UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
UFR DE BIOLOGIE

Année: 1997 Numéro d'ordre:

Thèse des Sciences de la Vie et de la Santé

présentée à l'Université de Lille I
pour l'obtention du grade de
Docteur en Biologie

par

Valérie DIMSTER-PODEVIN

MISE AU POINT D'UN DIAGNOSTIC *ANTE-MORTEM* DE LA MALADIE D'ALZHEIMER: CARACTÉRISATION IMMUNOCHIMIQUE DES AUTO-ANTICORPS ANTI-PROTÉINES CÉRÉBRALES.

présentée le 5 Décembre 1997 devant le jury composé de:

Président de jury:	Monsieur le Professeur André Verbert
Rapporteurs:	Monsieur le Professeur Michel Boniface
	Monsieur le Professeur Jean-François Dartigues
Examinateur:	Monsieur le Docteur Jean-Claude Beauvillain
Directeur de thèse:	Monsieur le Docteur André Delacourte

A Franck, mon époux

A ma mère, à mon père

A mes frères

A ma famille

A mes amis

J'exprime tous mes remerciements,

à Monsieur le Professeur André Verbert,
qui me fait le grand honneur de s'intéresser à mon travail et de juger ce manuscrit en tant que président de Jury. Je tiens à vous assurer de mon plus profond respect et à vous exprimer ma grande admiration.

à Monsieur le Professeur Michel Boniface,
Je suis très heureuse que vous ayez accepté d'être rapporteur de cette thèse. Vos compétences dans le domaine des Statistiques me rend votre avis très précieux. Je vous prie d'accepter ma profonde et respectueuse gratitude.

à Monsieur le Professeur Jean-François Dartigues,
pour avoir accepté de juger cette thèse. Notre collaboration a été pour moi très enrichissante. Votre venue en tant que rapporteur m'honore tout particulièrement.

à Monsieur le Docteur Jean-Claude Beauvillain,
qui m'a aimablement acceuilli au sein de son unité de recherche et m'a permis de réaliser ce travail. Je vous suis très reconnaissante du soutien, de la gentillesse et de la disponibilité que vous m'avez toujours témoignés.

à Monsieur le Docteur André Delacourte,
qui m'a confié ce thème de recherche passionnant et a dirigé ce travail. Vous avez su me faire partager votre dynamisme pour la recherche scientifique.

J'exprime également tous mes remerciements:

à la Fondation Pierre Louis pour l'épidémiologie (sous l'égide de la fondation de France) pour l'indispensable soutien financier dont j'ai bénéficié au cours de mes seconde et troisième années de thèse.

à Mademoiselle Nadia Tahri, qui a réalisé l'analyse statistique de ce travail de thèse. Je tiens à te remercier pour tes précieux conseils, pour tes encouragements, ton aide et surtout ta grande disponibilité. Cela a été un très grand plaisir de travailler à tes côtés.

à Monsieur le Docteur Mohamed Lemdani, pour votre disponibilité, vos précieux conseils et votre compétence dans le domaine des statistiques.

à Mesdames les Docteurs Annick Alpérovitch et Claudine Berr, pour leur collaboration indispensable à la réalisation de ces travaux et leurs précieux conseils.

à Mesdames le Professeur Françoise Forette et le Docteur Anne-Sophie Rigaud, dont la collaboration a permis la réalisation de ce travail.

à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Je voudrais aussi remercier tous les membres de l'Unité INSERM 422 sans oublier ceux qui en ont fait partie lors de mon arrivée dans le laboratoire, pour leur soutien, leur bonne humeur, leur gentillesse et leur encouragement au cours de ces quatre années.

Ce travail de thèse a donné lieu à une demande de dépôt de brevet auprès du service de valorisation de l'INSERM, ce qui a retardé la publication des résultats (article en préparation).

Néanmoins les résultats de ces travaux ont fait l'objet des communications affichées et orale suivantes:

Communications affichées

V. Podevin-Dimster, C. Berr, A. Alpérovitch, P. Vermersch, F. Pasquier, A. Delacourte. Analyse comparative des auto-anticorps sériques anti-protéines cérébrales produits au cours du Vieillissement et dans la Maladie d'Alzheimer. 3ème Réunion Francophone sur la Maladie d'Alzheimer et les syndrômes apparentés, Lille France (13 et 14 Octobre 1995).

V. Podevin-Dimster, C. Berr, A. Alpérovitch, P. Vermersch, F. Pasquier, A. Delacourte. Analyse comparative des auto-anticorps sériques anti-protéines cérébrales produits au cours du Vieillissement et dans la Maladie d'Alzheimer. Congré d'Épidémiologie du Vieillissement, Montpellier (2, 3 et 4 Avril 1997).

Communication orale

V. Podevin-Dimster, C. Berr, A. Alpérovitch, P. Vermersch, F. Pasquier, A. Delacourte. Analyse comparative des auto-anticorps sériques anti-protéines cérébrales produits au cours du Vieillissement et dans la Maladie d'Alzheimer. Société de Biologie du Vieillissement, Paris (14 Juin 1996).

INTRODUCTION

INTRODUCTION

C'est en 1906, lors d'une conférence intitulée: "Sur une maladie particulière du cortex cérébral" qu'Aloïs ALZHEIMER, psychiatre et anatomopathologiste allemand, donna la description clinique et histopathologique d'une de ses patientes qui décéda à l'âge de 56 ans avec une démence évoluée. A l'autopsie, le cerveau était très atrophié, et l'examen microscopique révéla la présence de lésions actuellement connues sous le terme de "dégénérescence neurofibrillaire" (DNF) et de "plaques séniles". Le cerveau de cette malade ne présentait pas d'anomalies vasculaires du type de celles connues dans les démences syphilitiques qui étaient fréquentes à l'époque.

Ces observations cliniques et anatomopathologiques furent confirmées chez d'autres patients. En 1910, KRAEPELIN (grand psychiatre allemand) donna le nom de son élève ALZHEIMER à cette démence dégénérative présénile. A l'époque, le terme de Maladie d'ALZHEIMER définissait une démence exclusivement présénile (développée avant 65 ans). Pourtant, de nombreux auteurs démontrèrent la présence de plaques séniles dans le cerveau de sujets atteints de démence sénile (développée après 65 ans). Mais ce n'est que dans les années soixante que les formes séniles et préséniles furent regroupées sous le terme unique de "Maladie d'ALZHEIMER" (MA).

La MA est la cause la plus fréquente de démence chez les personnes âgées. La prévalence de la MA, qui représente la proportion de cas recensés à un moment donné, est de l'ordre de 11% pour les sujets de plus de 65 ans et peut atteindre 50% au dessus de 85 ans selon une étude réalisée aux États Unis par Evans *et al.* (1989). Plus récemment, Letenneur *et al.* (1993) ont estimé la prévalence de la MA sur la cohorte PAQUID (population de Gironde âgée de 65 ans et plus) à 4,3%. Aucune différence n'a été mise en évidence entre les hommes et les femmes de cette cohorte. La prévalence est étroitement liée à l'âge, et double

tous les 5 ans après 65 ans. Ce qui signifie qu'elle peut atteindre 60% après 85 ans selon Letenneur *et al.* (1993). Ces estimations varient assez largement d'une étude à l'autre du fait des différentes populations et méthodologies employées.

L'incidence de la MA (nombre de nouveaux cas par an et par nombre d'habitants) est connue avec moins de précision que la prévalence, les études épidémiologiques longitudinales étant seules à même d'en donner une estimation correcte. Elle est de l'ordre de 1 nouveau cas par an pour 100 sujets au dessus de 65 ans. Entre 65 et 85 ans, l'augmentation de l'incidence avec l'âge est très forte, elle varie de 1% à 6,6% (Letenneur *et al*, 1994). Au delà de 85 ans, les épidémiologistes sont moins sûrs de l'allure de la courbe: après avoir pensé que l'incidence cessait de croître, ou même qu'elle diminuait, il semble à présent, sur la base des études les plus récentes, que l'incidence continue d'augmenter jusqu'aux âges extrêmes.

Depuis quelques années en France, on observe un accroissement de la proportion de personnes âgées de plus de 65 ans, par déclin de la natalité et surtout par augmentation de l'espérance de vie (particulièrement de la population féminine).

La projection démographique pour le début du XXIème siècle prévoit une aggravation de ce phénomène, ce qui permet de prédire à la MA une prévalence considérable dans les décennies à venir. Ces prévisions sont lourdes de conséquences en matière de santé publique. Sachant que 60% des patients sont soignés à domicile, on imagine les répercussions socio-économiques, familiales et médicales de la maladie.

La prise de conscience de l'ampleur que peut atteindre cette maladie a provoqué un essor sans précédent de la recherche fondamentale depuis une dizaine d'années. Ainsi, les deux principales lésions neuropathologiques de la MA ont été décrites: les neurones en DNF qui résultent de l'accumulation intra-cytoplasmique de protéines modifiées du cytosquelette et les dépôts extracellulaires d'un peptide sous la forme de plaques séniles (PS).

Malgré ces progrès décisifs et même si certaines formes familiales de la MA peuvent être expliquées par des facteurs génétiques (mutation du gène de l'APP ("Amyloid Protein

Precursor") ou du gène de la préséniline 1 ou PS1), la ou les causes précises de la plupart des formes de MA restent encore inconnues. Néanmoins, certains facteurs de risque génétiques tel que l'allèle ε4 de l'apolipoprotéine E, semblent prédisposer à cette pathologie. De plus, l'âge est le seul facteur de risque incontestable de la MA. Par ailleurs, le sexe a aussi été proposé comme facteur de risque puisque la prévalence de la MA est plus élevée chez les femmes, après ajustement tenant compte de leur espérance de vie plus longue que celle des hommes (Henderson, 1988). Enfin, d'autres facteurs, tels que des antécédents de traumatisme crânien, le niveau d'éducation, des facteurs environnementaux (aluminium, agents excitotoxiques, ...) sont l'objet d'une suspicion plus ou moins forte.

Du vivant du patient, le diagnostic de la MA est essentiellement clinique. Il repose sur des arguments de présomption et l'on parle uniquement de MA "possible" ou "probable" (McKhann *et al.*, 1984). Malgré l'avancée des recherches, le diagnostic *ante-mortem* est responsable d'un pourcentage non négligeable (environ 20%) de "faux diagnostics" positifs dans les populations étudiées, et de la présence dans la population dite "témoin" de patients atteints de la MA à un stade encore asymptomatique (Tierney *et al.*, 1988). Cela constitue donc un obstacle pour l'avancée des recherches et le traitement précoce de la maladie.

Des marqueurs biologiques diagnostiques voire prédictifs seraient donc très utiles pour une meilleure prise en charge des malades.

C'est pourquoi, depuis plusieurs années, de nombreuses équipes tentent de caractériser des marqueurs spécifiques de la MA: en particulier, des marqueurs neuropathologiques, biochimiques, génétiques et biologiques. Parmi les marqueurs biologiques, ceux qui ont attiré notre attention sont les marqueurs de l'inflammation et en particulier les auto-anticorps.

En effet, de nombreux travaux ont montré la présence de marqueurs de l'inflammation et d'auto-anticorps dirigés contre certains éléments neuronaux et gliaux dans le sang, le

liquide céphalo-rachidien (LCR) ou le cerveau du malade. Ainsi, l'implication du système immunitaire dans la pathogénèse de la MA est incontestable (pour revue Rogers, 1994).

Dans ce travail, nous avons étudié la réponse immunitaire de la MA, et plus particulièrement la production d'auto-anticorps au cours du vieillissement normal et dans la MA. En effet, les constituants connus ou encore inconnus des lésions de la MA (PS et DNF) avec les altérations de la barrière hémato-encéphalique (BHE), constituent une source d'antigènes normaux et pathologiques qui pourraient augmenter la réponse auto-immune. Certains auto-anticorps pourraient être spécifiques de la maladie, c'est-à-dire dirigés contre les constituants des lésions. Ces auto-anticorps, détectables par simple prélèvement sanguin, constitueraient des outils indispensables pour l'étiologie de la MA mais aussi et surtout pour le diagnostic de certitude *ante-mortem* de la maladie.

Notre travail bibliographique a consisté à faire le point sur l'aspect diagnostique de la MA en développant dans un premier temps, les critères cliniques de la maladie. Dans un second temps, nous décrirons les critères neuropathologiques, biochimiques, génétiques et biologiques (qui comprennent les critères immunologiques) intervenant dans le diagnostic de la MA, avant d'aborder nos résultats personnels.

GÉNÉRALITÉS

GÉNÉRALITÉS

I. DIAGNOSTIC CLINIQUE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

L'altération des différentes fonctions cognitives n'est pas homogène et, au sein d'une même fonction, les troubles sont variables selon le patient. On observe également des profils d'évolution différents. Du fait de cette hétérogénéité clinique, les différentes manifestations cognitives et psycho-comportementales de la MA seront décrites successivement.

La MA, démence neurodégénérative, se caractérise par des troubles mnésiques associés à l'atteinte d'autres fonctions cognitives: des troubles du langage (aphasie), de la réalisation de gestes coordonnés (apraxie), de la reconnaissance (agnosie) et des capacités intellectuelles. Elle comporte également des manifestations non cognitives: des troubles de l'humeur (dépression), de la personnalité, des manifestations psychotiques et des troubles neurologiques (crises d'épilepsie et myoclonies).

L'évaluation de ces signes cliniques est indispensable pour établir le diagnostic de la MA. Elle s'effectue à l'aide de tests neuropsychométriques dont certains seront cités dans ce chapitre. En effet, de nombreux tests évaluent le retentissement des difficultés cognitives et des troubles du comportement dans la vie quotidienne du malade, nous en présenterons quelques uns, en particulier ceux utilisés lors de la sélection de nos populations.

I.1. LES SIGNES CLINIQUES

I.1.1. LES TROUBLES COGNITIFS

I.1.1.1. Les troubles de l'attention

Les troubles de l'attention peuvent intervenir dans les états démentiels en particulier au cours de la MA. Ces troubles sont mesurés par les épreuves d'attention de l'échelle de Mattis (Mattis, 1976) et du "Mini-Mental State Examination" ou MMS de Folstein *et al.* (1975, Annexe I). Les capacités d'attention visuo-spatiale peuvent être mesurées par le test des barrages de Zazzo (Zazzo, 1969) et l'attention auditive par la PASAT (pour "Paced Auditory Serial Addition Task").

I.1.1.2. Les troubles de la mémoire

Les troubles de la mémoire sont très fréquemment les premiers signes cliniques rencontrés chez le malade et sont souvent attribués à l'âge. Les troubles de la mémoire les plus fréquents affectent essentiellement la vie quotidienne: le patient répète plusieurs fois les mêmes questions, oublie des séquences entières du passé proche (appels téléphoniques, rendez-vous, ...). Très rapidement, il oublie la date, le jour de la semaine et parfois son chemin sur un itinéraire qui lui était pourtant familier.

La mémoire primaire, ou mémoire à court terme, permettant le stockage temporaire d'une information, est souvent perturbée dans la MA. Elle est évaluée en clinique par le paradigme de Brown-Peterson, qui consiste à rappeler des informations après un délai court occupé par une tâche interférente. Les performances des patients atteints de la MA à ce type de test sont très faibles.

La mémoire secondaire, ou mémoire à long terme est caractérisée par une capacité illimitée dans la durée et dans la quantité d'informations stockées. Elle est subdivisée en mémoire implicite, préservée dans la MA (mémoire inconsciente: apprentissage de l'écriture,

de gestes précis) et en mémoire explicite, endommagée pendant la maladie (elle regroupe la mémoire épisodique: personnelle, évènements vécus, mémoire autobiographique et mémoire sémantique (didactique, culture générale)).

I.1.1.3. Les troubles du langage (aphasie)

Ils sont considérés comme les troubles les plus fréquents après les troubles mnésiques. 40 à 100% des cas de MA présentent des troubles du langage. Leur intensité est corrélée avec la sévérité de la démence. Le langage écrit est souvent plus précocement altéré que le langage oral. Les troubles du langage sont caractérisés par de fréquents manques du mot, associés à une réduction des fluences (densité de flux) verbales. Et, en fin d'évolution, les troubles de la compréhension apparaissent.

I.1.1.4. Les troubles de la réalisation de gestes coordonnés (apraxie)

Ces troubles, qui correspondent à des perturbations des réalisations gestuelles, sont très courants dans la MA. Ils se manifestent par une difficulté, voire une impossibilité à se servir d'objets usuels, ou plus fréquemment à se vêtir, mais aussi par une incapacité à reproduire sur imitation des gestes, des figures géométriques ou des dessins. Les troubles praxiques réduisent de façon considérable l'autonomie du sujet.

I.1.1.5. Les troubles de la reconnaissance (agnosie)

Ils ont été beaucoup moins étudiés. Les troubles les plus couramment observés sont des troubles visuels (agnosie visuelle), ils concerneraient environ 30% des malades. L'agnosie visuelle se traduit par une difficulté à reconnaître les formes géométriques, les couleurs, les objets, les mots (difficulté à lire), les lieux, ou les visages même familiers (prosopagnosie). Ces troubles sont mesurés par des tests psychométriques comme le test de rétention visuelle de Benton (Benton, 1963) ou TRV qui mesure la représentation spatiale et la mémoire visuelle immédiate.

I.1.1.6. Les troubles intellectuels

Les troubles intellectuels ne sont pas indispensables au diagnostic de la MA. Ils se traduisent par des troubles du jugement et de raisonnement comme la difficulté à résoudre des problèmes de la vie quotidienne. Ils sont évalués par des tests psychométriques, telles que l'échelle d'intelligence pour adulte de Wechsler (forme révisée) exprimée en quotient intellectuel (ou WAIS-R) (Wechsler *et al.*, 1956; 1989), et les matrices de Raven (Raven, 1981) qui permettent d'estimer l'intelligence logique.

I.1.2. LES TROUBLES DU COMPORTEMENT

Les troubles du comportement sont très variables d'un patient à l'autre et peuvent révéler la maladie. Ils peuvent être la conséquence directe des troubles cognitifs, témoigner de la réaction du malade à ses difficultés ou encore être le résultat de l'atteinte, par la MA, de certaines régions cérébrales impliquées dans l'activité émotionnelle.

I.1.2.1. La dépression

Elle a longtemps été considérée comme une réponse psychologique du malade à la diminution de ses capacités intellectuelles. Mais il semblerait qu'elle soit la conséquence des lésions de la MA. Du fait d'une sémiologie semblable sur certains points, il est parfois difficile de distinguer les patients souffrant de dépression "primaire" des patients déments. De plus, il semble que la dépression puisse retarder le diagnostic de la MA et aggraver les troubles cognitifs et/ou comportementaux. La symptomatologie dépressive est mesurée en autoquestionnaire par la "Center for Epidemiologic Studies Depression rating scale" (ou CES-D). L'échelle du CES-D a été construite pour évaluer la symptomatologie dépressive dans la population générale. Selon une étude de validation effectuée en France, des seuils de 16 pour les hommes et de 22 pour les femmes sont retenus: au delà de ces seuils, les sujets sont considérés comme à risque de dépression.

I.1.2.2. Les comportements psychopathologiques

De nombreux comportements psychopathologiques sont observés durant la MA: les comportements passifs (perte de l'initiative, émoussement affectif, anxiété...), les comportements d'agitation (irritabilité, comportement sexuel inapproprié) ou égocentriques (diminution du contrôle émotionnel, désaffection vis-à-vis des siens, ...). L'anxiété est souvent évaluée lors d'un diagnostic clinique. Elle est mésurée par l'échelle d'anxiété de Spielberger qui comprend 20 items. Cependant, il n'existe actuellement aucune validation de seuil permettant de déterminer les sujets à risque.

D'autres manifestations psychotiques (hallucinations, délires) probablement en rapport avec les déficits cognitifs sont rencontrées en fin d'évolution. Cependant, ces troubles ne sont pas spécifiques de la MA et peuvent être observés dans des cas de démences d'origine vasculaire.

Des échelles complexes d'évaluation de démence permettent de mesurer les troubles comportementaux et cognitifs. La plus connue est une échelle spécifique de la MA: l'échelle d'évaluation de la MA, " The Alzheimer's Disease Assessment Scale " ou ADAS (Rosen *et al.*, 1984) qui a l'avantage d'explorer les fonctions cognitives (la sous-échelle "ADAS-cog" explore les fonctions mnésiques, l'orientation dans le temps et dans l'espace, le langage, les praxies, ...) et non cognitives (la sous-échelle "ADAS non-cog" explore la dépression, l'anxiété, les troubles du comportement, ...).

I.1.3. LES TROUBLES NEUROLOGIQUES

Contrairement aux démences non dégénératives telles que les démences vasculaires, la MA ne s'accompagne pas de signes neurologiques importants. Toutefois, quelques troubles peuvent être observés. Ainsi, une augmentation du tonus musculaire, des troubles de la marche, des crises d'épilepsie et des myoclonies (contractions brèves et involontaires d'un

ou plusieurs muscles) sont rencontrés au cours de la MA. Il faut noter que l'intensité de ces troubles neurologiques semble être corrélée à la sévérité de la démence.

I.2. PROGRESSION ET ÉVALUATION DES SIGNES CLINIQUES

L'évaluation des signes cliniques de la MA, est certainement, aujourd'hui, le meilleur indice pour juger de l'évolution spontanée comme pour tester l'influence de thérapeutiques.

Un test comme le score CGIC ("Clinical Global Impression of Change"), échelle d'impression clinique globale remplie par le clinicien après un entretien avec le patient et son entourage, permet de coter l'évolution des signes cliniques du malade de 1 ("très amélioré") à 7 ("très aggravé"). Un score de 1, 2 ou 3 indique une amélioration.

Ce test, ainsi que tous ceux présentés précédemment, permettent d'évaluer les troubles cognitifs et non-cognitifs du patient. Cependant, ils ont leurs limites. La plupart ne peuvent en effet être utilisés au delà d'un certain degré de démence (MMS et WAIS-R), pour d'autres le temps de passation du test est trop long, ils nécessitent des examinateurs entraînés et leurs validations sont souvent imparfaites (Echelles de Mattis, Batterie de Rosen...).

Néanmoins, le diagnostic clinique de la MA reste possible. Compte tenu de l'hétérogénéité des signes cliniques de la MA, le praticien utilise une batterie de tests neuropsychométriques adaptée à chaque cas.

I.3. LE DIAGNOSTIC DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

En l'absence de marqueurs biologiques de la maladie, le diagnostic de la MA reste essentiellement clinique. Il comporte deux étapes: le diagnostic de démence, puis celui de démence de type Alzheimer.

I.3.1. DIAGNOSTIC DE DÉMENCE

I.3.1.1. Diagnostic clinique de démence

Il repose sur l'interrogatoire de l'entourage, l'examen clinique et l'exploration neuropsychologique.

Pour établir le diagnostic de démence, le clinicien utilise en particulier les critères du DSM III-R ("Diagnostic and Statistical Manuel of Mental Disorders III Revised") établis par l'"American Psychiatric Association" en 1987. Actuellement, le DSM III-R est remplacé par le DSM IV (American Psychiatric Association-DSM IV, 1996). Un sujet qui répond à ces critères présente une altération de la mémoire associée à une ou plusieurs perturbations cognitives (aphasie, apraxie, agnosie; voir Chapitre I.1.) retentissant sur les activités socio-professionnelles et entraînant un déclin par rapport au fonctionnement antérieur.

L'examen neuropsychologique permet de préciser la nature des déficits et leur sévérité par l'utilisation de tests, d'échelles ou de batteries (tests décrits dans les chapitres I.1. et I.2.). le plus souvent cet examen neuropsychologique comprend les évaluations cliniques standardisées du types " Mini Mental State Examination " ou MMS de Folstein *et al.* (1975, Annexe I) ou l' "Information Memory Concentration Test de Blessed " (Blessed *et al.*, 1968), qui ont pour avantage leur simplicité et leur brève durée d'administration. Le MMS est un test largement utilisé dans les études épidémiologiques en tant qu'instrument de dépistage des démences. Il comprend 30 questions explorant l'orientation dans le temps et l'espace, le rappel immédiat et différé, l'attention, le langage et les praxies. Un déficit cognitif est suspecté chez les sujets dont le score est inférieur à 24. Beaucoup de travaux

dans la littérature utilisent le MMS pour la classification de la sévérité de la démence: un score de 21 et plus caractérise des démences légères, de 11 à 20 les démences modérées et de 10 ou moins les démences sévères. Le test de Blessed est une échelle de démence qui précise la détérioration intellectuelle du malade.

Le diagnostic de démence étant posé, il faut ensuite éliminer une éventuelle cause curable qui nécessite une prise en charge spécifique. Des examens paracliniques et biologiques permettent d'exclure les autres causes de démence (démences métaboliques, toxiques, infectieuses, neurochirurgicales, vasculaires,...).

I.3.1.2. Approche paraclinique

Des examens paracliniques sont généralement pratiqués pour éliminer les affections non dégénératives. C'est le cas du Scanner X, qui écarte les tumeurs cérébrales et l'hydrocéphalie à pression normale; de l'Image par Résonance Magnétique Nucléaire (IRMN) qui montre le plus souvent une atrophie cérébrale mais peu contributive au diagnostic positif (elle permet surtout de différencier les démences primitives (dégénératives, mixtes et vasculaires) des démences secondaires (toxiques, métaboliques, infectieuses, inflammatoires...)); de l'électroencéphalogramme (EEG) qui montre parfois des tracés caractéristiques de certaines pathologies; et de la tomographie par émission monophotonique ou de positrons qui permet d'évaluer le taux d'utilisation de glucose, la consommation d'oxygène et le débit sanguin.

I.3.1.3. Approche biologique

Des examens biologiques (sang et LCR) sont aussi nécessaires pour éliminer une affection médicale susceptible de retentir sur le fonctionnement cérébral: une numération globulaire, vitesse de sédimentation, une exploration des fonctions thyroïdiennes, dosage de la vitamine B12, etc.... Ils permettent d'exclure certaines maladies inflammatoires ou métaboliques.

I.3.2. DIAGNOSTIC DE MALADIE D'ALZHEIMER

Les critères du "National Institute of Neurological Disorders and Stroke" (NINCDS) et de "l'Alzheimer's Disease and Related Disorders Association" (ADRDA) (Mc Khann *et al.*, 1984), permettent de poser le diagnostic de maladie d'Alzheimer "Probable" avec une fiabilité, établie par vérification anatomopathologique, de 80 à 90% (Tierney et al, 1988).

Par ailleurs, ces critères permettent de déterminer trois catégories de diagnostics (Annexe II): MA "possible", "probable" et "confirmée" (Mc Khann *et al.*, 1984).

I.3.2.1. "Maladie d'Alzheimer possible"

Le diagnostic de "MA possible" peut être fait sur la base d'un syndrome démentiel (établi à partir du DSM IV et un examen neuropsychologique: Chapitre I.3.1. "Diagnostic de démence") et en l'absence d'autres étiologies de démences (maladie neurologique, psychiatrique ou générale). Ces autres causes de démences seront éliminées par les examens paracliniques et biologiques décrits précédemment. De plus, le score d'Hachinski sera utilisé devant un patient présentant une détérioration intellectuelle marquée, afin de savoir si celle-ci est d'origine vasculaire, dégénérative ou mixte (Hachinski *et al.*, 1975).

Le diagnostic de "MA possible" peut aussi être établi en présence de formes atypiques quant à la survenue, le tableau clinique ou l'évolution de la démence. Ce diagnostic doit être posé pour un patient présentant un déficit cognitif isolé, sévère, progressif et en l'absence d'autres causes de démences identifiables.

I.3.2.2. "Maladie d'Alzheimer probable"

• Les critères du diagnostic clinique de "MA probable" sont les suivants:

- comme nous l'avons décrit dans le chapitre I.3.1., il faut d'abord établir le diagnostic clinique de démence à l'aide du MMS de Folstein, de l'échelle de démence de Blessed ou d'autres examens identiques, et confirmer ce diagnostic par des tests neuropsychologiques,

- le sujet doit présenter: un déficit dans au moins deux des fonctions cognitives décrites dans le chapitre I.1. (aphasie, apraxie, agnosie,...); une altération progressive de la mémoire ou d'autres fonctions cognitives; et aucun trouble de la conscience,

- la maladie doit apparaître entre 40 et 90 ans, le plus souvent après 65 ans,

- le patient ne doit présenter aucune affection générale (métabolique, toxique, infectieuse, ...) ou cérébrale (neurochirurgicale, vasculaire, ...) qui, directement ou non pourrait être responsable du déficit progressif des fonctions cognitives. Les examens paracliniques et biologiques permettent d'exclure ces autres causes de démences (Chapitres I.3.1.2. et I.3.1.3.).

• Le diagnostic de "MA probable" s'appuie sur:

- une détérioration progressive des fonctions cognitives spécifiques comme le langage (aphasie), l'habileté motrice (apraxie) et la reconnaissance (agnosie),

- une diminution des activités de la vie quotidienne et des modifications du comportement,

- des troubles semblables dans les antécédents familiaux (surtout s'ils sont confirmés par un examen neuropathologique),

- des examens de laboratoire (Chapitres I.3.1.2. et I.3.1.3.)

  * ponction lombaire normale,
  * EEG normal ou variations aspécifiques telle qu'une augmentation des ondes lentes,
  * atrophie cérébrale progressive vérifiée par scanners successifs (IRMN).

• D'autres caractéristiques cliniques compatibles avec un diagnostic de "MA probable" (après exclusion des autres causes de démences) sont:

- un plateau dans l'évolution de la maladie,

- des symptômes associés à la dépression, des insomnies, des incontinences, des hallucinations, de brusques manifestations verbales, émotionnelles et physiques, des désordres sexuels, une perte de poids,

- des troubles neurologiques surtout au stades plus avancés de la maladie avec des signes moteurs, une hypertonie, des myoclonies, des troubles de la marche,

- des comas brutaux aux stades avancés de la maladie,

- un scanner normal pour l'âge.

• Enfin, certaines caractéristiques peuvent rendre aléatoire le diagnostic de "MA probable", il s'agit de:

- la survenue brusque de la maladie,

- l'apparition de signes neurologiques focaux tels qu'une hémiparésie, un déficit sensitif, une diminution du champs visuel, des troubles de la coordination survenant précocement au cours de l'affection,

- des troubles de la marche en phase initiale de la maladie.

I.3.2.3. "Maladie d'Alzheimer confirmée"

Le diagnostic de "MA confirmée" doit être posé lorsque la démence possède les caractéristiques cliniques d'une "MA probable" mais aussi et surtout il faut une confirmation histologique montrant la présence des lésions caractéristiques de la MA (plaques séniles et dégénérescence neurofibrillaire) obtenue par biopsie ou autopsie. Ce dernier point sera développé dans le chapitre II "Diagnostic neuropathologique de la MA".

I.3.2.4. Conclusion

L'ensemble de ces critères diagnostiques montre qu'établir un diagnostic de MA, qu'il soit possible, probable ou confirmé, n'est pas simple.

Le test idéal qui resterait bref, tout en permettant d'évaluer des fonctions cognitives variées, suffisamment sensible, correctement étalonné pour l'âge et le niveau culturel, permettant d'établir un profil cognitif à l'aide de notes standardisées, reste à élaborer.

I.3.3. CONCLUSION

Ainsi, actuellement, le diagnostic de certitude de la MA repose sur l'association de critères cliniques aboutissant au diagnostic de MA "probable" (Mc Khann *et al.*, 1984) et de critères neuropathologiques qui se basent sur un examen histologique du cerveau montrant la présence de neurones en dégénérescence neurofibrillaire et de dépôts de substance amyloïde (Mc Khann *et al.*, 1984; Khachaturian, 1985; et les critères du CERAD "Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease": Mirra *et al.*, 1991). Depuis 1989, le CERAD s'efforce d'établir des critères diagnostiques cliniques, neuropsychologiques (Morris *et al.*, 1989) mais aussi neuropathologiques de la MA (Mirra *et al.*, 1991; Gearing *et al.*, 1995; Ellis *et al.*, 1996; Hyman *et al.*, 1997). Ainsi, même en tenant compte des lésions neuropathologiques de la MA, les critères du NINCDS-ADRDA et du CERAD permettent, certes, d'établir un diagnostic de certitude de la maladie, mais celui-ci, est toujours très lourd et très complexe. De plus, ce diagnostic de certitude de la MA ne s'établit qu'après la mort de l'individu (lors de l'autopsie), les biopsies, comme nous l'aborderons plus loin, étant trop délicates.

II. DIAGNOSTIC NEUROPATHOLOGIQUE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

Le diagnostic de certitude de la MA est clinico-neuropathologique: l'examen clinique permet le diagnostic de démence dégénérative, l'examen neuropathologique (selon les critères du CERAD, Mirra *et al.*, 1991) fournit la confirmation de la maladie. Ce dernier examen, généralement fait sur des prélèvements *post-mortem,* permet de montrer la présence de nombreuses plaques séniles et de neurones en DNF dans le néocortex du malade. L'analyse neuropathologique permet aussi d'observer d'autres modifications non spécifiques de la MA: une atrophie corticale, une réaction gliale et des anomalies vasculaires.

II.1. LES LÉSIONS NEUROPATHOLOGIQUES

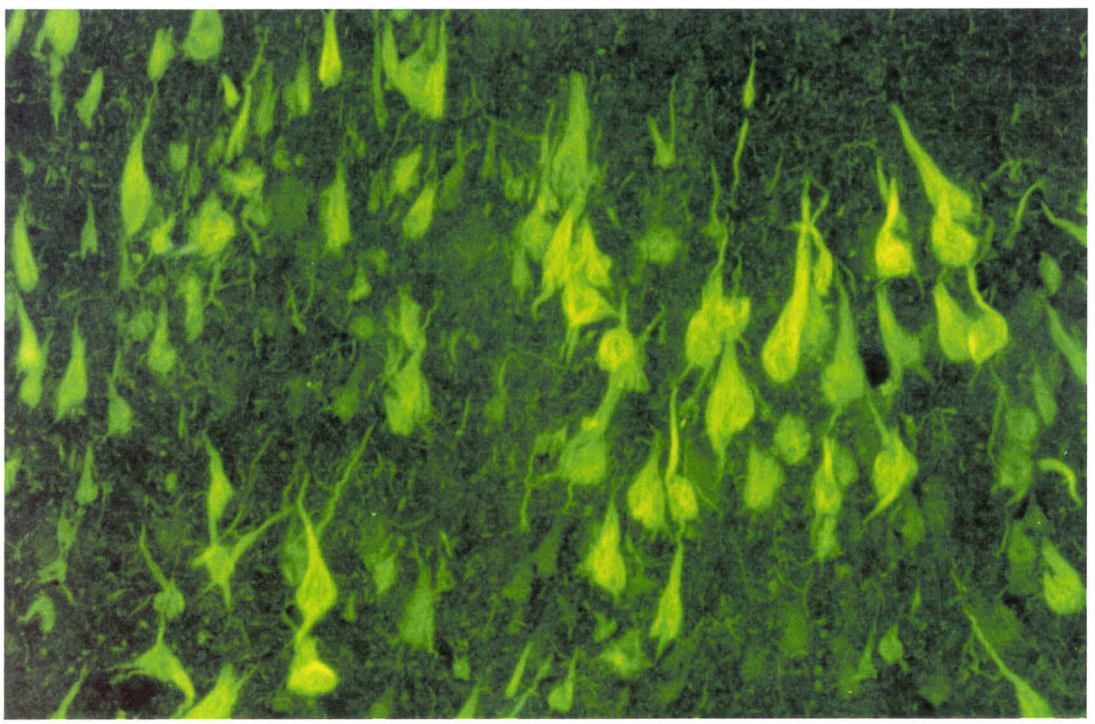
II.1.1. LA DÉGÉNÉRESCENCE NEUROFIBRILLAIRE

II.1.1.1. Structure

La dégénerescence neurofibrillaire (DNF) est caractérisée par l'accumulation intracellulaire d'un matériel fibrillaire anormal qui proviendrait de la dégradation du cytosquelette. Les neurones en DNF possèdent des propriétés argyrophiles, de telle sorte qu'ils sont facilement mis en évidence par des techniques d'imprégnation argentiques (Gallyas, 1971). Les neurones en DNF ainsi que les neurites dystrophiques peuvent également être visualisés par des molécules qui ont la particularité de mettre en évidence des structures en feuillet β plissés comme la thioflavine S (Delacourte *et al.*, 1987; Lenders *et al.*, 1989) **(Figure 1)**.

