne concernent que des populations d'origine européenne et doivent être répliqués dans d'autres populations. Ainsi, des études réalisées dans des populations asiatiques retrouvent l'association de *CLU*,²²⁸⁻²³¹ *CR1*,²³¹⁻²³⁴ *PICALM*,^{231;233;235-238} *BIN1*,²³⁹ *CD33*,^{240;241}, *MS4A*²⁴¹ et *SORL1*.²⁴² Des associations avec *CLU*, *PICALM* et *BIN1* ont également été rapportées dans une population hispanique des Caraïbes.²⁴³ Enfin, des associations dans les gènes connus, dont *ABCA7*,²⁴⁴ ont été rapportées dans des populations afro-américaines, bien que les SNPs et les sens d'association soient parfois différents des observations en population européenne.²⁴⁵

Ces facteurs de risque génétique ne constituent pour le moment que des signaux statistiques pointant sur une zone d'intérêt du génome. L'hypothèse la plus probable est qu'ils sont en déséquilibre de liaison avec des variants dits « fonctionnels », c'est-à-dire ayant un impact qualitatif ou quantitatif sur les protéines produites et qui restent à identifier. Ces variants étant potentiellement rares et mal couverts par les puces de génotypages, cette identification se base sur le reséquençage complet de la région d'intérêt, l'identification de tous les variants présents dans cette région et l'identification de variants fonctionnels associés à l'expression du gène étudié ou au risque de maladie d'Alzheimer. Cependant, le séquençage pose des problèmes spécifiques²⁴⁶ qui font que le regénotypage ou l'imputation des variants d'une région d'intérêt restent des alternatives intéressantes.

Pour *CLU*, Guerreiro et collaborateurs ne retrouvent pas de variant codant fréquent as-

socié au risque de maladie d'Alzheimer ni de variant fréquent associé à l'expression globale d'ARNm de la région et suggèrent l'existence d'effets faibles sur l'expression des gènes ou l'existence d'une variation dans l'induction de l'expression.²⁴⁷ Szymanski et collaborateurs confirment cette hypothèse en rapportant une association entre rs9331888 — un des SNPs identifiés par analyse pangénomique¹⁶⁶ — et l'expression préférentielle d'un des isoformes de CLU.²⁴⁸ Bettens et collaborateurs rapportent l'existence de variants rares non-synonymes, d'insertion/délétion et de variants fréquents associés de façon indépendante au risque de maladie d'Alzheimer.²⁴⁹ Enfin, Yu et collaborateurs identifient par séquençage de CLU 18 variants dont 2 variants rares dans une population chinoise mais ne rapportent d'association significative que pour un variant fréquent, rs9331949.²⁵⁰

Pour PICALM, Schnetz-Boutaud et collaborateurs rapportent que son séquençage chez 48 cas et 48 témoins n'a pas permis l'identification de nouveau variant, ce qui est peu étonnant compte tenu de la faible taille de population.²⁵¹ Ferrari et collaborateurs identifient plusieurs variants codants rares dans la région de PICALM, sans mettre en évidence d'association avec la maladie d'Alzheimer.²⁵² Dans une étude de la pathogénicité prédite des SNPs non-synonymes de PICALM, Masoodi et collaborateur rapportent rs12800974 comme potentiellement fonctionnel.²⁵² Enfin, dans une approche basée sur les levures, une association entre l'homologue de PICALM et la toxicité liée à A β a été rapportée.²⁵³

Pour CR1, Brouzers, Hazrati et collaborateurs identifient une variation du nombre de copies pouvant expliquer le signal observé en étude pangénomique et associé à la production de différents isoformes de CR1, CR1-F et CR1-S, augmentant potentiellement le nombre de sites de liaison pour C3b/C4b.^{225;254} Un autre variant codant de CR1 a été retrouvé associé au déclin cognitif²⁵⁵ mais n'a pas été répliqué.²⁵⁶

Pour BIN1, Chapuis et collaborateurs identifient une insertion / délétion associée à l'expression de celui-ci après imputation du locus présentant le signal pangénomique.²⁵⁷

L'utilisation d'études d'association pangénomiques a ainsi permis l'identification de nou-

veaux facteurs de risque génétique de maladie d'Alzheimer. Néanmoins, l'apport propre de chacun des variants identifiés est faible en terme de contribution à l'héritabilité. La recherche de « l'héritabilité manquante »²⁵⁸ de la maladie d'Alzheimer doit donc se poursuivre.²⁵⁹

Comme mentionné plus haut, l'utilisation de phénotypes intermédiaires permet de focaliser la recherche de variants vers des mécanismes physiopathologiques pré-symptomatiques. En plus des études présentées dans cette thèse, d'autres études pangénomiques se sont ainsi intéressées aux taux de peptides $A\beta_{1-42}$, Tau et phospho-Tau dans le liquide céphalorachidien^{178;207;260}, à l'atrophie cérébrale et hypersignaux de la substance blanche mesurés par imagerie par résonance magnétique cérébrale^{179;180;261-263}, au dépôt amyloïde cérébral mesuré par PET-scan²⁶⁴, à la dégénérescence neurofibrillaire observée à l'autopsie,²⁶⁵ au déclin des fonctions cognitives²⁶⁶⁻²⁶⁸ et à l'âge d'apparition de la maladie d'Alzheimer.²⁶⁹ L'étude de phénotypes intermédiaires permet également de confirmer les associations retrouvées dans les études cas-témoins.

La recherche de nouveaux facteurs de risque génétique de maladie d'Alzheimer s'est en grande partie basée sur l'analyse isolée d'un grand nombre de SNPs. D'autres analyses — pathways, analyses de type « burden », interactions gène-gène, interaction gène-environnement, pléiotropie... — seront nécessaires pour tirer pleinement parti des données pangénomiques disponibles et éclairer toute la complexité de la génétique de la maladie d'Alzheimer. Les analyses futures devront également s'intéresser aux chromosomes sexuels qui ont été peu étudiés jusqu'à présent.

L'utilisation des études d'association pangénomiques découle de l'hypothèse « maladie fréquente, variant fréquent » et le génotypage des SNPs. Les efforts de recherche se redirigent désormais vers l'identification de variants plus rares et d'autres types de variants — insertion / délétion, variation du nombre de copies — grâce à l'utilisation du séquençage. Des efforts de génotypage et de séquençage de l'ensemble des exons sont actuellement en cours. Au delà des exons, le séquençage entier du génome permettra de disposer de l'ensemble de

l'information génétique des individus et d'identifier l'ensemble des variations associées au risque de maladie.

L'identification de nouveaux facteurs de risque génétique associés à la maladie d'Alzheimer et l'étude des gènes situés à proximité ont permis d'approfondir les connaissances sur sa physiopathologie. Ces travaux ont permis de réaffirmer le rôle important des peptides A β , y compris dans les formes sporadiques, et de mettre en évidence l'implication potentielle de nouvelles voies métaboliques — métabolisme des lipides, réponse immunitaire, adhésion cellulaire, endocytose...²⁷⁰ — dont les mécanismes physiopathologiques restent à élucider. Une étude menée en partie dans l'unité U744 a ainsi rapporté une modulation de la toxicité liée à tau par BIN1.²⁵⁷

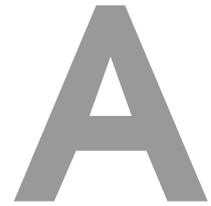
Ces nouveaux facteurs de risque génétique de maladie d'Alzheimer pourraient également permettre la construction de scores de risque génétique. L'objectif est à terme de prédire le risque de développer la maladie et d'identifier des sujets à risque en vue d'un traitement préventif. Les études menées jusqu'à présent ont rapporté des associations significatives entre différents scores de risque génétique et le risque de maladie d'Alzheimer mais un apport faible en terme de prédiction par rapport à l'utilisation de variables comme l'âge ou le sexe.²⁷¹⁻²⁷³ Il sera intéressant d'évaluer l'apport des gènes nouvellement identifiés.

Enfin, ces facteurs de risque génétique pourraient permettre l'identification de nouveaux biomarqueurs précoces. Plusieurs études ont ainsi rapporté une association entre les concentrations sanguines de clusterine et le risque de maladie d'Alzheimer.^{274;275}

Au total, les travaux auxquels j'ai participé durant cette thèse ont mené à l'identification de nombreux nouveaux facteurs de risque génétique associés à la maladie d'Alzheimer. Ces travaux ouvrent de nouvelles voies de recherche pour mieux comprendre les mécanismes de la maladie d'Alzheimer et à terme, permettre son traitement et sa prévention.