L'analyse ultrastructurale a révélé que ce matériel fibrillaire anormal de la DNF est composé de paires de filaments appariées en hélice ou PHF (pour le terme anglais "paired

FIGURE 1



Coupe de cortex temporal de cerveau de patient atteint de la maladie d'Alzheimer colorée par la thioflavine S. En fluorescence, les corps cellulaires des neurones en dégénérescence neurofibrillaire ont l'aspect caractéristique de flammes (observation au fort grossissement).

helical filament") (Kidd, 1963). Ces filaments ont un diamètre de 20 nm, pourvus de constrictions régulières tous les 80 nm. Kidd a expliqué cette forme par le fait que chaque filament serait constitué de deux brins de 10 nm de diamètre chacun, s'enroulant l'un autour de l'autre de manière hélicoïdale.

II.1.1.2. Composition

Les constituants antigéniques majeurs des PHF sont les protéines Tau; des protéines du cytosquelette associées aux microtubules (MAP pour "Microtubules Associated Proteins") (Brion *et al.*, 1985; Delacourte et Défossez, 1986; Grundke-Iqbal *et al.* 1986a).

D'autres antigènes que ceux des protéines tau ont été détectés sur les PHF. Certains anticorps comme ceux dirigés contre l'ubiquitine (Bancher *et al.*, 1991), les protéines du cytosquelette MAP 2 (Kosik *et al.*, 1984), les neurofilaments (Vickers *et al.*, 1994), marquent la DNF.

II.1.1.3. Distribution topographique

• Distribution régionale: Les régions neuronales les plus fortement touchées par la DNF sont les régions hippocampique et para-hippocampique (cortex entorhinal, subiculum, le champ CA1 de l'hippocampe), le noyau basal accessoire de l'amygdale, les aires néocorticales du lobe temporal, les aires limbiques et enfin les lobes frontal, pariétal et occipital qui sont les moins touchés (Arnold *et al.*, 1991).

• Distribution laminaire: Dans le néocortex, les couches II, III, V et VI sont les plus atteintes (Lewis *et al.*, 1987; Hof *et al.*, 1990a; Arnold *et al.*, 1991). Dans toutes les aires corticales associatives (temporale et frontale), ce sont les couches infragranulaires (V-VI) qui sont toujours plus atteintes que les couches supragranulaires (II-III) (Hof *et al.*, 1990a). Par contre, dans la région occipitale (aires visuelles primaire et secondaire), ce sont les couches II et III qui sont touchées par la DNF (Hof et Morrison, 1990).

II.1.1.4. Evolution

Selon Braak et Braak (1991), la DNF suit un shéma évolutif subdivisé en 6 étapes, du stade I au stade VI. Brièvement, au début de son évolution, la DNF est localisée au niveau de la région transentorhinale (stades transentorhinales I et II), puis elle s'installe dans la formation hippocampique (stade limbique; stade III et IV). Finalement, les aires associatives sont envahies par le processus dégénératif (stade isocorticaux; stades V et VI).

Par ailleurs, il a été montré que le nombre de neurones en DNF dans le cortex est corrélé avec la sévérité de la démence (Wilcock et Esiri, 1982; Arriagada *et al.*, 1992).

II.1.1.5. La DNF, un marqueur spécifique de la maladie d'Alzheimer?

La DNF n'est pas une entité caractéristique de la MA. Au cours du "vieillissement normal", ce processus neurodégénératif existe mais il est beaucoup moins développé puisqu'il se limite aux régions entorhinales et hippocampiques (Price et al;, 1991; Bouras *et al.*, 1993). De plus, la DNF est également retrouvée dans un grand nombre de maladies neurodégénératives: dégénérescence corticobasale, paralysie supranucléaire progressive (PSP) et certains syndromes parkinsoniens (Parkinson post-encephalitique, syndrome de l'île de Guam) (Delacourte et Buée, 1997).

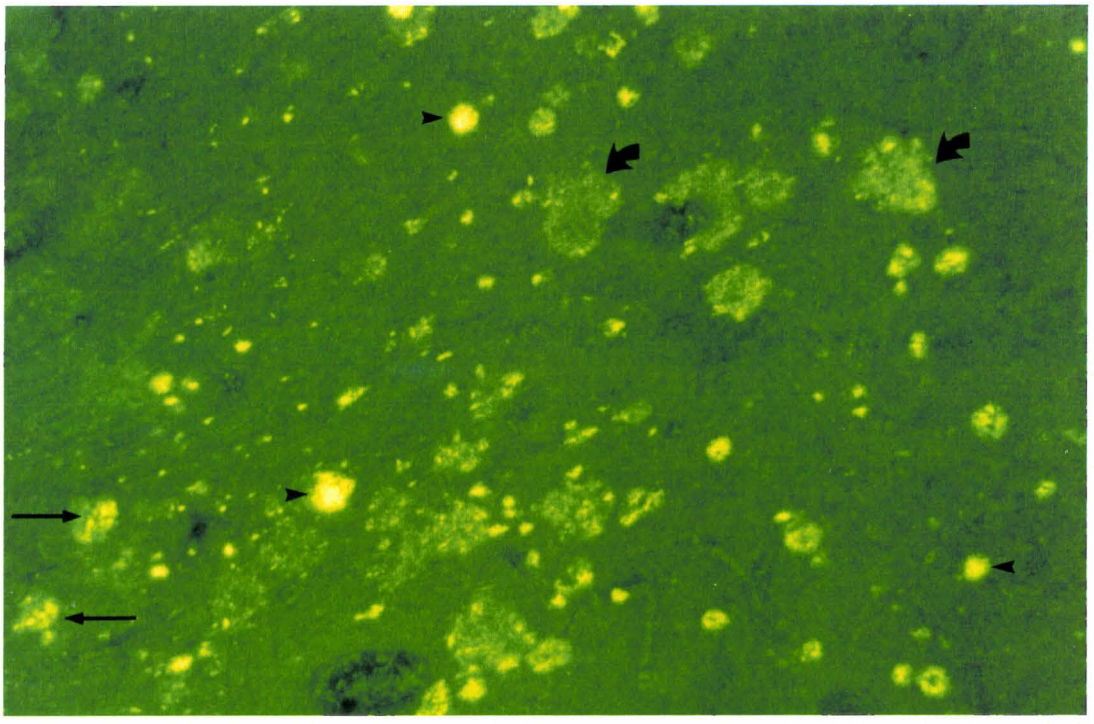
II.1.2. LES PLAQUES SÉNILES

II.1.2.1. Structure

Les plaques séniles sont des structures sphériques d'environ 40 µm de diamètre, comportant une couronne de prolongements nerveux (ou "neurites"), et un dépôt central de substance amyloïde, fréquemment au contact d'une cellule gliale. Le terme de plaque neuritique est utilisé pour insister sur la présence de prolongement nerveux, mis en évidence par des colorations argentiques et des anticorps anti-tau.

Les plaques séniles correspondent à des dépôts extracellulaires de substance amyloïde, de forme arrondie et compacte. Cette substance amyloïde peut s'accumuler au sein des

FIGURE 2



Coupe de cortex temporal de cerveau de patient atteint de la maladie d'Alzheimer colorée par la thioflavine S. En fluorescence, cette coloration permet de visualiser les dépôts amyloïdes compacts (pointes de flèches), classiques (flèches) et diffus (flèches courbées) (observation au faible grossissement).

vaisseaux, on parle alors d'angiopathie amyloïde. Les dépôts de substance amyloïde ont une structure en feuillets β plissés, visibles après diffraction aux rayons X (Glenner, 1980). Il est possible de les mettre en évidence par des colorants comme la thioflavine S ou le rouge congo **(Figure 2)**.

L'analyse ultrastructurale des dépôts amyloïdes a révélé qu'ils étaient constitués de filaments droits de 4 à 8 nm de diamètre (Merz *et al.*, 1983).

II.1.2.2. Composition

Le constituant principal des dépôts amyloïdes est un peptide de 39 à 43 acides aminés appelé peptide A4 ou Aβ (Glenner et Wong, 1984).

La substance amyloïde est formée de nombreux autres constituants qui ont été mis en évidence par des techniques d'immunohistochimie. L'α1-antichymotrypsine; les apolipoprotéines B et E (Apo B et Apo E); des marqueurs de l'inflammation tels que des protéines du complément (C1q, C3d et C4d) et des immunoglobulines (ces aspects seront développés dans le paragraphe VI.3.2.: Les marqueurs de l'inflammation au cours de la MA), la fibronectine, des laminines, des protéoglycannes ont été détectés au sein des PS (pour revue: Fraser *et al.*, 1993).

II.1.2.3. Distribution topographique

• Distribution régionale: Contrairement à la DNF, les dépôts amyloïdes affectent plus particulièrement les régions associatives du néocortex (les aires temporale et occipitale sont plus touchées que les aires pariétale et frontale), et plus rarement les régions hippocampique et parahippocampique (Arnold *et al.*, 1991; Braak et Braak, 1991).

• Distribution laminaire: Des premières études ont montré que les dépôts de substance amyloïde étaient localisés au niveau des couches III et V du néocortex (Rogers et Morrison, 1985; Lewis *et al.*, 1987). Puis, en 1991, Braak et Braak ont montré que la distribution de ces dépôts était plus large et s'étendait à toutes les couches du néocortex.

II.1.2.4. Evolution

En 1991, Braak et Braak ont décrit 3 stades d'évolution des dépôts amyloïdes au cours de la MA. Le premier stade (stade A), au cours duquel les dépôts amyloïdes sont en faible quantité dans les régions basales du cortex frontal, temporal et occipital. La formation hippocampique est épargnée. Puis, le stade B, pendant lequel les dépôts amyloïdes affectent avec une densité modérée les aires associatives de la presque totalité de l'isocortex. La formation hippocampique est légèrement touchée. Enfin, au stade C, l'ensemble de l'isocortex est atteint et certains noyaux sous-corticaux peuvent être envahis. La formation hippocampique reste modérément touchée.

II.1.2.5. Les plaques séniles, un marqueur spécifique de la maladie d'Alzheimer?

Si la DNF n'est pas spécifique de la MA, les PS non plus. En effet, elles sont retrouvées comme la DNF, dans la formation hippocampique des sujets sains de plus de 75 ans et dans d'autres pathologies comme la démence à corps de Lewy.

II.2. L'ATROPHIE CÉRÉBRALE

Le cerveau d'un patient atteint de MA présente une atrophie corticale diffuse significative après 75 ans pour les lobes temporaux et pariétaux. Le lobe occipital est épargné. L'atrophie corticale se traduit par un rétrécissement des circonvolutions et un élargissement des sillons. Elle provoque une diminution du poids du cerveau significative à l'échelle d'une population et non pour un individu donné. Par ailleurs, une dilatation des ventricules latéraux et du IIIème ventricule accompagne généralement l'atrophie corticale.

L'atrophie corticale observée au cours de la MA est le résultat d'une véritable perte de cellules neuronales, contrairement à l'atrophie des neurones observée au cours du vieillissement. En disparaissant, le neurone ne laisse pas d'espace libre dans le parenchyme

nerveux; au contraire ce dernier se resserre et comble ainsi la place laissée vide. Par conséquent, la densité neuronale (nombre de neurones par mm^2 de coupe microscopique) n'est pas modifiée, mais le cortex s'atrophie.

Cette mort neuronale toucherait environ 22 à 26% des cellules neuronales du cerveau (Terry *et al.*, 1981; Mountjoy *et al.*, 1983). Selon Mann (1988), elle serait la cause principale des signes cliniques de la MA. De plus, une perte de synapses et une dilatation des boutons présynaptiques ont été constatées (Masliah *et al.*, 1991a). Cette perte synaptique provoquerait l'apparition de disconnections entre les différentes aires néocorticales impliquées dans les processus cognitifs (Terry *et al*;, 1991).

L'atrophie corticale apporte des renseignements quant à la pathogénèse de la MA, mais ne peut être utilisée dans un but diagnostique.

II.3. LA RÉACTION GLIALE

Dans la MA, le nombre de cellules gliales reste constant. Cependant, le nombre d'astrocytes fibrillaires est fortement augmenté. Ces astrocytes sont mis en évidence par un anticorps anti-GFAP dirigé contre une protéine spécifique des filaments intermédiaires des astrocytes: la protéine gliofibrillaire acide ou GFAP. Le nombre constant de cellules gliales ainsi que l'augmentation de la concentration de la GFAP astrocytaire, laissent penser qu'il se produit une hypertrophie astrocytaire: on parle de gliose astrocytaire (Delacourte et Buée, 1989; Frederickson, 1992). Les astrocytes fibrillaires révélés par la GFAP sont particulièrement bien visibles autour des dépôts amyloïdes (Frederickson, 1992). La réaction gliale se traduirait aussi par la présence de cellules microgliales autour des lésions histologiques suggérant qu'elles jouent le rôle de macrophages en phagocytant les constituants des lésions (Wisniewski *et al.*, 1991).

Cette modification gliale observable en *post-mortem* ne peut être utilisée comme outil diagnostique précoce.

II.4. ANOMALIES VASCULAIRES

En 1986, Scheibel *et al.* ont suggéré que la présence d'une altération vasculaire dans le cerveau du patient atteint de la MA pouvait expliquer l'apparition des lésions neuropathologiques. Ainsi, dans le vieillissement et la MA, une augmentation du diamètre des capillaires et une diminution de la densité vasculaire ont été décrites (Bell et Ball, 1981; Buée *et al.*, 1994). Cependant, Bell et Ball n'observent pas de différence significative entre la population "Alzheimer" et la population de témoins âgés quant à ces deux types d'anomalies.

Scheibel *et al.* (1986) ainsi que Buée *et al.* (1994) voient non seulement une diminution de la densité vasculaire mais aussi la présence d'anomalies vasculaires particulières, comme des vaisseaux en boucle et/ou tortueux.

Finalement, les données actuelles ne permettent pas de conclure quant au rôle de la vascularisation dans la MA. Ces anomalies ne peuvent donc pas être utilisées comme outils diagnostiques.

II.5. CRITÈRES DIAGNOSTIQUES NEUROPATHOLOGIQUES

Même au niveau neuropathologiques, le diagnostic de certitude de la MA est difficile. La simple présence des lésions (PS et DNF) ne permet pas de porter le diagnostic de la maladie. Il est aujourd'hui impossible de déterminer si ces lésions sont une manifestation "normale" du vieillissement cérébral ou une phase préclinique de la MA. Dans le premier cas, la maladie apparaît à partir d'un certain seuil lésionnel que des critères diagnostiques se sont attachés à déterminer (Khachaturian, 1985; Mirra *et al.*, 1991). Dans le second cas, la maladie est présente dès les premières lésions mais elle n'est cliniquement apparente qu'à

partir d'un certain "stade" que l'examen neuropathologique permet de déterminer (Braak et Braak, 1991).

C'est pour résoudre la difficulté à établir le diagnostic de certitude de la MA (problèmes de seuil lésionnel, de reproductibilité inter-laboratoire dans la mise en évidence des plaques séniles par exemple) que de nombreuses équipes cherchent, non seulement des nouveaux marqueurs de la MA, mais aussi à améliorer les critères diagnostiques (Critères du CERAD). Récemment, le "National institute of Aging-Reagan Institute" a établi de nouveaux critères (Hyman *et al.*, 1997) basés sur des données cliniques (importance de la détérioration intellectuelle) et sur des données neuropathologiques (quantification des plaques neuritiques selon le CERAD, évaluation des stades selon Braak et Braak). Même dans ces derniers critères, on parle encore de diagnostic "très probable". Par conséquent, les critères diagnostiques neuropathologiques restent encore à améliorer.

Les recherches dans ce domaine se poursuivent, d'ailleurs récemment, l'équipe de Trojanowski (Schmidt *et al.*, 1997) a découvert, de manière fortuite, une nouvelle lésion appelée "AMY plaques". Ces plaques sont, d'aspect extérieur, semblables aux plaques amyloïdes, mais à l'intérieur, elles ne contiennent pas le core amyloïde qui caractérise les plaques séniles traditionnelles. Par contre, elles contiennent une protéine de 100 kDa encore non identifiée. Ces plaques Aβ négatives sont présentent dans le cerveau de sujets atteints de la MA, de Trisomie 21, de sujets non déments contenant de nombreux dépôts Aβ mais rarement dans le cerveau de sujets contrôles âgés ou atteints d'autres maladies neurodégénératives. La découverte de ces nouvelles lésions ouvre de nouvelles perspectives quant à l'étiologie et la pathogénèse de la MA, et permettra peut être la mise en évidence de nouveaux marqueurs de la MA (protéine de 100 kDa?) indispensable à la mise au point d'un diagnostic de certitude *ante-mortem*.

II.6. CONCLUSION

La découverte des lésions neuropathologiques a été une étape primordiale pour l'avancée des recherches sur la MA. Cependant, la mise en évidence des PS et de la DNF par l'observation du tissu cérébral, n'a pas permis d'établir un diagnostic de certitude *ante-mortem* de la MA, puisque ces lésions sont peu spécifiques et ne sont observables qu'en *post-mortem.*

Les biopsies cérébrales présenteraient une grande valeur pour un diagnostic *ante-mortem,* mais leurs indications restent très limitées pour plusieurs raisons (Katzman *et al.*, 1988): i) Il s'agit d'un examen agressif. La mortalité imputable à la biopsie est de l'ordre de 0,75%, la morbidité de 2%. ii) Cet examen présente une excellente spécificité mais sa sensibilité est faible: 25 à 50% des biopsies ne permettent pas d'établir un diagnostic. iii) L'absence de thérapeutique active sur l'évolution de la maladie ne justifie pas de tels risques pour le patient. Plus généralement, les biopsies sont effectuées lorsque le clinicien se trouve devant un cas de démence atypique chez un patient jeune, ou dans le cas de présomption de tumeurs.

C'est pourquoi, les études se sont orientées vers la recherche de marqueurs biochimiques constituant les lésions de la MA, dans le but d'en isoler un qui pourrait être utile au diagnostic *ante-mortem* de la MA.

L'intérêt de ce passage au niveau moléculaire est double:

1- il permet d'isoler des marqueurs qui peuvent être utilisés pour un diagnostic biologique,

2- et il permet aussi l'avancée dans la connaissance, en particulier, il facilite la compréhension des mécanismes et la mise au point de thérapie.

Nous aborderons l'aspect moléculaire de la MA dans le chapitre III "Diagnostic biochimique de la MA", ce qui amènera à l'établissement des critères biochimiques du diagnostic *post-mortem* (CEBDAD; Buée *et al.*, 1997a), et dans le chapitre IV "Diagnostic génétique de la MA". Enfin, l'aspect biologique permettant d'établir le diagnostic *ante-mortem* de la MA, sera développé dans le chapitre V "Diagnostic biologique de la MA".

III. DIAGNOSTIC BIOCHIMIQUE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

De nombreuses recherches ont permis d'identifier des marqueurs biochimiques de la MA au sein des lésions de la maladie.

III.1. LA DÉGÉNÉRÉSCENCE NEUROFIBRILLAIRE

L'analyse de la DNF a permis d'isoler des marqueurs biochimiques de la MA comme les protéines microtubulaires tau. D'autres constituants tels que l'ubiquitine, MAP 2 et les neurofilaments sont retrouvés au sein des neurones en DNF.

III.1.1. LES NEUROFILAMENTS

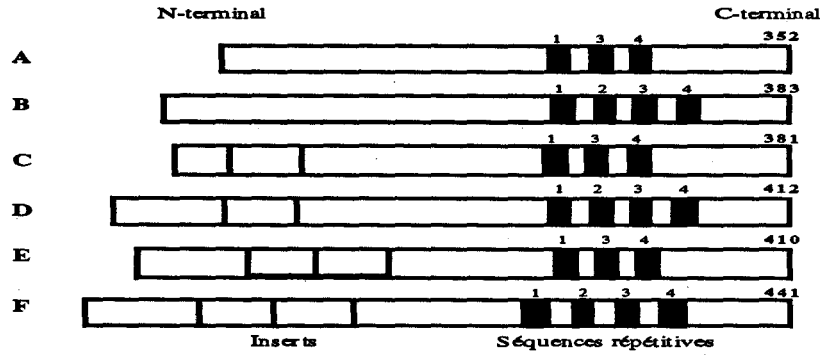
Les neurofilaments sont des filaments protéiniques de 12 nm de diamètre, constitutifs du cytosquelette des cellules nerveuses (neurones et cellules gliales). Ils sont formés de trois sous-unités: des protéines de poids moléculaires relativement faible (70 Kda) ou NF-L ("Low"); moyen (160 Kda) ou NF-M ("Medium") et élevé (210 Kda) ou NF-H ("High"). Ces protéines peuvent être phosphorylées. Les formes H et M sont caractérisées par la présence de séquences (X-Lys-Ser-Pro-X) phosphorylées et répétées plusieurs fois (Lee *et al.*, 1988). Des anticorps dirigés contre les régions contenant ces sites multiples de phosphorylation marquent les neurones en DNF, suggérant que les neurofilaments sont associés aux PHF (Haugh at al., 1986; Miller *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 1988). En fait, ce marquage peut également s'expliquer par l'existence de réactions croisées entre les protéines tau et les anticorps anti-NF notamment au niveau des sites de phosphorylation (X-Lys-Ser-Pro-X) (Steinberger *et al.*, 1985; Lichtenberg-Kraag *et al.*, 1992). Ce marquage non-spécifique de la MA ne peut être utilisé comme outil diagnostique.

III.1.2. LES PROTÉINES TAU

III.1.2.1. Caractéristiques

• Structure: Le gène des protéines tau est situé sur le chromosome 17 (Neve *et al.*, 1986). Dans le système nerveux central, 6 ARN messagers différents sont générés par épissage alternatif d'un transcrit primaire constitué de 16 exons. Ces 6 ARN messagers sont traduits en six isoformes de protéines tau (**Figure 3**) qui diffèrent par la présence du coté amino-terminal (N-terminal), d'un ou deux inserts de 29 ou 58 acides aminés et, du coté carboxy-terminal (C-terminal), de trois ou quatre séquences répétitives de 31 ou 32 acides aminés contenant le motif (Pro-Gly-Gly-Gly) (Goedert *et al.*, 1989a). Ces 6 variants tau ont une masse moléculaire apparente (déterminée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS) comprise entre 45 et 62 kDa.

FIGURE 3



Les 6 isoformes sont retrouvées dans le cerveau adulte humain. L'expression des protéines tau est régulée au cours du développement. En effet, une seule isoforme est retrouvée à la naissance, l'isoforme fœtale (isoforme A, **Figure 3**). Cette isoforme ne contient ni d'insert N-terminal, ni de séquence répétitive supplémentaire (Goedert *et al.*, 1989b).

• Localisation: Dans le cerveau humain, les protéines tau sont essentiellement localisées au niveau des neurones. Cette localisation des protéines tau serait plutôt axonale (Binder *et al.*, 1985; Kowall et Kosik, 1987; Brion *et al.*, 1988), mais aussi somato-dendritique (Papasozomenos et Binder, 1987). Le degré de phosphorylation régulerait leur localisation intracellulaire.

• Rôle: Les protéines ont un rôle dans le transport axonal. Elles induisent la polymérisation des molécules de tubuline, constituant majeur des microtubules (Cleveland *et al.*, 1977a,b). Elles stabilisent donc ces derniers qui interviennent dans le transport axonal (Drubin et Kirschner, 1986). Enfin, les protéines tau joueraient un rôle dans la différenciation axonale des neurites (Caceres et Kosik, 1990).

III.1.2.2. La phosphorylation des protéines tau

Si l'hétérogénéité des protéines tau est due à l'existence de différentes isoformes, elle est accentuée par des modifications post-traductionnelles (phosphorylation). L'analyse par électrophorèse bidimensionnelle révèle environ vingt protéines avec des points isoélectriques (pI) compris entre 6,5 et 8,5 (Cleveland *et al.*, 1977a,b).

III.1.3. LES PROTÉINES TAU AU COURS DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

III.1.3.1. Description

De nombreuses équipes ont démontré par des techniques immunocytochimiques (Brion *et al.* 1985; Nukina et Ihara, 1986; Delacourte et Défossez, 1986; Kosik *et al.*, 1986; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986a), et biochimiques (Wischik *et al.*, 1988 a,b; Kondo *et al.*, 1988) que les protéines tau sont les constituants majeurs des PHF (Tau-PHF). L'analyse sur gel de polyacrylamide permet de constater que ces protéines Tau-PHF ont une mobilité électrophorétique ralentie comparativement aux protéines tau normales. Un triplet de protéines tau pathologiques a été mis en évidence dans des homogénats de tissu cérébral

autopsique de patients atteints de maladie d'Alzheimer (Delacourte *et al.*, 1989; 1990; Flament *et al.*, 1989; Ksiezak-Reding *et al.*, 1990; Greenberg et Davies, 1990). Il s'agit des protéines tau 55, tau 64 et tau 69 (en référence à leur masse moléculaire respective de 55, 64 et 69 kDa). Les protéines tau pathologiques sont incapables de se lier aux microtubules (Iqbal *et al.*, 1986), elles sont particulièrement insolubles et s'agrègent pour former les PHF au cours de la MA.

III.1.3.2. Hypothèse de la phosphorylation anormale

Depuis 1986, il est reconnu que les protéines Tau sont anormalement phosphorylées au cours de la MA (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986b; Ihara *et al.*, 1986, Flament *et al.*, 1989). L'augmentation de leur masse moléculaire, ainsi que l'acidité accrue de leur point isoélectrique (5,5 à 6,5), seraient dues à une hyperphosphorylation (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986b; Flament *et al.*, 1989; Delacourte *et al.*, 1990; Goedert *et al.*, 1992a). Le triplet de protéines tau pathologiques résulterait ainsi de la phosphorylation de l'ensemble des 6 variants tau (Goedert *et al.*, 1992a). De nombreux sites de phosphorylation "anormale" ont été découverts sur les protéines tau pathologiques par spectrométrie de masse (Hasegawa *et al.*, 1992; Morishima-Kawashima *et al.*, 1995) ou grâce à l'utilisation d'anticorps dépendants de la phosphorylation (Mercken *et al.*, 1992; Goedert *et al.*, 1994). La protéine kinase responsable de la phosphorylation anormale des protéines tau pathologiques n'a pas encore été identifiée. Cependant des kinases potentielles ont été proposées: les MAP kinases (Drewes *et al.*, 1992), la "glycogen synthase kinase-3" ou GSK3 (Hanger *et al.*, 1992), ou les kinases dépendantes des cyclines (Ledesma al., 1992). Par ailleurs, des phosphatases ont été impliquées dans ce phénomène de phosphorylation puisque cette dernière résulterait de la balance des activités kinasiques et phosphatasiques. (Goedert *et al.*, 1992b; Gong *et al.*, 1993)

III.1.3.3. Hypothèse de la phosphorylation normale

Récemment, Matsuo *et al.* (1994) démontrèrent que certains sites de phosphorylation "anormale" des protéines tau pathologiques étaient retrouvés sur les protéines tau provenant de biopsies de sujets sains, après un délai *post-mortem* court voire nul. L'étude immunochimique de cerveaux biopsiques sains réalisée avec des anticorps monoclonaux dépendants de la phosphorylation révèle la présence d'un triplet de protéines tau hyperphosphorylées, très proche de celui des protéines tau pathologiques de la MA. L'hyperphosphorylation des protéines tau pathologiques serait remise en cause.

III.1.3.4. Différences entre protéines tau autopsiques normales, tau autopsiques pathologiques et tau biopsiques

Une étude cinétique a démontré que l'hyperphosphorylation des protéines tau biopsiques de sujets sains disparaît très rapidement lorsque le délai *post-mortem* est supérieur à 2 heures. Cette déphosphorylation des protéines tau, constatée également chez le rat, est due aux phosphatases endogènes encore actives en *post-mortem* (Mawal-Dewan *et al.*, 1994; Buée-Scherrer *et al.*, 1996b). L'absence de triplet de protéines tau pathologiques chez les sujets sains autopsiques était du au fait que le tissu cérébral autopsique a été bien souvent obtenu après des délais post-opératoires supérieurs à 2 heures. Toutefois la distinction entre une protéine tau pathologique et tau normale biopsique reste possible puisque leur phosphorylation est différente: i) l'analyse par électrophorèse bidimensionnelle montre que les protéines tau pathologiques sont plus acides, résultant probablement d'une phosphorylation plus importante (Sergeant *et al.*, 1995); ii) un anticorps monoclonal dépendant de la phosphorylation (AT100) ne détecte aucun triplet dans les biopsies. Ceci indique que certains sites de phosphorylation sont spécifiques des protéines tau pathologiques (Matsuo *et al.*, 1994).

Enfin, on peut s'interroger sur la présence de protéines tau pathologiques phosphorylées après un délai *post-mortem* supérieur à 2 heures. Plusieurs hypothèses sont avancées: une inactivité phosphatasique, une inaccessibilité des PHF aux phosphatases ou

encore une conformation spécifique des protéines tau pathologiques pourrait expliquer la protection des PHF vis à vis des phosphatases.

III.1.3.5. Conclusion

La DNF de type Alzheimer est caractérisée par un profil électrophorétique particulier de protéines tau hyperphosphorylées: le triplet tau 55, 64 et 69. Ce triplet est généralement retrouvé dans les syndromes parkinsoniens de l'île de Guam et du Parkinson post-encéphalitique (Buée-Scherrer *et al.*, 1995). Cependant, nous verrons dans le paragraphe suivant que ces pathologies peuvent être différenciées de la MA par la faible quantité d'Aβ contenue dans le cortex du malade. Les autres maladies neurodégénératives comme la PSP (paralysie supranucléaire progressive), la dégénérescence corticobasale sont caractérisées par un doublet tau 64 et 69 (Flament *et al.*, 1991; Buée-Scherrer *et al.*, 1996b) et les démences de type frontal par des profils particuliers (Buée-Scherrer *et al.*, 1996b; Delacourte *et al.*, 1996; Vermersch *et al.*, 1995). Le triplet de protéines tau pathologiques reste donc un excellent marqueur biochimique de la MA.

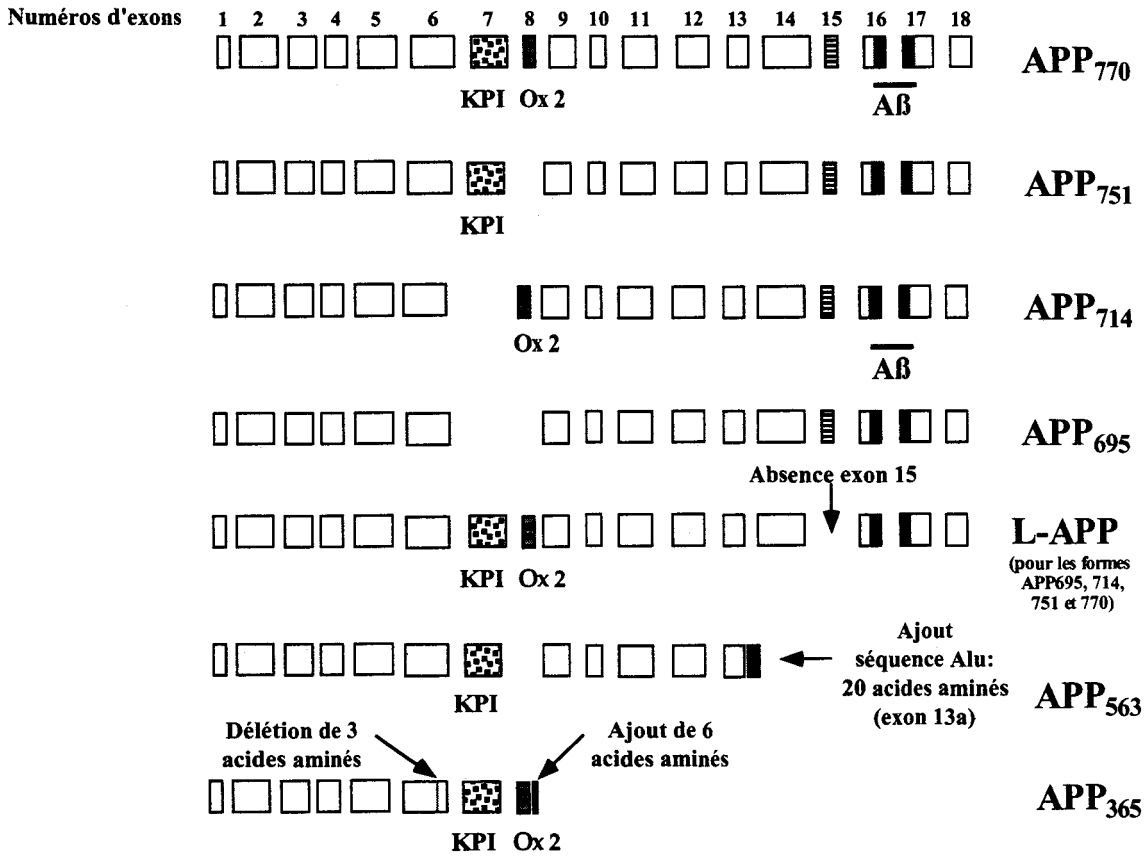
III.2. LES DÉPÔTS AMYLOÏDES

Les dépôts amyloïdes comme la DNF ont été le terrain de recherche de marqueurs biochimiques de la MA. De nombreux constituants ont été isolés au sein des dépôts amyloïdes. Nous allons présenter dans ce paragraphe les plus intéressants pour notre étude. Cette liste est par conséquent non exhaustive.

III.2.1. LA PROTÉINE AMYLOÏDE OU PEPTIDE Aβ ET SON PRÉCURSEUR

Le constituant majeur de la substance amyloïde est le peptide Aβ. Il est insoluble et dérive d'un précurseur beaucoup plus grand, appelé précurseur de la protéine amyloïde ou

FIGURE 4


Numéros d'exons
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
KPI
Ox 2
Aß
APP770
APP751
APP714
APP695
Absence exon 15
L-APP
(pour les formes APP695, 714, 751 et 770)
Ajout séquence Alu: 20 acides aminés (exon 13a)
APP563
Délétion de 3 acides aminés
Ajout de 6 acides aminés
APP365

APP ("Amyloid Precursor Protein") dont le gène se situe sur le chromosome 21, dans la région 21q21 (Goldgaber *et al.*, 1987; Kang *et al.*, 1987; Robakis *et al.*, 1987a,b).

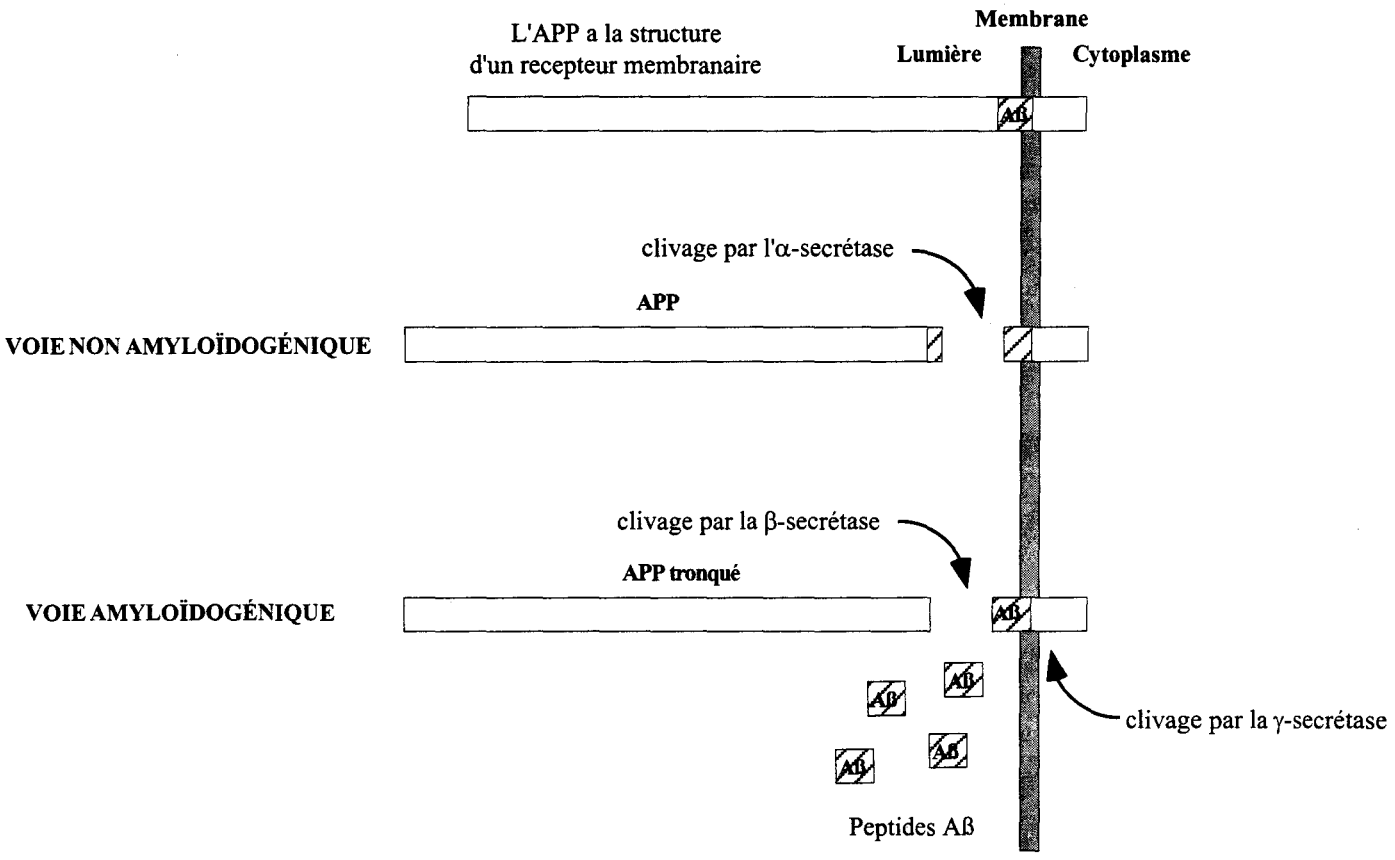
III.2.1.1. Le précurseur de la protéine amyloïde (APP)

• Structure: Il existe plusieurs précurseurs du peptide Aβ, $APP_{695, 714, 751, et 770}$ (pour le nombre d'acides aminés) dont la description a été faite à partir de leur ARN messagers **(Figure 4)**. Ces variants se différencient par la présence ou l'absence de certains exons (8 exons pour la forme la plus petite (APP_{365}) et 18 pour la forme la plus grande (APP_{770})). Cet épissage alternatif permet l'insertion d'un ou deux exons codant pour l'antigène OX-2 (analogue à un antigène lymphocytaire) (APP_{770} et APP_{714}) et une région homologue aux inhibiteurs de protéases de type Kunitz (APP_{770} et APP_{751}). Un autre mode d'épissage a également été identifié dans les leucocytes et les cellules microgliales. Il donne naissance aux L-APP ($APP_{677, 696, 733 et 752}$) qui correspondent à la délétion de l'exon 15 (position des exons pour l'isoforme 770), situé en amont des exons codant pour le peptide Aß (König *et al.*, 1992). Toutes ces isoformes contiennent le peptide amyloïde, mais il en existe également d'autres qui ne le contiennent pas: APP_{563} et APP_{365}.

• Distribution tissulaire: Seules les trois principales isoformes de l'APP (APP_{695}, APP_{751} et APP_{770}) ont été étudiées. L'isoforme APP_{695} est principalement rencontrée dans le cerveau et elle représente environ 67% des ARN messagers cérébraux (Tanaka *et al.*, 1991). Elle n'existe qu'en très faible proportion dans les tissus non-neuronaux. Les deux autres formes (APP_{751} et APP_{770}), sont essentiellement et respectivement présentes dans la rate et dans le coeur.

• Rôles: L'APP est une protéine ubiquitaire. Actuellement, aucun rôle physiologique direct ne lui a été attribué dans le système nerveux central. L'APP joue un rôle dans la régulation de la croissance cellulaire (Schubert *et al.*, 1989a). Comme il interagit fortement avec les constituants de la matrice extracellulaire, on lui suggère un rôle dans l'adhésion

FIGURE 5


L'APP a la structure
d'un recepteur membranaire
Membrane
Lumière
Cytoplasme
Aß
clivage par l'α-secrétase
APP
VOIE NON AMYLOÏDOGÉNIQUE
clivage par la β-secrétase
APP tronqué
VOIE AMYLOÏDOGÉNIQUE
clivage par la γ-secrétase
Peptides Aß

cellulaire (Schubert *et al.*, 1989b). Au niveau périphérique, il semblerait être impliqué dans la cicatrisation, la coagulation des plaquettes, l'activation des lymphocytes et l'induction de la réponse immunitaire (Oltersdorf *et al.*, 1989; Van Nostrand *et al.*, 1989; Godfroid et Octave, 1990; Sinha *et al.*, 1991).

III.2.1.2. De l'APP à l'Aβ

L'APP présente deux clivages possibles dont un permet la production de peptide Aβ. Il peut être clivé à l'intérieur du peptide Aβ par une activité enzymatique encore inconnue appelée α-secrétase (Sisodia *et al.*, 1990; Anderson *et al.*, 1991) (**Figure 5**). Il s'agit de la voie non amyloïdogénique ne conduisant pas à la formation du peptide Aβ. Ce clivage peut avoir lieu dans les compartiments intracellulaires ou au niveau de la membrane plasmique (pour revue, Checler *et al.*, 1995).

De façon alternative l'APP n'est pas clivé à l'intérieur du peptide Aβ, mais en amont de celui-ci par une activité enzymatique appelée β-secrétase et dans la partie transmembranaire par une activité γ-secrétase. **(Figure 5).** Ce clivage a lieu après le résidu 40 de l'Aβ ($A\beta_{1-40}$) et occasionnellement après le résidu 42 ($A\beta_{1-42}$). Ce dernier clivage est amplifié au cours de la MA (Younki, 1995). La voie conduisant à la formation du peptide Aβ, est appelée voie amyloïdogénique (Golde *et al.*, 1992; Estus *et al.*, 1992). Elle a lieu au niveau du réticulum endoplasmique pour la forme contenant 42 acides aminés et du trans-Golgi ou des endosomes tardifs pour la forme à 40 acides aminés (Hartmann *et al.*, 1997).

III.2.1.3. Le peptide Aβ

• Structure: Le peptide Aβ, formé de 39 à 43 acides aminés, est codé en partie par les exons 16 et 17 de l'APP (position des exons pour la plus grande isoforme APP_{770}), suggérant qu'il ne résulte pas d'un épissage aberrant (Lemaire *et al.*, 1989) (**Figure 4**). Il est situé à la fois dans les domaines extracellulaire et transmembranaire (**Figure 5**). De récentes études immunohistochimiques, utilisant des anticorps spécifiques ont montré que la forme contenant 42 acides aminés est préférentiellement retrouvée dans les dépôts amyloïdes

compacts et diffus (Mak *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1994). Ces résultats suggèrent que la longueur du peptide Aβ est un facteur important pour son agrégation sous forme substance amyloïde (Burdick *et al.*, 1992).

• Propriétés biologiques: En 1989, Yankner *et al.*, ont montré la neurotoxicité d'un fragment l'APP. Par la suite, la région 25-35 du peptide Aβ s'est révélée neurotoxique à des concentrations élevées de l'ordre de 10-100 nM, alors qu'à des concentrations plus faibles (10-100 pM), cette région aurait un rôle neurotrophique (Yankner *et al.*, 1990). La neurotoxicité du peptide Aβ serait liée à sa conformation; les peptides Aβ synthétiques possèdent une structure soit en pelote statique, soit en hélice α dans la partie amino-terminale. Seuls les peptides avec une hélice α seraient neurotoxiques (Yankner et Busciglio, 1992). Dans la MA, le peptide Aβ est agrégé sous la forme de dépôt amyloïde. Il semblerait que la neurotoxicité du peptide Aβ soit également liée à son état d'agrégation (Frautschy *et al.*, 1991; 1992).

D'autres auteurs ont également montré que la neurotoxicité du peptide Aβ était médiée par l'ion Ca^{2+}. En particulier, le peptide Aβ augmenterait la vulnérabilité des neurones à l'excitabilité (Koh *et al.*, 1990; Mattson *et al.*, 1992).

Les techniques utilisées pour l'étude de la neurotoxicité du peptide Aβ sont diverses, cela expliquerait les résultats contradictoires obtenus.

Enfin, le peptide Aβ possède des sites de fixation pour certaines molécules appelées co-facteurs de l'amyloïdogénèse, comme l'α1-antichymotrypsine, les protéoglycannes et l'apolipoprotéine E (Potter *et al.*, 1991; Buée *et al.*, 1993a,b ; Strittmatter *et al.*, 1993a,b).

• Dosage de l'Aβ agrégé dans le cerveau: Buée *et al.* (1997a) ont dosé par immunochimie le peptide Aβ agrégé au sein des plaques séniles dans une population de témoins et de patients atteints de la MA. Ce dosage est parfaitement corrélé aux résultats obtenus par immunohistochimie (Permanne *et al.*, 1995). Malgré une forte hétérogénéité dans la quantité d'Aβ agrégé chez les témoins et les malades, il est possible d'établir un seuil

à 30 pmoles d'Aβ (1-42) par mg de cortex qui n'est jamais dépassé chez les sujets témoins et la quasi-totalité de patients atteints d'autres maladies neurodégénératives. Nous verrons dans le paragraphe III.4. que ce dosage a été utilisé combiné au dosage des protéines tau pour établir des critères diagnostiques biochimiques (CEBDAD, Buée *et al.*, 1997a).

III.2.2. LES CO-FACTEURS DE L'AMYLOÏDOGÉNÈSE

La recherche de marqueurs biochimiques de la MA a permis d'isoler plusieurs molécules dans les dépôts amyloïdes, mais pour autant toutes ne sont pas des co-facteurs. La notion de co-facteurs est très floue. Les co-facteurs proprement dits doivent répondre à plusieurs critères: être retrouvés dans les dépôts amyloïdes, avoir une forte affinité pour le peptide Aβ, ou pour l'APP (pour bloquer par exemple, le site de clivage de l'α-secrétase), agréger le peptide Aβ *in vitro*, et être associés à un ou plusieurs gènes candidats. Tous ces critères réunis en théorie montrent qu'à l'heure actuelle, il est difficile de trouver un véritable co-facteur de l'amyloïdogénèse.

• α1-antichymotrypsine: L'α_1-antichymotrypsine, antiprotéase de type Serpine, est présente dans les dépôts amyloïdes (Abraham *et al.*, 1988). Elle est capable de former *in vitro* un complexe stable avec le peptide Aβ (Potter *et al.*, 1991). Récemment, Ma *et al.*, (1994) ont montré que le peptide Aβ pouvait s'agréger sous la forme de structures filamenteuses en présence d'α1-antichymotrypsine. Cet inhibiteur de protéases provoque une augmentation de l'agrégation de 10 à 20 fois supérieure à celle du peptide Aβ seul. Le gène de l'α_1-antichymotrypsine est situé sur le chromosome 14, dans une région proche de celle où il existe une association avec la MA.

• Protéoglycannes: Les protéoglycannes sont retrouvés dans toutes les amyloïdoses (Kisilevski *et al.*, 1992). Dans la MA, les plaques séniles contiennent des héparane sulfate

protéoglycannes (Snow *et al.*, 1988; Buée *et al.*, 1994). Ces derniers sont également présents dans les dépôts pré-amyloïdes, supposant que l'accumulation des protéoglycannes est un phénomène précoce (Snow *et al.*, 1990). Il existe une forte affinité entre les protéoglycannes et l'APP (Narindrasorasak *et al.*, 1991; Buée *et al.*, 1993a), ainsi qu'une interaction spécifique entre le peptide Aβ et les protéoglycannes (Buée *et al.*, 1993a, b). Des injections de peptide Aβ et de protéoglycannes dans l'hippocampe de rat conduisent, au bout d'une semaine, à la formation de structures amyloïdes au point d'injection. Elles sont visualisées à l'aide d'une sonde immunologique polyclonale contre le peptide Aβ (1-40), et par la thioflavine S (Snow et Malouf, 1993). Il semble donc que les protéoglycannes jouent un rôle important dans le processus d'amyloïdogénèse.

• Apolipoprotéine E: L'apolipoprotéine E (Apo E) a d'abord été retrouvée dans les dépôts amyloïdes par Namba *et al.* en 1991. Le gène de l'apolipoprotéine E est situé sur le chromosome 19 et code pour une protéine polymorphique. Ce polymorphisme correspond à des mutations dans la séquence nucléotidique du gène. Trois isomorphes ont été décrits: E2, E3, E4, correspondant respectivement aux allèles ε2, ε3, ε4 (Zannis *et al.*, 1981). En 1993, Corder *et al.*, ont démontré que l'allèle ε4 de l'Apo E favorise l'apparition de la MA dans les familles à début tardif (âge d'apparition de la maladie après 65 ans). D'autres études sont venues confirmer cette association entre l'allèle ε4 et les formes tardives de la MA, qu'elles soient familiales ou sporadiques (Strittmatter *et al.*, 1993b; Chartier *et al.*, 1994). Enfin, ces résultats furent étendus à certaines formes précoces (âge d'apparition de la maladie avant 65 ans) (Pérez-Tur *et al.*, 1995). Dès lors, l'allèle ε4 fut considéré comme le premier facteur de risque de la MA. A l'inverse, l'allèle ε2 aurait un rôle protecteur vis-à-vis de la maladie (Chartier-Harlin *et al.*, 1994). Le mécanisme d'action de l'Apo E reste cependant hypothétique.

Des études *in vitro* ont montré que le variant E4 de l'Apo E a une affinité plus importante pour le peptide Aβ synthétique que le variant E3 (Strittmatter *et al.*, 1993a, b). Néanmoins, ces résultats ne font pas l'unanimité (Ladu *et al.*, 1994; Evans *et al.*, 1995).

III.2.3. LES MARQUEURS DE L'INFLAMMATION

Rappelons qu'un grand nombre de constituants compose les plaques séniles. En effet, plus de 40 protéines non spécifiques de la MA sont présentes dans les dépôts amyloïdes, la majorité est liée à l'inflammation. Ainsi, on trouve des immunoglobulines (Ishii *et al.*, 1975; Eikelenboom *et al.*, 1982); des cytokines (Interleukine 1β ou IL1β); des protéines du complément (C1q, C3d, C3c, C4d, C7, C9 et le complexe d'attaque membranaire C5b-9); des inhibiteurs du complément (telle que la vitronectine, la clusterine ou l'Apo J); des protéines de la phase aiguë secrétées en réponse à une atteinte physiologique (inflammation ou autre) comme l'α1-antichymotrypsine, l'α2-macroglobuline, le composé P amyloïde (retrouvé dans toutes les amyloïdoses); des protéines participant au mécanisme de la formation du caillot sanguin (thrombine, activateur du plasminogène, facteur d'Hageman); des molécules d'adhésion (ICAM-1) et enfin, des facteurs de croissance (bFGF, TGFβ) (Pour revue: McGeer et McGeer, 1995).

Toutes ces molécules sont produites dans le cerveau par les astrocytes ou les cellules microgliales. C'est cette association très importante entre protéines de l'inflammation et lésions de la MA qui nous a conduit à analyser l'hypothèse inflammatoire de la maladie. La recherche de marqueurs de l'inflammation, point sur lequel portent nos travaux, sera développé dans le chapitre VI "Approche immunologique du diagnostic biologique de la MA".

III.3. ALTÉRATION DES NEUROTRANSMETTEURS

D'autres modifications biochimiques cérébrales comme les altérations des systèmes de neurotransmetteurs ont été analysées dans le but d'isoler un marqueur diagnostique de la MA.

Les premières altérations des neurotransmetteurs mises en évidence concernaient le système cholinergique. Mais, rapidement, les recherches ont montré que d'autres systèmes de neurotransmetteurs étaient affectés au cours de la MA, impliquant ainsi de nouvelles populations neuronales dans la pathogénèse de la maladie.

III.3.1. LE DÉFICIT CHOLINERGIQUE

Une perte de neurones cholinergiques correlée avec le nombre de dépôts amyloïdes est constatée dans le cortex temporal et l'hippocampe. Par ailleurs, une baisse de l'activité de l'enzyme de synthèse de l'acétylcholine, la choline acétyltransférase a été observée dans le cortex temporal, l'hippocampe et dans le noyau basal de Meynert (où se trouvent les neurones qui projettent leurs prolongements cholinergiques dans le cortex temporal et l'hippocampe). La présence de DNF et de dépôts amyloïdes dans ces régions cérébrales pourrait expliquer le déficit cholinergique observé.

III.3.2. LE DÉFICIT DES SYSTÈMES MONOAMINERGIQUES

(Signoret et Hauw, 1991)

III.3.2.1. La noradrénaline

Une part importante de l'innervation noradrénergique du système nerveux central (SNC) provient de neurones situés dans le locus coeruleus. Ces neurones assurent en particulier l'innervation noradrénergique du cortex cérébral et de l'hippocampe. Une raréfaction des axones noradrénergiques ainsi que des anomalies des fibres restantes ont été mises en évidence au niveau du cortex et de l'hippocampe. De plus, une baisse de la noradrénaline endogène a été décrite au niveau du cortex et de certaines régions sous-corticales.

III.3.2.2. La dopamine

Des études ont montré que les taux de dopamine et de ses métabolites ne sont pas abaissés dans le cortex ni dans les structures sous-corticales. En revanche, la densité des récepteurs dopaminergiques D1 et D2 semble diminuée.

III.3.2.3. La sérotonine

L'altération des systèmes sérotoninergiques est vraisemblable, au moins dans certains cas de démence de type Alzheimer. Les fibres sérotoninergiques qui innervent le cortex cérébral et l'hippocampe sont issus des noyaux du raphé. Des lésions de type neurofibrillaire ont été observées à ce niveau. Par ailleurs, une baisse du taux de sérotonine et de la densité de récepteurs sérotoninergiques ont été mises en évidence dans le cortex.

III.3.3. LE DÉFICIT DES SYSTÈMES D'AMINO-ACIDES

III.3.3.1. Acide γ-amino-butyrique (GABA)

L'acide γ-amino-butyrique ou GABA est le transmetteur de l'inhibition synaptique dans de nombreuses structures du SNC. Il est présent dans de nombreux interneurones corticaux et hippocampiques. L'ensemble des études suggère qu'il existerait peu de perte de neurones GABAergiques et de récepteurs postsynaptiques mais qu'en revanche les terminaisons des neurones présents seraient, elles, sévèrement affectées.

III.3.3.2. Acide glutamique

Une diminution du taux de glutamate existe dans certaines zones recevant une innervation glutamatergique comme dans la formation hippocampique. Une baisse de la densité des récepteurs de l'acide glutamique a aussi été observée dans le cortex et l'hippocampe. Cependant, ces derniers résultats n'ont pas toujours été retrouvés, cela

pourrait être lié à la sélection des cas étudiés, les anomalies des récepteurs pouvant n'apparaître que tardivement dans l'évolution de la maladie.

III.3.4. LE DÉFICIT DES SYSTÈMES DE NEUROPEPTIDES

III.3.4.1. La somatostatine

Le taux de somatostatine est abaissé dans le cortex de patients atteints de la MA. Cette diminution semble être parfaitement corrélée avec la gravité de la détérioration intellectuelle et la densité des lésions neuropathologiques. Ce déficit est l'une des anomalies importantes de la neurotransmission. Enfin, la densité des récepteurs somatostatinergiques est abaissée dans certaines aires corticales.

III.3.4.2. Autres neuropeptides

- La substance P: Une diminution du taux de substance P a été observée par certains auteurs, en particulier dans le cortex. Elle s'accompagne d'une baisse de la densité des cellules "substance P" positive.

- Le neuropeptide Y (NPY): Certains auteurs ont observé une diminution du taux de NPY ainsi qu'une perte de neurones NPY positifs dans le cortex cérébral.

- Les autres neuropeptides ont été beaucoup moins étudiés.

III.3.5. CONCLUSION

En conclusion, les déficits des neurotransmetteurs observés au cours de la MA apportent des renseignements sur la pathogénèse de la maladie, mais ces déficits difficilement observables, ne peuvent pas être utilisés comme outils diagnostiques.

III.4. ETABLISSEMENT DE CRITÈRES BIOCHIMIQUES

Finalement, c'est l'analyse de la composition biochimique des PS et de la DNF, lésions neuropathologiques non spécifiques de la MA (car retrouvées au cours du vieillissement et dans d'autres pathologies), qui a porté ses fruits.

En effet, ces recherches ont abouti à la mise en évidence de deux marqueurs biochimiques importants: les protéines tau et le peptide Aβ qui sont respectivement les constituants majeurs de la DNF et des PS. Dans le cerveau, il est possible de doser l'un et l'autre très facilement en utilisant des standards de référence (protéines tau recombinantes ou peptide $A\beta_{1-42}$ synthétique). Buée *et al.* (1997a) ont proposé ce type d'approche pour faciliter le diagnostic *post-mortem* de la MA et établir les critères biochimiques (CEBDAD). En effet, après le dosage de l'Aβ dans une population formée de 30 "Alzheimer" et de 39 "témoins", ils ont établi un seuil à 30 pmoles d'Aβ/mg de cortex qui permet de distinguer les "Alzheimer" des "témoins". Parallèlement, ils ont analysé les protéines tau hyperphosphorylées de cette population par la technique des immuno-empreintes avec des anticorps anti-tau dépendants de la phosphorylation (Buée-Scherrer *et al.*, 1996a) et ont défini un profil particulier de protéines tau hyperphosphorylées qui consiste en un triplet appelé tau 55, 64 et 69. Chez les patients présentant une dégénérescence très sévère, une quatrième composante est présente à 74 kDa (Sergeant *et al.*, 1997). Ils ont également montré que dans des pathologies comme les syndromes de l'île de Guam et du Parkinson post-encéphalitique qui sont caractérisées par un triplet de protéines tau hyperphosphorylées, la quantité d'Aß n'atteint jamais le seuil critique de 30 pmoles/mg de cortex. A partir de ces données, ils ont finalement établi les critères biochimiques du CEBDAD qui sont donc de nouveaux critères diagnostiques de la MA. Ces critères associent à la fois une quantité déterminée de peptide Aβ et un profil électrophorétique particulier des protéines tau dans les aires polymodales associatives. Ils permettent de poser le diagnostic *post-mortem* de la MA avec une sensibilité et une spécificité proche de 100%. Les critères du CEBDAD représentent

donc par leur simplicité, un atout majeur dans le diagnostic *post-mortem* de certitude de la maladie.

III.4. CONCLUSION

La présence de ces marqueurs (protéines tau et peptide Aβ) mais aussi celle d'autres marqueurs biochimiques comme les co-facteurs de l'amyloïdogénèse, les marqueurs de l'inflammation ou les déficits de neurotransmetteurs au niveau du cerveau, a permis de suspecter leur présence dans le LCR (en relation étroite avec le parenchyme cérébral par l'intermédiaire de la barrière hémato-encéphalique) et dans le sang. Ces liquides périphériques sont en effet plus facile d'accés, du vivant du patient, pour la mise au point d'un test diagnostique précoce de la MA (voir chapitre V et VI).

Enfin, la biochimie des PS et de la DNF a permis d'isoler des marqueurs génétiques de la MA (tels que l'APP et l'Apo-E), ce qui a relancé la recherche de marqueurs génétiques de la MA.

IV. DIAGNOSTIC GENETIQUE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

A l'heure actuelle, toutes les causes de MA ne sont pas encore connues. Seules certaines formes de la maladie peuvent être expliquées par des facteurs génétiques.

Bien que la majorité des cas de MA soient sporadiques, plusieurs arguments militent en faveur d'une implication de facteurs génétiques dans les formes familiales (antécédents familiaux) selon Folstein (1989).

Parmi ces facteurs génétiques il faut distinguer d'une part, les facteurs de risques génétiques, comme l'allèle ε4 de l'Apo-E (sur le chromosome 19) et plus récemment le chromosome 3 et d'autre part, les mutations génétiques à transmission autosomique dominante (mendélienne) comme les mutations sur les chromosomes 21, 14, 1 et dernièrement le chromosome 12.

IV.1. LES FACTEURS DE RISQUES

IV.1.1. LE CHROMOSOME 19

Des études génétiques ont montré qu'il existe une association entre certaines formes tardives de la MA et le chromosome 19 (Pericak-Vance *et al.*, 1991). Le gène de l'ApoE se situe sur le chromosome 19. L'allèle ε4 de l'apolipoprotéine E est un facteur de risque de la MA. En effet, sa fréquence est plus élevée dans les formes tardives et précoces de la MA, qu'elle soit familiale ou sporadique. Le risque de développer une MA est augmenté de 3 à 6 fois pour les porteurs de l'allèle ε4, et de 6 à 12 fois pour les porteurs de deux allèles ε4 (pour revue, Chartier-Harlin et Pérez-Tur, 1995). Par contre, une baisse de la fréquence de

l'allèle ε2 est observée chez les malades, ce qui suggère que l'allèle ε2 jouerait un rôle neuroprotecteur (Corder *et al.*, 1994).

IV.1.2. CHROMOSOME 3

Une équipe britannique (Smith *et al.*, 1997) a mis en évidence, très récemment, sur le chromosome 3 un nouveau gène prédisposant à la MA: l'allèle K du butyrylcholinesterase (BCHE-K). Ce gène aurait une action synergique en présence de l'allèle ε4 de l'Apo-E, augmentant ainsi le risque de contracter la MA.

IV.2. FORMES FAMILIALES AUTOSOMIQUES DOMINANTES

L'analyse de plusieurs centaines de familles a apporté une information importante en montrant que dans une minorité des cas (environ 1000 cas estimés en France), la MA obéit à un déterminisme mendélien et que ce sous-groupe se caractérise par une transmission autosomique dominante avec une pénétrance complète avant 60 ans (Frebourg *et al.*, 1997). Cependant, les études de liaison génétique ont rapidement mis en évidence l'hétérogénéité génétique, au sein de ces formes autosomiques dominantes de la maladie, suggérant ainsi l'implication de plusieurs gènes.

IV.2.1. LE CHROMOSOME 21

Dans la trisomie 21, on observe le même type de lésions cérébrales qu'au cours de la MA. L'expression de l'ARN messager de l'APP est augmentée. Ces résultats ont orienté les premières études génétiques sur le chromosome 21.

Des mutations sur les codons 717, 670 et 671 du gène de l'APP ont été identifiées dans certaines formes familiales à début précoce (Goate *et al.*, 1991; Murrell *et al.*, 1991; Chartier-Harlin *et al.*, 1991; Mullan *et al.*, 1992). Elles ne sont jamais observées dans la population normale.

D'autres mutations non spécifiques aux codons 692 et 693 ont aussi été retrouvées.

Les mutations spécifiques des formes familiales précoces (717, 670, 671) sont situées de part et d'autre de la séquence du peptide Aβ. La mutation 717 modifierait le clivage du peptide Aβ et conduirait à la formation d'un peptide plus long (42 à 43 acides aminés). L'ajout de ces acides aminés provoque une augmentation de l'hydrophobie et de l'insolubilité du peptide. Cela expliquerait l'agrégation du peptide à faible concentration (Tamaoka *et al.*, 1994).

Les deux autres mutations 670, 671 favorisent le clivage β secrétase et augmentent ainsi la concentration du peptide Aβ libéré, facilitant là aussi son agrégation (Citron *et al.*, 1992)

Ainsi, l'accumulation du peptide Aβ dans ces trois cas de mutations induirait la DNF.

IV.2.2. LE CHROMOSOME 14

Avant même d'isoler le gène responsable, une liaison génétique entre une région du chromosome 14 et des formes familiales à début précoce (autres que celles liées au gène de l'APP) a été mise en évidence (Schellenberg *et al.*, 1992).

Un gène codant pour une protéine appelée préséniline 1 (PS1 ou S182) formée de 7 domaines transmembranaires et de rôle inconnu a été identifié (Sherrington *et al.*, 1995). A l'heure actuelle, 24 mutations différentes ont été mises en évidence sur ce gène.

Il semblerait que les fibroblastes des malades porteurs d'une mutation de PS1 secrètent préférentiellement les dérivés plus longs de l'Aβ favorisant ainsi son agrégation (Scheuner, 1995).

IV.2.3. LE CHROMOSOME 1

Le gène de la préséniline 2 (PS2) est lui aussi impliqué dans des formes familiales de la MA à début précoce. Ce gène présente 67% d'homologie avec le gène PS1. Deux mutations sur le gène PS2 ont été trouvées chez 7 familles d'origine germanique et une famille d'origine italienne (Levy-Lahad *et al.*, 1995; Sorbi *et al.*, 1995).

IV.2.4. LE CHROMOSOME 12

Pericak-Vance *et al.* (1997) ont mis en évidence un nouveau gène situé sur le chromosome 12. Ce gène serait impliqué dans la MA, en particulier chez les sujets de plus de 65 ans (formes familiales à début tardif). Comme l'Apo-E, il présenterait plusieurs isoformes. Cependant, des investigations complémentaires sont nécessaires pour identifier le gène impliqué.

IV.3. CONCLUSION

Des études épidémiologiques ont démontré que les formes familiales de la MA représentent 10 à 40% des cas (pour revue, voir Van Broeckhoven, 1995).

L'ensemble des facteurs génétiques présentés dans ce chapitre n'explique donc pas la totalité des cas de MA, ceci suggère l'existence d'autres liaisons génétiques et de nouveaux gènes candidats.

Finalement, le diagnostic génétique ne peut être utilisé que pour une infime partie des patients atteints de la MA.

V. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

Des recherches de plus en plus nombreuses tendent à identifier un marqueur de la MA dans un tissu qui ne soit pas cérébral, et dont le prélèvement soit le moins invasif possible. Le sang et le LCR sont évidemment les candidats idéaux pour établir un diagnostic *ante-mortem* de la MA. De nombreux travaux ont tenté d'y identifier des marqueurs périphériques permettant, du vivant du patient, un diagnostic précoce de la MA.

V.1. MARQUEURS EN RAPPORT AVEC LA DÉGÉNÉRESCENCE NEUROFIBRILLAIRE

V.1.1. UBIQUITINE

Certains antigènes présents au sein des PHF comme l'ubiquitine (Mori *et al.*, 1987) sont retrouvés dans le LCR en quantité plus élevée lors de la MA (Wang *et al.*, 1991; Kudo *et al.*, 1994). Malheureusement, par leur caractère ubiquitaire, le dosage de ces protéines ne montre que des différences quantitatives peu spécifiques (Manaka *et al.*, 1992).

V.1.2. NTP

Récemment, une protéine de 21 kDa, nommée " *neuronal thread protein* " (NTP) et surexprimée dans les homogénats de cerveaux de patients atteints de la MA, a été détectée en quantité plus importante dans le LCR des malades (Delamonte *et al.*, 1992; Chong *et al.*, 1992). L'origine et les propriétés biochimiques de cette protéine ne sont encore que partiellement connues (Blennow *et al.*, 1995).

V.1.3. PROTÉINES TAU

De nombreuses études visant à doser les protéines tau dans le sérum et le LCR ont été réalisées. Dans le sérum, le dosage des protéines tau jusqu'en 1995 semblait totalement inexploitable (Blennow *et al.*, 1995). Mais très récemment, Ingelson *et al.* (1997) ont mis en évidence la présence de protéines tau dans le sérum humain en quantité suffisante pour être détectées par ELISA. Ces auteurs suggèrent d'identifier les différentes isoformes sériques dans le but de mettre au point un test diagnostique de la MA.

Dans le LCR, les différents résultats présentés dans la littérature tendent à montrer une augmentation significative de la concentration des protéines tau dans le LCR de patients atteints de la MA. Néanmoins, les valeurs fournies varient selon les tests développés et l'on obtient souvent un chevauchement important entre la concentration de protéines tau présente dans le LCR de sujets " Alzheimer " et celle présente dans le LCR de sujets atteints d'autres maladies neurodégénératives.