Troisième partie

Appendices



Publications de thèse

A.1 Publications présentées dans cette thèse

- Laumet G, Chouraki V, Grenier-Boley B, Legry V, Heath S, Zelenika D, et al. Systematic analysis of candidate genes for Alzheimer's disease in a French, genome-wide association study. *J Alzheimers Dis.* 2010;20(4):1181–1188. Available from: <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-2010-100126>
- Hollingworth P, Harold D, Sims R, Gerrish A, Lambert JC, Carrasquillo MM, et al. Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2011 May;43(5):429–435. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.803>
- Lambert JC et collaborateurs. Extended meta-analysis of 74,538 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2013 (sous presse)
- Chouraki V et collaborateurs. A genome-wide association meta-analysis of plasma A β peptide concentrations. *Mol Psychiatry.* 2013 (soumis)

Les contributions du candidat à chacun de ces travaux sont précisées dans les sections dédiées du chapitre 4

A.2 Autres publications en rapport avec la thématique de la maladie d'Alzheimer

- Lambert JC, Grenier-Boley B, Chouraki V, Heath S, Zelenika D, Fievet N, et al. Implication of the immune system in Alzheimer's disease: evidence from genome-wide pathway analysis. *J Alzheimers Dis.* 2010;20(4):1107–1118. Available from: <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-2010-100018>

Contribution : réalisation des analyses statistiques préalables à l'utilisation du logiciel Gengen, relecture du manuscrit

- Lambert JC, Zelenika D, Hiltunen M, Chouraki V, Combarros O, Bullido MJ, et al. Evidence of the association of BIN1 and PICALM with the AD risk in contrasting European populations. *Neurobiol Aging*. 2011 Apr;32(4):756.e11–756.e15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.11.022>

Contribution : réalisation des analyses statistique, relecture du manuscrit

- Lambert JC, Grenier-Boley B, Harold D, Zelenika D, Chouraki V, Kamatani Y, et al. Genome-wide haplotype association study identifies the FRMD4A gene as a risk locus for Alzheimer’s disease. *Mol Psychiatry*. 2012 Mar; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2012.14>

Contribution : extraction des résultats d’association entre les variants identifiés par approche pan-haplotypique et taux plasmatiques des peptides A β , relecture du manuscrit

- Bis JC, DeCarli C, Smith AV, van der Lijn F, Crivello F, Fornage M, et al. Common variants at 12q14 and 12q24 are associated with hippocampal volume. *Nat Genet*. 2012;44(5):545–551. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2237>

Contribution : réalisation des analyses statistiques pour l’étude des Trois Cités

A.3 Autres publications portant sur des données pangénomiques

- Pattaro C, Köttgen A, Teumer A, Garnaas M, Böger CA, Fuchsberger C, et al. Genome-wide association and functional follow-up reveals new Loci for kidney function. *PLoS Genet*. 2012 Mar;8(3):e1002584. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1002584>

Contribution : réalisation des analyses statistiques pour l’étude des Trois Cités

B

Critères diagnostiques de maladie d'Alzheimer

B.1 Critères de diagnostic de démence

Le diagnostic de démence est posé en présence de symptômes cognitifs ou neuropsychiatriques qui :

- Interfèrent avec la capacité de travail ou de réalisation des activités habituelles
- Représentent un déclin par rapport à des valeurs antérieures
- Ne sont pas expliqués par un délirium ou un trouble psychiatrique sévère

L'atteinte des fonctions cognitives est détectée par la combinaison de (1) l'anamnèse reconstituée avec le patient ou un informant fiable et (2) une évaluation objective des fonctions cognitives, soit au « lit du patient », soit lors d'une consultation neuropsychologique. Cette dernière devrait être réalisée quand l'anamnèse et l'examen cognitif « au lit du patient » ne permettent pas un diagnostic fiable.

Les troubles des fonctions cognitives ou du comportement impliquent au moins deux des domaines suivants :

1. Atteinte de la capacité à acquérir et à se souvenir de nouvelles informations
2. Atteinte des capacités de raisonnement et de gestion des tâches complexes et du jugement
3. Atteinte du langage (parole, lecture, écriture)
4. Modifications de la personnalité, du comportement

B.2 Arguments en faveur d'une démence liée à un processus physiopathologique de type Alzheimer

B.2.1 Maladie d'Alzheimer probable

Le diagnostic de maladie d'Alzheimer probable peut être porté quand les critères de démence précédemment décrits sont présents, ainsi que les caractéristiques suivantes :

1. Survenue progressive (mois, années)
2. Histoire de dégradation des fonctions cognitives par l'anamnèse ou l'examen
3. L'atteinte cognitive principale est initialement :
 - (a) Présentation amnésique : le syndrome le plus fréquent de la démence de type Alzheimer. Les déficits incluent des troubles de l'apprentissage et du rappel des informations récentes. La présence d'au moins un autre trouble cognitif est requise.
 - (b) Présentation non-amnésique :
 - Troubles du langage : récupération des mots
 - Troubles visuospatiaux
 - Troubles des fonctions exécutives
4. Le diagnostic de maladie d'Alzheimer probable ne devrait pas être posé en cas de (a) maladie cérébrovasculaire importante associée, définie par des antécédents d'accidents vasculaires cérébraux concomitants à la survenue ou l'aggravation des troubles cognitifs ; ou la présence d'infarctus extensifs ou multiples ou d'hyperintensités importantes dans la substance blanche ; ou si les caractéristiques de (b) démence à corps de Lewy, (c) de démence frontotemporale ou (d) d'aphasie primaire progressive sont présentes en dehors de la démence elle-même ; (e) ou de preuve de la présence de tout autre maladie neurologique ou de comorbidités non-neurologiques ou d'utilisation de médicaments pouvant avoir un effet sur la cognition.

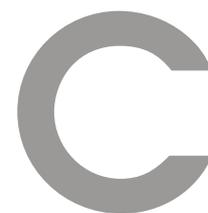
Le niveau de certitude de diagnostic de maladie d'Alzheimer probable peut être augmenté en cas de déclin documenté des fonctions cognitives ou si le sujet est porteur d'une mutation génétique causant la maladie d'Alzheimer (mutations sur les gènes APP, PSEN1 ou PSEN2).

B.2.2 Maladie d'Alzheimer possible

Un diagnostic de maladie d'Alzheimer possible est posé quand :

- L'évolution des troubles est atypique, soit le début des troubles est brutal, soit l'anamnèse des troubles et du déclin cognitif n'est pas suffisamment documentée.

- Les critères diagnostiques de démence de type Alzheimer sont présents ainsi (a) qu'une histoire concomitante de maladie cérébrovasculaire, (b) de démence à corps de Lewy, (c) ou d'autre maladie neurologique ou de comorbidités non-neurologiques ou d'utilisation de médicaments pouvant avoir un effet sur la cognition.



Critères diagnostiques de MCI

C.1 Critères de diagnostic de MCI

- Plainte concernant une modification des fonctions cognitives par rapport à l'état antérieur. Cette plainte émane du patient lui-même, d'un informant fiable ou d'un clinicien entraîné observant le patient
- Atteinte d'une fonction cognitive ou plus. La preuve d'une baisse de performance d'une ou plusieurs fonctions cognitives doit être faite, comparée aux valeurs attendues compte tenu de l'âge et du niveau d'éducation du patient ou de valeurs antérieures si des mesures répétées sont disponibles. Les domaines cognitifs atteints sont variés : mémoire, fonctions exécutives, attention, langage. Une atteinte de la mémoire épisodique est plus souvent rencontrée chez les patients progressant vers une démence de type maladie d'Alzheimer. Habituellement, on considère une atteinte objective quand les scores aux tests cognitifs sont inférieurs de 1 à 1.5 déviations standard par rapport à ce qui est attendu à âge et niveau d'éducation similaires.
- Préservation de l'indépendance dans les capacités fonctionnelles. Malgré la possible présence de difficultés pour réaliser des tâches complexes comme payer des factures, préparer un repas ou faire les courses, les sujets présentant un MCI conservent leur indépendance dans les tâches de la vie quotidienne.
- Absence de démence

C.2 Arguments en faveur d'un MCI lié à un processus physiopathologique de type Alzheimer

- Preuve d'un déclin progressif des fonctions cognitives grâce à des mesures répétées dans le temps
- Élimination d'autres causes pouvant expliquer le déclin cognitif (vasculaire, médicamenteuse, traumatique, autres causes neurodégénératives)

- Existence d'arguments génétiques augmentant le risque de maladie d'Alzheimer (mutations autosomiques dominantes, variants génétiques à risque)

Bibliographie

- [1] Pull CB. Classification internationale des maladies, dixième révision : CIM-10/ICD-10 : chapitre V (F) : troubles mentaux et troubles du comportement : descriptions cliniques et directives pour le diagnostic. Classification internationale des maladies : dixième révision. OMS ; 1993. Available from : <http://books.google.fr/books?id=FfbicjMnS9wC>.
- [2] Prince M, Jackson J, International AD. World Alzheimer Report 2009. Alzheimer's Disease International ; 2009.
- [3] World Health Organization. Neurological Disorders : Public Health Challenges. Nonserial Publication. World Health Organization ; 2006. Available from : <http://books.google.fr/books?id=Z8uwPwlPUw4C>.
- [4] World Health Organization, Alzheimer's Disease International. Dementia : A Public Health Priority. World Health Organization ; 2012. Available from : http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241564458_eng.pdf.
- [5] United Nations. World Population Ageing 2009 (Population Studies Series). United Nations ; 2010.
- [6] Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, et al. Global prevalence of dementia : a Delphi consensus study. *Lancet*. 2005 Dec ;366(9503) :2112–2117.
- [7] World Health Organization. The Global Burden of Disease : 2004 Update. World Health Organization ; 2008.
- [8] Reynish E, Fratiglioni L, Prince M, Bickel H, Kiejna A, Georges J. EUROCODE : Report of WP7 2006. Prevalence of dementia in Europe. Europe A, editor. Alzheimer Europe ; 2006.
- [9] Ott A, Breteler MM, van Harskamp F, Claus JJ, van der Cammen TJ, Grobbee DE, et al. Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia : association with education. The Rotterdam study. *BMJ*. 1995 Apr ;310(6985) :970–973.
- [10] Viswanathan A, Rocca WA, Tzourio C. Vascular risk factors and dementia : how to move forward? *Neurology*. 2009 Jan ;72(4) :368–374. Available from : <http://dx.doi.org/10.1212/01.wnl.0000341271.90478.8e>.
- [11] Knapp M, Prince M, Albanese E, Banerjee S, Dhanasiri S, Fernandez J, et al. Dementia UK – A report into the prevalence and cost of dementia prepared by the Personal Social Services Research Unit (PSSRU) at the London school of Economics and the Institute of Psychiatry at King's College London, for the Alzheimer's Society Dementia UK : The full report. Alzheimer's Society, London ; 2007.