V.2. MARQUEURS EN RAPPORT AVEC LES DÉPÔTS AMYLOÏDES

V.2.1. APP

Depuis les travaux de Palmert *et al.* (1989) qui démontrent la présence de formes solubles d'APP dans le LCR, de nombreux auteurs se sont intéressés au dosage de l'APP. Ces travaux ont montré une diminution significative des 3 isoformes d'APP (variants à 695, 751 et 770 résidus d'acides aminés) chez les patients " Alzheimer " par rapport aux sujets témoins avec néanmoins un chevauchement très important. De plus, cette diminution ne semble pas spécifique puisque Prior *et al.* (1991) la retrouvent dans des cas de démences par infarctus multiples. Par la suite, Lannfelt *et al.* (1995) ont mis en évidence, chez les membres d'une famille d'origine suédoise présentant la double mutation aux codons

670/671, un faible taux d'APP soluble comparativement aux sujets ne présentant pas cette mutation.

Dans le plasma, les dosages des produits de clivages de l'APP (Bush *et al.,* 1990) montrent une augmentation des produits de haut poids moléculaire et une diminution de ceux de faible poids (Bush *et al.,* 1991; 1992). Cette technique séduisante nécessite malheureusement une manipulation du LCR comprenant par exemple une chromatographie d'affinité ou une immunoprécipitation, ce qui la rend difficilement applicable en pratique clinique courante.

V.2.2. Aβ

Des études de dosage du peptide ß amyloïde dans le LCR n'ont apporté que des résultats contradictoires et peu convaincants (Pour revue: Southwick *et al.*, 1996). Cependant, depuis peu le dosage a porté sélectivement sur les formes 1-40 et 1-42 du peptide Aß. Il a été suggéré que les formes 1-42 seraient diminuées dans le LCR au cours de la MA alors que les formes 1-40 ne seraient que peu ou pas affectées (Motter *et al,* 1995; Kanai *et al,* 1996).

Dans le plasma, le dosage de la protéine Aß (Tamaoka *et al.*, 1996), ne montre pas de différence significative entre les " Alzheimer " sporadiques, les patients avec une atteinte neurologique sans démence, et les témoins.

V.2.3. Aβ-TAU

Seubert *et al.* (1996) ont proposé un co-dosage Tau-Aß qui a permis d'améliorer la sensibilité du test mais sa spécificité reste faible.

V.2.4. APO-E

Enfin, l'Apo-E définie comme facteur de risque de la MA, a aussi fait l'objet d'analyses quantitatives dans le LCR mais les résultats sont assez contradictoires; Carlsson *et al.*, (1991) ne trouvent pas de variation significative de la quantité d'Apo-E dans le LCR, alors que Blennow *et al.* (1994) décrivent une diminution de cette concentration chez les malades.

V.2.5. LES MARQUEURS DE L'INFLAMMATION

Notre travail de thèse portant essentiellement sur les marqueurs de l'inflammation (en particulier les auto-anticorps), nous avons préféré consacrer un chapitre complet pour développer cet aspect (chapitre VI "Approche immunologique du diagnostic biologique de la MA").

V.3. MARQUEURS EN RAPPORT AVEC DES DÉFICITS NEUROCHIMIQUES

Certains travaux dont ceux de Hardy *et al.* (1985) et de Reinikainen *et al.* (1990) montrent une atteinte de plusieurs neurotransmetteurs incluant les systèmes cholinergiques (acétylcholinestérase, choline acétyltransférase, butyrylcholinesterase); dopaminergiques, sérotoninergiques et neuropeptidergiques. Ces observations ont conduit à l'analyse dans le LCR des modifications des différents métabolites impliqués dans ces systèmes neurochimiques (Hartikainen *et al.*, 1992). Cependant, aucun de ces dosages n'a permis la mise au point d'un test diagnostique fiable.

En 1994, une équipe américaine a mis au point un test basé sur la dilatation de la pupille en présence d'un antagoniste des récepteurs cholinergiques: *le tropicamide* (Scinto *et al.*, 1994). Ce test est simple, non agressif, sans effet secondaire et sensible. Mais, d'autres auteurs ont montré qu'il manquait de spécificité (Treloar *et al.*, 1996; Fitzsimon *et al.*, 1997). Ce type de test peu onéreux est malheureusement trop peu spécifique; il ne peut donc pas être utilisé comme outil diagnostique pour la MA.

V.4. AUTRES MARQUEURS

Des protéases et des anti-protéases, principalement *l'α 1-antichymotrypsine* (Matsubara *et al.*, 1990) *les métaux* (aluminium, zinc), *la mélanotransferrine ou P97* (Kennard *et al.*, 1996), *la glutamine synthetase, la GFAP,* et bien d'autres marqueurs ont été analysés, sans succés, dans le LCR ou dans le sang.

V.5. CONCLUSION

Finalement, toutes ces études renseignent essentiellement sur la pathogénèse de la MA et rendent compte de son hétérogénéité. Toutefois, à cause d'une faible spécificité (discrimination entre MA et autres pathologies neurodégénératives) et/ou de leur complexité, ces résultats sont peu utiles pour l'élaboration d'un test diagnostique applicable en pratique quotidienne.

VI. APPROCHE IMMUNOLOGIQUE DU DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

La recherche de marqueurs spécifiques de la MA s'est aussi orientée vers l'aspect immunologique de la maladie.

En effet, le système immunitaire a souvent été impliqué dans la pathogénèse de la MA. Diverses anomalies immunologiques sont fréquemment rencontrées chez les sujets atteints de la MA: en particulier, la fréquence accrue d'auto-anticorps circulants; la présence de nombreux marqueurs de l'inflammation dans le sang, le LCR et le cerveau ainsi qu'une anomalie de répartition des sous-populations lymphocytaires. Il nous a paru indispensable d'approfondir cette orientation immunologique qui selon nous est la plus intéressante mais aussi la plus floue.

VI.1. LE SYSTÈME IMMUNITAIRE ET LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Avant de développer les mécanismes immunitaires du système nerveux central (SNC), nécessaire à la compréhension du mécanisme immunologique de la MA, il nous a paru important de faire un rappel sur la structure et le fonctionnement des principaux acteurs, en particulier la barrière hémato-encéphalique (BHE), le système immunitaire périphérique et la microglie (cellules immunitaires du cerveau). La majorité des données d'anatomie est tirée de l'Atlas d'Anatomie du système nerveux et des organes des sens de Kahle *et al.* (1995).

VI.1.1. LA BARRIÈRE HÉMATO-ENCÉPHALIQUE

Le système nerveux central (cerveau et moelle épinière) est protégé de toutes parts par des parois osseuses ainsi que par l'effet d'un liquide: le liquide cérébrospinal ou liquide céphalo-rachidien (LCR).

La paroi des capillaires cérébraux est formée de cellules endothéliales qui se chevauchent à leur zone de contact comme les tuiles d'un toit. L'ensemble est entouré par une membrane basale et par un revêtement formé de prolongements cytoplasmiques astrocytaires (cellules astrocytaires de forme étoilée).

La membrane basale et le revêtement astrocytaire isole le SNC des vaisseaux sanguins qui l'entourent. L'isolement du tissu cérébral par rapport au reste du corps se manifeste par la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette barrière sélective empêche de nombreuses substances de passer du courant sanguin dans le tissu cérébral à travers la paroi capillaire.

Cette BHE a été mise en évidence la première fois par Goldmann au moyen de bleu de trypan. En injectant par voie intraveineuse le colorant à un animal de laboratoire, on observe une coloration bleue dans presque tous les organes. Seuls le cerveau et la moelle épinière restent blancs (les plexus choroïdes et la dure mère sont colorés). Par contre, l'injection de colorant dans le LCR entraîne une coloration superficielle du cerveau et de la moelle épinière alors que le reste du corps demeure non coloré. Il existe, par conséquent, une barrière entre le sang et le cerveau et qui n'existe pas entre le LCR et le cerveau.

La barrière cerveau/sang peut être complète lorsqu'elle empêche le passage d'une substance ou incomplète lorsqu'elle le ralentit seulement.

La perméabilité ou la non-perméabilité de la BHE aux médicaments est d'une grande importance pratique.

De nombreux auteurs ont mis en évidence la présence d'altérations de la BHE au cours du vieillissement et de la MA (Wisniewski and Kozlowski, 1982; Scheibel *et al.*, 1986, Buée *et al.*, 1997b). Lors du vieillissement, de faibles changements sont observés alors qu'au cours de la MA les altérations sont beaucoup plus sévères. Ces modifications seraient

à l'origine d'une véritable rupture de la BHE accentuant ainsi le rôle éventuellement toxique de certaines substances telles que l'aluminium (Pullen *et al.*., 1990) ou le peptide amyloïde (Selkoe, 1994). Elles faciliteraient également le passage d'auto-anticorps anti-neurones (Fillit *et al.*, 1988).

VI.1.2. LE SYSTÈME IMMUNITAIRE PÉRIPHÉRIQUE ET LE CERVEAU

Le système immunitaire a pour fonction de protéger l'organisme des lésions causées par l'invasion de micro-organismes (bactéries, virus, champignons et parasites). Chaque individu développe normalement des mécanismes complexes pour distinguer le "soi" du "non-soi" (les antigènes étrangers des auto-antigènes) afin d'éviter les inconvénients d'une auto-immunité.

Pour bien comprendre comment une réaction auto-immune peut émerger, il est nécessaire de décrire les mécanismes par lesquels la tolérance du "soi" est normalement maintenue. Ces mécanismes sont au nombre de 5:

1- La séquestration des antigènes du soi dans des sites inaccessibles au système immunitaire. C'est le cas du SNC qui est séparé du système vasculaire par la BHE.

2- L'apoptose (ou mort cellulaire programmée) des cellules T autoréactives pendant le développement intrathymique.

3- L'incapacité à apprêter ou à présenter les molécules "du soi".

4- L'inhibition des cellules T autoréactives grâce à l'intervention de cytokines spécifiques.

5- La présence de cellules ou d'hormones suppressives (par exemple: les glucocorticoïdes).

La défaillance de n'importe lequel de ces mécanismes peut conduire à l'auto-immunité.

Dans le cas du cerveau, c'est la BHE qui empêche le passage de cellules du système immunitaire périphérique (mécanisme n°1: séquestration des antigènes du soi). Car ces

cellules sont capables de dégrader et de tuer les neurones, ce qui serait irréparable au niveau du cerveau où les cellules sont incapables de se reproduire.

Outre ce mécanisme de protection du cerveau vis-à-vis du système immunitaire, des auteurs (Hart and Fabry, 1995), ont proposé un contrôle spécifique des cellules immunitaires susceptibles d'être présentes dans le cerveau (lymphocytes T, lymphocytes B). De plus, les cellules microgliales (dont nous développerons le rôle dans le paragraphe suivant) qui sont considérées comme les macrophages du SNC sont constamment contrôlées. Les mécanismes de contrôle des cellules immunitaires du SNC (lymphocytes T, lymphocytes B, cellules microgliales) sont mal connus, mais tous les modes de contrôle proposés précédemment (incapacité à présenter ou apprêter les molécules du soi, inhibition des cellules T autoréactives par des cytokines, présence d'hormones ou de cellules suppressives) peuvent être suspectés.

Nous pouvons supposer que face à la difficulté d'utiliser le système immunitaire périphérique à cause de la BHE, le SNC a "développé" son propre système immunitaire.

VI.1.3. LA MICROGLIE: CELLULES IMMUNITAIRES DU CERVEAU.

Le système immunitaire du cerveau est très complexe et de nombreux points restent à éclaircir. Le tissu de soutien et d'enveloppement du SNC est la névroglie qui assume les fonctions du tissu conjonctif (soutien, échange, et lors de processus pathologiques: résorption et formation de cicatrices).

La névroglie est constituée de trois types cellulaires: les astrocytes, (cellules de forme étoilée constituées de prolongements cytoplasmiques qui composent la BHE, éléments de soutien et producteur de fibres gliales), les oligodentrocytes (formateurs de la gaine de myéline entourant les axones) et les cellules microgliales qui seraient capables de se déplacer dans le tissu cérébral entre les prolongements astrocytaires. Ces dernières forment un réseau

de défense au niveau du cerveau et sont suspectées d'avoir un rôle immunologique (rôle de macrophages; Kreutzberg, 1996). Parfois, la microglie perd ses caractères initiaux et peut causer des dégâts comme dans la maladie d'Alzheimer et d'autres maladies neurodégénératives (Maladie de Parkinson, de Huntington, paralysie supra-nucléaire progressive (PSP), sclérose latérale amyotrophique (SLA), ...).

Lors d'une destruction de tissu nerveux, les cellules microgliales réagissent très rapidement, elles rétractent leurs prolongements cytoplasmiques, prennent une forme arrondie (cellules microgliales amiboïdes) et se déplacent pour se rendre au site de dégénérescence et phagocyter les neurones morts et les débris cellulaires.

Outre ce rôle de macrophage, les cellules microgliales produisent des facteurs de croissance tels que le NGF (Nerve Growth Factor) pour "réparer" les neurones endommagés et expriment des antigènes de surface du système immunitaire (complexe majeur d'histocompatibilité de classe II) qui leur permettent d'avoir un rôle de cellule présentatrice d'antigène.

Le dernier rôle des cellules microgliales est la dégradation des cellules nerveuses environnantes par la libération de substances toxiques (interleukines, cytokines) à forte dose. La libération excessive de ce type de substance peut être induite par un produit bactérien: anion superoxyde et peroxyde d'hydrogène. Le SNC est en contact très étroit avec la microglie, l'obligeant ainsi à garder une sécrétion minimale de ces substances toxiques. De nombreux auteurs suggèrent que lors d'une maladie neurodégénérative, ce lien très étroit est perdu à cause des dégâts provoqués par la microglie ou parce que la maladie modifie le comportement normal des cellules microgliales: augmentation de la sécretion de cytokines, d'interleukines, etc.

Enfin, la microglie modifie ses comportements avec l'âge: augmentation de la présentation des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité et disparition de

l'inhibition normale de la microglie. Cette "perte de contrôle" provoquerait la destruction neuronale et contribuerait ainsi au déclin cognitif et à la sénilité (Streit *et al.*, 1995).

Si la microglie est l'acteur principal dans les maladies neurodégénératives, il est possible d'empêcher leur évolution en inhibant spécifiquement la microglie ou en bloquant l'activité de ses molécules co-stimulatrices (telles que les cytokines). Les recherches vont dans ce sens, en particulier des études montrent que l'utilisation d'anti-inflammatoires est capable d'inhiber la microglie (Rogers *et al.*, 1994; Aisen *et al.*, 1994; Andersen *et al.*, 1995; Breitner *et al.*,1995; 1996a; 1996b).

Il y a dix ans, les chercheurs niaient l'existence de la microglie. Il y a cinq ans, beaucoup de scientifiques rejetaient l'hypothèse selon laquelle la microglie pouvait être le principal acteur dans la MA et d'autres maladies neurodégénératives. Aujourd'hui, le septicisme a disparu et l'on pense que la microglie est l'une des principales cibles pour l'application de nouvelles thérapeutiques.

VI.1.4 . LA PRÉSENTATION D'ANTIGÈNES DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL

La présence d'auto-anticorps dirigés contre des antigènes cérébraux dans le sérum de sujets âgés et de sujets atteints de la MA suggère la libération ou la présentation de ces antigènes cérébraux au système immunitaire périphérique ou central.

Pour pouvoir présenter des antigènes, les cellules présentatrices d'antigènes (ou CPA) doivent exprimer le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (ou CMH II).

On distingue deux sortes de CPA: les CPA "professionnelles" (cellules microgliales et lymphocytes B) qui expriment de manière constitutive le CMH II et les CPA "non-professionnelles" (astrocytes, oligodendrocytes, neurones) qui expriment le CMH II suite à une activation par des cytokines comme l'interféron-gamma (IFN-γ). Pendant l'inflammation, de nombreuses cellules deviennent capables de présenter des antigènes du SNC. L'antigène est présenté aux lymphocytes T par la CPA. Une fois activés, les

lymphocytes T deviennent effecteurs et recrutent des cellules T effectrices (cytotoxiques) ou des lymphocytes B producteurs d'anticorps. Cette production d'anticorps anti-antigènes cérébraux a lieu à l'extérieur du cerveau.

Le problème se pose surtout au niveau de la présentation de l'antigène.

Hart et Fabry en 1995 ont proposé 3 modèles de présentation des antigènes cérébraux:

1 - Les antigènes sont présentés aux lymphocytes T dans le SNC.

2 - La présentation d'antigènes a lieu hors du SNC.

3 - La présentation d'antigènes a lieu au niveau de la BHE.

VI.1.4.1. Présentation dans le SNC

Les astrocytes et les cellules microgliales sont les deux meilleurs candidats pour le rôle de CPA.

En effet, les astrocytes sont capables de présenter des antigènes et de phagocyter *in vitro*, même s'ils n'expriment pas le CMH II de manière constitutive. Par contre, ils sont incapables d'induire la multiplication des cellules *in vitro* (Weber *et al.*, 1994). La majorité des arguments montrent que les astrocytes ne sont pas des CPA *in vivo*. Cependant, un rôle de CPA "non professionnelles" n'est pas à exclure.

Les cellules microgliales expriment le CMH II de manière constitutive et synthétisent des molécules co-stimulatrices (cytokines ou molécules d'adhésion) *in vitro*. Elles ont donc la capacité de stimuler les lymphocytes T *in vitro*. Ces expériences suggèrent qu'une telle activation pourrait avoir lieu dans le cerveau. Il reste cependant à prouver que ce type d'interaction ait bien lieu *in vivo*.

VI.1.4.2. Présentation hors du SNC

Cette hypothèse se base sur la récente mise en évidence d'un important réseau lymphatique dans le cerveau (Cserr *et al.*, 1992). L'injection de protéines dans le LCR induit la production d'anticorps que l'on retrouve dans les ganglions lymphatiques cervicaux. Ceci

montre que l'introduction intrathécale d'antigènes peut être immunogène (Harling-Berg *et al.*, 1989) et suggère donc le passage de protéines cérébrales dans le réseau lymphatique.

VI.1.4.3. Présentation au niveau de la BHE

Le rôle principal de la BHE est d'isoler la circulation sanguine du cerveau. Cependant, les cellules endothéliales formant la BHE expriment les mêmes molécules d'adhésion pour les leucocytes que n'importe quel autre endothélium. Selon Hart et Fabry (1995), les cellules endothéliales utiliseraient ces molécules pour faire entrer les cellules sanguines dans le SNC.

Les cellules endothéliales de la BHE sont de potentielles CPA car elles expriment de manière non-constitutive le CMH II et synthétisent *in vivo* comme *in vitro* des molécules co-stimulatrices nécessaires à la liaison des lymphocytes T. Elles ont une position stratégique puisqu'elles sont les premières rencontrées par les lymphocytes T activés susceptibles d'entrer dans le SNC.

Hart et Fabry proposent ici encore deux possibilités:

1 - les cellules endothéliales recruteraient les lymphocytes T et B grâce à une activation spécifique (étape nécessaire à leur admission dans le cerveau). Cette hypothèse est en accord avec le fait que des lymphocytes T activés contre le SNC injectés par voie intraveineuse deviennent effecteurs dans le cerveau alors que lorsqu'ils sont injectés directement dans le SNC, ils restent inactifs. Il y aurait donc dans le cerveau un mécanisme qui empêcherait les lymphocytes T intrinsèques de devenir cytotoxiques.

En cas de nécessité (inflammation), les cellules endothéliales selectionneraient des lymphocytes T provenant de la circulation sanguine pour entrer et agir dans le cerveau.

Ces données sont en contradiction avec les travaux d'Eikelenboom *et al.* qui ont mis en évidence que les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins ne montrent pas d'expression accrue des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1) qui sont impliquées dans l'adhésion et la migration des leucocytes (Eikelenboom *et al.*, 1991). Ces observations

indiquent qu'il n'existe aucun influx de cellules d'origine sanguine dans les cerveaux de sujets atteints de la MA.

2 - Les cellules endothéliales pourraient fournir des antigènes cérébraux et d'autres co-facteurs aux cellules de la BHE avec lesquelles elles sont en contact (macrophages circulants, cellules musculaires lisses, astrocytes, péricytes). Ces dernières activeraient les lymphocytes T circulants. Ce mécanisme de présentation d'antigènes serait une "barrière" pour le trafic des lymphocytes T activés dans le SNC.

A l'heure actuelle, les trois modèles de présentation d'antigènes sont encore valides. Aucune étude n'a permis de valider avec certitude l'une de ces hypothèses.

VI.2. LA RÉPONSE AUTO-IMMUNE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

Parmi toutes les hypothèses visant à expliquer le processus d'apparition et de développement de la maladie d'Alzheimer (MA), celle qui nous a paru la plus intéressante concerne le rôle d'un processus auto-immun.

Depuis un peu moins de 20 ans, de nombreuses études éparses ont apporté une multitude de données suggérant l'implication d'auto-anticorps dans la pathogénèse de la maladie.

Dans ce chapitre, nous avons établi le bilan de tous les auto-anticorps mis en évidence au cours du vieillissement et de la MA. Cette synthèse permettra d'isoler les éventuels auto-anticorps spécifiques de la MA.

L'âge étant l'unique facteur de risque incontestable de la MA, il nous a paru indispensable de comparer la réponse auto-immune de la MA à celle du vieillissement.

VI.2.1. LES AUTO-ANTICORPS PRODUITS AU COURS DU VIEILLISSEMENT

Il est admis depuis longtemps que le système immunitaire se dégrade progressivement avec l'âge. Les cellules immunitaires les plus touchées sont essentiellement les lymphocytes T, mais aussi les lymphocytes B qui en particulier produisent beaucoup plus d'auto-anticorps. On observe en effet au cours du vieillissement l'apparition d'un mécanisme de régulation immunitaire non spécifique: la réponse immunitaire vis-à-vis des antigènes du "non-soi" (antigènes étrangers) diminue alors que celle dirigée contre les antigènes du "soi" augmente. Ces anticorps anti-antigènes du "soi" (ou auto-anticorps) sont dirigés contre des antigènes appartenant aux organes ou tissus périphériques mais aussi au SNC. Les altérations de la BHE apparaissant au cours du vieillissement faciliteraient la production d'auto-anticorps anti-protéines cérébrales.

VI.2.1.1. Les auto-anticorps dirigés contre les éléments du SNC

1/ Les auto-anticorps anti-neurofilaments (anti-NF)

Chaque individu produit des anticorps dirigés contre ses propres tissus. En particulier, en 1983 Elizan *et al.* ont montré que des sujets sains âgés de 5 ans à 29 ans produisent des anticorps dirigés contre les neurofilaments. Ces anticorps sont aussi retrouvés dans le sérum de sujets très jeunes (moins de 5 ans) mais rarement au cours de la première année de la vie. Cette production augmente avec l'âge. Ces résultats ont ensuite souvent été confirmés.

Stefansson *et al.* (1985) ainsi que Toh *et al.* (1985) ont mis en évidence la présence d'auto-anticorps dirigés contre le triplet de neurofilaments (NF-H, NF-L, NF-M) dans le sérum de sujets âgés de 20 à 80 ans. De plus, Soussan *et al.* (1994) ont été les seuls à mettre en évidence une différence significative entre la quantité d'anti-NF-H produite par des sujets de 40 à 59 ans et celle produite par des sujets âgés de 70 à 79 ans. La concentration sérique d'auto-anticorps anti-NF augmente avec l'âge.

En résumé, la production d'auto-anticorps dirigés contre le triplet de NF apparaît donc dès le plus jeune âge (1 an), augmente progressivement au cours de la vie, et comme nous le verrons dans le chapitre suivant, s'intensifie dans le cas de démences neurodégénératives telle que la MA.

Cette évolution peut s'expliquer par la libération croissante d'antigènes comme les NF lors de la dégénérescence neuronale (observée au cours du vieillissement et de la MA) à travers les altérations de la BHE.

2/ Les auto-anticorps anti-GFAP

Des anticorps dirigés contre la GFAP ("Glial Fibrillary Acidic Protein") sont produits au cours du vieillissement. Selon Mecocci *et al.* (1992; 1995) cette production augmente en fonction de l'âge.

Une gliose croissante au cours du vieillissement et de la MA ainsi que l'altération grandissante de la BHE facilitant la libération des produits de gliose, seraient à l'origine de la production de ces auto-anticorps.

3/ Les auto-anticorps anti-bande 3 ou antigène cellulaire de sénescence

Un antigène cellulaire de la sénescence (ACS) est généré par la modification (oxydation) d'une molécule impliquée dans le transport d'anions membranaire: la protéine "bande 3" (Kay, 1991). Cette protéine ubiquitaire de 95 kilo-Daltons (deux sous-unités de 50 et 55 kDa) est présente dans les membranes plasmiques de différents types cellulaires et tissulaires, mais aussi dans les membranes nucléaires, golgiennes et mitochondriales. Elle joue un rôle dans la structure du cytosquelette en liant l'ankyrine (bande 2.1) et dans le transport d'anions à travers la membrane des globules rouges.

Cet antigène généralement retrouvé dans les membranes des érythrocytes, est aussi présent dans celles des cellules cérébrales. La protéine bande 3 du cerveau joue les mêmes rôles que celle présente dans les érythrocytes; transporteur d'anions, liaison à l'ankyrine, production d'ACS.

Elle génère donc après oxydation des antigènes du vieillissement à la surface des cellules cérébrales. Ainsi, ces ACS marquent les cellules qui seront éliminées suite à la synthèse et à la liaison d'auto-anticorps spécifiques (réponse auto-immune) (Kay *et al.*, 1994).

Tout individu possède des auto-anticorps dirigés contre les ACS (Marchalonis *et al*, 1993). Des auto-anticorps anti-ACS sont donc produits au cours du vieillissement et leur concentration sérique semble augmenter avec l'âge (Kay *et al.*, 1994; 1995).

Outre son rôle dans l'élimination des cellules "âgées" et endommagées, l'ACS présent dans les cellules microgliales localisées au sein des plaques séniles et dans les neurones en dégénérescence neurofibrillaire de la MA, serait impliqué dans l'élimination des cellules neuronales malades.

Nous verrons dans le paragraphe VI-2-2 ("Auto-anticorps produits au cours de la MA") que l'augmentation de la quantité d'auto-anticorps anti-ACS est accentuée avec l'apparition de la MA (Kay *et al.*, 1995; Cover *et al.*, 1996).

4/ Les auto-anticorps dirigés contre une protéine de 240 kDa (anti-P240)

Peltola *et al.* (1996) ont mis en évidence par immuno-empreintes la présence d'auto-anticorps (Immunoglobuline G et M ou IgG et IgM) dirigés contre une protéine cérébrale foetale dans le sérum de personnes saines âgées de 15 à 56 ans et dans le sérum provenant du cordon ombilical de nouveaux-nés.

Cet antigène est spécifique du cerveau foetal et n'a pu être détecté dans le cerveau adulte ni dans d'autres tissus comme la peau, le muscle, la thyroide, les reins ou le pancréas.

Le rôle et l'origine de ces auto-anticorps dans la circulation sanguine ne sont pas encore connus.

5/ Les auto-anticorps anti-cellules de l'hippocampe

Des auto-anticorps dirigés contre les cellules de l'hippocampe ont été détectés dans le LCR de sujets sains jeunes et âgés (Loeffler *et al.*, 1997). Ces auto-anticorps seraient

TABLEAU 1

AUTO-ANTICORPS PRODUITS AU COURS DU VIEILLISSEMENT

Année	1er Auteur	Auto-anticorps	Techniques	Variations	Liquide
1983	Elizan	Anti-NF	Immunofluorescence sur des coupes de moelle épinère de rat	↑	Sérum
1985	Stefansson	Anti-NF-H (200 kDa), M (150 kDa) et L (68 kDa)	Immuno-empreintes avec des homogénats de cerveaux humains sains	Présence	Sérum
1985	Toh	Anti-NF-H (200 kDa), M (150 kDa) et L (70 kDa))	Immuno-empreintes avec des préparations d'axones et des préparations enrichies en NF de cerveaux de souris	Présence	Sérum
1991	Lopez	Anti-non SNC (système nerveux central)	Hémaglutination indirecte, Immunofluorescence, ELISA	Présence	Sérum
1992	Lopez	Anti-non SNC	Hémaglutination indirecte, Immunofluorescence, ELISA	Présence	Sérum
1994	Kay	Anti-bande 3	ELISA avec des peptides synthétiques de l'antigène de sénéscence	↑	Sérum
1994	Soussan	Anti-NF-H	Immuno-empreintes avec des préparations de neurones cholinergiques bovins	↑	Sérum
1995	Mecocci	Anti-GFAP Anti-S100	ELISA avec des peptides synthétiques de la GFAP et S100	↑	Sérum
1995	Kay	Anti-bande 3	ELISA avec des peptides synthétiques de la bande 3	↑	Sérum
1996	Cover	Anti-bande 3	ELISA avec des peptides synthétiques de la bande 3	↑	Sérum
1996	Peltola	Anti-P240	Immuno-empreintes avec des homogénats de cerveaux de rats et d'hommes	Présence	Sérum
1997	Loeffler	Anti-cellules hippocampiques	Immuno-histochimie sur des coupes de cerveaux de rats	Présence	LCR

Légende: ↑ = augmentation du taux d'auto-anticorps avec l'âge; Présence = auto-anticorps présents, mais variations avec l'âge non étudiées

impliqués dans un mécanisme de cytotoxicité des cellules neuronales. Cependant, comme nous l'aborderons plus loin, ils ne représentent pas un facteur de perte neuronale important dans la MA.

VI.2.1.2. Les auto-anticorps dirigés contre des éléments n'appartenant pas au SNC

Une étude portant sur les auto-anticorps produits au cours de la MA (Lopez *et al.*, 1991, 1992) a permis de mettre en évidence dans le sérum de sujets sains des auto-anticorps dirigés contre des antigènes nucléaires, des cellules musculaires lisses, la thyroglobuline (molécule précurseur des hormones thyroïdiennes) et contre le facteur rhumatoïde (molécule sérique ayant les caractères d'une IgM, qui se comporte comme un auto-anticorps anti-IgG, souvent présente chez la majorité des sujets atteints de polyarthrite rhumatoïde).

VI.2.1.3. Conclusion

Ces données montrent qu'un sujet sain jeune ou âgé produit des auto-anticorps dirigés contre ses propres tissus, y compris contre le cerveau qui pourtant est un organe bien protégé par la BHE. Des altérations de la BHE apparaissant au cours du vieillissement faciliteraient l'accès du système immunitaire au cerveau ou la libération d'antigènes cérébraux dans le système immunitaire périphérique, et permettraient donc la production d'auto-anticorps spécifiques du tissu cérébral (**Tableau 1**).

Lors de la MA, ces altérations sont plus importantes et sont accompagnées de l'apparition de lésions spécifiques (antigènes potentiels). C'est pourquoi, une plus grande diversité d'auto-anticorps est observée chez le sujet atteint de la maladie.

VI.2.2. LES AUTO-ANTICORPS PRODUITS AU COURS DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

VI.2.2.1. Les différentes sous-classes d'immunoglobulines

Au cours d'une réponse immune typique, les anticorps qui apparaissent à la suite d'une stimulation antigénique primaire (réponse qui suit le premier contact avec l'antigène) sont d'abord les IgG (Immunoglobuline G) puis les IgM. Par contre, lors d'une stimulation antigénique secondaire (après la seconde rencontre avec l'antigène), la réponse immunitaire est essentiellement constituée d'IgG. Ces dernières augmentent plus rapidement en concentration, persistent plus longtemps et atteignent des taux plus élevés par opposition à ce que l'on observe lors d'une stimulation primaire. Le premier contact avec l'antigène peut être insuffisant pour induire une réponse mesurable, mais peut générer une mémoire, induisant une réponse secondaire plus importante donc facilement détectable.

Au cours de la MA, s'il existe une réponse immunitaire (contre les principales lésions: plaques séniles et DNF), le taux d'IgG doit augmenter à un moment ou à un autre de la vie du malade (suite à une stimulation primaire ou secondaire).

Déjà en 1982, Pentland *et al.* ont analysé l'aspect auto-immun de la MA en dosant par RIA (Radio ImmunoAssay ou dosage radioimmunologique) et immuno-diffusion, les différents types d'Ig. Ils ont montré une diminution d'au moins une des 3 principales classes d'Ig: IgG, IgA et IgM chez les malades.

Cependant, aucune variation significative n'a pu être montrée. Ces résultats permettaient donc d'écarter l'hypothèse selon laquelle la MA serait accompagnée d'un désordre auto-immun.

Pourtant, en 1989 Singh *et al.* ont mis en évidence une augmentation de la sous-classe IgG3 dans le sérum des malades, due à l'apparition d'auto-anticorps anti-cerveau ("antibrain"). Ces auto-anticorps auraient un rôle cytotoxique vis à vis des cellules neuronales en intervenant dans l'activation de la voie classique du complément.

Par la suite, ces résultats ont été confirmés puisque de nombreux auteurs ont constaté la présence d'anticorps dirigés contre le SNC dans le sérum des patients.

VI.2.2.2. Les auto-anticorps dirigés contre le SNC

La présence des plaques séniles et des neurones en DNF dans le cerveau du malade peut être la source d'une réponse auto-immune. En effet, l'apparition de ces lésions induit la production d'antigènes "anormaux" ou pathologiques (ayant subit des modifications post-traductionnelles par exemple). Ces antigènes reconnus comme des corps étrangers ("non-soi") provoquent l'activation d'un processus d'auto-immunité.

1/ Contre les lésions de la MA

* *Anti - NFT (Neurofibrillary Tangles: enchevêtrements neurofibrillaires)*

En 1987, Gaskin *et al.* ont établi une lignée cellulaire transformée par le virus d'Epstein-Barr à partir de lymphocytes B de patients atteints de la MA. Les anticorps produits par cette lignée reconnaissent des NFT par immunocytochimie réalisée sur des préparations de NFT purifiés à partir de cerveaux "Alzheimer certain".

En 1988, Kingsley *et al.* confirment la production d'auto-anticorps anti-NFT par les sujets atteints de la MA.

* *Anti - Aβ*

Des anticorps dirigés contre le peptide β amyloïde ont été mis en évidence en transformant des lymphocytes B de malades par le virus d'Epstein-Barr (Gaskin *et al.*, 1992; 1993). Ces auto-anticorps reconnaissent la séquence 1-28 du peptide amyloïde (Gaskin *et al.*, 1992).

Cette technique ne permet pas une analyse comparative entre la production d'auto-anticorps anti-Aβ produits au cours de la MA et du vieillissement. Par conséquent, nous ne pouvons conclure quant à la spécificité de ces auto-anticorps pour la MA.

2/ Contre les neurones

* *Anti - SNC ou anti-cerveau ("antibrain")*

D'une manière générale, des auto-anticorps dirigés contre les cellules neuronales ont été mis en évidence par les techniques d'immunofluorescence (sur des coupes de cerveaux de rat et d'homme) et d'immuno-empreintes (Fillit *et al.* 1985; Singh *et al.* 1986; Sugiura *et al.* 1989).

Fillit *et al.* (1985) avaient montré que ces auto-anticorps "antibrain" reconnaissent de manière spécifique certaines aires du cerveau normal de rat et d'homme (hippocampe, putamen) alors que le sérum de sujets contrôles ne les détecte pas.

Par ailleurs, Singh *et al.* (1986) mettaient en évidence des auto-anticorps anti-cerveau dans le sérum de sujets atteints de la MA (87% des malades), de sujets atteints de Trisomie 21 (8% des trisomiques), par contre aucun sujet témoin ne présentait ces auto-anticorps (0%).

En 1996, Schott *et al.* confirme les résultats obtenus jusqu'alors en montrant une augmentation de la concentration des anticorps anti-neurones chez les sujets atteints de la MA.

* *Anti - neurones cholinergiques*

D'autres études ont permis de caractériser des auto-anticorps dirigés contre une sous-population neuronale: les neurones cholinergiques (Fillit *et al.* 1988; Foley *et al.* 1988; Michaelson *et al.* 1989).

Ces auto-anticorps ont aussi été retrouvés dans le LCR des malades (McRae *et al.*, 1987; 1988; 1990a; 1990b).

Ces deux types d'auto-anticorps ne sont pas suffisamment spécifiques pour être utilisés comme outils diagnostiques.

3/ Contre les éléments neuronaux

* *Anti - NF*

Les auto-anticorps anti-NF ont fait l'objet de nombreuses études contradictoires. Toh *et al.* (1985) ont été les premiers à mettre en évidence une plus grande fréquence d'auto-anticorps sériques dirigés contre le triplet de neurofilaments (NF-H; NF-L; NF-M) chez les sujets atteints de la MA par rapport aux sujets contrôles sains. Une forte incidence a aussi été retrouvée dans d'autres maladies neurologiques comme le Creutzfeld-Jacob (CJ) et le Kuru.

Karcher *et al.* (1986) et Bahmanyar *et al.* (1982) ont montré que la concentration d'auto-anticorps anti-NF présents dans le sérum des patients atteints de la MA n'est pas augmentée contrairement à celle observée chez les sujets atteints d'autres maladies neurologiques telles que la maladie de Parkinson (MP) et la maladie de CJ.

Par la suite, d'autres études ont mis en évidence une augmentation de la concentration sérique de la sous-classe H des NF avec l'âge et la MA (Tchernakov *et al.*, 1992; Soussan *et al.*, 1994).

La présence des auto-anticorps anti-NF signerait la dégénérescence neuronale qui apparaît au cours du vieillissement et s'intensifie avec la MA.

Par ailleurs, des rats immunisés avec des NF-H (Chapman *et al.*, 1991) de Torpedo ("poisson électrique") présentent des dysfonctions cérébrales (mémoire à court terme affectée).

Par conséquent, les anticorps anti-NF seraient produits en réponse à la DNF mais sont aussi à l'origine de l'amplification de la MA (mort neuronale).

Dans le LCR, des auto-anticorps dirigés contre les NF-H ont aussi été détectés (McRae *et al.*, 1990a; 1990b).

Les auto-anticorps anti-NF ne peuvent pas être utilisés comme outils diagnostiques car leur présence ainsi que l'augmentation de leur concentration sérique ne sont pas spécifiques

de la MA (retrouvées dans d'autres maladies neurologiques comme le CJ, le Kuru, le Syndrome de Down (Trisomie 21)).

* *Anti - Ganglioside GM1*

Les gangliosides (le plus complexe des glycolipides) sont abondants dans la membrane plasmique des neurones et serviraient de recepteurs pour la transmission entre cellules. Ils ont un rôle dans le développement et la régénération neuronale. Chez le patient atteint de la MA, les auto-anticorps anti-gangliosides modifieraient ce processus. Chapman *et al.* (1988) ont montré un haut niveau d'auto-anticorps anti-gangliosides GM1 dans le sérum de sujets atteints de MA, de la maladie de Parkinson, de démences par infarctus multiples mais pas dans le sérum de sujets témoins. Ces auto-anticorps ne sont donc pas spécifiques de la MA mais refléteraient une modification du métabolisme des gangliosides impliquée dans le processus de neurodégénérescence de la MA et d'autres causes de démences.

* *Anti - protéine basique de la Myéline (PBM) de 18,5 kDa:*

En utilisant la technique des immuno-empreintes (Western-Blot), Singh *et al.* (1992) ont mis en évidence des auto-anticorps sériques anti-protéine basique de la myéline spécifiques de la MA. 89% (16 sur 18) des malades possèdent ces auto-anticorps contre 8% (7 sur 90) des contrôles seulement (sujets sains adultes, âgés, atteints de maladie de Parkinson, et de trisomie 21). Ces auteurs ont suggéré qu'au cours de la MA, la dégénérescence neuronale provoque la libération d'antigènes neuronaux mais aussi celle de la myéline entourant les axones. La mort neuronale induit donc une réponse immunitaire contre la protéine basique de la myéline augmentant ainsi la progression de la maladie.

Cette piste intéressante, à première vue, n'a donnée aucune suite, ce qui suggère qu'elle est restée infructueuse.

* *Anti - histones*

Mecocci *et al.*, en 1993 ont montré une forte concentration (non significative) d'auto-anticorps anti-histones dans le sérum de sujets atteints de démence sénile de type Alzheimer par rapport aux sujets sains. La production d'auto-anticorps anti-histones est fonction de la sévérité de la démence. Et leur présence refléterait des modifications de la fluidité et/ou de l'intégrité membranaires permettant la libération d'immunogènes nucléaires tels que les histones.

* *Anti - S 100*

La protéine S 100 est un facteur d'extension neuritique surexprimé par les astrocytes activés du cerveau de sujets atteints de la MA. Ce facteur est impliqué dans la formation des neurites dystrophiques donc des plaques neuritiques observées dans le cerveau des malades.

Les patients atteints de la démence sénile de type Alzheimer et de démences vasculaires ont un taux d'auto-anticorps dirigés contre cette protéine supérieur à ceux des sujets atteints de la forme présénile de la MA (Mecocci *et al.*, 1995).

Ce taux d'auto-anticorps anti-S100 ne peut pas être utilisé pour établir le diagnostic de la MA car les concentrations observées dans les différents groupes de sujets étudiés (Alzheimer sénile et présénile, démences vasculaires et contrôles) se chevauchent de manière importante. La présence de ces auto-anticorps refléterait une altération de la BHE qui faciliterait l'accès du système nerveux central aux cellules immuno-compétentes.

* *Anti - bande 3 ou anti-ACS*

Comme nous l'avons vu précédemment, des anticorps dirigés contre l'antigène cellulaire de sénéscence (ACS) sont produits en quantité croissante au cours du vieillissement normal. Lors de la MA, cette production est accentuée (Kay *et al.* ; 1995; 1996; 1997; Cover *et al.* 1996).

En particulier, le taux d'anticorps dirigés contre les séquences peptidiques spécifiques de l'ACS est augmenté alors que la concentration d'anticorps dirigés contre les séquences peptidiques de base (non modifées) de la protéine bande 3 est diminuée (Cover *et al.*, 1996).

En résumé, le vieillissement normal ou "accéléré" (MA) se traduit par des modifications post-traductionnelles d'une région de la bande 3, perturbant ainsi le transport anionique. Ces modifications post-traductionnelles engendrent la production d'ACS (antigènes du "non-soi"), et donc la production d'auto-anticorps anti-ACS. Ces auto-anticorps reconnaissent les ACS présents sur les cellules neuronales âgées ou malades dans le cas de la MA et permettent leur élimination.

Il semblerait qu'aucune étude comparative n'ait permis de montrer que ces auto-anticorps sont spécifiques de la MA.

* *Anti - spectrine*

La spectrine est l'une des protéines majeures du cytosquelette cellulaire, elle est formée de 2 chaines alpha et beta respectivement de 240 et 220 kDa. La spectrine est présente dans les globules rouges mais aussi dans les neurones et les fibroblastes du cerveau. La spectrine cérébrale (ou Fodrine) participe à la libération des neurotransmetteurs, aux processus d'endocytose et d'exocytose, à la morphogénèse cellulaire et à la plasticité neuronale.

Récemment (Vazquez *et al.*, 1996), des auto-anticorps dirigés contre la spectrine cérébrale ont été mis en évidence dans le sérum de sujets atteints de la MA (49%; n=49) alors qu'ils sont rarement présents chez les sujets contrôles (5%; n=43). Par ailleurs, la quantité d'auto-anticorps est affectée par l'âge du sujet. En effet, on observe une augmentation de la concentration d'auto-anticorps anti-spectrine cérébrale avec l'âge chez les malades, par contre chez les témoins cette variation n'est pas observée.

De nombreuses altérations de la spectrine cérébrale ont été décrites et corrélées avec l'âge et la MA. Ainsi, la dégradation de la spectrine est augmentée au cours de la MA (Masliash *et al.*, 1990); une immunoréactivité anormale de la spectrine cérébrale a été mise en évidence dans les plaques neuritiques de la MA (Masliash *et al.*, 1991b). De plus, une

protéolyse de la spectrine des fibroblastes a été observée chez les sujets âgés et atteints de la MA (Peterson *et al.*, 1991) et ses produits de dégradation augmentent avec l'âge dans certaines régions du cerveau (Bahr *et al.*, 1991). Enfin, d'autres études ont montré que des modifications structurales de la spectrine cérébrale jouent un rôle important dans le remodelage des synapses et la plasticité neuronale (Lynch *et al.*, 1991).

Tous ces travaux sont en accord avec l'idée selon laquelle la dégradation de la spectrine cérébrale est un marqueur biochimique pathologique de la perte synaptique et de la dégénéréscence neuronale. Dans ce contexte, il semble tout à fait probable qu'une accumulation de produits de dégradation de la spectrine cérébrale ait lieu dans le cerveau de sujets atteints de la MA et puisse induire, par un mécanisme encore inconnu, une augmentation de la production d'auto-anticorps anti-spectrine cérébrale.

4/ Contre d'autres types cellulaires

Parallèlement à toutes les études concernant les neurones, de nombreux auteurs ont recherché des auto-anticorps dirigés contre d'autres types cellulaires.

* *Anti - cellules à prolactine*

Dès 1983, Pouplard mettait en évidence la présence significative (96%) d'auto-anticorps dirigés contre les cellules hypophysaires produisant la prolactine (hormone agissant sur le développement, la reproduction, la lactogénèse, ...) dans le sérum de sujets atteints de la MA comparée à la population générale (moins de 4%).

La signification étiopathogénique de ces auto-anticorps n'apparait pas clairement mais leur présence est un argument supplémentaire montrant l'intervention de facteurs auto-immuns dans la MA.

* *Anti - cellules vasculaires*

L'utilisation en immunofluorescence, de sérums provenant de sujets atteints de la MA a permis de marquer les vaisseaux sanguins d'un cerveau de rat. Fillit *et al.*, (1987), ont

montré que cet immuno-marquage est spécifique des héparane sulfate protéoglycannes (HSPG) vasculaires qui ont un rôle important dans la fonction de la BHE. Selon ces auteurs, les anticorps anti-HSPG seraient impliqués dans la pathogénèse de la MA en augmentant la dégradation de la BHE, facilitant ainsi le passage de substances neurotoxiques dans le cerveau.

* *Anti - cellules astrocytaires*

Kingsley *et al.*, (1988), ont d'abord montré la présence d'auto-anticorps sériques dirigés contre les cellules astrocytaires chez les sujets atteints de la MA.

Des auto-anticorps anti-GFAP ont ensuite été découverts dans le sérum des malades (Tanaka *et al.*, 1988; 1989; Nakamura *et al.*, 1992; Mecocci *et al.*, 1995). Ces auto-anticorps présents au cours du vieillissement (Mecocci *et al.*, 1992) ont un taux significativement élevé au cours de la MA comparativement aux sujets contrôles: témoins et démences par infarctus multiples (Nakamura *et al.*, 1992).

* *Anti - membrane basale épithéliale des plexus choroïdes*

Les plexus choroïdes jouent un rôle majeur dans la filtration, la sécrétion et la résorption du LCR. Au cours de la MA, les taux de deux molécules sécrétées dans le LCR par les plexus choroïdes, la vitamine B12 et la transthyrétine (préalbumine) sont significativement diminués (Riisoen, 1988; Ikeda *et al.*, 1990). Ces résultats suggèrent une atteinte des plexus choroïdes.

C'est en 1992 que Serot *et al.* ont mis en évidence la présence d'auto-anticorps dirigés contre la membrane basale des plexus choroïdes dans le sérum des patients atteints de la MA. Ils ont donc suggéré que ces auto-anticorps seraient responsables des altérations sévères des plexus choroïdes observées au cours de la MA (Serot *et al.*, 1995).

* *Anti - cellules microgliales*

L'analyse du LCR de malades a abouti à la découverte d'auto-anticorps spécifiques des cellules microgliales amiboïdes (Ling *et al.* 1992; McRae *et al.* 1993; 1996; Dahlström *et al.* 1994). Cette spécificité est particulièrement intéressante puisque les cellules microgliales amiboïdes (forme active de la microglie) sont capables de proliférer en réponse à une dégénérescence neuronale pour ensuite agir comme les macrophages du SNC en phagocytant les débris cellulaires.

Ces auto-anticorps seraient là encore la preuve d'une activité immunitaire considérable suite à l'apparition des lésions caractéristiques de la MA.

* *Anti - cellules de l'hippocampe*

Récemment, Loeffler *et al.* (1997) ont détecté par immunocytochimie dans le LCR de malades, de sujets sains jeunes et sains âgés, des auto-anticorps dirigés contre les cellules hippocampiques. Ces auto-anticorps participeraient à l'activation de la voie classique du complément. Ils seraient donc un des acteurs de la mort neuronale observée dans la MA. Cependant, aucune différence significative n'ayant été observée entre les trois groupes, ces auto-anticorps ne peuvent être utilisés comme marqueurs de la MA.

Du fait de l'insuffisance de leur spécificité, aucun de ces auto-anticorps anti-cellules n'a pu être exploité en tant qu'outil diagnostique.

5/ Contre des enzymes, des facteurs neuronaux, des hormones et des neurotransmetteurs

Des anticorps dirigés contre la *choline acétyltransférase* bovine (68 et 70 Kda) ont été identifiés dans le sérum de sujets "Alzheimer". Ces auto-anticorps absents dans le sérum de sujets sains, agiraient chez le malade comme inhibiteurs d'enzymes en liant un site fonctionnel de la choline acétyltransférase. Finalement, cette liaison aboutirait à un déficit de la transmission neuronale (Fillit *et al.*, 1985).

Enfin, des auto-anticorps dirigés contre le "*Nerve Growth Factor*" (NGF) (Roy *et al.*, 1988); la *somatostatine* (Roy *et al.*, 1994); la *sérotorine* (Schott *et al.*, 1996) ont été détectés dans le sérum de sujets atteints de la MA. Cependant, aucune différence significative n'a été mise en évidence et n'a permis d'établir un diagnostic précoce de la maladie.

Tous ces résultats apportent des éléments supplémentaires facilitant la compréhension de la pathogénèse de la MA, mais ne permettent pas d'isoler un marqueur spécifique de la MA.

VI.2.2.3. Les anticorps dirigés contre des éléments n'appartenant pas au SNC

D'autres tentatives visant à établir le diagnostic de la MA en utilisant les auto-anticorps non spécifiques du SNC ont échoué. En particulier, Schott *et al.* (1996) ont recherché des auto-anticorps dirigés contre des éléments n'appartenant pas au SNC dans le sérum des malades (anticorps anti-cellules pariétales gastriques; anti-cellules musculaires; anti-laminine; anti-kératine; anti-glandes thyroïdes). Selon Schott, hormis des anticorps anti-cellules pariétales gastriques et anti-nucléaires, le sérum des malades ne présente aucun autre type d'auto-anticorps non spécifique du SNC.

Par ailleurs, les taux d'auto-anticorps anti-thyroglobuline (hormone thyroïdienne) et anti-microsomes dans le LCR (Ewins *et al.* 1991; McRae *et al.* 1988) et dans le sérum (Lopez *et al.* 1992; Genovesi *et al.* 1996) sont augmentés de manière significative chez les patients atteints de la MA. La présence d'auto-anticorps anti-thyroglobuline suppute une liaison génétique entre la maladie auto-immune de la thyroïde et la MA familiale. En effet, une très forte prévalence de la maladie auto-immune de la thyroïde dans la MA familiale s'expliquerait par la présence (sur le chromosome 21 à proximité du gène impliqué dans la MA familiale: ApoE) d'un facteur génétique responsable de la maladie auto-immune de la thyroïde.

TABLEAU 2

AUTO-ANTICORPS PRODUITS AU COURS DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

Année	1er Auteur	Auto-anticorps	Techniques	Variations	Liquide
1982	Bahmanyar	Anti-NF	Immunofluorescence indirecte sur des coupes longitudinales de moelle épinière de rats	Taux normaux	Sérum
1983	Pouplard	Anti-cellules à prolactine	Immunofluorescence indirecte sur des coupes d'hypophyse humaine	Présence (S)	Sérum
1985	Fillit	Anti-choline acétyltransférase (ChAT) Anti-cerveau	Immuno-empreintes contre la ChAT bovine Immunofluorescence indirecte sur des coupes de cerveaux de rats et d'hommes	Présence dans MA Absence chez sains	Sérum
1985	Toh	Anti-NF-H, NF-M, NF-L	Immuno-empreintes sur des préparations de cerveaux de souris enrichies en NF	Présence fréquente dans MA	Sérum
1986	Karcher	Anti-NF	Dot-blot avec des préparations de triplet de NF humain	Taux normaux	Sérum
1986	Singh	Anti-cerveau	Immunofluorescence indirecte sur des coupes de cerveaux de rats	Présence dans MA Absence chez sains	Sérum
1987	Fillit	Anti-cellules vasculaires	Immunofluorescence sur des coupes de cerveaux de rats	Présence dans MA Absence chez sains	Sérum
1987	Foley	Anti-neurones cholinergiques	Immunolyse complément-dépendant de synaptosomes cholinergiques de rats réalisée avec le sérum du malade	Présence	Sérum
1987	Gaskin	Anti-NFT	Transformation par le virus d'Epstein Barr de lymphocytes B de malades	Présence	Sérum
1987	McRae	Anti-neurones cholinergiques	Immunohistochimie sur des coupes de cerveaux de rats	Présence	LCR

TABLEAU 2

2/4

Année	1er Auteur	Auto-anticorps	Techniques	Variations	Liquide
1988	Chapman	Anti-gangliosides GM1	ELISA avec des gangliosides de cerveaux bovins purifiés.	Présence (S)	Sérum
1988	Fillit	Anti-neurones cholinergiques	Immunolyse complément-dépendant de synaptosomes cholinergiques de rats réalisée avec le sérum du malade	Présence	Sérum
1988	Kingsley	Anti-NFT Anti-Astrocytes	Transformation par le virus d'Epstein Barr de lymphocytes B de malades Surnageant testé par immuno-cytochimie, immuno-empreintes et ELISA	Présence (NS)	Sérum
1988	McRae	Anti-Thyroglobuline (anti-TG)	Immunocytochimie sur des coupes de cerveaux de rats et ELISA contre la TG	Taux ↑ dans MA	LCR
1988	McRae	Anti-neurones cholinergiques	Immunohistochimie sur des coupes de cerveaux de rats	Présence	LCR
1988	Roy	anti-NGF	Chromatographie d'affinité	Taux ↑ dans MA	Sérum
1988	Tanaka	anti-GFAP	Immuno-empreintes contre des préparations de GFAP bovine et des cerveaux de souris Immunofluorescence indirecte sur cerveau humain ELISA avec GFAP bovine	Taux ↑ dans MA	Sérum
1989	Michaelson	Anti-neurones cholinergiques	Immuno-empreintes contre des neurones cholinergiques de Torpedo	Taux ↑ dans MA (S)	Sérum
1989	Singh	IgG3	Radio immunodiffusion (Kit)	Taux ↑ dans MA (S)	Sérum
1989	Sugiura	Anti-cerveau	Immunofluorescence indirecte sur des coupes de cervelets de rats, de cobays et de lapins	Présence	Sérum
1989	Tanaka	Anti-GFAP	ELISA avec la GFAP bovine purifiée	Taux ↑ dans MA (S)	Sérum
1990	McRae	Anti-cerveau	Immunohistochimie sur des coupes de cerveaux de rats	Présence	LCR

TABLEAU 2

3/4

Année	1er Auteur	Auto-anticorps	Techniques	Variations	Liquide
1991	Ewins	Anti-Thyroglobuline anti-Microsomes	ELISA avec des peptides synthétiques	Taux ↑ dans MA (S)	LCR
1992	Gaskin	Anti-Aß Anti-NFT	Transformation par le virus d'Epstein Barr de lymphocytes B de malades	Présence	Sérum
1992	Ling	Anti-cellules microgliales	Immunocytochimie sur des coupes de cerveaux de rats avec des lésions expérimentales	Présence	LCR
1992	Lopez	Anti-Thyroglobuline	Hémaglutination indirecte (Kit)	Taux ↑ dans MA (S)	Sérum
1992	Serot	Anti-cellules des plexus choroïdes	Immunofluorescence indirecte sur des coupes de cerveaux de rats et de foetus humains	Présence (S)	Sérum
1992	Singh	Anti-protéine basique de la myéline (PBM)	Immuno-empreintes avec les PBM de lapin (18,5kDa)	Présence (S)	Sérum
1992	Tchernakov	Anti-NF-H (augmentation avec l'âge dans la MA)	Immuno-empreintes avec des NF bovins	Taux ↑ dans MA (S)	Sérum
1993	Gaskin	Anti-Aß	Transformation par le virus d'Epstein Barr de lymphocytes B de malades	Présence	Sérum
1993	McRae	Anti-cellules microgliales	Immunohistochime sur des coupes de cerveau de rat avec des lésions expérimentales et sur des coupes de tissu cortical biopsique de malades	Présence (S)	LCR
1993	Mecocci	Anti-histones	ELISA avec des histones H1, H2A, H2B, H3, H4	Taux ↑ dans MA (S)	Sérum
1994	Dahlström	Anti-cellules microgliales	Immunocytochimie sur des neurones de rat Immunohistochimie sur des coupes de cerveaux humains biopsiques	Présence	LCR
1994	Roy	Anti-somatostatine et pro-dynorphine	ELISA avec la somatostatine et la pro-dynorphine	Présence (NS)	Sérum

TABLEAU 2

4/4

Année	1er Auteur	Auto-anticorps	Techniques	Variations	Liquide
1995	Kay	Anti-bande 3	ELISA avec des peptides synthétiques de la bande 3	Taux ↑ dans MA (S)	Sérum
1995	Mecocci	Anti-S100 Anti-GFAP	ELISA	Taux ↑ dans MA tardive (S)	Sérum
1996	Cover	Anti-Bande 3	ELISA avec des peptides synthétiques de la bande 3	Taux ↑ dans MA (S)	Sérum
1996	Genovesi	Anti-Thyroglobuline Anti-microsomes	RadioImmuno Assay (Kit)	Taux ↑ dans MA (S)	Sérum
1996	Kay	Anti-bande 3	ELISA avec des peptides synthétiques de la bande 3	Taux ↑ dans MA (S)	Sérum
1996	McRae	Anti-cellules microgliales	Immunocytochimie sur des cultures de cellules cholinergiques Immunohistochimie sur des coupes de: - cerveaux de rats - lésions expérimentales de cerveaux de rats -biopsies de malades	Présence	LCR
1996	Schott	Anti-SNC Anti-non-SNC: sérotonine, cellules pariétales gastriques et noyau cellulaire	ELISA Immunofluorescence indirecte sur des coupes de tissus nerveux et non-nerveux	Présence	Sérum
1996	Vazquez	Anti-spectrine cérébrale	Immuno-empreintes (Sérum humain dilué au 1:20) contre la spectrine extraite de cerveaux de rats et contre des homogénats de cerveaux humains	Taux ↑ dans MA	Sérum
1997	Kay	Anti-Bande 3	ELISA avec des peptides synthétiques de la bande 3	Taux ↑ dans MA (S)	Sérum
1997	Loeffler	Anti-neurones hippocampiques	Immunohistochimie sur des coupes de cerveaux de rats	Présence (NS)	LCR

Légende: Variations = variations du taux ou de la présence des auto-anticorps chez les malades par rapport aux témoins sains; Taux ↑ = taux d'auto-anticorps augmenté; S = significatif; NS = non signficatif; Présence = présence des auto-anticorps chez les malades, la comparaison avec une population de témoins sains n'a pas été réalisée.

VI.2.2.4. Conclusion

En conclusion, de nombreux auto-anticorps ont été mis en évidence au cours de la MA (**Tableau 2**). Mais aucun, même les plus intéressants (anti-PBM; anti-spectrine; anti-cellules à prolactine), n'a pu être utilisé dans un but diagnostique du fait de l'insuffisance de leur spécificité pour la MA.

VI.2.3. CONCLUSION GÉNÉRALE

La grande diversité d'auto-anticorps produits par les sujets atteints de la MA (**Tableau 2**) par rapport au faible nombre d'auto-anticorps produits au cours du vieillissement (**Tableau 1**), suggère qu'il existe, lors de la MA, un mécanisme auto-immun décelable par une simple analyse du sérum.

On notera que les populations contrôles utilisées dans la majorité de ces études, sont des sujets sains âgés ou jeunes, mais surtout des sujets atteints d'autres maladies (telles que les démences par infarctus multiples, la maladie de Parkinson, la Trisomie 21, le Kuru...), maladies qui ne peuvent pas se confondre cliniquement avec la MA. Il semblerait donc que les populations contrôles utilisées ne soient pas adaptées pour la mise en évidence d'auto-anticorps spécifiques de la MA.

Toutes ces études montrent qu'il y a, réellement, intervention d'un mécanisme auto-immun au cours de la MA. Si une relation de cause à effet entre ces auto-anticorps et la MA n'apparait pas clairement, d'autres arguments (les marqueurs de l'inflammation développés dans le paragraphe suivant) permettent d'envisager l'existence d'une dérégulation immunitaire importante au cours de la MA. Une telle dérégulation associée à un facteur déclenchant (viral? toxique? génétique?...) pourrait engendrer une réaction auto-immune dont la cible exacte reste encore à définir.

VI.3. LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

La découverte de nombreux marqueurs de l'inflammation au sein des PS (IgG, cytokines, protéines du complément..) a orienté les travaux à visés diagnostiques vers la recherche de marqueurs inflammatoires de la MA.

L'inflammation est la réponse des tissus à la blessure (ici la réponse du cerveau aux lésions de la MA). Elle a pour objet de diriger les molécules sériques et les cellules du système immunitaire vers le site de lésion tissulaire.

Comme nous avons comparé la réponse auto-immune de la MA à celle observée au cours du vieillissement, nous comparons ici les marqueurs de l'inflammation produits au cours de la MA à ceux produits au cours du vieillissement.

VI.3.1. LES MARQUEURS DE L'INFLAMMATION AU COURS DU VIEILLISSEMENT

(Geokas *et al.*, 1990; Weigle *et al.*, 1989).

VI.3.1.1. Le système immunitaire du système nerveux central: la microglie

Le système immunitaire périphérique a fait l'objet de nombreuses études, alors que le système immunitaire du cerveau (la microglie) a été peu exploité du fait de sa complexité et de la difficulté d'approche. Les principales modifications des cellules microgliales ont été présentées dans le paragraphe VI.1.3 - la microglie: cellules immunitaires du cerveau. En effet, Streit *et al.* (1995) ont décrit une augmentation de la présentation du CMHII ainsi qu'une perte de contrôle des cellules microgliales. Au cours du vieillissement, ces dernières agissent donc comme des CPA contribuant ainsi au déclin cognitif et à la sénilité. Ces modifications expliquent aussi l'augmentation du taux d'auto-anticorps circulants chez les personnes âgées.

VI.3.1.2. Le système immunitaire périphérique

a) Les modifications cellulaires

Les réponses immunitaires humorale (faisant intervenir les anticorps, le complément et les autres molécules solubles) et à médiation cellulaire (faisant intervenir les lymphocytes T, B, macrophages et autres effecteurs cellulaires) déclinent avec l'âge.

Il a été suggéré que la régression du thymus (organe lymphoïde), qui commence à la puberté, est la première cause de l'immunosénescence (vieillissement du système immunitaire). Par conséquent, la chute de l'immunocompétence cellulaire est plus sévère dans le compartiment des lymphocytes T produits au niveau du thymus.

La diminution d'un sous-groupe de lymphocytes expliquerait aussi le déclin du système immunitaire. Les lymphocytes T (LT) sont identifiés par les marqueurs de surface appelés "CD" (pour Clusters of Differenciation). Tous les LT ont le marqueur de surface CD3. Les LT "helper" ou auxiliaires qui stimulent les LB (lymphocytes B) producteurs d'anticorps ont le marqueur CD4 alors que les LT cytotoxiques et suppresseurs ont le CD8. Au cours du vieillissement, le rapport LTCD4+ / LTCD8+ est modifié. Les études quantitatives sont assez contradictoires. Néanmoins, la majorité des auteurs s'accordent à dire que les LTCD4+ et LTCD8+ diminuent au cours du vieillissement. Cependant, cette diminution est inférieure à 20%, ce qui est relativement faible compte tenu de l'altération du système immunitaire observée au cours du vieillissement.

Les LB sont moins perturbés que les LT par le vieillissement. Les LB "âgés" sont moins sensibles aux signaux d'activation, leur affinité pour les antigènes est réduit, ils produisent moins d'Ig de surface (récepteur) mais par contre ils produisent plus d'auto-anticorps que les LB "jeunes". Par ailleurs, la capacité à proliférer des LB est réduite de 20% au cours du vieillissement alors que celle des LT est réduite de 80 à 90%. Enfin, avec l'âge, les LB commencent à reconnaître des antigènes du "soi" alors qu'ils ont au contraire des difficultés à reconnaître les antigènes du "non-soi".

b) Les interleukines

Lors d'une réponse immunitaire, les macrophages présentent l'antigène étranger aux LTCD4+ qui réagissent en produisant l'interleukine 2 (IL2) et ses récepteurs. Les LT lient donc l'IL2 qu'ils ont produit (signal autocrine) et prolifèrent. Ils induisent donc leur propre prolifération. De plus, l'IL2 est nécessaire pour la prolifération des LTCD8+.

Au cours du vieillissement, le taux d'IL2 est diminué. Cette baisse est due à une diminution du nombre de thymocytes actifs et non pas à une chute de la synthèse d'IL2. Les LT CD4+ âgés produisent autant d'IL2 que les cellules jeunes, c'est le nombre de cellules actives qui est réduit.

Il est difficile de définir les lymphokines impliquées dans le vieillissement car peu d'entre elles ont été étudiées. Outre l'IL2, Ershler *et al.* (1993) ont mis en évidence une augmentation du taux d'IL6 au cours du vieillissement. Par ailleurs, Candore *et al.* (1993) n'ont pas constaté de différence significative entre la production d'IL6 et d'IL4 par les LT helper "âgés" par rapport aux LT helper "jeunes". Mais une diminution de la production d'interféron γ (IFNγ) a été observée. Ces trois types de lymphokines (IL6, IL4, INFγ) permettent la différenciation des LB en cellules productrices d'anticorps.

En conclusion, les réponses immunitaires à médiation cellulaire et humorale sont altérées au cours du vieillissement. Les LB et les LT montrent des déficits au niveau de leur activation, prolifération et différenciation. Les LT, en particulier les CD4+ (LT "helper") sont les plus sévèrement touchés à cause de la régression thymique. Une diminution du nombre de LT fonctionnels est observée au cours du vieillissement. Par ailleurs, la réponse à médiation humorale est affectée au cours du vieillissement au niveau de la production des cytokine (IL2 et IL6). Enfin, le système immunitaire des muqueuses; le GALT (tissu lymphoïde associé à l'intestin qui permet d'intervenir sur les microbes provenant de la flore intestinale) est relativement peu affecté par le vieillissement.

VI.3.2. LES MARQUEURS DE L'INFLAMMATION AU COURS DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

(Pour revue, Eikelenboom, 1996)

VI.3.2.1. Les marqueurs du système immunitaire du système nerveux central

Diverses protéines inflammatoires ont été identifiées, notamment au voisinage des plaques amyloïdes, dans les cerveaux de patients atteints de la MA. Certaines découvertes actuelles indiquent que ces molécules sont impliquées dans bon nombre d'étapes fondamentales de la cascade pathologique. De récentes études épidémiologiques suggèrent que l'utilisation de médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens réduit le risque de développer une maladie d'Alzheimer.

Tandis que la plupart des dépôts Aβ présents dans le cerveau de patients atteints de la MA sont de type "diffus", (peu ou pas d'Aβ fibrillaire, et pas d'association avec les cellules gliales et les neurites altérés), certains de ces dépôts, en association avec des structures corticales et limbiques, sont fibrillaires et compacts, entourés d'altérations neuritiques, avec des astrocytes et de la microglie activée. C'est ce que l'on appelle des plaques neuritiques. Des études neuropathologiques chez des patients souffrant de trisomie 21 démontrent que les plaques diffuses précèdent les plaques neuritiques fibrillaires et la DNF, suggérant que le peptide Aβ, dans sa forme non fibrillaire, ne suffit pas par lui-même à engendrer un tableau clinique "Alzheimerien" (Mann *et al.*, 1990). La fibrillogénèse du peptide Aβ semble nécessaire pour induire la destruction du neuropile.

a) Les protéines associées aux dépôts amyloïdes

Hormis le peptide Aβ, de nombreuses protéines ont été découvertes en étroite association avec les plaques à la fois classiques et diffuses (Pour revue McGeer et McGeer, 1995).

* Les immunoglobulines

C'est en 1975 qu'Ishii et Haga ont mis en évidence la présence d'immunoglobulines (Ig) dans les PS par immunofluorescence sur des coupes de cerveau humain. Ces résultats ont été confirmés par Eikelenboom et Stam en 1982, qui ont précisé la localisation de ces Ig. Elles sont principalement retrouvées autour des PS et non au coeur des dépôts de substance amyloïde.

* Les protéines du complément

Le système du complément est l'un des systèmes enzymatiques du sérum. Il intervient dans l'inflammation, dans l'opsonisation des particules antigéniques (y compris les micro-organismes) et dans la destruction des pathogènes. Le système est constitué de molécules sériques, qui peuvent être activées selon deux voies: la voie classique et la voie alterne.

La voie classique du complément est celle qui est développée dans le cerveau au cours de la MA. Les molécules de la voie classique sont appelées C1, C2, ..., C9. Des études immunohistochimiques ont démontré la présence dans les dépôts amyloïdes de protéines du complément. C'est le cas des protéines C1q (fraction de C1); C3d et C3c (fractions du C3); C4d (fraction du C4); C7; C9 et du C5b-9 ou "complexe d'attaque membranaire" (formé du complexe C5b; C6; C7; C8 et C9) qui traverse la membrane de la cellule cible et forme ainsi un canal lytique provoquant la mort de la cellule nerveuse (Eikelenboom *et al.*, 1989; McGeer *et al.*, 1989). Les ARN messagers de C1q, C3 et C4 sont constamment exprimés à des niveaux faibles dans les cerveaux normaux, mais bien davantage dans la MA (Johnson *et al.*, 1992; McGeer *et al.*, 1993). C7 et C9 ont été mis en évidence dans les dépôts amyloïdes par immunohistochimie, indiquant la présence de protéines de fin de cascade dans les lésions de la MA. De plus, le C5b9 est retrouvé en association avec les neurites anormaux dans et autour des PS et dans quelques neurones en DNF (McGeer *et al.*, 1989).