- [12] Fitzpatrick AL, Kuller LH, Lopez OL, Kawas CH, Jagust W. Survival following dementia onset : Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Neurol Sci.* 2005 Mar ;229-230 :43–49. Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2004.11.022>.
- [13] Ganguli M, Dodge HH, Shen C, Pandav RS, DeKosky ST. Alzheimer disease and mortality : a 15-year epidemiological study. *Arch Neurol.* 2005 May ;62(5) :779–784. Available from : <http://dx.doi.org/10.1001/archneur.62.5.779>.
- [14] Dewey ME, Saz P. Dementia, cognitive impairment and mortality in persons aged 65 and over living in the community : a systematic review of the literature. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2001 Aug ;16(8) :751–761.
- [15] Haute Autorité de Santé. Maladie d'Alzheimer et maladies apparentées : diagnostic et prise en charge. Haute Autorité de Santé ; 2011.
- [16] McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease : report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology.* 1984 Jul ;34(7) :939–944.
- [17] Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 1975 Nov ;12(3) :189–198.
- [18] McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR Jr, Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia 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.* 2011 May ;7(3) :263–269. Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005>.
- [19] Petersen RC. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J Intern Med.* 2004 Sep ;256(3) :183–194. Available from : <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2796.2004.01388.x>.
- [20] Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild cognitive impairment : clinical characterization and outcome. *Arch Neurol.* 1999 Mar ;56(3) :303–308.
- [21] Winblad B, Palmer K, Kivipelto M, Jelic V, Fratiglioni L, Wahlund LO, et al. Mild cognitive impairment—beyond controversies, towards a consensus : report of the International Working Group on Mild Cognitive Impairment. *J Intern Med.* 2004 Sep ;256(3) :240–246. Available from : <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2796.2004.01380.x>.

- [22] 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*. 2011 May;7(3) :270–279. Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.008>.
- [23] Hampel H, Lista S, Khachaturian ZS. Development of biomarkers to chart all Alzheimer's disease stages : The royal road to cutting the therapeutic Gordian Knot. *Alzheimers Dement*. 2012 Jul;8(4) :312–336. Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2012.05.2116>.
- [24] 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 Aug;6(8) :734–746. Available from : [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70178-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70178-3).
- [25] 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*. 2010 Nov;9(11) :1118–1127. Available from : [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70223-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70223-4).
- [26] Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TLS, Fagan AM, Goate A, Fox NC, et al. Clinical and Biomarker Changes in Dominantly Inherited Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*. 2012 Jul ;.
- [27] Mullard A. Sting of Alzheimer's failures offset by upcoming prevention trials. *Nat Rev Drug Discov*. 2012 Sep ;11(9) :657–660. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3842>.
- [28] Love S. Neuropathological investigation of dementia : a guide for neurologists. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 2005 Dec;76 Suppl 5 :v8–14. Available from : <http://dx.doi.org/10.1136/jnnp.2005.080754>.
- [29] Dickerson BC, Bakkour A, Salat DH, Feczko E, Pacheco J, Greve DN, et al. The cortical signature of Alzheimer's disease : regionally specific cortical thinning relates to symptom severity in very mild to mild AD dementia and is detectable in asymptomatic amyloid-positive individuals. *Cereb Cortex*. 2009 Mar;19(3) :497–510. Available from : <http://dx.doi.org/10.1093/cercor/bhn113>.
- [30] Dickerson BC, Stoub TR, Shah RC, Sperling RA, Killiany RJ, Albert MS, et al. Alzheimer-signature MRI biomarker predicts AD dementia in cognitively normal adults. *Neurology*. 2011 Apr;76(16) :1395–1402. Available from : <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182166e96>.

- [31] Vandenberghe R, Tournoy J. Cognitive aging and Alzheimer's disease. *Postgrad Med J*. 2005 Jun;81(956) :343–352. Available from : <http://dx.doi.org/10.1136/pgmj.2004.028290>.
- [32] Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011 Sep;1(1) :a006189. Available from : <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a006189>.
- [33] Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*. 2002 Jun;58(12) :1791–1800.
- [34] Braak H, Braak E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 1991 ;82(4) :239–259.
- [35] Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, et al. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status : a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012 May;71(5) :362–381. Available from : <http://dx.doi.org/10.1097/NEN.0b013e31825018f7>.
- [36] Ingelsson M, Fukumoto H, Newell KL, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Frosch MP, et al. Early Aβ accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology*. 2004 Mar;62(6) :925–931.
- [37] Serrano-Pozo A, Mielke ML, Muzitansky A, Gómez-Isla T, Growdon JH, Bacskai BJ, et al. Stable Size Distribution of Amyloid Plaques Over the Course of Alzheimer Disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012 Jul; Available from : <http://dx.doi.org/10.1097/NEN.0b013e31825e77de>.
- [38] Jack CR Jr, Lowe VJ, Weigand SD, Wiste HJ, Senjem ML, Knopman DS, et al. Serial PIB and MRI in normal, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease : implications for sequence of pathological events in Alzheimer's disease. *Brain*. 2009 May;132(Pt 5) :1355–1365. Available from : <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awp062>.
- [39] Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat*. 1995;8(6) :429–431. Available from : <http://dx.doi.org/10.1002/ca.980080612>.
- [40] Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del Tredici K. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol*. 2006 Oct;112(4) :389–404. Available from : <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-006-0127-z>.
- [41] Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW. The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the

- cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb Cortex*. 1991 ;1(1) :103–116.
- [42] Knudsen KA, Rosand J, Karluk D, Greenberg SM. Clinical diagnosis of cerebral amyloid angiopathy : validation of the Boston criteria. *Neurology*. 2001 Feb ;56(4) :537–539.
- [43] Neuropathology Group of the Medical Research Council Cognitive Function and Aging Study (MRC CFAS). Pathological correlates of late-onset dementia in a multicentre, community-based population in England and Wales. *Lancet*. 2001 Jan ;357(9251) :169–175.
- [44] Pfeifer LA, White LR, Ross GW, Petrovitch H, Launer LJ. Cerebral amyloid angiopathy and cognitive function : the HAAS autopsy study. *Neurology*. 2002 Jun ;58(11) :1629–1634.
- [45] Greenberg SM, Gurol ME, Rosand J, Smith EE. Amyloid angiopathy-related vascular cognitive impairment. *Stroke*. 2004 Nov ;35(11 Suppl 1) :2616–2619. Available from : <http://dx.doi.org/10.1161/01.STR.0000143224.36527.44>.
- [46] Arvanitakis Z, Leurgans SE, Wang Z, Wilson RS, Bennett DA, Schneider JA. Cerebral amyloid angiopathy pathology and cognitive domains in older persons. *Ann Neurol*. 2011 Feb ;69(2) :320–327. Available from : <http://dx.doi.org/10.1002/ana.22112>.
- [47] Itagaki S, McGeer PL, Akiyama H, Zhu S, Selkoe D. Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Neuroimmunol*. 1989 Oct ;24(3) :173–182.
- [48] Pike CJ, Cummings BJ, Cotman CW. Early association of reactive astrocytes with senile plaques in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 1995 Apr ;132(2) :172–179.
- [49] Vehmas AK, Kawas CH, Stewart WF, Troncoso JC. Immune reactive cells in senile plaques and cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2003 ;24(2) :321–331.
- [50] Serrano-Pozo A, Mielke ML, Gómez-Isla T, Betensky RA, Growdon JH, Frosch MP et al. Reactive glia not only associates with plaques but also parallels tangles in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 2011 Sep ;179(3) :1373–1384. Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.05.047>.
- [51] Gómez-Isla T, Price JL, McKeel D Jr, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 1996 Jul ;16(14) :4491–4500.

- [52] Gómez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, et al. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1997 Jan;41(1) :17–24. Available from : <http://dx.doi.org/10.1002/ana.410410106>.
- [53] DeKosky ST, Scheff SW. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease : correlation with cognitive severity. *Ann Neurol*. 1990 May;27(5) :457–464. Available from : <http://dx.doi.org/10.1002/ana.410270502>.
- [54] Scheff SW, DeKosky ST, Price DA. Quantitative assessment of cortical synaptic density in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1990;11(1) :29–37.
- [55] Scheff SW, Price DA. Synapse loss in the temporal lobe in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1993 Feb;33(2) :190–199. Available from : <http://dx.doi.org/10.1002/ana.410330209>.
- [56] Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, DeKosky ST, Mufson EJ. Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology*. 2007 May;68(18) :1501–1508. Available from : <http://dx.doi.org/10.1212/01.wnl.0000260698.46517.8f>.
- [57] Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease : synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*. 1991 Oct;30(4) :572–580. Available from : <http://dx.doi.org/10.1002/ana.410300410>.
- [58] Masliah E, Mallory M, Hansen L, DeTeresa R, Alford M, Terry R. Synaptic and neuritic alterations during the progression of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 1994 Jun;174(1) :67–72.
- [59] Hyman BT. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease : clinical-pathological studies. *Neurobiol Aging*. 1997;18(4 Suppl) :S27–S32.
- [60] Schneider JA, Arvanitakis Z, Bang W, Bennett DA. Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons. *Neurology*. 2007 Dec;69(24) :2197–2204. Available from : <http://dx.doi.org/10.1212/01.wnl.0000271090.28148.24>.
- [61] Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease : initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984 May;120(3) :885–890.
- [62] Tanzi RE. The Genetics of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; Available from : <http://perspectivesinmedicine.org/content/early/2012/07/25/cshperspect.a006296.full.pdf+html>.

- [63] Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease and Down's syndrome : sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 Aug;122(3) :1131–1135.
- [64] Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease : the amyloid cascade hypothesis. *Science* (80-). 1992 Apr;256(5054) :184–185.
- [65] Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease : progress and problems on the road to therapeutics. *Science* (80-). 2002 Jul;297(5580) :353–356. Available from : <http://dx.doi.org/10.1126/science.1072994>.
- [66] Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S. Trafficking and Proteolytic Processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 May;2(5) :a006270. Available from : <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a006270>.
- [67] Zhang H, Ma Q, Zhang Yw, Xu H. Proteolytic processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein. *J Neurochem.* 2012 Jan;120 Suppl 1 :9–21. Available from : <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07519.x>.
- [68] Saido T, Leissring MA. Proteolytic Degradation of Amyloid β -Protein. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Jun;2(6) :a006379. Available from : <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a006379>.
- [69] Sagare AP, Bell RD, Zlokovic BV. Neurovascular Defects and Faulty Amyloid- β Vascular Clearance in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2012 Jun; Available from : <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-2012-129037>.
- [70] Bates KA, Verdile G, Li QX, Ames D, Hudson P, Masters CL, et al. Clearance mechanisms of Alzheimer's amyloid-beta peptide : implications for therapeutic design and diagnostic tests. *Mol Psychiatry.* 2009 May;14(5) :469–486. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2008.96>.
- [71] Sagare AP, Winkler EA, Bell RD, Deane R, Zlokovic BV. From the liver to the blood-brain barrier : an interconnected system regulating brain amyloid- β levels. *J Neurosci Res.* 2011 Jul;89(7) :967–968. Available from : <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.22670>.
- [72] Müller UC, Zheng H. Physiological Functions of APP Family Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Feb;2(2) :a006288. Available from : <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a006288>.
- [73] Lazarov O, Demars MP. All in the Family : How the APPs Regulate Neurogenesis. *Front Neurosci.* 2012;6 :81. Available from : <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2012.00081>.

- [74] Chasseigneaux S, Allinquant B. Functions of A β , sAPP α and sAPP β : similarities and differences. *J Neurochem.* 2012 Jan ;120 Suppl 1 :99–108. Available from : <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07584.x>.
- [75] Kontush A. Alzheimer's amyloid-beta as a preventive antioxidant for brain lipoproteins. *Cell Mol Neurobiol.* 2001 Aug ;21(4) :299–315.
- [76] Li QX, Whyte S, Tanner JE, Evin G, Beyreuther K, Masters CL. Secretion of Alzheimer's disease A β amyloid peptide by activated human platelets. *Lab Invest.* 1998 Apr ;78(4) :461–469.
- [77] Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hyman B, et al. The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS ONE.* 2010 ;5(3) :e9505. Available from : <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0009505>.
- [78] Thomas T, Thomas G, McLendon C, Sutton T, Mullan M. beta-Amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage. *Nature.* 1996 Mar ;380(6570) :168–171. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/380168a0>.
- [79] Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein : reversal by tachykinin neuropeptides. *Science (80-).* 1990 Oct ;250(4978) :279–282.
- [80] Benilova I, Karran E, De Strooper B. The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease : an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci.* 2012 ;15(3) :349–357. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3028>.
- [81] Huang Y, Mucke L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell.* 2012 Mar ;148(6) :1204–1222. Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.040>.
- [82] Prusiner SB. Cell biology. A unifying role for prions in neurodegenerative diseases. *Science (80-).* 2012 Jun ;336(6088) :1511–1513. Available from : <http://dx.doi.org/10.1126/science.1222951>.
- [83] Mandelkow EM, Mandelkow E. Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Jul ;2(7) :a006247. Available from : <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a006247>.
- [84] Lippens G, Amniai L, Wieruszeski JM, Sillen A, Leroy A, Landrieu I. Towards understanding the phosphorylation code of tau. *Biochem Soc Trans.* 2012 Aug ;40(4) :698–703. Available from : <http://dx.doi.org/10.1042/BST20120050>.
- [85] Veerhuis R. Histological and direct evidence for the role of complement in the neuroinflammation of AD. *Curr Alzheimer Res.* 2011 Feb ;8(1) :34–58.

- [86] Wyss-Coray T, Rogers J. Inflammation in Alzheimer disease—a brief review of the basic science and clinical literature. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Jan;2(1) :a006346. Available from : <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a006346>.
- [87] Krstic D, Knuesel I. Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2012 Dec;9(1) :25–34. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/nrneuro1.2012.236>.
- [88] de la Torre JC. Preface : physiopathology of vascular risk factors in Alzheimer’s disease. *J Alzheimers Dis*. 2012;32(3) :517–518. Available from : <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-2012-120830>.
- [89] Ostergaard L, Aamand R, Gutiérrez-Jiménez E, Ho YCL, Blicher JU, Madsen SM, et al. The capillary dysfunction hypothesis of Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging*. 2012 Oct; Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.09.011>.
- [90] Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease : risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol*. 2013 Jan; Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/nrneuro1.2012.263>.
- [91] Reiss AB, Voloshyna I. Regulation of cerebral cholesterol metabolism in Alzheimer disease. *J Investig Med*. 2012 Mar;60(3) :576–582. Available from : <http://dx.doi.org/10.231/JIM.0b013e318246d973>.
- [92] Holtzman DM, Herz J, Bu G. Apolipoprotein e and apolipoprotein e receptors : normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Mar;2(3) :a006312. Available from : <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a006312>.
- [93] Filippi M, Canu E, Agosta F. The Role of Amyloid- β , tau, and Apolipoprotein E variants in Alzheimer Disease : How Is the Team Playing? *AJNR Am J Neuroradiol*. 2012 Aug; Available from : <http://dx.doi.org/10.3174/ajnr.A3295>.
- [94] Wolf AB, Caselli RJ, Reiman EM, Valla J. APOE and neuroenergetics : an emerging paradigm in Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging*. 2013 Apr;34(4) :1007–1017. Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.10.011>.
- [95] Ziegler-Graham K, Brookmeyer R, Johnson E, Arrighi HM. Worldwide variation in the doubling time of Alzheimer’s disease incidence rates. *Alzheimers Dement*. 2008 Sep;4(5) :316–323. Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2008.05.2479>.

- [96] Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2011 Mar ;377(9770) :1019–1031. Available from : [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61349-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61349-9).
- [97] Weuve J, McQueen M, Blacker D. The AlzRisk Database; 2012. Available from : <http://www.alzforum.org>.
- [98] Barnes DE, Yaffe K. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol*. 2011 Sep ;10(9) :819–828. Available from : [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70072-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70072-2).
- [99] Berr C, Vercambre MN, Akbaraly TN. [Epidemiology of Alzheimer's disease : methodological approaches and new perspectives]. *Psychol Neuropsychiatr Vieil*. 2009 Dec ;7 Spec No 1 :7–14. Available from : <http://dx.doi.org/10.1684/pnv.2009.0191>.
- [100] Guan JW, Huang CQ, Li YH, Wan CM, You C, Wang ZR, et al. No association between hypertension and risk for Alzheimer's disease : a meta-analysis of longitudinal studies. *J Alzheimers Dis*. 2011 ;27(4) :799–807. Available from : <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-2011-111160>.
- [101] Power MC, Weuve J, Gagne JJ, McQueen MB, Viswanathan A, Blacker D. The association between blood pressure and incident Alzheimer disease : a systematic review and meta-analysis. *Epidemiology*. 2011 Sep ;22(5) :646–659. Available from : <http://dx.doi.org/10.1097/EDE.0b013e31822708b5>.
- [102] Williams JW, Plassman BL, Burke J, Benjamin S. Preventing Alzheimer's disease and cognitive decline. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)*. 2010 Apr ;(193) :1–727.
- [103] Daviglus ML, Bell CC, Berrettini W, Bowen PE, Connolly ES, Cox NJ, et al. NIH State-of-the-Science Conference Statement : Preventing Alzheimer's Disease and Cognitive Decline. *NIH Consens State Sci Statements*. 2010 Apr ;27(4).
- [104] Daviglus ML, Plassman BL, Pirzada A, Bell CC, Bowen PE, Burke JR, et al. Risk factors and preventive interventions for Alzheimer disease : state of the science. *Arch Neurol*. 2011 Sep ;68(9) :1185–1190. Available from : <http://dx.doi.org/10.1001/archneurol.2011.100>.
- [105] Lautenschlager NT, Cupples LA, Rao VS, Auerbach SA, Becker R, Burke J, et al. Risk of dementia among relatives of Alzheimer's disease patients in the MIRAGE study : What is in store for the oldest old ? *Neurology*. 1996 Mar ;46(3) :641–650.
- [106] Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, et al. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry*. 2006 Feb ;63(2) :168–174. Available from : <http://dx.doi.org/10.1001/archpsyc.63.2.168>.

- [107] Traynor BJ, Singleton AB. Nature versus nurture : death of a dogma, and the road ahead. *Neuron*. 2010 Oct ;68(2) :196–200. Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2010.10.002>.
- [108] Devlin B, Risch N. A comparison of linkage disequilibrium measures for fine-scale mapping. *Genomics*. 1995 Sep ;29(2) :311–322. Available from : <http://dx.doi.org/10.1006/geno.1995.9003>.
- [109] Gabriel SB, Schaffner SE, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* (80-). 2002 Jun ;296(5576) :2225–2229. Available from : <http://dx.doi.org/10.1126/science.1069424>.
- [110] Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, et al. dbSNP : the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*. 2001 Jan ;29(1) :308–311.
- [111] Kruglyak L. The road to genome-wide association studies. *Nat Rev Genet*. 2008 ;9(4) :314–8. Available from : <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18283274>.
- [112] Lander ES. The new genomics : global views of biology. *Science* (80-). 1996 Oct ;274(5287) :536–539.
- [113] Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* (80-). 1996 Sep ;273(5281) :1516–1517.
- [114] International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature*. 2003 Dec ;426(6968) :789–796.
- [115] International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005 Oct ;437(7063) :1299–1320.
- [116] International HapMap Consortium, Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 2007 Oct ;449(7164) :851–861. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/nature06258>.
- [117] International HapMap 3 Consortium, Altshuler DM, Gibbs RA, Peltonen L, Altshuler DM, Gibbs RA, et al. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature*. 2010 Sep ;467(7311) :52–58. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/nature09298>.
- [118] 1000 Genomes Project Consortium. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*. 2010 Oct ;467(7319) :1061–1073. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/nature09534>.