La présence de toutes ces molécules du complément dans le cerveau du malade suggère donc l'existence d'un processus inflammatoire impliquant l'activation de la voie classique du

complément. Ce mécanisme aboutit à la formation du dernier élément de la cascade: le complexe d'attaque membranaire (C5b9), qui provoque la mort de la cellule nerveuse.

* Les inhibiteurs du complément

Un grand nombre d'inhibiteurs du complément a été identifié dans le cerveau et plus particulièrement dans le cerveau de patients atteints de la MA. Le plus important est le C1-inhibiteur (produit par les macrophages) car il bloque la cascade à la base. On trouve aussi le "C4-binding-protein" qui, comme son nom l'indique, lie le C4 et bloque le cycle.

Il y a aussi trois molécules qui protègent les cellules nerveuses de la lyse par le C5b9. Il s'agit de la vitronectine, la clusterine (ou SP40 ou APOJ) produits par les astrocytes en culture et la protectine. McGeer et McGeer (1995) expliquent la présence de ces inhibiteurs dans les PS par le fait que la cascade du complément activée dans le cerveau du malade provoque la stimulation d'inhibiteurs spécifiques (C1-inhibiteur, C4 binding protein) et non spécifiques du complément (vitronectine, clusterine et protectine). Mais cette activation est insuffisante pour empêcher la formation du complexe d'attaque membranaire qui s'insert dans les membranes neuronales et provoque la mort cellulaire.

* Les protéines de phase aigüe

Les protéines de phase aigüe sont des protéines généralement produites par le foie et qui sont surexprimées en cas de réaction inflammatoire. Le taux plasmatique de ces protéines a une valeur diagnostique mais leur fonction reste encore assez obscure.

Des protéines de phase aigüe ont été mises en évidence dans les lésions de la MA. La plus connue, la protéine C réactive a été retrouvée dans les PS. C'est le cas aussi du composant P de l'amyloïde sérique présent dans toutes les formes d'amyloïdoses (Emsley *et al.*, 1994) et qui permet aux fibres amyloïdes de résister aux mécanismes de dégradation. Par ailleurs, l'α1-antichymotrypsine, l'α1-antitrypsine et l'α2-macroglobuline (inhibiteurs de protéases) qui protégeraient le malade d'un mécanisme inflammatoire protéolytique sont aussi retrouvés associés aux PS (Pour revue: McGeer et McGeer, 1995).

* Facteurs d'adhésion

Des molécules d'adhésion comme ICAM1 (ou CD54) produits par les astrocytes et LFA-1 (ou CD11a) produits par la microglie activée ont été mises en évidence dans le cerveau de patients atteints de la MA.

b) La microglie activée

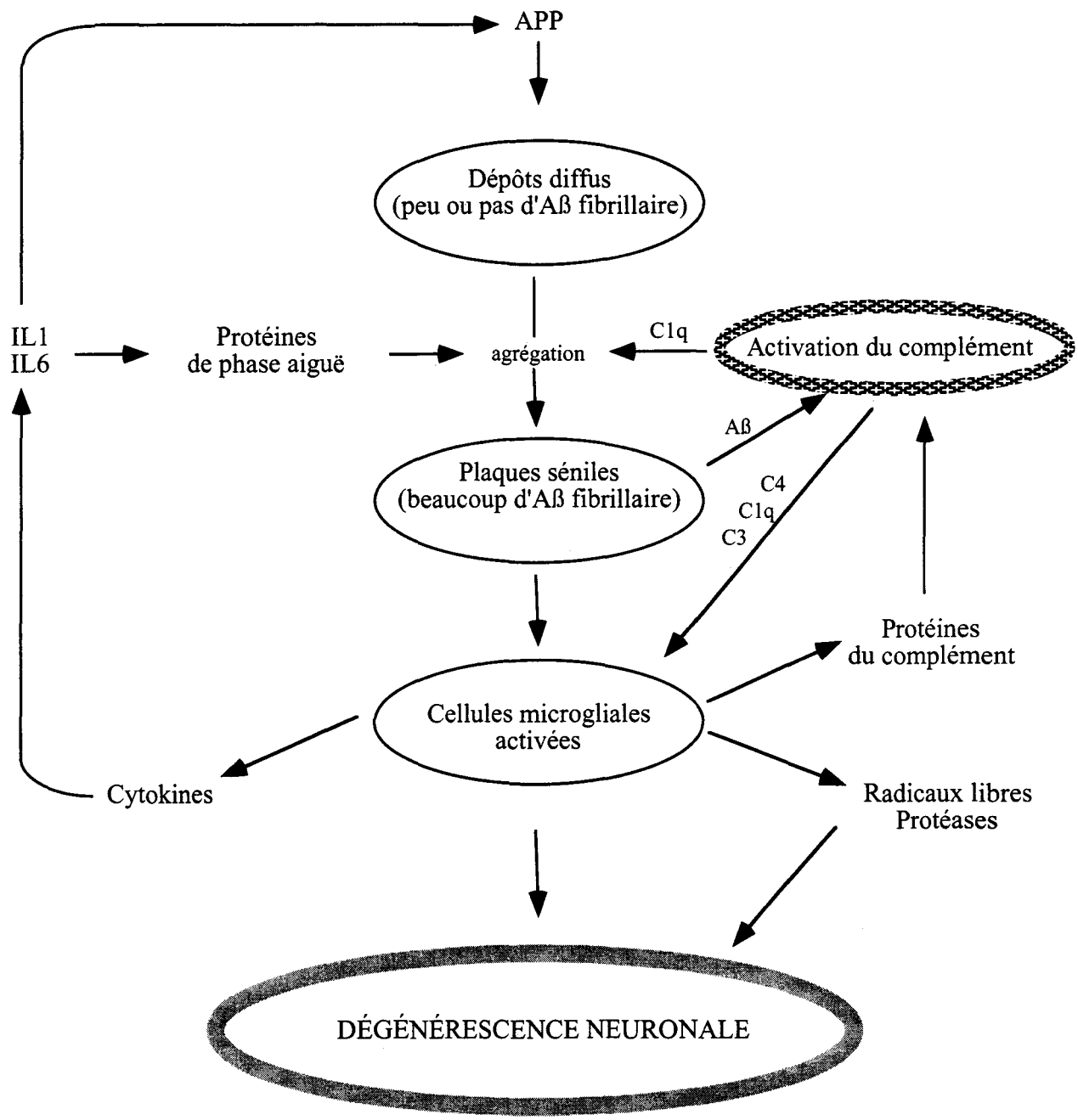
La microglie au repos peut rapidement être activée en réponse à des stimuli pathologiques subtils (Mattiace *et al.*, 1990). L'activation s'accompagne d'une forte "uprégulation" ou de l'apparition de marqueurs des macrophages. Dans la MA, les plaques neuritiques (mais non les plaques diffuses) sont associées à des amas de cellules microgliales activées, qui expriment l'antigène majeur d'histocompatibilité de classe II: HLA-DR (McGeer *et al.*, 1987), et les récepteurs du complément CR3 et CR4 (Rozemuller *et al.*, 1989). Dans le cerveau de patients atteints de la MA examinés en *post-mortem*, la microglie s'est montrée également immunoréactive avec des anticorps dirigés contre les interleukines IL-1 (Griffin *et al.*, 1989) et IL-6 (Bauer *et al.*, 1991), et le facteur de nécrose tumorale (TNF) (Dickson *et al.*, 1993). La microglie activée associée aux plaques neuritiques montre une coloration particulièrement intense pour ces cytokines. De récentes études indiquent que l'IL-1 (Griffin *et al.*, 1995) et l'IL-6 (Huell *et al.*, 1995) sont présentes aux toutes premières étapes de la formation des plaques. Il-6 pourrait ne pas être détectée dans les dépôts Aβ (essentiellement dans les plaques diffuses) des patients non déments (Huell *et al.*, 1995).

c) La plaque neuritique, site d'une réponse inflammatoire chronique

Les plaques neuritiques sont caractérisées par l'activation du complément et des amas de cellules microgliales activées, ce qui suggère fortement l'existence d'un processus inflammatoire. De plus, comme nous l'avons vu précédemment, selon Eikelenboom les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins ne montrent pas d'expression accrue des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1) qui sont impliquées dans l'adhésion et

FIGURE 6

INFLAMMATION ET CASCADE PATHOLOGIQUE



la migration des leucocytes (Eikelenboom *et al.*, 1991). Ces observations indiquent qu'il n'existe aucun influx de cellules d'origine sanguine dans les cerveaux de sujets atteints de la MA.

Prises dans leur ensemble, ces données corroborent l'hypothèse selon laquelle dans les cerveaux malades, la plaque neuritique est étroitement associée à une réponse inflammatoire chronique, médiée de façon non immunitaire, localement induite, sans influx de leucocytes du sang dans le neuropile. L'idée selon laquelle le peptide Aβ lui-même pourrait induire une réponse inflammatoire locale a été fortement renforcée par la découverte du fait que le peptide Aβ peut se lier à C1 et activer la voie classique du complément sans utilisation d'anticorps (Jiang *et al.*, 1994).

d) Inflammation et cascade pathologique

De nombreux schémas ont été proposés pour expliquer l'implication du processus inflammatoire dans la pathogénèse de la MA. Le schéma proposé par Eikelenboom (1996) semble bien résumer ce phénomène (**Figure 6**).

Le rôle des molécules inflammatoires dans le processus de cascade pathologique de la MA n'est pas encore totalement compris. Mais les découvertes actuelles suggèrent que les molécules suivantes pourraient être impliquées dans un certain nombre d'étapes clés de cette cascade (Eikelenboom *et al.*, 1994: **Figure 6**):

1/ IL-1 (peut-être en association avec IL-6) peut réguler la synthèse de l'APP (Vandenabeele *et al.*, 1991).

2/ Les protéines associées à Aβ (C1q, protéines de phase aiguë) sont impliquées dans la régulation de l'agrégation Aβ.

3/ Le peptide fibrillaire Aβ peut induire l'activation du complément. Les produits du complément initialement activés peuvent recruter et attirer la microglie. En effet, une fois au stade fibrillaire, l'activation du complément induite par Aβ entraîne la formation des

fragments d'activation C1q, C4 et C3 qui parsèment les plaques Aβ et attirent la microglie dont les cellules expriment des récepteurs du complément CR3 et CR4.

4/ Les cellules microgliales activées produisent des substances neurotoxiques, dont des protéases et des radicaux libres, susceptibles d'endommager les cellules neuronales. En outre, les cellules microgliales activées produisent des cytokines (IL1, IL6) et des protéines du complément capables de renforcer la cascade pathologique.

Dans ce chapitre, nous avons présenté les protéines inflammatoires les plus importantes, par conséquent cette liste n'est pas exhaustive.

VI.3.2.2. Les marqueurs du système immunitaire périphérique

Outre l'intervention de molécules inflammatoires dans la formation des lésions, la MA se caractérise par des modifications du système inflammatoire au niveau périphérique. De nombreux auteurs ont montré une augmentation du taux d'auto-anticorps circulants, de protéines de la phase aiguë, de cytokines, de protéines du complément, etc, dans le sang et/ou le LCR du malade.

* Les protéines de la phase aiguë

Une augmentation du taux d'α1-antichymotrypsine a été mise en évidence dans le LCR et le sérum de sujets atteints de la MA par rapport aux sujets sains (Lieberman *et al.*, 1995; Licastro *et al.*, 1995; Matsubara *et al.*, 1990). Pour Pirttila *et al.*, (1994), en revanche l'α1-antichymotrypsine ne peut être utilisé comme marqueur périphérique de la MA. Aucune variation n'a pu être observée en ce qui concerne le taux d'α2-macroglobuline et d'α1-antitrypsine présent dans le sang et le LCR du malade (Licastro *et al.*, 1995).

* Les protéines du complément

Certains auteurs ont observé une augmentation du taux de C1q dans le sérum de sujets atteints de MA. Cette augmentation semble être corrélée avec la sévérité de la démence

(Soininen *et al.*, 1993; Heinonen *et al.*, 1993). Par contre, Smyth *et al.*, (1994) ont montré une diminution de la concentration de C1q corrélée avec la sévérité de la démence dans le LCR du malade. Loeffler *et al.*, (1997) quant à eux, ont remarqué lors d'une étude sur les auto-anticorps, la présence d'une forte concentration de complexe d'attaque membranaire (C5b9) dans le LCR d'un de leurs malades.

* Les cytokines

Les résultats sont assez contradictoires mais la majorité des travaux réalisés sur les interleukines montrent peu ou pas de variation du taux d'IL1 dans le LCR ou le sérum des malades (Pirttila *et al.*, 1994; Shalit *et al.*, 1994) alors que l'on observe au contraire une augmentation de la production d'IL2 et d'IL6 corrélée avec la sévérité de la démence (Shalit *et al.*, 1994; Huberman *et al.*; 1995). De plus, certains auteurs ont constaté une augmentation de la concentration de TNFα chez les malades (Fillit *et al.*, 1991; Henneberg *et al.*, 1995), alors qu'Alvarez *et al.* (1996) ont plutôt observé une augmentation du taux de TNFα dans le sérum de sujets sains.

* Les lymphocytes

Les cellules immunitaires, qui semblent être les plus impliquées dans le mécanisme inflammatoire de la MA sont les lymphocytes T CD8+ et CD4+ (Singh, 1994; 1997).

Finalement, tous les travaux relatifs à l'inflammation systémique montrent des résultats assez contradictoires et suggèrent que ce phénomène est encore assez mal connu. Une petite partie des travaux réalisés dans ce domaine a été présentée car il est délicat d'en faire une synthèse globale. Cependant, toutes ces données témoignent de l'existence d'un dysfonctionnement du système inflammatoire au cours de la MA.

VI.3.2.3. Conclusion

Un cerveau de sujet atteint de MA se distingue d'un cerveau sain par la présence de plaques neuritiques au sein desquels s'accumulent de nombreux marqueurs de l'inflammation. Parallèlement à la caractérisation des marqueurs de l'inflammation dans les lésions de la MA, les chercheurs ont tenté de mettre en évidence des marqueurs systémiques de l'inflammation. Toutes les recherches entreprises à ce sujet ont permis d'impliquer toute une série de molécules inflammatoires sans en isoler une qui aurait pu être utilisée comme marqueur diagnostique de la MA.

Le résultat majeur qui émane de ces recherches est la mise en évidence incontestable d'un dysfonctionnement du système immunitaire et donc d'un processus inflammatoire au cours de la MA.

VI.4. HYPOTHÈSE DE LA BOUCLE AUTOTOXIQUE SELON MCGEER ET MCGEER, 1995

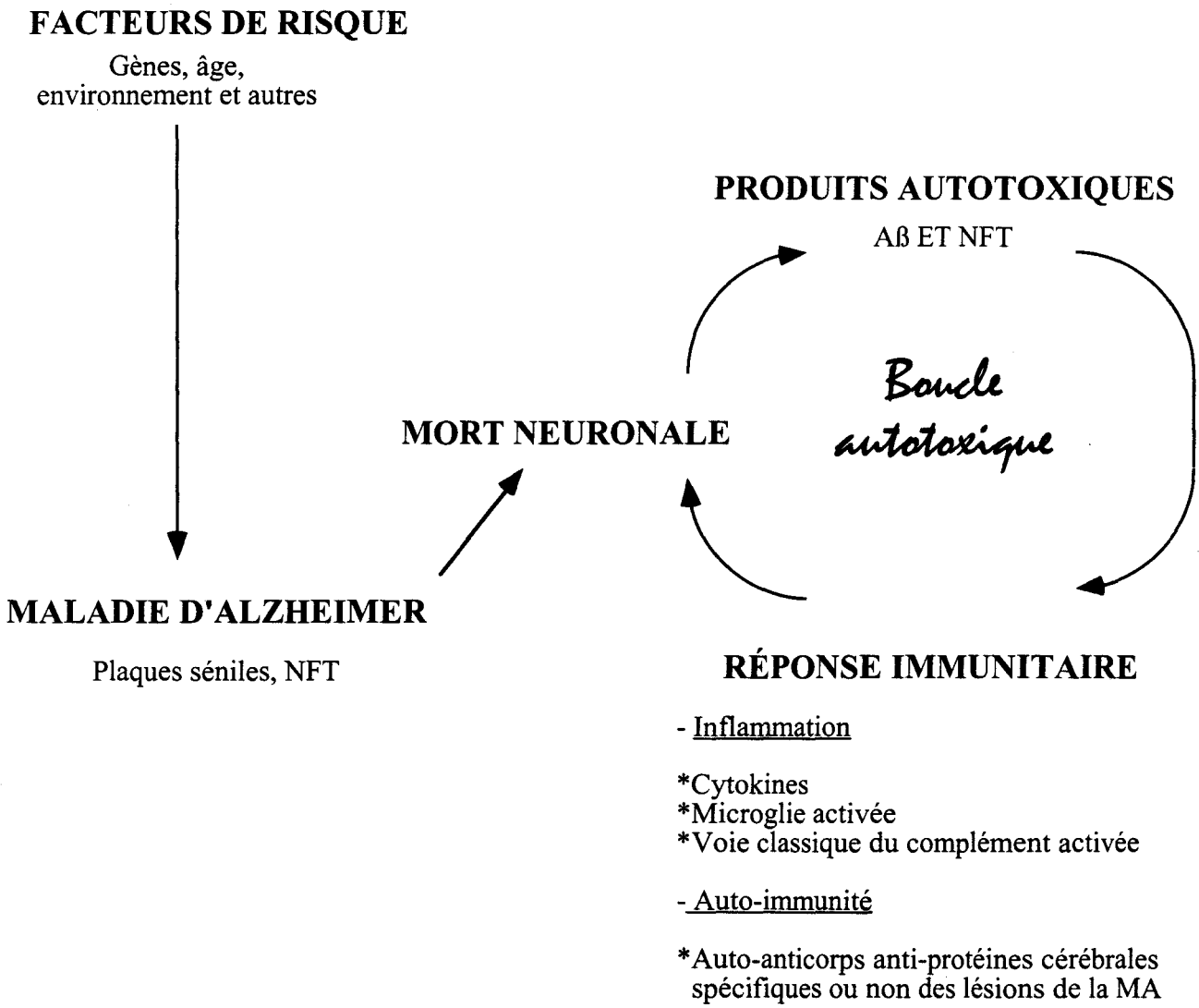
La MA peut s'installer lentement au début puis la détérioration peut devenir très rapide. Une démence sévère peut s'installer en 2 à 4 ans. Cette accélération peut s'expliquer par une boucle autotoxique (**Figure 7**).

Des facteurs de risque comme l'âge, des facteurs génétiques, contribuent au développement initial des lésions de la MA. Les enchevêtrements neurofibrillaires (NFT pour "Neurofibrillary Tangles") extracellulaires et les PS conduisent à la mort neuronale. Mais ce processus à lui seul est peu agressif et en l'absence d'amplification par un processus inflammatoire, la progression de la MA serait lente. Donc, les lésions (irritants chroniques) activent un processus inflammatoire mettant en jeu des cytokines, la microglie activée, la voie classique du complément, et un processus d'auto-immunité impliquant des auto-anticorps. Un tel mécanisme génère de nouvelles lésions (mort neuronale) qui amplifieraient

FIGURE 7

INFLAMMATION ET AUTO-IMMUNITÉ

DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER



la réponse inflammatoire etc.... Cette boucle autotoxique expliquerait le rapide déclin cognitif observé au cours de la MA.

VI.5. LES TRAITEMENTS ANTI-INFLAMMATOIRES

Plusieurs travaux indiquent une prévalence de MA plus faible parmi les patients atteints d'arthrite rhumatoïde. On a suggéré que les médicaments anti-inflammatoires prescrits dans cette affection pouvaient jouer un rôle protecteur contre la MA (McGeer et McGeer, 1990). Deux récentes études de populations indiquent une relation inverse entre l'utilisation des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et le risque de développer la MA (Andersen *et al.*, 1995). Dans une étude portant sur des jumeaux, Breitner *et al.* (1994) ont également mis en évidence une association inverse entre traitements inflammatoires et MA. Récemment, ces chercheurs ont aussi découvert, chez des sujets appartenant à des familles à haut risque de MA, qu'une utilisation prolongée d'AINS retardait également l'installation de la maladie tout en réduisant le risque (Breitner *et al.*, 1996a; 1996b).

Dans une étude portant sur des patients d'un centre de recherche sur la MA, il a été prouvé que ceux qui prenaient des AINS étaient plus performants aux tests cognitifs et, sur un an, étaient moins frappés de déclin cognitif par rapport aux non utilisateurs d'AINS (McGeer et McGeer, 1990). Dans un petit essai clinique en double aveugle, Rogers *et al.* (1993) ont découvert que le traitement par indométhacine (anti-inflammatoire) peut retarder ou prévenir l'évolution prévisible des symptômes de la MA. L'idée selon laquelle un processus inflammatoire contribue à la pathogénèse de cette maladie a donc été corroborée par des études cliniques et épidémiologiques.

VI.6. CONCLUSION

Après les annonces initiales, au début des années 80, relatives à la présence de protéines du complément et de cellules microgliales activées dans la MA, on dispose aujourd'hui de toute une masse de données démontrant que les cerveaux atteints de MA sont caractérisés par de profondes modifications inflammatoires. Cependant, aucun marqueur de l'inflammation n'a pu être utilisé dans un test diagnostique. Néanmoins, on peut estimer que, dans la MA, les travaux précliniques et épidémiologiques suggèrent des possibilités de développement de stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation de substances anti-inflammatoires.

VII. LA MALADIE D'ALZHEIMER ET LE VIEILLISSEMENT

Plusieurs arguments laissent suspecter un lien entre la MA et le vieillissement: en premier lieu, le fait que la MA survienne à partir d'un certain âge et que sa fréquence augmente quasi-proportionnellement avec l'âge. Par ailleurs, les marqueurs histologiques de la MA (DNF et PS) se retrouvent également, bien qu'en moins grande quantité, dans le cerveau vieillissant et principalement au niveau de l'hippocampe.

Les données neuropathologiques, biochimiques et cliniques de la littérature montrent que la différence entre MA et vieillissement est le plus souvent quantitative. La présence de dépôts amyloïdes diffus est souvent observée dans le néocortex de personnes âgées non démentes de plus de 75 ans (Davies *et al.*, 1988; Ikeda *et al.*, 1989; Delaere *et al.*, 1990). Des plaques neuritiques accompagnées ou non de quelques neurones en dégénérescence neurofibrillaire peuvent également être observées (Dickson *et al.*, 1991). Cependant, le vieillissement cérébral normal se distingue de la maladie d'Alzheimer par une densité moins importante et une distribution plus restreinte des lésions neuropathologiques. Par exemple, les régions corticales associatives (cortex préfrontal, temporal supérieur et pariétal) ne sont jamais touchées par la DNF au cours du vieillissement alors qu'elles sont toujours affectées au cours de la MA.

Deux hypothèses demeurent possibles:

- la MA pourrait être une simple exagération du vieillissement physiologique.
- la MA et le vieillissement constitueraient deux processus séparés et indépendants.

A l'heure actuelle, les avis sont encore très partagés et aucune étude n'a réellement permis de trancher pour l'une ou l'autre des hypothèses. Néanmoins, la piste des auto-anticorps nous semble intéressante car elle pourrait permettre de différencier les sujets âgés de ceux atteints de la MA. En effet, de nombreux auteurs ont montré des différences quantitatives mais surtout qualitatives quant à la production d'auto-anticorps entre ces deux populations.

VIII. HÉTÉROGÉNÉITÉ DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

Dans le chapitre IV, nous avons montré que la MA est une maladie hétérogène sur le plan génétique. Cette hétérogénéité existe également dans d'autres aspects de la maladie: sur le plan clinique, neuropathologique et biochimique (Scheltens *et al.*, 1993; Ikeda *et al.*, 1989; Van Broeckhoven, 1995).

Sur le plan clinique, l'hétérogénéité de la maladie d'Alzheimer est une évidence. Deux sous-groupes se distinguent selon l'âge de début de la MA: les formes préséniles (avant 65 ans) et les formes séniles (après 65 ans). Les troubles du langage qui se développent chez tous les patients dont le processus dégénératif cortical est très avancé, peuvent également constituer les premiers symptômes cliniques. Par ailleurs, la durée d'évolution de la MA est très variable. Enfin, la maladie d'Alzheimer serait observée plus fréquemment chez les femmes, même en tenant compte de leur espérance de vie plus longue.

Sur le plan neuropathologique, la distribution des 2 types de lésions de la MA est également hétérogène. Ainsi, des variations sur le plan clinique pourraient être liées à une distribution spécifique des enchevêtrements neurofibrillaires, en relation avec des circuits neuronaux précis (Hof *et al.*, 1990b). Les dépôts amyloïdes envahissent généralement l'ensemble du cerveau sans suivre un schéma défini. De plus, ces dépôts se différencient sur le plan morphologique (Ikeda *et al.*, 1989).

Sur le plan biochimique, il a été démontré par une méthode de quantification de la DNF dans l'ensemble des aires iso-corticales, que des variations inter-individuelles étaient surtout rencontrées selon un axe rostro-caudal (Vermersch *et al.*, 1992). Cette hétérogénéité sur le plan biochimique se vérifie également par l'existence de nombreux types de fragments de peptide Aß au sein des dépôts amyloïdes (Masters *et al.*, 1985; Miller *et al.*, 1993).

Il est difficile de savoir actuellement si l'hétérogénéité sur les plans génétique, clinique, neuropathologique et biochimique est le résultat de la sévérité de la maladie et/ou de la topographie des lésions, ou s'il existe réellement des sous-groupes traduisant l'influence de facteurs endogènes (génétique, sexe, processus différentiel du vieillissement...) et de facteurs exogènes (toxiques ou infectieux). Quoiqu'il en soit, ces différences sont à prendre en considération pour le diagnostic, la mise au point de marqueurs biologiques et les essais thérapeutiques.

IX. APPROCHES THÉRAPEUTIQUES

IX.1. LES MODÈLES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

A l'heure actuelle, il n'existe pas de "bon modèle" de la MA. Les systèmes *in vitro* sont trop simples et la plupart des animaux n'ont pas un cortex suffisamment développé pour être comparé à celui de l'homme.

IX.1.1. LES MODÈLES ANIMAUX

Chez le singe âgé, des troubles comportementaux pouvant évoquer un déficit de la mémoire, et des lésions cérébrales de type PS ont été décrits (Price *et al.*, 1986). Plus récemment, un modèle très prometteur a été développé. Il s'agit d'un primate lémurien (*Microcebus murinus*) qui avec l'âge développe à la fois des neurones en dégénérescence neurofibrillaire et des plaques séniles (Bons *et al.*, 1994; Delacourte *et al.* 1995).

De nombreuses études ont été entreprises pour mettre au point un modèle animal transgénique de la maladie d'Alzheimer. Les premiers résultats intéressants ont été obtenus à partir de souris transgéniques âgées de 2 à 15 mois, exprimant l'APP_{751} humaine (Quon *et al.*, 1991). De nombreux dépôts amyloïdes ont ainsi été observés au niveau du cortex et de l'hippocampe, comparativement aux souris non transfectées. Récemment, des souris transgéniques exprimant des taux élevés d'APP $humain_{717}$ ont été décrites (Games *et al.*, 1995). Ces animaux présentent des dépôts amyloïdes, des plaques neuritiques, une perte synaptique ainsi qu'une réaction gliale, mais aucune DNF. Ces résultats semblent conforter l'hypothèse selon laquelle les lésions de type amyloïde précéderaient la DNF.

BU LILLE I

IX.1.2. LES MODÈLES CELLULAIRES

De nombreuses études de transfection ont été réalisées. Certaines, par exemple, ont montré que le peptide Aß pouvait être normalement secrété sous une forme soluble par divers types cellulaires (Shoji *et al.*, 1992; Haass *et al.*, 1992). D'autres ont permis de mettre au point un modèle de cellules exprimant des protéines tau (Anderton *et al.*, 1994).

IX.2. TRAITEMENT

A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement de la MA. Cependant, de nombreux essais thérapeutiques visant à suppléer les mécanismes de neurotransmission déficitaires (aminergique, gabaergique, glutaminergique et cholinergique) ont été proposés. L'objectif principal de ces traitements est de freiner la dégradation progressive des fonctions intellectuelles et/ou d'améliorer le comportement des malades dans leurs activités quotidiennes.

Beaucoup d'autres tentatives thérapeutiques ont été réalisées telles que l'intervention de neuropeptides, de facteurs trophiques comme le NGF, d'oestrogènes, etc ... .

IX.2.1. LA TACRINE

Finalement, l'approche cholinergique qui a été abordée avec l'utilisation de précurseurs de l'acétylcholinestérase (physostigmine et tétrahydroacridine) ainsi qu'avec des agonistes cholinergiques directes, est celle qui a donné les meilleurs résultats.

Ainsi, la tacrine (THA ou 9-amino-1,2,3,4-tétrahydroacridine) a reçu une autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis et en France sous contrôle hospitalier. La tacrine agit comme un inhibiteur non compétitif et réversible de l'acétylcholinestérase (AchE: enzyme de dégradation de l'acétylcholine). En empêchant l'action de l'AchE, la tacrine permet à l'acétylcholine de rester plus longtemps dans la synapse et donc d'agir sur les sites post-

synaptiques. Elle provoque donc une augmentation de l'activité cholinergique anormalement diminuée au cours de la MA.

Un traitement de la démence doit améliorer les fonctions cognitives non seulement lors de tests, mais également lors d'un entretien et au moins stabiliser le comportement dans la vie quotidienne. Les tests utilisés pour l'évaluation clinique et neuropathologique de l'efficacité de la tacrine sont par exemple: une ADAS-cognitive (une diminution de 4 points révèle une amélioration des fonctions cognitives) et le score CGIC (une amélioration ou une stabilisation du score révèle l'efficacité du traitement).

Les avis quant à l'efficacité de la tacrine restent très partagés: son action n'est bénéfique que sur un sous-groupe de patients (au début de la maladie et dans les formes légères à modérées, mais pas dans les formes sévères). Un bilan des effets indésirables rapporte essentiellement des troubles digestifs de type cholinergique: nausées-vomissements (28% des patients traités), diarrhées (16%), dyspepsie (9%), douleurs abdominales (8%). La fréquence de ces effets est liée à la dose prescrite.

IX.2.2. CONCLUSION

L'action de la tacrine sur le système cholinergique a fait de cette molécule le premier médicament à avoir démontré un effet positif dans la MA et à avoir reçu une autorisation de mise sur le marché dans cette indication pour les formes légères à modérées. Pour beaucoup, son premier effet est même d'avoir rendu l'espoir aux patients, à leurs familles, ... et à leurs médecins. A ce titre, la tacrine représente une étape historique dans la lutte contre la démence Alzheimer. Mais ce n'est qu'un début. Des molécules très prometteuses sont expérimentées notamment des molécules visant à bloquer ou ralentir les deux grands processus pathologiques de la maladie: la formation des dépôts amyloïdes et la DNF. Des molécules qui empêcheraient l'agrégation des dépôts amyloïdes ou qui auraient un effet neuroprotecteur ont été testées (Kisilevsky *et al.*, 1995). Cependant, ces études ont été réalisées sur des

cellules neuronales en culture. Il faudrait pouvoir disposer d'un bon modèle cellulaire ou animal de la MA pour tester ces molécules, pour ensuite élargir l'étude à l'homme.

Mais encore de nombreux progrès quant à la compréhension de la pathogénèse de la MA restent à accomplir avant de pouvoir "contrôler" totalement le mécanisme d'"Alzheimerisation".

OBJECTIFS

OBJECTIFS

Toutes les recherches à visée diagnostique (recherche clinique, neuropathologique, biochimique, génétique, biologique et immunologique) présentées dans les "Généralités" sont très intéressantes pour la pathogénèse de la MA, mais aucun des marqueurs ne présente, dans l'état actuel des connaissances, une validité suffisante pour être utilisé dans un test diagnostique *ante-mortem.*

La découverte d'un marqueur périphérique de la MA apporterait un outil de choix pour la pratique clinique, la recherche de la (ou des) cause(s) de la maladie, et l'obtention de traitements efficaces. En clinique, elle permettrait d'augmenter la fiabilité du diagnostic, évitant ainsi la multiplication des hospitalisations et des examens complémentaires. Aussi, elle autoriserait le dépistage précoce des personnes à risque et l'essai de mesures préventives.

Le marqueur idéal de la MA devrait être une modification qualitative ou quantitative; aisément reproductible; observée dans un tissu facilement accessible; spécifique et enfin sensible.

Le sang est évidemment le candidat idéal pour établir un diagnostic: son prélèvement s'opère couramment et peut être répété à intervalles réguliers. Jusqu'à présent, aucun marqueur valable de la MA n'a malheureusement pu y être mis en évidence.

Néanmoins, les études concernant la recherche d'auto-anticorps spécifiques dans le sérum de patients atteints de la MA sont intéressantes mais nécessitent des investigations complémentaires. En effet, tous les travaux entrepris à ce sujet ne concernaient que des classes particulières d'auto-anticorps **(Tableau 2)**. Aucune étude n'a permis d'établir le bilan de tous les auto-anticorps anti-protéines cérébrales produits au cours du vieillissement et de la MA. Tant que cette étude comparative n'est pas réalisée, nous ne pouvons pas

conclure quant à l'existence de marqueurs immunologiques (auto-anticorps) spécifiques de la MA.

C'est pourquoi, l'objectif principal de notre thèse a été d'établir le bilan de tous les auto-anticorps produits au cours de la MA.

Une modification qualitative et/ou quantitative de la production d'auto-anticorps chez le malade permettrait de les utiliser comme marqueurs diagnostiques précoces de la MA.

Le sang étant facile d'accès, pour répondre aux critères de marqueur idéal, nous avons dû mettre au point une technique de détection d'auto-anticorps facilement reproductible, et optimiser la sensibilité du test (définie par le pourcentage de malades bien diagnostiqués parmi les malades) et sa spécificité (pourcentage de témoins diagnostiqués non malades parmi les témoins).

Avant d'aborder le chapitre "Résultats-Discussion", nous présenterons la partie "Matériels et Méthodes" car l'ensemble de l'étude est basé sur la technique des immuno-empreintes, ainsi que sur une série d'échantillons qu'il est indispensable de décrire au préalable.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. MATÉRIELS

I.1. DESCRIPTION DES POPULATIONS ÉTUDIÉES

I.1.1. POPULATION "EVA" (ISSUE DE L'ÉTUDE EVA)

I.1.1.1. Protocole d'échantillonnage

Les sérums provenant de l'étude EVA ("Study of Vascular aging and declining cognitive functions") nous ont été fournis par les Docteurs Annick ALPÉROVITCH et Claudine BERR de l'INSERM Unité 360 (Villejuif). Cette étude, visant à comparer le vieillissement "normal" au vieillissement pathologique (vasculaire), a été réalisée par les Unités INSERM 360 (Recherches Épidémiologiques en Neurologie et Psychopathologie; Villejuif) et 258 (Épidémiologie Cardiovasculaire, Hôpital Broussais, Paris).