- [119] 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012 Nov;491(7422) :56–65. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/nature11632>.
- [120] Steemers FJ, Gunderson KL. Whole genome genotyping technologies on the BeadArray platform. *Biotechnol J*. 2007 Jan;2(1) :41–49. Available from : <http://dx.doi.org/10.1002/biot.200600213>.
- [121] Steemers FJ, Gunderson KL. Illumina, Inc. *Pharmacogenomics*. 2005 Oct;6(7) :777–782. Available from : <http://dx.doi.org/10.2217/14622416.6.7.777>.
- [122] Spencer C. Designing a genome-wide association study. In : Marchini J, editor. *Statistical Methods for the Analysis of Genome-Wide Association Studies : Practical advice and guidance*. The Biomedical & Life Sciences Collection. London : Henry Stewart Talks Ltd ; 2008. Available from : <http://hstalks.com/bio>.
- [123] Plagnol V. Genotyping algorithms for genome wide association studies. In : Marchini J, editor. *Statistical Methods for the Analysis of Genome-Wide Association Studies : Practical advice and guidance*. The Biomedical & Life Sciences Collection. London : Henry Stewart Talks Ltd ; 2008. Available from : <http://hstalks.com/bio>.
- [124] Vens M, Schillert A, König IR, Ziegler A. Look who is calling : a comparison of genotype calling algorithms. *BMC Proc*. 2009 ;3 Suppl 7 :S59.
- [125] Weale ME. Quality control for genome-wide association studies. *Methods Mol Biol*. 2010 ;628 :341–372. Available from : http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-367-1_19.
- [126] Barrett J. Quality control measures for GWAS. In : Marchini J, editor. *Statistical Methods for the Analysis of Genome-Wide Association Studies : Practical advice and guidance*. The Biomedical & Life Sciences Collection. London : Henry Stewart Talks Ltd ; 2008. Available from : <http://hstalks.com/bio>.
- [127] Ziegler A. Genome-wide association studies : quality control and population-based measures. *Genet Epidemiol*. 2009 ;33 Suppl 1 :S45–S50. Available from : <http://dx.doi.org/10.1002/gepi.20472>.
- [128] Smith JG, Newton-Cheh C. Genome-wide association study in humans. *Methods Mol Biol*. 2009 ;573 :231–258. Available from : http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60761-247-6_14.
- [129] Anderson CA, Pettersson FH, Clarke GM, Cardon LR, Morris AP, Zondervan KT. Data quality control in genetic case-control association studies. *Nat Protoc*. 2010 Sep;5(9) :1564–1573. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2010.116>.

- [130] Devlin B, Roeder K. Genomic control for association studies. *Biometrics*. 1999 Dec;55(4) :997–1004.
- [131] Devlin B, Roeder K, Bacanu SA. Unbiased methods for population-based association studies. *Genet Epidemiol*. 2001;21(4) :273–84. Available from : <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11754464>.
- [132] Ioannidis JPA. Why most discovered true associations are inflated. *Epidemiology*. 2008;19(5) :640–8. Available from : <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18633328>.
- [133] Kraft P. Curses–winner’s and otherwise–in genetic epidemiology. *Epidemiology*. 2008;19(5) :649–51; discussion 657. Available from : <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18703928>.
- [134] de Bakker PIW, Ferreira MAR, Jia X, Neale BM, Raychaudhuri S, Voight BF. Practical aspects of imputation-driven meta-analysis of genome-wide association studies. *Hum Mol Genet*. 2008 Oct;17(R2) :R122–R128. Available from : <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddn288>.
- [135] Zeggini E, Ioannidis JPA. Meta-analysis in genome-wide association studies. *Pharmacogenomics*. 2009 Feb;10(2) :191–201. Available from : <http://dx.doi.org/10.2217/14622416.10.2.191>.
- [136] Thompson JR, Attia J, Minelli C. The meta-analysis of genome-wide association studies. *Brief Bioinformatics*. 2011 May;12(3) :259–269. Available from : <http://dx.doi.org/10.1093/bib/bbr020>.
- [137] Begum F, Ghosh D, Tseng GC, Feingold E. Comprehensive literature review and statistical considerations for GWAS meta-analysis. *Nucleic Acids Res*. 2012 Jan; Available from : <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr1255>.
- [138] Gögele M, Minelli C, Thakkestian A, Yurkewich A, Pattaro C, Pramstaller PP, et al. Methods for Meta-Analyses of Genome-wide Association Studies : Critical Assessment of Empirical Evidence. *Am J Epidemiol*. 2012 Mar; Available from : <http://dx.doi.org/10.1093/aje/kwr385>.
- [139] Marchini J, Howie B. Genotype imputation for genome-wide association studies. *Nat Rev Genet*. 2010 Jun;11(7) :499–511. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2796>.
- [140] Goldgaber D, Lerman MI, McBride OW, Saffiotti U, Gajdusek DC. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer’s disease. *Science* (80-). 1987 Feb;235(4791) :877–880.

- [141] Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GA, St George-Hyslop P, Van Keuren ML, et al. Amyloid beta protein gene : cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* (80-). 1987 Feb ;235(4791) :880–884.
- [142] Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*. 1987 ;325(6106) :733–736. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/325733a0>.
- [143] Robakis NK, Wisniewski HM, Jenkins EC, Devine-Gage EA, Houck GE, Yao XL, et al. Chromosome 21q21 sublocalisation of gene encoding beta-amyloid peptide in cerebral vessels and neuritic (senile) plaques of people with Alzheimer disease and Down syndrome. *Lancet*. 1987 Feb ;1(8529) :384–385.
- [144] St George-Hyslop PH, Tanzi RE, Polinsky RJ, Haines JL, Nee L, Watkins PC, et al. The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science* (80-). 1987 Feb ;235(4791) :885–890.
- [145] Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, et al. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet*. 1992 Aug ;1(5) :345–347. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/ng0892-345>.
- [146] Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, et al. Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature*. 1991 Oct ;353(6347) :844–846. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/353844a0>.
- [147] Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD. A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* (80-). 1991 Oct ;254(5028) :97–99.
- [148] Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1991 Feb ;349(6311) :704–706. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/349704a0>.
- [149] Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1995 Jun ;375(6534) :754–760. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/375754a0>.
- [150] Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* (80-). 1995 Aug ;269(5226) :973–977.

- [151] Cruts M, Theuns J, Van Broeckhoven C. Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. *Hum Mutat.* 2012 May; Available from : <http://dx.doi.org/10.1002/humu.22117>.
- [152] Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson PV, Bjornsson S, et al. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature.* 2012 Aug;488(7409) :96–99. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/nature11283>.
- [153] Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell P Jr, Yamaoka LH, Hung WY, Alberts MJ, et al. Linkage studies in familial Alzheimer disease : evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet.* 1991 Jun ;48(6) :1034–1050.
- [154] Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E, Ikeda K. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res.* 1991 Feb ;541(1) :163–166.
- [155] Wisniewski T, Frangione B. Apolipoprotein E : a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci Lett.* 1992 Feb ;135(2) :235–238.
- [156] Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science (80-)*. 1993 Aug ;261(5123) :921–923.
- [157] Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, et al. Apolipoprotein E : high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Mar ;90(5) :1977–1981.
- [158] Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA.* 1997 ;278(16) :1349–1356.
- [159] Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies : the AlzGene database. *Nat Genet.* 2007 Jan ;39(1) :17–23. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/ng1934>.
- [160] Genin E, Hannequin D, Wallon D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, et al. APOE and Alzheimer disease : a major gene with semi-dominant inheritance. *Mol Psychiatry.* 2011 Sep ;16(9) :903–907. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2011.52>.

- [161] Royston MC, Mann D, Pickering-Brown S, Owen F, Perry R, Raghavan R, et al. Apolipoprotein E epsilon 2 allele promotes longevity and protects patients with Down's syndrome from dementia. *Neuroreport*. 1994 Dec ;5(18) :2583–2585.
- [162] Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell P Jr, et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet*. 1994 Jun ;7(2) :180–184. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/ng0694-180>.
- [163] Ertekin-Taner N. Genetics of Alzheimer disease in the pre- and post-GWAS era. *Alzheimers Res Ther*. 2010 ;2(1) :3. Available from : <http://dx.doi.org/10.1186/alzrt26>.
- [164] Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* (80-). 2005 Apr ;308(5720) :385–389. Available from : <http://dx.doi.org/10.1126/science.1109557>.
- [165] Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007 Jun ;447(7145) :661–678. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/nature05911>.
- [166] Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2009 Oct ;41(10) :1094–1099. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/ng.439>.
- [167] Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2009 Oct ;41(10) :1088–1093. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/ng.440>.
- [168] Seshadri S, Fitzpatrick AL, Ikram MA, DeStefano AL, Gudnason V, Boada M, et al. Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA*. 2010 May ;303(18) :1832–1840. Available from : <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2010.574>.
- [169] Naj AC, Beecham GW, Martin ER, Gallins PJ, Powell EH, Konidari I, et al. Dementia revealed : novel chromosome 6 locus for late-onset Alzheimer disease provides genetic evidence for folate-pathway abnormalities. *PLoS Genet*. 2010 Sep ;6(9). Available from : <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1001130>.
- [170] Hu X, Pickering E, Liu YC, Hall S, Fournier H, Katz E, et al. Meta-analysis for genome-wide association study identifies multiple variants at the BIN1 locus associated with late-onset Alzheimer's disease. *PLoS ONE*. 2011 ;6(2) :e16616.