Les sujets "EVA" sont des volontaires. Une invitation a été adressée aux sujets nés entre 1922 et 1932, inscrits sur les listes électorales de la ville de Nantes établies en 1991. D'autres sujets se sont présentés spontanément ou correspondent aux conjoints des sujets recrutés sur les listes électorales.

Ces hommes et femmes sont âgés de 60 à 69 ans, période au cours de laquelle les maladies vasculaires cérébrales et les démences sont relativement rares. L'objectif principal de l'étude EVA a donc été de suivre le vieillissement "normal" de ces sujets au cours d'une étude longitudinale sur une période de 4 années.

Pour être sélectionnés et faire partie de l'étude, ces sujets devaient répondre à plusieurs critères:

• Critères d'inclusion:

- Hommes et femmes âgés de 60 à 69 ans au moment du recrutement,
- Volontaires et ayant accepté de suivre la série d'examens prévue au cours de l'étude,
- N'ayant pas l'intention de quitter Nantes dans les 4 ans après le recrutement,
- Ne suivant aucun traitement médicamenteux.

• Critères d'exclusion:

Les personnes présentant au cours du premier examen l'un des 3 critères décrits ci-dessous ont été exclus de l'étude:

- Antécédent d'accident vasculaire cérébral,
- Détérioration cognitive indiquée par un MMS < 24,
- Symptomatologie dépressive indiquée par un CES-D > 22 pour les femmes et > 16 pour les hommes.

Pour notre propre étude (analyse des profils immunologiques), tous les sujets témoins "EVA" sortant des critères d'inclusion présentés ci-dessus à un moment ou un autre des deux premières années de l'étude longitudinale ont été systématiquement exclus. De plus, seuls les sujets ayant un MMS ≥ 28 à T0 (au début de l'étude) et à T2 (deux ans après le recrutement) ont été retenus.

Tout au long de l'étude longitudinale "EVA", ces sujets ont subi une batterie de tests neuropsychologiques tels que:

- les matrices de Raven,
- le test de rétention visuelle de Benton,
- le PASAT (Paced Auditory Serial Addition Task),
- l'échelle de Spielberger (évaluant l'anxiété),
- l'échelle d'intelligence pour adulte de Wechsler (Wais-R),

TABLEAU 3

SUJETS TÉMOINS "EVA"

N° Sérum	Nom	Diagnostic clinique	Age	Sexe	MMS T0-T2
1	238 MON	Témoin âgé	59	F	29-30
2	253 LEB	Témoin âgé	59	F	29-29
3	594 COU	Témoin âgé	59	F	30-30
4	110 BUR	Témoin âgé	60	F	29-30
5	182 DEV	Témoin âgé	60	F	30-30
6	301 LIO	Témoin âgé	60	F	30-29
7	359 GAZ	Témoin âgé	60	F	30-30
8	158 CRO	Témoin âgé	60	F	29-29
9	342 BER	Témoin âgé	60	F	30-28
10	276 BON	Témoin âgé	60	F	30-30
11	475 LEP	Témoin âgé	70	F	30-28
12	388 BRU	Témoin âgé	70	F	30-30
13	817 MAE	Témoin âgé	70	F	29-29
14	750 RUA	Témoin âgé	70	F	29-30
15	202 PIE	Témoin âgé	70	F	30-29
16	828 MOU	Témoin âgé	70	F	30-28
17	871 GER	Témoin âgé	71	F	30-30
18	377 GIR	Témoin âgé	59	H	30-29
19	697 NGU	Témoin âgé	60	H	30-30
20	86 NOE	Témoin âgé	60	H	29-30
21	460 BOU	Témoin âgé	60	H	30-30
22	886 LEG	Témoin âgé	60	H	30-29
23	177 ROP	Témoin âgé	60	H	30-29
24	170 RAV	Témoin âgé	60	H	30-28
25	724 COU	Témoin âgé	60	H	28-28
26	673 LEF	Témoin âgé	61	H	29-30
27	870 GER	Témoin âgé	70	H	30-30
28	295 DEL	Témoin âgé	70	H	30-30
29	532 PER	Témoin âgé	70	H	30-29
30	653 BOD	Témoin âgé	70	H	29-30
31	570 FOU	Témoin âgé	70	H	30-30
32	957 GUE	Témoin âgé	70	H	30-29
33	759 JOJ	Témoin âgé	70	H	29-29

Légende: H= homme; F= femme; MMS = "Mini Mental State" au début de l'étude (à T0) et deux ans après (à T2).

- le MMS et le CES-D (évaluant la dépression) utilisés lors du recrutement.

Ils ont aussi subi d'autres tests biologiques tels que des examens sanguins (numération globulaire, cholestérol, Apo A/B ...) mais aussi des questionnaires concernant l'éducation, les médicaments, le tabagisme, la consommation d'alcool, ...

I.1.1.2. Prélèvements sanguins

Un prélèvement sanguin a été effectué sur chaque sujet "EVA" à T0 lors du recrutement et à T2 (2 ans après).

I.1.1.3. Conclusion

Les sujets obtenus par le biais de l'étude "EVA" présentés dans le **Tableau 3** sont donc de "vrais" témoins âgés de 60 à 69 ans, non déments (MMS ≥ 28 à T0 et T2). L'avantage que présente cette population est qu'elle a été suivie pendant 2 ans avec une large batterie de tests neuropsychologiques, ce qui a permis d'exclure les sujets à risque (présentant par exemple des signes de démences).

I.1.2. POPULATION "ALZHEIMER"

I.1.2.1. Protocole d'échantillonnage

Tout au long de notre thèse, nous avons collecté des sérums "Alzheimer probables" provenant du service de Neurologie du Professeur Petit (Hôpital B, Lille). Nous pouvons avoir accès à certaines informations des dossiers cliniques des malades (constamment mis à jour) dans le cadre des règles en accord avec le comité d'éthique. Ces sujets venaient en consultation à l'hôpital B de Lille et sont donc originaires de la région Nord-Pas de Calais.

• Critères d'inclusion et d'exclusion:

Ces sujets ont été diagnostiqués "Alzheimer probables" selon les critères du NINCDS-ADRDA (Mc Khann *et al.*, 1984). Par ailleurs, certains de ces sujets "Alzheimer probables"

TABLEAU 4

SUJETS "ALZHEIMER"

N° Sérum	Nom	Diagnostic clinique	Age	Sexe
1	DEL	MA Probable	68	F
2	ZAL	MA Probable	70	F
3	FOU	MA Probable	70	F
4	SAN	MA Probable	63	F
5	WAR	MA Probable	68	H
6	GOL	MA Probable	69	F
7	MIL	MA Probable	76	F
8	TAL	MA Probable	66	H
9	SLI	MA Probable	77	H
10	LEC	MA Probable	68	F
11	DUC	MA Probable	72	F
12	PAW	MA Probable	80	F
13	MEZ	MA Probable	78	F
14	GRA	MA Probable	84	F
15	DER	MA Probable	73	F
16	STR	MA Probable	79	F
17	HER	MA Probable	74	F
18	EEC	MA Probable	69	F
19	DEV	MA Probable	68	H
20	LEJ	MA Probable	71	F
21	STA	MA Probable	79	F
22	FELI	MA Probable	82	H
23	CAMI	MA Probable	63	F
24	LEL	MA Probable	73	H
25	DELE	MA Probable	79	F
26	DELB	MA Probable	73	F
27	LEP	MA Probable	75	F
28	PEU	MA Probable	75	F
29	FRE	MA Probable	67	F
30	BOE	MA Probable	69	F
31	FIQ	MA Probable	81	F
32	MOD	MA Probable	68	F
33	VRO	MA Probable	58	F
34	BEL	MA Probable	77	H
35	BAI	MA Probable	80	H
36	95027	MA Probable	80	H
37	95033	MA Probable	82	H
38	DAP	MA Probable	84	F
39	LUB	MA Probable	64	F
40	RIP	MA Probable	74	H
41	ALG	MA Certifiée	79	H
42	FRA	MA Certifiée	58	H
43	CAI	MA Certifiée	64	F
44	FOU	MA Certifiée	73	H
45	MAI	MA Certifiée	63	F
46	TRO	MA Certifiée	53	F

Légende: H= homme; F= femme; MA= Maladie d'Alzheimer.

ont pu être diagnostiqués "Alzheimer confirmés" après un examen neuropathologique *post-mortem.*

I.1.2.2. Prélèvements sanguins

Un seul prélèvement sanguin a été réalisé sur ces sujets "Alzheimer".

I.1.2.3. Conclusion

Au cours de la thèse, nous avons donc constitué notre propre banque de sérums de sujets diagnostiqués "Alzheimer probables" et "Alzheimer certains" présentés dans le **Tableau 4**. Cependant, nous ne disposons malheureusement que de très peu de prélèvements de sujets diagnostiqués "Alzheimer certains". Pour limiter le risque d'erreur de diagnostic, nous avons constitué notre population "Alzheimer" de sujets "Alzheimer probables" et "Alzheimer certains" en évitant d'y inclure les sujets "Alzheimer possibles" aussi disponibles dans notre banque.

I.1.3. POPULATION "PAQUID" (ISSUE DE L'ÉTUDE PAQUID)

I.1.3.1. Protocole d'échantillonnage

Les sérums provenant de l'étude PAQUID nous ont été fournis par le Professeur DARTIGUES (INSERM Unité 330, Bordeaux). PAQUID est une enquête épidémiologique dont l'objectif général est d'étudier le vieillissement cérébral et fonctionnel après 65 ans, d'en distinguer les modalités normales et pathologiques et d'identifier les sujets à haut risque de détériorations physique ou intellectuelle chez lesquels une action préventive serait possible. L'étude a débuté en 1988 et regroupe de nombreuses Unités de recherches dont les Unités INSERM 330 (JF. DARTIGUES, Bordeaux); 360 (A. ALPÉROVITCH, Paris); 324 (F. BOLLER, Paris), 33 (E.E BEAULIEU, Paris); l'Unité CJF 95-05 (P. AMOUYEL, Lille) ... .

La population cible de l'étude est constituée par des personnes âgées de 65 ans et plus, tirées au sort sur listes électorales, vivant dans les départements de Gironde et de Dordogne avec une stratification sur la taille de la commune, l'âge et le sexe, ce qui permet d'obtenir un échantillon représentatif de la population de ces deux départements. Les sujets utilisés pour notre étude ont été tirés au sort parmi cette large population.

• Critères d'inclusion et d'exclusion:

Pour être sélectionnés, les sujets devaient:

- être âgés de 65 ans ou plus au 31/12/87,
- ne pas vivre en institution,
- être inscrits sur les listes électorales de Gironde ou de Dordogne.

Tous les sujets ont fait l'objet d'un suivi depuis 8 ans. Ce suivi comprend:

- des questionnaires (relatifs au niveau d'étude, à l'état de santé, au tabagisme, à la consommation d'alcool, ...),
- une enquête complémentaire auprès du médecin traitant comprenant l'échelle de symptomatologie dépressive (CES-D); le MMS de Folstein (nous disposons des MMS à T0; T3; T5; et T8),
- et des tests neuropsychométriques plus spécifiques comme le test de rétention visuelle de Benton; l'échelle d'intelligence de Wechsler; le test des barrages de Zazzo.

A l'issue de l'entrevue, la psychologue porte un diagnostic clinique de démence, selon les critères du DSM III R et l'échelle d'Hachinski. Si ce diagnostic est positif, le sujet est revu par un neurologue pour confirmation et bilans clinique, biologique et radiologique complémentaires. A l'issue de cette procédure, les sujets sont classés selon les critères du NINCDS-ADRDA pour l'étiologie et la démence.

Tous ces tests ont été réalisés à T0, T3, T5 et T8 et ont donc permis d'obtenir trois groupes de "sujets PAQUID" bien distincts:

TABLEAU 5

SUJETS TÉMOINS "PAQUID"

N°Sérum	Nom	Diagnostic clinique	Age	Sexe	MMS T0-T3-T5-T8
1	96 T0	Témoin âgé	67	F	29-28-30-28
2	110 T0	Témoin âgé	77	F	30-30-30-29
3	206 T0	Témoin âgé	67	F	29-28-30-29
4	237 T0	Témoin âgé	67	F	29-28-29-29
5	248 T0	Témoin âgé	66	F	29-28-30-29
6	357 T0	Témoin âgé	76	F	28-28-29-28
7	384 T0	Témoin âgé	78	F	28-29-28-28
8	409 T0	Témoin âgé	67	F	30-29-30-30
9	469 T0	Témoin âgé	81	F	29-30-30-30
10	550 T0	Témoin âgé	75	H	29-29-29-30
11	1102 T0	Témoin âgé	66	F	28-29-28-28
12	1168 T0	Témoin âgé	78	F	28-29-29-28
13	1222 T0	Témoin âgé	69	F	29-30-29-29
14	1319 T0	Témoin âgé	79	F	29-29-30-30
15	1644 T0	Témoin âgé	77	F	28-28-28-29
16	1654 T0	Témoin âgé	81	F	29-29-29-30
17	1670 T0	Témoin âgé	78	F	29-30-29-30

Légende: H= homme; F= femme; MMS= "Mini Mental State" au début de l'étude (à T0); trois ans après (à T3); cinq ans après (à T5) et huit ans après (à T8)

TABLEAU 6

SUJETS "ALZHEIMER PAQUID"

N° Sérum	Nom	Diagnostic clinique	Age	Sexe	MMS T0-T3-T5-T8	Visite à T8
1	112 T0	MA incidente	83	F	26-22-16-1	vu
2	265 T0	MA incidente	79	H	26-26-28-X	décédé
3	359 T0	MA incidente	92	F	0-X-X-X	décédé
4	390 T0	MA incidente	75	H	23-22-X-X	décédé
5	423 T0	MA incidente	82	H	24-22-22-X	refus
6	532 T0	MA incidente	85	F	29-21-23-X	décédé
7	915 T0	MA incidente	89	F	23-X-12-X	décédé
8	1010 T0	MA incidente	75	F	21-19-12-12	vu
9	1104 T0	MA incidente	78	F	15-19-X-X	refus
10	1153 T0	MA incidente	93	F	23-17-X-X	décédé
11	1348 T0	MA incidente	78	F	22-X-18-15	vu
12	1513 T0	MA incidente	80	H	24-19-X-X	décédé
13	1590 T0	MA incidente	81	F	28-25-19-22	vu
14	1821 T0	MA incidente	87	H	20-17-17-15	vu
15	2013 T0	MA incidente	88	F	26-24-20-16	vu
16	2056 T0	MA incidente	82	H	27-0-X-X	décédé
17	2155 T0	MA incidente	90	F	23-14-X-X	décédé
18	2302 T0	MA incidente	84	F	17-X-7-0	vu
19	2617 T0	MA incidente	80	F	27-25-21-X	décédé
20	5028 T0	MA incidente	84	F	26-29-22-19	vu
21	5061 T0	MA incidente	68	F	27-27-24-X	déménagé
22	244 T0	MA prévalente	77	F	8-0-0-0	vu
23	430 T0	MA prévalente	80	H	0-12-13-4	vu
24	431 T0	MA prévalente	79	F	0-16-X-X	décédé
25	452 T0	MA prévalente	102	F	0-X-X-X	décédé
26	709 T0	MA prévalente	75	H	12-X-0-X	décédé
27	801 T0	MA prévalente	85	F	0-X-X-X	décédé
28	1063 T0	MA prévalente	82	H	X-X-X-X	décédé
29	1233 T0	MA prévalente	85	F	9-5-0-X	décédé
30	1650 T0	MA prévalente	93	F	15-10-10-X	décédé
31	1766 T0	MA prévalente	78	H	12-X-X-X	décédé
32	1925 T0	MA prévalente	89	F	19-10-X-X	décédé
33	1926 T0	MA prévalente	79	F	16-13-17-9	vu
34	2200 T0	MA prévalente	85	F	8-8-X-X	décédé
35	2496 T0	MA prévalente	87	F	0-X-X-X	décédé
36	2498 T0	MA prévalente	95	F	0-X-X-X	décédé
37	2588 T0	MA prévalente	80	F	9-7-X-X	décédé
38	3098 T0	MA prévalente	75	H	X-X-X-X	décédé
39	3108 T0	MA prévalente	81	F	6-X-X-X	décédé

Légende: H= homme; F= femme; MMS= "Mini Mental State" au début de l'étude (à T0); trois ans après (à T3); cinq ans après (à T5) et huit ans après (à T8); X= test MMS non réalisé.

1/ Les sujets "témoins PAQUID": sujets non déments jusqu'à T8 et dont le MMS était toujours supérieur à 23 (sans baisse du MMS entre le MMS initial et celui à T8). Pour notre étude, nous avons sélectionné les sujets témoins ayant des MMS ≥ 28 à T0, T3, T5 et T8.

2/ Les sujets "Alzheimer prévalents": sujets déments initialement à T0 (diagnostiqués "Alzheimer probables" selon les critères du NINCDS-ADRDA).

3/ Les sujets "Alzheimer incidents": sujets devenus déments au cours du suivi à T1, T3, T5 ou T8 (diagnostiqués "Alzheimer probables" selon les critères du NINCDS-ADRDA).

I.1.3.2. Prélèvements sanguins

Les trois groupes de "sujets PAQUID" ont été prélevés à T1 (1 an après le recrutement). Les sujets témoins ont aussi été prélevés à T8 (8 ans après le début de l'étude).

I.1.3.3. Conclusion

Cet échantillon "PAQUID" apporte un avantage considérable. En effet, il contient en particulier des sujets "Alzheimer incidents", ce qui permettra de valider la sensibilité d'un diagnostic précoce. La liste des "témoins PAQUID" est présentée dans le **Tableau 5** et celle des "Alzheimer PAQUID" dans le **Tableau 6**.

I.1.4. POPULATION "JEUNE" TÉMOIN

I.1.4.1. Protocole d'échantillonnage

Ces sujets jeunes âgés de 17 à 52 ans sont des volontaires recrutés au sein du personnel de laboratoires de recherche du Nord-Pas de Calais. Hormis un prélèvement sanguin, ces sujets n'ont subi aucun autre examen biologique ni test psychologique.

TABLEAU 7

SUJETS TÉMOINS JEUNES

N° Sérum	Nom	Diagnostic clinique	Age	Sexe
1	Hio	Témoin jeune	17	H
2	Dev	Témoin jeune	29	H
3	Des	Témoin jeune	29	H
4	Bla	Témoin jeune	23	F
5	Bil	Témoin jeune	21	F
6	Mor	Témoin jeune	24	F
7	SJ1	Témoin jeune	24	H
8	SJ2	Témoin jeune	23	F
9	SJ3	Témoin jeune	26	H
10	SJ4	Témoin jeune	28	F
11	SJ5	Témoin jeune	25	F
12	SJ7	Témoin jeune	27	F
13	SJ8	Témoin jeune	27	H
14	SJ12	Témoin jeune	25	F
15	Aub	Témoin jeune	37	H
16	Now	Témoin jeune	34	H
17	Dho	Témoin jeune	37	H
18	Deb	Témoin jeune	31	F
19	Del	Témoin jeune	37	H
20	Bla	Témoin jeune	36	H
21	Dhon	Témoin jeune	39	H
22	Ven	Témoin jeune	38	F
23	Hid	Témoin jeune	32	F
24	SJ6	Témoin jeune	33	H
25	SJ9	Témoin jeune	31	H
26	SJ10	Témoin jeune	33	H
27	SJ11	Témoin jeune	33	F
28	SJ13	Témoin jeune	42	F
29	Meu	Témoin jeune	43	H
30	Pan	Témoin jeune	47	H
31	Car	Témoin jeune	50	F
32	Cor	Témoin jeune	44	F
33	Koc	Témoin jeune	47	H
34	Les	Témoin jeune	46	H
35	Lec	Témoin jeune	48	F
36	Sam	Témoin jeune	42	H
37	Fri	Témoin jeune	46	H
38	Lan	Témoin jeune	41	F
39	SJ14	Témoin jeune	49	H
40	Bir	Témoin jeune	42	H
41	Da	Témoin jeune	52	H
42	Del	Témoin jeune	52	H

Légende: H= homme; F= femme.

TABLEAU 8

SUJETS À DIAGNOSTIC "CONFIRMÉ"

N° Sérum	Nom	Diagnostic neuropathologique	Age	Sexe	Provenance du sérum
1	Poz	Témoin	98	F	Hôpital E. Roux, Limeil-Brevannes
2	Pey	Témoin	93	H	Hôpital E. Roux, Limeil-Brevannes
3	Var	Témoin	84	F	Hôpital E. Roux, Limeil-Brevannes
4	Cros	Témoin	72	F	Hôpital E. Roux, Limeil-Brevannes
5	Coa	Témoin	76	H	Hôpital E. Roux, Limeil-Brevannes
6	Delu	Témoin	98	F	Hôpital B, Lille
7	Mag	Témoin	95	F	Hôpital E. Roux, Limeil-Brevannes
8	Joa	Témoin-début d'atteinte	92	F	Hôpital E. Roux, Limeil-Brevannes
9	Mal	MA Certifiée	37	F	Hôpital B, Lille
10	Fai	Démence mixte	92	F	Hôpital E. Roux, Limeil-Brevannes
11	Ord	Démence type frontale	59	F	Hôpital B, Lille
12	Har	Démence mixte	[illegible]	[illegible]	Hôpital E. Roux, Limeil-Brevannes
13	Han	Témoin	95	F	Hôpital E. Roux, Limeil-Brevannes

Légende: H= homme; F= femme; MA= maladie d'Alzheimer. Le sujet N°8 (début d'atteinte) présente des troubles neuropsychologiques faisant penser à un début de démence. Démence mixte = démence vasculaire (artériopathique) et dégénérative (ici MA); Démence de type frontal = démence neurodégénérative touchant préférentiellement les lobes frontaux.

I.1.4.2. Conclusion

Il est généralement plus difficile de trouver des sujets témoins jeunes que des sujets témoins âgés. Cependant, pour valider un test diagnostique (vérifier la spécificité) et pour étudier le vieillissement, une population de sujets jeunes est indispensable. C'est pourquoi nous avons recruté des volontaires dans notre entourage (personnel de laboratoire) pour constituer cet échantillon. La liste de ces sujets est présentée dans le **Tableau 7**.

I.1.5. POPULATION "CONFIRMÉE"

Nous avons constitué une population contenant des sujets "témoins", "Alzheimer" ou "atteints d'autres maladies neurodégénératives" avec un diagnostic "confirmé" par un examen neuropathologique. Ces sujets ont été suivis par J.P. DAVID à l'hôpital E. ROUX (Limeil-Brevannes, service du Docteur DI-MENZA) et par le Professeur P. VERMERSCH dans le service du Professeur PETIT (Hôpital B, Lille). Ces individus présentés dans le **Tableau 8** constituent un bon échantillon pour la validation d'un test diagnostique.

I.1.6 . POPULATION "AUTRES MALADIES NEURODÉGÉNÉRATIVES"

Un échantillon constitué de sujets atteints de maladies neurodégénératives autres que la MA est nécessaire pour vérifier la spécificité d'un test diagnostique. Nous avons choisi, pour constituer cette population, des maladies pour lesquelles le diagnostic clinique peut se confondre avec celui de la MA:

- la démence de type frontal (démence neurodégénérative touchant préférentiellement voire exclusivement les lobes frontaux),
- la démence vasculaire (démence artériopathique),
- la Paralysie Supranucléaire Progressive (démence neurodégénérative affectant préférentiellement les structures sous-corticales),

TABLEAU 9

SUJETS ATTEINTS D'AUTRES MALADIES NEURODÉGÉNÉRATIVES

N° Sérum	Nom	Diagnostic clinique	Age	Sexe
1	7067	Démence type frontal	47	H
2	7049	Démence type frontal	61	F
3	7019	Démence type frontal	72	F
4	1497	Démence type frontal	73	F
5	1486	Démence type frontal	69	F
6	1485	Démence type frontal	66	F
7	1479	Démence type frontal	63	H
8	1474	Démence type frontal	62	F
9	7151	Démence vasculaire	86	H
10	7072	Démence vasculaire	71	H
11	7068	Démence vasculaire	70	H
12	1473	Démence vasculaire	82	H
13	7104	Démence vasculaire	65	F
14	5193	Démence vasculaire	71	H
15	1449	Démence vasculaire	69	F
16	1081	Démence vasculaire	76	H
17	7361	Paralysie supranucléaire progressive	70	H
18	7367	Paralysie supranucléaire progressive	72	H
19	1477	Paralysie supranucléaire progressive	64	H
20	7363	Hydrocéphalie à pression normale	69	H
21	7362	Hydrocéphalie à pression normale	58	H
22	7206	Hydrocéphalie à pression normale	61	F

Légende: H= homme; F= femme.

- et l'hydrocéphalie à pression normale (démence due à une accumulation de LCR dans les ventricules cérébraux).

Ces sujets ont été suivis, diagnostiqués et prélevés au sein du service du Professeur PETIT (Hôpital B, Lille).

La liste de ces malades est présentée dans le **Tableau 9.**

I.1.7. POPULATION "TACRINE" (ISSUE DE L'ÉTUDE "TACRINE")

I.1.7.1. Protocole d'échantillonnage

Les sujets de l'étude "Tacrine" (témoins non traités; malades répondeurs ou non à la tacrine) nous ont été fournis par A.S. RIGAUD-MONNET (service du Professeur F. FORETTE, Hôpital Broca, Paris).

Cette étude, toujours en cours, consiste à déterminer le profil d'auto-anticorps sériques anti-protéines cérébrales et à chercher la corrélation éventuelle avec la qualité de la réponse à la tacrine.

Les sujets malades "répondeurs ou non répondeurs à la tacrine" sont des patients ambulatoires âgés de plus de 50 ans et répondant aux critères d'inclusion et d'exclusion suivants:

• Critères d'inclusion:

- patients pour lesquels le diagnostic de démence dégénérative a été établi selon les critères du DSM IV et le diagnostic de MA probable selon les critères du NINCDS-ADRDA,

- patients pour lesquels le degré de gravité des troubles cognitifs est mineur ou modéré: MMS > 15.

• Critères d'exclusion:

- troubles sensoriels, visuels ou auditifs, incompatibles avec les tests,

- troubles du langage majeurs,

- affection en cours contre-indiquant le traitement par la tacrine, c'est-à-dire des troubles hépatiques, rénaux ou hématologiques, hypertrophie prostatique, glaucome, maladie pulmonaire obstructive ou insuffisance cardiaque grave.

• Traitement:

Le traitement par la tacrine a débuté à la dose de 40 mg toutes les 6 semaines jusqu'à la dose maximale de 160 mg par jour en fonction de la tolérance clinique et biologique du patient. Une évaluation clinique et neuropsychologique de la réponse au traitement par la tacrine est réalisée avec la batterie de tests suivants: ADAS-cognitive, MMS et Score CGIC. Ces tests sont réalisés avant chaque changement de traitement à 40 mg puis 80 mg, puis après deux mois de traitement par 120 mg et enfin à 160 mg. L'efficacité de la tacrine permettant de distinguer le groupe des répondeurs de celui des non-répondeurs est jugée à la posologie maximale tolérée à partir de deux types de critères:

1 - une diminution d'au moins 4 points à la sous-échelle ADAS-cognitive à l'une quelconque des 4 doses,

2 - une amélioration ou stabilisation du MMS et du score CGIC.

• Remarque: un groupe de sujets témoins non traités et non déments a été constitué: il s'agit des conjoints volontaires des sujets malades. Ces témoins "Tacrine" ont un MMS supérieur ou égal à 29.

I.1.7.2. Prélèvements sanguins

Pour le projet "Tacrine", deux prélèvements sanguins ont été réalisés sur chaque sujet: un avant le début du traitement à la tacrine (T0) et un second 6 mois après (T6mois). Cependant, les sujets utilisés au cours de notre étude ont uniquement été prélevés à T6mois.

I.1.7.3. Conclusion

Finalement, cette étude "Tacrine" étant toujours en cours, nous n'avons disposé pour notre thèse que de très peu de sujets (n=46 pour les trois groupes "témoins", "Alzheimer

TABLEAU 10

Sujets répondeurs et non répondeurs à la tacrine

N° Sérum	Nom	Diagnostic clinique	Age	Sexe
1	NA 2	MA répondeur	62	F
2	MB 29	MA répondeur	85	F
3	GB 28	MA répondeur	73	H
4	CB 31	MA répondeur	76	F
5	FD 7	MA répondeur	78	H
6	JD 12	MA répondeur	69	H
7	GF 8	MA répondeur	75	H
8	AN 6	MA répondeur	89	F
9	MV 18	MA répondeur	79	F
10	MS 33	MA répondeur	79	F
11	PR 37	MA répondeur	78	H
12	ET 49	MA répondeur	84	F
13	MLP 23	MA répondeur	83	F
14	LMD 36	MA répondeur	83	F
15	IM 10	MA répondeur	80	F
16	MM 9	MA répondeur	88	F
17	DL 15	MA répondeur	86	F
18	MD 14	MA répondeur	86	H
19	MD 30	MA répondeur	86	F
20	NZ 38	MA répondeur	86	F
21	MR 47	MA répondeur	86	H
22	JB 32	MA répondeur	75	H
23	SC 13	MA non-répondeur	75	F
24	GE 26	MA non-répondeur	84	F
25	JD 16	MA non-répondeur	70	H
26	RP 3	MA non-répondeur	73	F
27	LR 24	MA non-répondeur	85	F
28	JS 20	MA non-répondeur	74	H
29	SZ35	MA non-répondeur	74	F

Légende: H= homme; F= femme; MA= maladie d'alzheimer, répondeurs et non-répondeurs= sujets traités par la tacrine, répondeurs ou non.

TABLEAU 11

SUJETS TÉMOINS "TACRINE"

N° Sérum	Nom	Diagnostic clinique	Age	Sexe
1	SB 27	Témoin âgé	73	F
2	DD 17	Témoin âgé	70	F
3	RB 21	Témoin âgé	79	H
4	JD 25	Témoin âgé	86	H
5	JGR 22	Témoin âgé	67	F
6	GM 11	Témoin âgé	70	H
7	JJN 5	Témoin âgé	89	H
8	MP 4	Témoin âgé	75	H
9	MA 52	Témoin âgé	80	H
10	JT 50	Témoin âgé	84	H
11	VR 54	Témoin âgé	67	H
12	RL 44	Témoin âgé	83	H
13	GA 41	Témoin âgé	74	H
14	LP 56	Témoin âgé	70	F
15	RS 34	Témoin âgé	86	H
16	EL 46	Témoin âgé	74	F
17	SR 48	Témoin âgé	70	F

Légende: H= homme; F= femme.

répondeurs" et "Alzheimer non répondeurs"). Néanmoins, cet échantillon permettra, par une première approche, d'avoir une idée des profils d'auto-anticorps des sujets répondeurs et non répondeurs à la tacrine. De plus, ce groupe "Tacrine" constitue un bon échantillon pour valider la spécificité et la sensibilité d'un test diagnostique. La liste de ces sujets est présentée dans les **Tableaux 10 et 11.**

I.1.8. CONCLUSION

Toutes ces populations ont été utilisées au cours de notre thèse, soit:

• pour analyser les profils d'auto-anticorps au cours de la MA (populations "Alzheimer" et "EVA") afin d'établir un test diagnostique,

• pour valider les tests que nous avons établi (population "PAQUID", population "jeune", population "confirmée", population "autres maladies neurodégénératives", population "tacrine"),

• pour étudier le vieillissement (population "EVA", population "jeune"),

• ou encore pour comparer les profils immunologiques des sujets répondeurs ou non à la tacrine (population "Tacrine").

Toutes les populations (hormis le groupe de sujets "jeunes") ont été suivies (étude longitudinale) pendant 6 mois (pour la population "Tacrine") à 8 ans (pour la population "PAQUID"), ce qui réduit le risque d'erreur de diagnostic. Par conséquent, tous ces sujets constituent des populations très fiables pour notre étude.

I.2. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DES SÉRUMS

Tous les prélèvements sanguins de cette étude ont été effectués dans les mêmes conditions. Ils ont été réalisés dans des tubes traités à l'héparine (inhibiteur de la coagulation) lorsque nous voulions récupérer le plasma et dans des tubes secs (non traités)

pour prélever le sérum (plasma sans fibrinogène). Au cours de notre thèse, nous avons principalement travaillé avec le sérum.

Ces tubes sont ensuite centrifugés pendant 20 minutes à 1 800 tours par minute. Le surnageant (sérum ou plasma selon le tube) est prélevé, puis dilué dans 50% de glycérol pour éviter les chocs dus à des congélations et décongélations successives. Les échantillons sériques et plasmatiques sont alors stockés à - 80 °C.

I.3. MATÉRIEL AUTOPSIQUE

Le matériel autopsique a été obtenu par le CHU de Lille, France.

Les autopsies ont été réalisées quelques heures après le décès. Le matériel est soit fixé pour un travail histologique, soit congelé à - 80 °C dans l'optique d'une étude biochimique.

Au cours de la thèse, nous avons principalement utilisé un seul et même cortex cérébral pour l'homogénéité de l'étude.

Ce cerveau provient d'un patient diagnostiqué "Alzheimer certain". L'aire corticale que nous avons utilisé est le pôle frontal (région sévèrement touchée au cours de la MA).

Nous avons choisi de travailler avec ce type de tissu car il renferme à la fois les antigènes normaux et pathologiques présentés *in vivo* au système immunitaire du malade.

I.4. SONDES IMMUNOLOGIQUES

Nous avons utilisé différents anticorps monoclonaux et polyclonaux au cours de notre étude.

I.4.1. ANTICORPS POLYCLONAUX

I.4.1.1. Anticorps anti-neurofilaments

L'anticorps polyclonal anti-NF (345) a été préparé dans le laboratoire à partir d'une préparation de NF, selon le protocole d'immunisation décrit par Vaitukaitis *et al.*, 1971. Il est utilisé en immuno-empreintes à la dilution de 1:2000, et il détecte dans un homogénat de cerveau humain (Alzheimer ou témoin) le triplet de NF: NF-H à 210 kDa, NF-M à 160 kDa et NF-L à 70 kDa.

Cet anticorps a été utilisé pour identifier les auto-anticorps anti-NF sériques humains.

I.4.1.2. Anticorps anti-spectrine humaine

Un anticorps anti-spectrine humaine commercialisé par Sigma-Aldrich Chimie a été utilisé pour identifier certains auto-anticorps sériques humains.

Il a été préparé chez le lapin à partir des chaînes α et β de la spectrine érythrocytaire humaine. Cet anticorps a été utilisé en immuno-empreintes à la dilution de 1:800.