- [171] Reiman EM, Webster JA, Myers AJ, Hardy J, Dunckley T, Zismann VL, et al. GAB2 alleles modify Alzheimer's risk in APOE epsilon4 carriers. *Neuron*. 2007 Jun ;54(5) :713–720. Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.022>.
- [172] Abraham R, Moskvina V, Sims R, Hollingworth P, Morgan A, Georgieva L, et al. A genome-wide association study for late-onset Alzheimer's disease using DNA pooling. *BMC Med Genomics*. 2008 ;1 :44. Available from : <http://dx.doi.org/10.1186/1755-8794-1-44>.
- [173] Feulner TM, Laws SM, Friedrich P, Wagenpfeil S, Wurst SHR, Riehle C, et al. Examination of the current top candidate genes for AD in a genome-wide association study. *Mol Psychiatry*. 2010 Jul ;15(7) :756–766. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2008.141>.
- [174] Heinzen EL, Need AC, Hayden KM, Chiba-Falek O, Roses AD, Strittmatter WJ, et al. Genome-wide scan of copy number variation in late-onset Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2010 ;19(1) :69–77. Available from : <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-2010-1212>.
- [175] Coon KD, Myers AJ, Craig DW, Webster JA, Pearson JV, Lince DH, et al. A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry*. 2007 Apr ;68(4) :613–618.
- [176] Webster JA, Myers AJ, Pearson JV, Craig DW, Hu-Lince D, Coon KD, et al. Sorl1 as an Alzheimer's disease predisposition gene? *Neurodegener Dis*. 2008 ;5(2) :60–64. Available from : <http://dx.doi.org/10.1159/000110789>.
- [177] Li H, Wetten S, Li L, St Jean PL, Upmanyu R, Surh L, et al. Candidate single-nucleotide polymorphisms from a genomewide association study of Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2008 Jan ;65(1) :45–53. Available from : <http://dx.doi.org/10.1001/archneurol.2007.3>.
- [178] Han MR, Schellenberg GD, Wang LS, ADNI. Genome-wide association reveals genetic effects on human Abeta42 and Tau protein levels in cerebrospinal fluids : a case control study. *BMC Neurol*. 2010 ;10 :90.
- [179] Furney SJ, Simmons A, Breen G, Pedroso I, Lunnon K, Proitsi P, et al. Genome-wide association with MRI atrophy measures as a quantitative trait locus for Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*. 2011 Nov ;16(11) :1130–1138.
- [180] Seshadri S, DeStefano AL, Au R, Massaro JM, Beiser AS, Kelly-Hayes M, et al. Genetic correlates of brain aging on MRI and cognitive test measures : a genome-wide association and linkage analysis in the Framingham Study. *BMC Med Genet*. 2007 ;8 Suppl 1 :S15. Available from : <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2350-8-S1-S15>.

- [181] Lunetta KL, D'Agostino RB Sr, Karasik D, Benjamin EJ, Guo CY, Govindaraju R, et al. Genetic correlates of longevity and selected age-related phenotypes : a genome-wide association study in the Framingham Study. *BMC Med Genet.* 2007 ;8 Suppl 1 :S13. Available from : <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2350-8-S1-S13>.
- [182] Poduslo SE, Huang R, Spiro A 3rd. A genome screen of successful aging without cognitive decline identifies LRP1B by haplotype analysis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2010 Jan ;153B(1) :114–119. Available from : <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.b.30963>.
- [183] Laumet G, Chouraki V, Grenier-Boley B, Legry V, Heath S, Zelenika D, et al. Systematic analysis of candidate genes for Alzheimer's disease in a French, genome-wide association study. *J Alzheimers Dis.* 2010 ;20(4) :1181–1188. Available from : <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-2010-100126>.
- [184] Shulman JM, Chibnik LB, Aubin C, Schneider JA, Bennett DA, De Jager PL. Intermediate phenotypes identify divergent pathways to Alzheimer's disease. *PLoS ONE.* 2010 ;5(6) :e11244. Available from : <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011244>.
- [185] Hollingworth P, Harold D, Sims R, Gerrish A, Lambert JC, Carrasquillo MM, et al. Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2011 May ;43(5) :429–435. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/ng.803>.
- [186] Naj AC, Jun G, Beecham GW, Wang LS, Vardarajan BN, Buross J, et al. Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2011 May ;43(5) :436–441. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/ng.801>.
- [187] Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, Carrasquillo M, Rogaeva E, Majounie E, et al. TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2013 Jan ;368(2) :117–127. Available from : <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1211851>.
- [188] Jonsson T, Stefansson H, Steinberg S, Jonsdottir I, Jonsson PV, Snaedal J, et al. Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2013 Jan ;368(2) :107–116. Available from : <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1211103>.
- [189] De Strooper B, Annaert W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci.* 2000 Jun ;113 (Pt 11) :1857–1870.
- [190] Maezawa I, Jin LW, Woltjer RL, Maeda N, Martin GM, Montine TJ, et al. Apolipoprotein E isoforms and apolipoprotein AI protect from amyloid precursor protein carboxy

- terminal fragment-associated cytotoxicity. *J Neurochem.* 2004 Dec;91(6) :1312–1321. Available from : <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02818.x>.
- [191] Yazawa H, Yu ZX, Takeda, Le Y, Gong W, Ferrans VJ, et al. Beta amyloid peptide (A β 42) is internalized via the G-protein-coupled receptor FPRL1 and forms fibrillar aggregates in macrophages. *FASEB J.* 2001 Nov;15(13) :2454–2462. Available from : <http://dx.doi.org/10.1096/fj.01-0251com>.
- [192] Ibrahim-Verbaas CA, Zorkoltseva IV, Amin N, Schuur M, Coppus AMW, Isaacs A, et al. Linkage analysis for plasma amyloid beta levels in persons with hypertension implicates A β -40 levels to presenilin 2. *Hum Genet.* 2012 Dec;131(12) :1869–1876. Available from : <http://dx.doi.org/10.1007/s00439-012-1210-2>.
- [193] Lambert JC, Dallongeville J, Ellis KA, Schraen-Maschke S, Lui J, Laws S, et al. Association of plasma a β peptides with blood pressure in the elderly. *PLoS ONE.* 2011;6(4) :e18536. Available from : <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0018536>.
- [194] Lambert JC, Schraen-Maschke S, Richard F, Fievet N, Rouaud O, Berr C, et al. Association of plasma amyloid beta with risk of dementia : the prospective Three-City Study. *Neurology.* 2009 Sep;73(11) :847–853. Available from : <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181b78448>.
- [195] van Oijen M, Hofman A, Soares HD, Koudstaal PJ, Breteler MMB. Plasma A β (1-40) and A β (1-42) and the risk of dementia : a prospective case-cohort study. *Lancet Neurol.* 2006 Aug;5(8) :655–660. Available from : [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70501-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70501-4).
- [196] Ertekin-Taner N, Graff-Radford N, Younkin LH, Eckman C, Adamson J, Schaid DJ, et al. Heritability of plasma amyloid beta in typical late-onset Alzheimer's disease pedigrees. *Genet Epidemiol.* 2001 Jul;21(1) :19–30. Available from : <http://dx.doi.org/10.1002/gepi.1015>.
- [197] Lourenço FC, Galvan V, Fombonne J, Corset V, Llambi F, Müller U, et al. Netrin-1 interacts with amyloid precursor protein and regulates amyloid-beta production. *Cell Death Differ.* 2009 May;16(5) :655–663. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2008.191>.
- [198] Marambaud P, Chevallier N, Ancolio K, Checler F. Post-transcriptional contribution of a cAMP-dependent pathway to the formation of alpha- and beta/gamma-secretases-derived products of beta APP maturation in human cells expressing wild-type and Swedish mutated beta APP. *Mol Med.* 1998 Nov;4(11) :715–723.
- [199] Rama N, Goldschneider D, Corset V, Lambert J, Pays L, Mehlen P. Amyloid precursor protein regulates netrin-1-mediated commissural axon outgrowth. *J Biol Chem.* 2012

- Aug;287(35) :30014–30023. Available from : <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.324780>.
- [200] Su Y, Ryder J, Ni B. Inhibition of Abeta production and APP maturation by a specific PKA inhibitor. *FEBS Lett.* 2003 Jul ;546(2-3) :407–410.
- [201] Chen Y, Tang BL. The amyloid precursor protein and postnatal neurogenesis/neuroregeneration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Mar ;341(1) :1–5. Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.150>.
- [202] Bartl J, Scholz CJ, Hinterberger M, Jungwirth S, Wichart I, Rainer MK, et al. Disorder-specific effects of polymorphisms at opposing ends of the Insulin Degrading Enzyme gene. *BMC Med Genet.* 2011 ;12 :151. Available from : <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2350-12-151>.
- [203] Carrasquillo MM, Belbin O, Zou F, Allen M, Ertekin-Taner N, Ansari M, et al. Concordant association of insulin degrading enzyme gene (IDE) variants with IDE mRNA, Abeta, and Alzheimer's disease. *PLoS ONE.* 2010;5(1) :e8764. Available from : <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0008764>.
- [204] Ertekin-Taner N, Allen M, Fadale D, Scanlin L, Younkin L, Petersen RC, et al. Genetic variants in a haplotype block spanning IDE are significantly associated with plasma Abeta42 levels and risk for Alzheimer disease. *Hum Mutat.* 2004 Apr ;23(4) :334–342. Available from : <http://dx.doi.org/10.1002/humu.20016>.
- [205] Reitz C, Cheng R, Schupf N, Lee JH, Mehta PD, Rogaeva E, et al. Association between variants in IDE-KIF11-HHEX and plasma amyloid beta levels. *Neurobiol Aging.* 2012 Jan ;33(1) :199.e13–199.e17. Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.07.005>.
- [206] Reitz C, van Rooij FJA, Soares HD, de Maat MPM, Hofman A, Witteman JCM, et al. Matrix metalloproteinase 3 haplotypes and plasma amyloid beta levels : the Rotterdam Study. *Neurobiol Aging.* 2010 Apr ;31(4) :715–718. Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.05.033>.
- [207] Kim S, Swaminathan S, Shen L, Risacher SL, Nho K, Foroud T, et al. Genome-wide association study of CSF biomarkers Abeta1-42, t-tau, and p-tau181p in the ADNI cohort. *Neurology.* 2011 Jan ;76(1) :69–79. Available from : <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0b013e318204a397>.
- [208] Gavín R, Ferrer I, del Río JA. Involvement of Dab1 in APP processing and beta-amyloid deposition in sporadic Creutzfeldt-Jakob patients. *Neurobiol Dis.* 2010 Feb ;37(2) :324–329. Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2009.10.010>.

- [209] Kwon OY, Hwang K, Kim JA, Kim K, Kwon IC, Song HK, et al. Dab1 binds to Fe65 and diminishes the effect of Fe65 or LRP1 on APP processing. *J Cell Biochem.* 2010 Oct;111(2) :508–519. Available from : <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.22738>.
- [210] Wang HT, Chang JW, Guo Z, Li BG. In silico-initiated cloning and molecular characterization of cortexin 3, a novel human gene specifically expressed in the kidney and brain, and well conserved in vertebrates. *Int J Mol Med.* 2007 Oct ;20(4) :501–510.
- [211] Pericak-Vance MA, Haines JL. Beyond proof of principle : new genes for Alzheimer’s disease through collaboration. *Lancet Neurol.* 2009 Nov ;8(11) :977–979. Available from : [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70277-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70277-7).
- [212] Psaty BM, Sitlani C. The Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology (CHARGE) Consortium as a Model of Collaborative Science. *Epidemiology.* 2013 May ;24(3) :346–348. Available from : <http://dx.doi.org/10.1097/EDE.0b013e31828b2cbb>.
- [213] Wijsman EM, Pankratz ND, Choi Y, Rothstein JH, Faber KM, Cheng R, et al. Genome-wide association of familial late-onset Alzheimer’s disease replicates BIN1 and CLU and nominates CUGBP2 in interaction with APOE. *PLoS Genet.* 2011 Feb ;7(2) :e1001308.
- [214] Antúnez C, Boada M, González-Pérez A, Gayán J, Ramírez-Lorca R, Marín J, et al. The membrane-spanning 4-domains, subfamily A (MS4A) gene cluster contains a common variant associated with Alzheimer’s disease. *Genome Med.* 2011 ;3(5) :33. Available from : <http://dx.doi.org/10.1186/gm249>.
- [215] Kamboh MI, Demirci FY, Wang X, Minster RL, Carrasquillo MM, Pankratz VS, et al. Genome-wide association study of Alzheimer’s disease. *Transl Psychiatry.* 2012 ;2 :e117. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/tp.2012.45>.
- [216] Jun G, Naj AC, Beecham GW, Wang LS, Buross J, Gallins PJ, et al. Meta-analysis confirms CR1, CLU, and PICALM as Alzheimer disease risk loci and reveals interactions with APOE genotypes. *Arch Neurol.* 2010 Dec ;67(12) :1473–1484. Available from : <http://dx.doi.org/10.1001/archneurol.2010.201>.
- [217] Corneveaux JJ, Myers AJ, Allen AN, Pruzin JJ, Ramirez M, Engel A, et al. Association of CR1, CLU and PICALM with Alzheimer’s disease in a cohort of clinically characterized and neuropathologically verified individuals. *Hum Mol Genet.* 2010 Aug ;19(16) :3295–3301. Available from : <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddq221>.
- [218] Carrasquillo MM, Belbin O, Hunter TA, Ma L, Bisceglia GD, Zou F, et al. Replication of CLU, CR1, and PICALM associations with Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2010 Aug ;67(8) :961–964. Available from : <http://dx.doi.org/10.1001/archneurol.2010.147>.

- [219] Lambert JC, Zelenika D, Hiltunen M, Chouraki V, Combarros O, Bullido MJ, et al. Evidence of the association of BIN1 and PICALM with the AD risk in contrasting European populations. *Neurobiol Aging*. 2011 Apr;32(4) :756.e11–756.e15. Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.11.022>.
- [220] Gu H, Wei X, Chen S, Kurz A, Müller U, Gasser T, et al. Association of clusterin gene polymorphisms with late-onset Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2011;32(3) :198–201. Available from : <http://dx.doi.org/10.1159/000331276>.
- [221] Carrasquillo MM, Belbin O, Hunter TA, Ma L, Bisceglia GD, Zou F, et al. Replication of EPHA1 and CD33 associations with late-onset Alzheimer's disease : a multi-centre case-control study. *Mol Neurodegener*. 2011;6(1) :54. Available from : <http://dx.doi.org/10.1186/1750-1326-6-54>.
- [222] Carrasquillo MM, Belbin O, Hunter TA, Ma L, Bisceglia GD, Zou F, et al. Replication of BIN1 association with Alzheimer's disease and evaluation of genetic interactions. *J Alzheimers Dis*. 2011;24(4) :751–758. Available from : <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-2011-101932>.
- [223] Sillén A, Lilius L, Forsell C, Kimura T, Winblad B, Graff C. Linkage to the 8p21.1 region including the CLU gene in age at onset stratified Alzheimer's disease families. *J Alzheimers Dis*. 2011;23(1) :13–20. Available from : <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-2010-101359>.
- [224] Kamboh MI, Minster RL, Demirci FY, Ganguli M, Dekosky ST, Lopez OL, et al. Association of CLU and PICALM variants with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2012 Mar;33(3) :518–521. Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.04.015>.
- [225] Brouwers N, Van Cauwenberghe C, Engelborghs S, Lambert JC, Bettens K, Le Bastard N, et al. Alzheimer risk associated with a copy number variation in the complement receptor 1 increasing C3b/C4b binding sites. *Mol Psychiatry*. 2012 Feb;17(2) :223–233. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2011.24>.
- [226] Ferrari R, Moreno JH, Minhajuddin AT, O'Bryant SE, Reisch JS, Barber RC, et al. Implication of common and disease specific variants in CLU, CR1, and PICALM. *Neurobiol Aging*. 2012 Aug;33(8) :1846.e7–1846.18. Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.01.110>.
- [227] Cascorbi I, Flüh C, Remmler C, Haenisch S, Faltraco F, Grumt M, et al. Association of ATP-binding cassette transporter variants with the risk of Alzheimer's disease. *Pharmacogenomics*. 2013 Apr;14(5) :485–494. Available from : <http://dx.doi.org/10.2217/pgs.13.18>.

- [228] Yu JT, Li L, Zhu QX, Zhang Q, Zhang W, Wu ZC, et al. Implication of CLU gene polymorphisms in Chinese patients with Alzheimer's disease. *Clin Chim Acta*. 2010 Oct;411(19-20) :1516–1519. Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2010.06.013>.
- [229] Ma JF, Liu Lh, Zhang Y, Wang Y, Deng YL, Huang Y, et al. Association study of clusterin polymorphism rs11136000 with late onset Alzheimer's disease in Chinese Han population. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*. 2011 Dec;26(8) :627–630. Available from : <http://dx.doi.org/10.1177/1533317511432735>.
- [230] Lin YL, Chen SY, Lai LC, Chen JH, Yang SY, Huang YL, et al. Genetic polymorphisms of clusterin gene are associated with a decreased risk of Alzheimer's disease. *Eur J Epidemiol*. 2012 Jan; Available from : <http://dx.doi.org/10.1007/s10654-012-9650-5>.
- [231] Chen LH, Kao PYP, Fan YH, Ho DTY, Chan CSY, Yik PY, et al. Polymorphisms of CR1, CLU and PICALM confer susceptibility of Alzheimer's disease in a southern Chinese population. *Neurobiol Aging*. 2012 Jan ;33(1) :210.e1–210.e7. Available from : <http://dx.doi.org/16>.
- [232] Zhang Q, Yu JT, Zhu QX, Zhang W, Wu ZC, Miao D, et al. Complement receptor 1 polymorphisms and risk of late-onset Alzheimer's disease. *Brain Res*. 2010 Aug;1348 :216–221. Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.06.018>.
- [233] Li HL, Shi SS, Guo QH, Ni W, Dong Y, Liu Y, et al. PICALM and CR1 variants are not associated with sporadic Alzheimer's disease in Chinese patients. *J Alzheimers Dis*. 2011 ;25(1) :111–117. Available from : <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-2011-101917>.
- [234] Jin C, Li W, Yuan J, Xu W, Cheng Z. Association of the CR1 polymorphism with late-onset Alzheimer's disease in Chinese Han populations : a meta-analysis. *Neurosci Lett*. 2012 Oct;527(1) :46–49. Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2012.08.032>.
- [235] Ohara T, Ninomiya T, Hirakawa Y, Ashikawa K, Monji A, Kiyohara Y, et al. Association study of susceptibility genes for late-onset Alzheimer's disease in the Japanese population. *Psychiatr Genet*. 2012 Dec;22(6) :290–293. Available from : <http://dx.doi.org/10.1097/YPG.0b013e3283586215>.
- [236] Yu JT, Song JH, Ma T, Zhang W, Yu NN, Xuan SY, et al. Genetic association of PICALM polymorphisms with Alzheimer's disease in Han Chinese. *J Neurol Sci*. 2011 Jan;300(1-2) :78–80. Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2010.09.027>.

- [237] Liu G, Zhang L, Feng R, Liao M, Jiang Y, Chen Z, et al. Lack of association between PICALM rs3851179 polymorphism and Alzheimer's disease in Chinese population and APOE ϵ 4-negative subgroup. *Neurobiol Aging*. 2013 Apr;34(4) :1310.e9–1310.10. Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.08.015>.
- [238] Liu G, Zhang S, Cai Z, Ma G, Zhang L, Jiang Y, et al. PICALM Gene rs3851179 Polymorphism Contributes to Alzheimer's Disease in an Asian Population. *Neuromolecular Med*. 2013 Apr; Available from : <http://dx.doi.org/10.1007/s12017-013-8225-2>.
- [239] Liu G, Zhang S, Li Y, Cui L, Ma G, Jiang Y, et al. BIN1 gene rs744373 polymorphism contributes to Alzheimer's disease in East Asian population. *Neurosci Lett*. 2013 Apr; Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2013.02.075>.
- [240] Yuan Q, Chu C, Jia J. Association studies of 19 candidate SNPs with sporadic Alzheimer's disease in the North Chinese Han population. *Neurol Sci*. 2012 Oct;33(5) :1021–1028. Available from : <http://dx.doi.org/10.1007/s10072-011-0881-0>.
- [241] Tan L, Yu JT, Zhang W, Wu ZC, Zhang Q, Liu QY, et al. Association of GWAS-linked loci with late-onset Alzheimer's disease in a northern Han Chinese population. *Alzheimers Dement*. 2012 Dec; Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2012.08.007>.
- [242] Miyashita A, Koike A, Jun G, Wang LS, Takahashi S, Matsubara E, et al. SORL1 Is Genetically Associated with Late-Onset Alzheimer's Disease in Japanese, Koreans and Caucasians. *PLoS One*. 2013 ;8(4) :e58618. Available from : <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0058618>.
- [243] Lee JH, Cheng R, Barral S, Reitz C, Medrano M, Lantigua R, et al. Identification of novel loci for Alzheimer disease and replication of CLU, PICALM, and BIN1 in Caribbean Hispanic individuals. *Arch Neurol*. 2011 Mar;68(3) :320–328. Available from : <http://dx.doi.org/10.1001/archneurol.2010.292>.
- [244] Reitz C, Jun G, Naj A, Rajbhandary R, Vardarajan BN, Wang LS, et al. Variants in the ATP-binding cassette transporter (ABCA7), apolipoprotein E ϵ 4, and the risk of late-onset Alzheimer disease in African Americans. *JAMA*. 2013 Apr ;309(14) :1483–1492. Available from : <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2013.2973>.
- [245] Logue MW, Schu M, Vardarajan BN, Buross J, Green RC, Go RC, et al. A comprehensive genetic association study of Alzheimer disease in African Americans. *Arch Neurol*. 2011 Dec;68(12) :1569–1579. Available from : <http://dx.doi.org/10.1001/archneurol.2011.646>.

- [246] Lord J, Turton J, Medway C, Shi H, Brown K, Lowe J, et al. Next generation sequencing of CLU, PICALM and CR1 : pitfalls and potential solutions. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2012 ;3(4) :262–275.
- [247] Guerreiro RJ, Beck J, Gibbs JR, Santana I, Rossor MN, Schott JM, et al. Genetic variability in CLU and its association with Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2010 ;5(3) :e9510. Available from : <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0009510>.
- [248] Szymanski M, Wang R, Bassett SS, Avramopoulos D. Alzheimer's risk variants in the clusterin gene are associated with alternative splicing. *Transl Psychiatry.* 2011 ;1. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/tp.2011.17>.
- [249] Bettens K, Brouwers N, Engelborghs S, Lambert JC, Rogaeva E, Vandenberghe R, et al. Both common variations and rare non-synonymous substitutions and small insertion/deletions in CLU are associated with increased Alzheimer risk. *Mol Neurodegener.* 2012 ;7 :3. Available from : <http://dx.doi.org/10.1186/1750-1326-7-3>.
- [250] Yu JT, Ma XY, Wang YL, Sun L, Tan L, Hu N, et al. Genetic variation in Clusterin gene and Alzheimer's disease risk in Han Chinese. *Neurobiol Aging.* 2013 Feb ;Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.01.010>.
- [251] Schnetz-Boutaud NC, Hoffman J, Coe JE, Murdock DG, Pericak-Vance MA, Haines JL. Identification and confirmation of an exonic splicing enhancer variation in exon 5 of the Alzheimer disease associated PICALM gene. *Ann Hum Genet.* 2012 Nov ;76(6) :448–453. Available from : <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-1809.2012.00727.x>.
- [252] Masoodi TA, Al Shammari SA, Al-Muammar MN, Alhamdan AA, Talluri VR. Exploration of deleterious single nucleotide polymorphisms in late-onset Alzheimer disease susceptibility genes. *Gene.* 2013 Jan ;512(2) :429–437. Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.08.026>.
- [253] Treusch S, Hamamichi S, Goodman JL, Matlack KES, Chung CY, Baru V, et al. Functional links between A β toxicity, endocytic trafficking, and Alzheimer's disease risk factors in yeast. *Science (80-).* 2011 Dec ;334(6060) :1241–1245. Available from : <http://dx.doi.org/10.1126/science.1213210>.
- [254] Hazrati LN, Van Cauwenberghe C, Brooks PL, Brouwers N, Ghani M, Sato C, et al. Genetic association of CR1 with Alzheimer's disease : a tentative disease mechanism. *Neurobiol Aging.* 2012 Dec ;33(12) :2949.e5–2949.e12. Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.07.001>.
- [255] Keenan BT, Shulman JM, Chibnik LB, Raj T, Tran D, Sabuncu MR, et al. A coding variant in CR1 interacts with APOE- ϵ 4 to influence cognitive decline. *Hum Mol Genet.*

- 2012 May;21(10) :2377–2388. Available from : <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/dds054>.
- [256] Van Cauwenberghe C, Bettens K, Engelborghs S, Vandebulcke M, Van Dongen J, Vermeulen S, et al. Complement receptor 1 coding variant p.Ser1610Thr in Alzheimer's disease and related endophenotypes. *Neurobiol Aging*. 2013 Apr; Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.03.008>.
- [257] Chapuis J, Hansmannel F, Gistelincq M, Mounier A, Van Cauwenberghe C, Kolen KV, et al. Increased expression of BIN1 mediates Alzheimer genetic risk by modulating tau pathology. *Mol Psychiatry*. 2013 Feb; Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2013.1>.
- [258] Maher B. Personal genomes : The case of the missing heritability. *Nature*. 2008 Nov;456(7218) :18–21. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/456018a>.
- [259] Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. 2009 Oct;461(7265) :747–753. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/nature08494>.
- [260] Cruchaga C, Kauwe JSK, Harari O, Jin SC, Cai Y, Karch CM, et al. GWAS of Cerebrospinal Fluid Tau Levels Identifies Risk Variants for Alzheimer's Disease. *Neuron*. 2013 Apr; Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2013.02.026>.
- [261] Fornage M, Debette S, Bis JC, Schmidt H, Ikram MA, Dufouil C, et al. Genome-wide association studies of cerebral white matter lesion burden : the CHARGE consortium. *Ann Neurol*. 2011 Jun;69(6) :928–939. Available from : <http://dx.doi.org/10.1002/ana.22403>.
- [262] Stein JL, Medland SE, Vasquez AA, Hibar DP, Senstad RE, Winkler AM, et al. Identification of common variants associated with human hippocampal and intracranial volumes. *Nat Genet*. 2012 Apr; Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2250>.
- [263] Melville SA, Buross J, Parrado AR, Vardarajan B, Logue MW, Shen L, et al. Multiple loci influencing hippocampal degeneration identified by genome scan. *Ann Neurol*. 2012 Jul;72(1) :65–75.
- [264] Ramanan VK, Risacher SL, Nho K, Kim S, Swaminathan S, Shen L, et al. APOE and BCHE as modulators of cerebral amyloid deposition : a florbetapir PET genome-wide association study. *Mol Psychiatry*. 2013 Feb; Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2013.19>.
- [265] Kramer PL, Xu H, Woltjer RL, Westaway SK, Clark D, Erten-Lyons D, et al. Alzheimer disease pathology in cognitively healthy elderly : a genome-wide study. *Neurobiol*

- Aging. 2011 Dec;32(12) :2113–2122. Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.01.010>.
- [266] De Jager PL, Shulman JM, Chibnik LB, Keenan BT, Raj T, Wilson RS, et al. A genome-wide scan for common variants affecting the rate of age-related cognitive decline. *Neurobiol Aging*. 2012 May;33(5) :1017.e1–1017.15. Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.09.033>.
- [267] Davies G, Harris SE, Reynolds CA, Payton A, Knight HM, Liewald DC, et al. A genome-wide association study implicates the APOE locus in nonpathological cognitive ageing. *Mol Psychiatry*. 2012 Dec; Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2012.159>.
- [268] Sherva R, Tripodis Y, Bennett DA, Chibnik LB, Crane PK, de Jager PL, et al. Genome-wide association study of the rate of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2013 Mar ;.
- [269] Szigeti K, Lal D, Li Y, Doody RS, Wilhelmsen K, Yan L, et al. Genome-wide scan for copy number variation association with age at onset of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2013 ;33(2) :517–523. Available from : <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-2012-121285>.
- [270] Schellenberg GD, Montine TJ. The genetics and neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2012 May; Available from : <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-012-0996-2>.
- [271] Rodríguez-Rodríguez E, Sánchez-Juan P, Vázquez-Higuera JL, Mateo I, Pozueta A, Berciano J, et al. Genetic risk score predicting accelerated progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 2012 Nov; Available from : <http://dx.doi.org/10.1007/s00702-012-0920-x>.
- [272] Sabuncu MR, Buckner RL, Smoller JW, Lee PH, Fischl B, Sperling RA, et al. The association between a polygenic Alzheimer score and cortical thickness in clinically normal subjects. *Cereb Cortex*. 2012 Nov;22(11) :2653–2661.
- [273] Verhaaren BFJ, Vernooij MW, Koudstaal PJ, Uitterlinden AG, Duijn CMv, Hofman A, et al. Alzheimer's Disease Genes and Cognition in the Nondemented General Population. *Biol Psychiatry*. 2012 May; Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.04.009>.
- [274] Hardy J, Guerreiro R, Lovestone S. Clusterin as an Alzheimer biomarker. *Arch Neurol*. 2011 Nov;68(11) :1459–1460. Available from : <http://dx.doi.org/10.1001/archneurol.2011.1000>.
- [275] Schrijvers EMC, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MMB. Plasma clusterin and the risk of Alzheimer disease. *JAMA*. 2011 Apr ;305(13) :1322–1326. Available from : <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2011.381>.

- [276] Lambert JC, Grenier-Boley B, Chouraki V, Heath S, Zelenika D, Fievet N, et al. Implication of the immune system in Alzheimer's disease : evidence from genome-wide pathway analysis. *J Alzheimers Dis.* 2010;20(4) :1107–1118. Available from : <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-2010-100018>.
- [277] Lambert JC, Grenier-Boley B, Harold D, Zelenika D, Chouraki V, Kamatani Y, et al. Genome-wide haplotype association study identifies the FRMD4A gene as a risk locus for Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry.* 2012 Mar ;Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2012.14>.
- [278] Bis JC, DeCarli C, Smith AV, van der Lijn F, Crivello F, Fornage M, et al. Common variants at 12q14 and 12q24 are associated with hippocampal volume. *Nat Genet.* 2012;44(5) :545–551. Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2237>.
- [279] Pattaro C, Köttgen A, Teumer A, Garnaas M, Böger CA, Fuchsberger C, et al. Genome-wide association and functional follow-up reveals new Loci for kidney function. *PLoS Genet.* 2012 Mar;8(3) :e1002584. Available from : <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1002584>.