I.4.1.3. Anticorps anti-fodrine humaine

Un anticorps anti-fodrine humaine (spectrine cérébrale) préparé à partir de fodrine de cerveau de porc, a été utilisé en immuno-empreintes à la dilution de 1:500 pour la caractérisation des auto-anticorps.

I.4.1.4. Anticorps anti-préalbumine (transthyrétine)

Cet anticorps produit chez la chèvre à partir de préalbumine humaine (Dako) a été utilisé en immuno-empreintes à la dilution de 1/500.

I.4.1.5. Anticorps anti-protéines sériques

Cet anticorps produit chez le lapin à partir de sérum humain (Sigma BioSciences) a été utilisé pour mettre en évidence l'origine cérébrale des antigènes reconnus par les auto-anticorps sériques.

I.4.2. ANTICORPS MONOCLONAUX

I.4.2.1. Anticorps anti-tau-PHF (AD2)

L'anticorps monoclonal anti-tau-PHF a été élaboré dans le laboratoire (Buée-Scherrer *et al.*, 1996a) à partir de préparations de protéines tau-PHF humaines. Cet anticorps dépendant de la phosphorylation, détecte par immuno-empreintes sur un homogénat de cerveau "Alzheimer" le triplet de protéines tau pathologiques (tau 69, tau 64, tau 55). Il a été utilisé à la dilution de 1:8000.

I.4.2.2. Anticorps anti-GFAP

Un anticorps monoclonal anti-GFAP a été utilisé pour caractériser les auto-anticorps sériques humains anti-GFAP. Il a été préparé à partir de peptides synthétiques, et il est utilisé au 1:20 000 en immuno-empreintes. Cet anticorps détecte la protéine gliofibrillaire acide (de 50 kDa) et ses produits de dégradation dans les homogénats de cerveaux "Alzheimer" et "témoin".

I.4.2.3. Anticorps anti-bande 3

L'anticorps monoclonal anti-bande 3 humain commercialisé par Sigma-Aldrich Chimie a été élaboré à partir de la glycophorine B érythrocytaire humaine. Cet anticorps reconnaît par immuno-empreintes différentes protéines: la bande 3 à environ 90-100 kDa et des peptides de masse moléculaire inférieure; aux environs de 60, 40 et 20 kDa. Cet anticorps a été utilisé en immuno-empreintes à des dilutions variant de 1:1000 à 1:200 pour caractériser les auto-anticorps sériques humains anti-bande 3.

I.5. TÉMOINS DE MASSE MOLÉCULAIRE

Différents types de témoins de masse moléculaire (TPM) ont été testés au cours de la thèse. Cependant, les plus appropriés pour notre étude sont les TPM commercialisés par Novex, Mark 12. En effet, leurs masses moléculaires varient de 2,5 à 200 kDa. Ces TPM sont bien visibles sur un gel de polyacrylamide 10-20 %. Ils ont donc permis de déterminer la masse moléculaire de tous les antigènes détectés par les auto-anticorps sériques humains.

I.6. MATÉRIEL INFORMATIQUE

Un logiciel Image Master (IM1D, Pharmacia Biotech) pour Macintosh a été utilisé pour la quantification de l'immunoréactivité des auto-anticorps. Un autre logiciel pour PC: SAS (marque déposée par SAS institute) a été utilisé pour l'analyse statistique de nos résultats.

Cette analyse statistique a été réalisée par NADIA TAHRI dans le cadre d'un stage de DEA au laboratoire de Biomathématiques de la Faculté de Pharmacie de Lille II (du Professeur BONIFACE).

II. MÉTHODES

II.1. ANALYSE BIOCHIMIQUE

II.1.1. HOMOGÉNÉISATION DU TISSU CÉRÉBRAL

Le cortex frontal est disséqué et homogénéisé par pottérisation dans la solution de Laemmli (Laemmli, 1970) à la concentration de 10% (p/v).

La solution de Laemmli est constituée de:

Tris-HCL	50 mM	pH 6,8
SDS	5% (p/v)	
EDTA	4 mM	
EGTA	3 mM	
Glycérol	10%	

Cette solution est stockée à - 80°C.

Après l'étape d'homogénéisation, les échantillons sont chauffés à 100°C pendant 10 minutes puis stockés à - 80°C.

Avant d'être déposé sur gel de polyacrylamide en vue d'une électrophorèse, 0,25% (p/v) de dithiothréitol (DTT) ainsi que du bleu de bromophénol (traces) sont ajoutés dans l'homogénat cérébral.

II.1.2. ÉLECTROPHORÈSE MONODIMENSIONNELLE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN SOLUTION SDS

Les électrophorèses sont réalisées sur gel de polyacrylamide en gradient 10-20% et en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS 0,1%) ou SDS-PAGE (pour le terme anglais "SDS-polyacrylamide-gel electrophoresis").

• Gels de séparation:

	Solution d'acrylamide à 10%	Solution d'acrylamide à 20%
	pH 8,8	pH 8,8
Tris HCl	0,3 M	0,3 M
Acrylamide	10%	20% (p/v)
Bis acrylamide	0,266%	0,532% (p/v)
SDS	0,1%	0,1% (p/v)
Temed	300 µl	300 µl
Glycérol		200 ml
H_2O	qsp 1000 ml	qsp 1000 ml

13,5 ml de chaque solution sont utilisés pour former le gradient 10-20%.

Un gel de concentration à 5% d'acrylamide (5 ml) est coulé au dessus des 27 ml de gel de séparation.

• Gels de concentration:

	Solution d'acrylamide à 5%
	pH 6,8
Tris HCl	0,1 M
Acrylamide	5% (p/v)
Bis acrylamide	0,08% (p/v)
SDS	0,1% (p/v)
Temed	500 µl
H_2O	qsp 1000 ml

La polymérisation est amorcée par l'addition de 200 µl de persulfate d'ammonium (à 100mg/ml) pour 27 ml de gel de séparation et pour 5 ml de gel de concentration. La dimension des plaques est de 140 x 140 x 1,5 mm.

Les dépôts sont généralement effectués dans un seul puits faisant toute la largeur de la plaque. Le volume d'homogénat cérébral déposé dans ces conditions est de 500 µl.

La séparation des protéines est réalisée pendant une nuit à 70 V constants avec un tampon d'électrophorèse Tris-Glycine.

• Tampon d'électrophorèse:

Tris HCl	25 mM	pH 8,3
Glycine	0,2 M	
SDS	0,1% (p/v)	
H_2O	qsp 1000 ml	

II.1.3. TECHNIQUE DES IMMUNO-EMPREINTES

Une fois séparées en fonction de leur masse moléculaire, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (0,45 µm, Schleicher & Schuell) pendant 90 minutes (courant: 0,8 mA par cm^2) en milieu semi-liquide sur LKB Multiphor II Nova Blot selon les instructions du fabricant:

• Tampon "anode":

Tris HCl	0,3 M	pH 10,4
Méthanol	20% (v/v)	
H_2O	qsp 1000 ml	

• Tampon "cathode":

Acide 6-amino-n-hexanoïque	40 mM	pH 7,6
Méthanol	20% (v/v)	
H_2O	qsp 1000 ml	

Une coloration réversible au rouge ponceau permet de contrôler l'efficacité du transfert.

• Solution de rouge ponceau:

Acide trichloroacétique	3% (p/v)
Rouge ponceau	0,2% (p/v)
H_2O	qsp 1000ml

La technique des immuno-empreintes est réalisée d'après la méthode de Townbin (Townbin *et al.*, 1979) légèrement modifiée. Après le transfert, la membrane est saturée 30 minutes par une solution de TNT (Tris HCl 15 mM, pH 8; NaCl 0,3 M; Tween-20 0,05% (p/v)) contenant 5% (p/v) de lait délipidé.

La membrane est alors découpée en bandelettes de 7 mm de largeur et chaque bandelette est incubée 90 min à 20°C avec le sérum humain à analyser ou 2 heures à température ambiante avec l'anticorps primaire monoclonal ou polyclonal.

Les sérums humains (avec 50% de glycérol) sont dilués au 1/50 dans le tampon TNT avec 5% de lait. La dilution des anticorps monoclonaux et polyclonaux est variable suivant l'anticorps et leur incubation peut être faite soit dans le tampon TNT avec 5% de lait soit dans le TNT sans lait.

Après plusieurs rinçages dans le tampon TNT, les bandelettes sont incubées avec l'anticorps secondaire. Les anticorps secondaires marqués à la péroxydase (Sigma-Aldrich Chimie) sont:

- soit des anticorps anti-IgG humaines Fc spécifiques (reconnaissant le fragment Fc des IgG humaines) lorsque l'anticorps primaire est un sérum humain. Ces anti-IgG Fc spécifiques (commercialisés par Sigma Aldrich Chimie) sont utilisés en immuno-empreintes à la dilution de 1/20000,

- soit des anticorps anti-Ig de souris ou de lapin produits chez la chèvre suivant la nature de l'anticorps primaire utilisé (monoclonale ou polyclonale). Ils sont généralement utilisés en immuno-empreintes à la dilution de 1/4000. Ces anticorps sont commercialisés par Sigma Aldrich Chimie.

L'anticorps secondaire anti-IgG humaines est incubé 45 min à 20°C dans du tampon TNT avec 5% de lait et les anti-Ig de souris ou de lapin sont incubés 1 heure à température ambiante dans du tampon TNT sans lait.

Après l'étape d'incubation avec l'anticorps secondaire, les bandelettes sont rincées à plusieurs reprises dans du tampon TNT.

La détection des complexes "antigène-anticorps primaire-anticorps secondaire marqué à la péroxydase" est réalisée avec le kit ECL ("Enhanced chemiluninescence") commercialisé par la société Amersham. Le principe de ce kit est l'oxydation d'un dérivé cyclique: le luminol, en présence d'eau oxygénée (H_2O_2) et de la péroxydase (couplée à l'anticorps secondaire). Pour revenir à l'état stable, le luminol émet alors une "lumière" (photons) dont l'intensité est fortement augmentée par des résidus phénoliques. Ce sont ces photons qui, en impressionnant un film (Hyperfilm-ECL, Amersham), permettent de visualiser les complexes "antigène-anticorps primaire-anticorps secondaire marqué à la péroxydase" formés sur la membrane de nitrocellulose.

Les temps d'exposition utilisés pour révéler une membrane incubée avec un sérum humain sont généralement plus longs (10 à 20 mn) que ceux utilisés pour révéler une membrane incubée avec un anticorps primaire mono- ou polyclonal (10 secondes à 10 mn). Ceci s'explique par le fait que la concentration des auto-anticorps contenus dans le sérum

FIGURE 8

TECHNIQUE DES IMMUNO-EMPREINTES
adaptée à la détection d'auto-anticorps

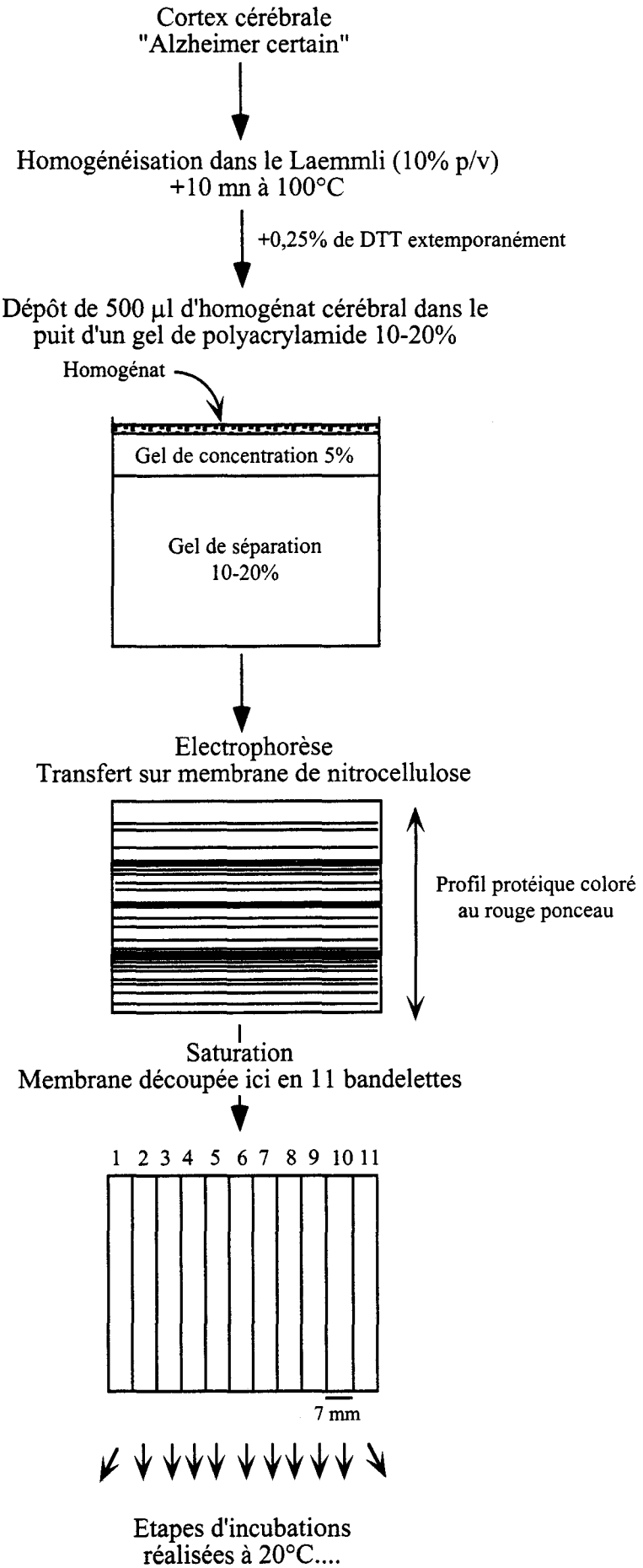


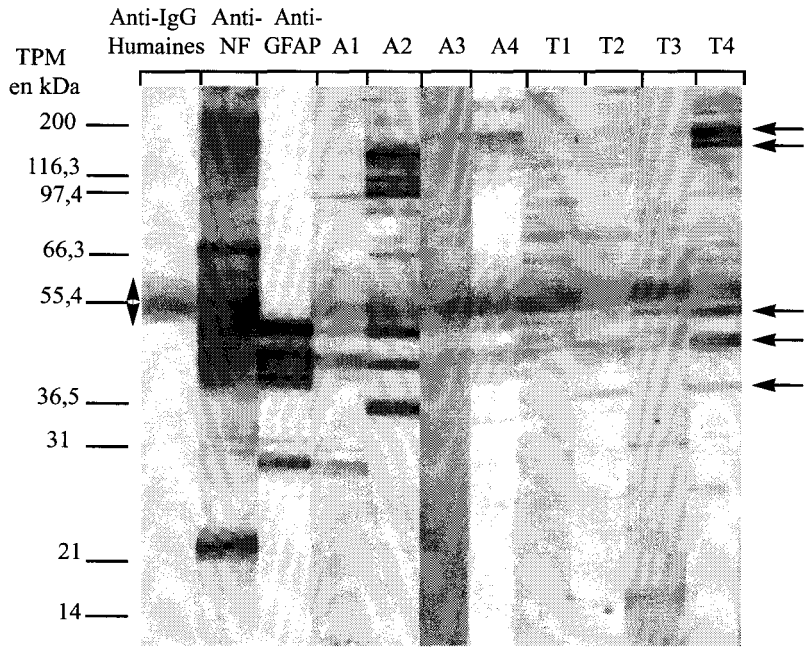
FIGURE 8

Étapes d'incubation:
* Incubation de chaque bandelette avec un sérum différent (anticorps I au 1/100)
* Incubation de chaque bandelette avec l'anticorps II anti-IgG Fc spécifiques (dilué au 1/20000)

Étapes d'incubation réalisées à 20°C

* Révélation

* Profil d'auto-anticorps obtenus:



Légende: Les sérums de 4 «Alzheimer» (A1; A2; A3 et A4) et de 4 témoins (T1; T2; T3 et T4) ont été incubés avec les 8 dernières bandelettes de l'immuno-empreinte. Les trois premières ont été incubées avec l'anti-IgG humaines seul; un anti-NF et un anti-GFAP. Des témoins de masses moléculaires (TPM) ont été utilisés pour déterminer la masse de chaque antigène détecté. Notons que l'anticorps secondaire seul révèle une bande aspécifique aux environs de 55 kDa (double-flêche). Chaque sérum à un profil d'auto-anticorps différent sous forme de bandes d'intensité plus ou moins forte (flêches).

humain est nettement inférieure à celle des anticorps mono- ou polyclonaux. De plus, les antigènes détectés par les auto-anticorps sont généralement en très faible quantité dans l'homogénat cérébral.

La technique des immuno-empreintes utilisée pour visualiser les différents auto-anticorps anti-protéines cérébrales est résumée sur la **Figure 8**.

En conclusion, en utilisant les sérums humains comme anticorps primaires et les antigènes normaux et pathologiques d'un cerveau "Alzheimer certain" comme antigènes, nous pouvons visualiser toutes les protéines cérébrales reconnues par les auto-anticorps sériques de chaque sujet. Ces antigènes apparaissent sur l'immuno-empreinte sous forme de bandes d'intensité plus ou moins forte. Les protéines détectées par cette technique ont une masse moléculaire qui varie de 10 à 250 kDa. En général les sérums ont été testés deux à cinq fois pour être certain de mettre en évidence tous les auto-anticorps appartenant à cet intervalle de masses moléculaires.

II.1.4. ELECTROPHORÈSE BIDIMENSIONNELLE

Cette technique a été utilisée pour caractériser certains antigènes reconnus par les auto-anticorps. Elle a été réalisée selon la méthode modifiée de O'Farrell (1975). La première dimension permet de séparer les protéines en fonction de leur point isoélectrique (pI). Cette séparation est réalisée dans un gel d'acrylamide contenant:

Acrylamide	4% (p/v)	
Bisacrylamide	2,5% (p/v)	
Urée	9,5 mol/l	
Triton X-100	2% (v/v)	
Pharmalyte (Ampholytes de Pharmacia)	1% (v/v)	pH 4 - 6,5
Temed	0,1%	

Le tissu cérébral homogénéisé, chauffé 10 minutes à 100°C, est centrifugé 10 minutes à 10000g. Un volume de solution contenant 8 mol/l d'urée et 4% (v/v) de Triton X-100 est ajouté au surnageant. L'équivalent de 200 µg de tissu cérébral est déposé sur un gel de 12 cm de longueur et de 3 mm de diamètre. La séparation des protéines en fonction du pI a été réalisée avec un total de 10500 V/h. Une fois la migration terminée, le gel est plongé dans un tampon d'équilibration contenant:

SDS	3%	
Tris HCl	0,25 mol/l	pH 6,8
Dithiothréitol	0,5% (p/v)	

La seconde dimension permettant de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire, est réalisée dans les mêmes conditions que pour l'électrophorèse monodimensionnelle: sur un gradient d'acrylamide 10-20% (SDS-PAGE). Le gradient de pH de cette seconde dimension est calibré à l'aide d'un kit de calibration Carbamalyte (Pharmacia). Les échantillons cérébraux sont traités au préalable avec ce kit selon les instructions du fabricant.

Le transfert sur membrane de nitrocellulose et l'incubation de l'anticorps primaire puis secondaire sont réalisés dans les mêmes conditions que celle décrites précédemment (II.1.3 Technique des immuno-empreintes), la seul différence porte sur le fait qu'ici la membrane n'est pas découpée en bandelettes. Cette technique est celle décrite par Sergeant *et al*, 1997.

II.2. QUANTIFICATION PAR DENSITOMÉTRIE

Les films ECL sont digitalisés sur Compact Prolinea 4/33, à l'aide d'un scanner Sharp JX-325 et avec une résolution de 127 x 127 pixels. Ces images numérisées sont enregistrées

sous format TIFF pour être analysées avec le logiciel Image Master (IM1D) de Pharmacia Biotech.

II.3. IMMUNOHISTOCHIMIE

La caractérisation de certains auto-anticorps a été réalisée par immunohistochimie sur des coupes de cerveaux de patients atteints de la MA.

Le tissu est fixé dans une solution de paraformaldéhyde à 4% pendant 24 heures, puis rincé dans du tampon Coons contenant 20% de sucrose.

• Tampon Coons:

Veronal ou Barbital sodique	0,2% (p/v)	pH 7,4
NaCl	0,85% (p/v)	
Triton X-100	0,1% (p/v)	

Des coupes de 12 µm d'épaisseur sont réalisées au cryostat et sont conservées à -80°C jusqu'à leur prochaine utilisation.

Après leur décongélation, les lames sont immergées 10 min dans un bain d'eau oxygénée à 1% pour éliminer la péroxydase endogène, puis elles sont rincées 15 min dans un bain de tampon Coons. Les sérums à tester sont alors déposés sur les coupes et l'incubation est faite en atmosphère humide à température ambiante et pendant 2 heures.

Les lames sont ensuite rincées dans le tampon Coons et l'anticorps secondaire est mis au contact des coupes pendant une heure.

La révélation est faite à la diaminobenzidine (DAB, Sigma Aldrich Chimie). Les coupes sont finalement déshydratées dans 3 bains d'alcool de degré croissant, puis 3 bains de toluène. Les lames sont montées à l'Eukitt ™ avec une lamelle.

II.4. ANALYSE STATISTIQUE

De nombreuses techniques statistiques ont été utilisées pour analyser nos résultats. Cependant, une méthode statistique a le plus souvent été utilisée parce qu'elle était plus appropriée pour l'analyse de nos résultats et qu'elle permettait de répondre aux problèmes posés. Il s'agit de la régression logistique.

II.4.1. RAPPEL: LA RÉGRESSION LINÉAIRE ET LA REGRESSION LINÉAIRE MULTIPLE

La régression linéaire est une méthode statistique de prévision de la valeur moyenne d'un paramètre quantitatif Y en fonction d'un autre paramètre quantitatif X. Si "y" désigne cette valeur prévue, le résultat de cette méthode donne l'équation $y = a\,x + b$, où a et b représentent les coefficients de la droite de régression de y en fonction de x.

La régression multilinéaire (ou linéaire multiple) est l'extension de cette méthode (régression linéaire) à la prévision de y en fonction de plusieurs variables (n) quantitatives x_i

$$y = a_0 + \sum_{i=1}^{i=n} a_i x_i$$

L'objet d'une régression linéaire multiple est d'explorer les relations liant une variable Y (traditionnellement dénommée "variable à expliquer" ou encore "variable dépendante") à une série de variables X_1, X_2, ..., X_n (dénommées, elles, "variables explicatives", ou encore "variables indépendantes"). La principale vertu de cette méthode est de permettre, par l'intermédiaire d'un *modèle mathématique*, d'évaluer la force de l'association entre Y et chacun des X_i, les autres variables explicatives étant maintenues à un niveau constant.

La régression logistique, quant à elle, est une regression linéaire multiple sur le Logit.

II.4.2. LA RÉGRESSION LOGISTIQUE

Si la régression linéaire est une méthode de choix quand il s'agit d'explorer les relations associant une variable Y quantitative, à une série de variables X_1, X_2, ..., X_n; pour une variable Y binaire comme c'est le cas dans notre étude (malade (Y=1) et non-malade (Y=2), une régression logistique est mieux adaptée.

Plutôt que d'utiliser l'équation linéaire du type:

p= probabilité d'être malade = probabilité (Y=1) = $a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + ... + a_n x_n + e$

qui présente pour certaines valeurs de x des probabilités prédites par le modèle de régression soit négatives soit supérieures à 1, il est généralement préféré la transformation monotone "logit" qui permet d'éviter ces aberrations:

$$\text{Log } [p / (1-p)] = \text{Logit } (p) = a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + ... + a_n x_n + e$$

l'inversion est immédiate:

$$p = \frac{e^{\text{Logit } (p)}}{1 + e^{\text{Logit } (p)}}$$

et l'on a toujours $0<p<1$.

Il s'agit d'un modèle logistique. Ce modèle mathématique détermine la probabilité (p) pour un sujet d'être malade. Le seuil de p est fixé à 0,5: ce qui correspond à un tirage aléatoire (une chance sur deux d'être malade). Si le p calculé > 0,5, le sujet est "classé" dans le groupe des "malades", sinon ($p<0,5$) il est classé dans le groupe "non malade". Ce modèle est évalué, par sa sensibilité et sa spécificité au seuil s=0,5.

La spécificité est définie par le rapport:

$$\frac{\text{Nombre de Vrais "négatifs"}}{\text{Nombre de non malades}}$$ c'est à dire

$$\frac{\text{Nombre de témoins "bien classés"}}{\text{Nombre total de "vrais témoins"}}$$

La sensibilité, quant à elle, est définie par le rapport:

$$\frac{\text{Nombre de Vrais "positifs"}}{\text{Nombre de malades}}$$ c'est à dire

$$\frac{\text{Nombre de malades "bien classés"}}{\text{Nombre total de "vrais malades"}}$$

De plus, le logiciel SAS évalue la validité du modèle en effectuant des tests de signification sur le modèle lui-même et sur les variables.

La régression logistique a donc été utilisée pour établir un test diagnostique de la MA à partir des profils d'auto-anticorps.

RÉSULTATS- DISCUSSION

RESULTATS - DISCUSSION

Actuellement, aucune étude n'a permis d'établir un test diagnostique de certitude *ante-mortem* de la MA (Chapitre Généralité). La découverte d'un marqueur périphérique spécifique de la MA est donc indispensable pour l'avancée des recherches et le traitement précoce.

De nombreuses études concernant la recherche d'auto-anticorps spécifiques dans le sérum de patients atteints de la MA ont été entreprises (Chapitre VI des Généralités). Cependant tous ces travaux ne concernaient que des classes particulières d'auto-anticorps (**Tableau 2** du chapitre VI des Généralités). Aucune étude n'a permis d'établir le bilan de tous les auto-anticorps anti-protéines cérébrales produits au cours du vieillissement et de la MA.

C'est pourquoi, l'objectif principal de notre thèse a été d'établir le bilan de tous les auto-anticorps produits au cours de la MA, afin d'en isoler un ou même plusieurs qui seraient spécifiques de la maladie. Une modification qualitative et/ou quantitative de la production d'auto-anticorps sériques chez le malade permettrait de les utiliser comme marqueurs diagnostiques de la MA. De plus, le sang est le candidat idéal pour établir un diagnostic *ante-mortem* car il est facilement accessible.

C'est par une approche originale et simple d'application que nous avons pu mettre au point une technique de détection d'auto-anticorps. En effet, nous avons utilisé la technique des immuno-empreintes, largement répandue en biochimie. Cette technique est par ailleurs plus sensible et plus spécifique que la technique d'ELISA ("Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) généralement utilisée pour la détection d'auto-anticorps (**Tableau 2** du chapitre VI des Généralités) mais aussi pour la mise au point d'un test diagnostique.

Dans un premier temps, nous allons décrire les caractéristiques de la technique utilisée. Puis, dans un second temps nous aborderons les résultats concernant la production d'auto-anticorps au cours de la MA (objectif principal de notre thèse), avant d'aborder la production d'auto-anticorps au cours du vieillissement. Les résultats préliminaires de l'étude des profils d'auto-anticorps de sujets "répondeurs" et "non répondeurs" à la tacrine seront ensuite présentés. Enfin, nous analyserons les caractéristiques de certains auto-anticorps.

I. MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE DE DÉTECTION DES AUTO-ANTICORPS SERIQUES

I.1. ADAPTATION ET OPTIMISATION DE LA TECHNIQUE DES IMMUNO-EMPREINTES

I.1.1. LES SÉRUMS

Une fois prélevés, les sérums sont immédiatement dilués dans 50 % de glycérol pour éviter la dégradation des protéines sériques due aux chocs de congélations et décongélations successives. Ils sont conservés ainsi à -80 °C.

Le sérum (dilué au 1/2 dans le glycérol) est utilisé en immuno-empreintes à la dilution de 1/50 (dilution totale: 1/2 x 1/50 = 1/100). Plusieurs concentrations ont été testées, la dilution au 1/100 est celle qui donne les plus beaux profils d'auto-anticorps avec peu de bruit de fond (immunoréactivité aspécifique).

Par ailleurs, cette dilution doit être réalisée dans le tampon TNT avec 5 % de lait pour réduire l'immunoréactivité aspécifique. Tous les sérums sont utilisés sans purification préalable (natif), pour conserver la totalité des auto-anticorps, mais aussi pour ne pas compliquer la technique de détection des auto-anticorps.

I.1.2. L'ANTICORPS SECONDAIRE

Plusieurs anticorps secondaires ont été testés. La **Figure 9** présente les résultats obtenus avec ces anticorps:

* Anticorps anti-IgGγ (H+L) humaines marqués par la péroxydase produits chez la chèvre (Sanofi Diagnostic Pasteur, France). Ils ont été utilisés à la dilution de 1/2000.

* Anticorps anti-IgA, IgG, IgM humaines marqués à la péroxydase produits chez la chèvre (Sigma-Aldrich Chimie) utilisés à la dilution de 1/1700.

* Anticorps anti-IgG humaines Fc spécifiques marqués à la péroxydase produits chez le lapin (Sigma-Aldrich Chimie) dilués au 1/20000.

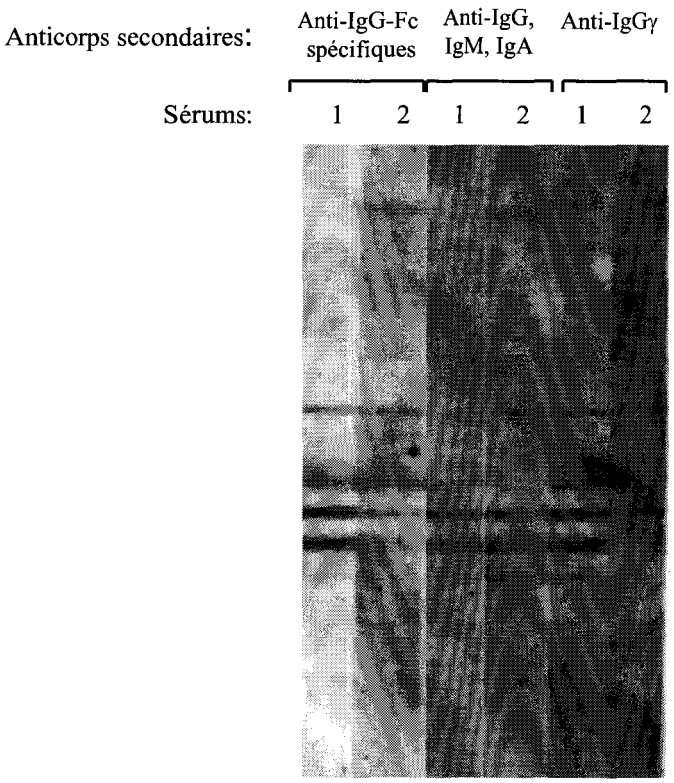
L'anticorps anti-IgG Fc spécifiques dilué au 1/20000 donne les meilleurs profils d'auto-anticorps (peu de bruit de fond). Toute notre étude a donc été réalisée avec cet auto-anticorps secondaire. Notons que ce dernier reconnaît les IgG qui, comme nous l'avions indiqué dans les "Généralités", sont présentes avec les IgM lors d'une stimulation antigénique primaire, mais aussi et surtout lors d'une stimulation antigénique secondaire au cours de laquelle elles augmentent rapidement en concentration, persistent plus longtemps et atteignent des taux plus élevés qu'au cours d'une stimulation primaire. Par conséquent, avec ce type d'anticorps secondaire, nous pourrons détecter les éventuelles réponses auto-immunes primaires et surtout secondaires de la MA ou du vieillissement.

Remarque: Au cours de la thèse, suite à l'article de Hu *et al.* (1997) qui décrit la mise au point d'une technique de détection d'auto-anticorps en utilisant la protéine G marquée à la péroxydase, nous avons remplacé l'anticorps secondaire par cette protéine G (dilution au 1/3000 dans du TNT avec 5 % de lait). La protéine G (Sigma Aldrich Chimie) est une protéine de surface cellulaire bactérienne qui lie le fragment Fc des IgG.

Nous avons pu noter (**Figure 10**) que la protéine G permet d'éliminer une bande aspécifique aux environs de 55 kDa qui est détectée par les auto-anticorps anti-IgG Fc spécifiques. Cependant, le bruit de fond est nettement plus important. Afin de réduire ce

FIGURE 9

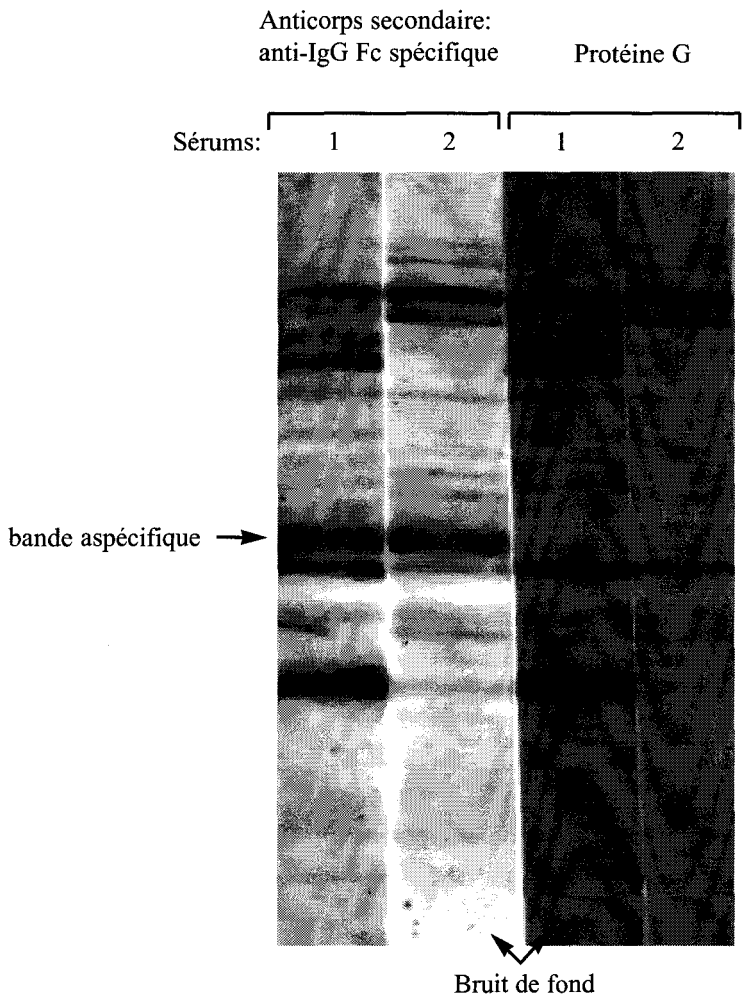
Analyse de différents anticorps secondaires



Légende: Immuno-empreinte réalisée avec deux sérums différents (1: provenant d'un «Alzheimer» et 2 d'un témoin). Trois anticorps secondaires ont été testés, les anti-IgG Fc spécifiques sont ceux qui permettent d'obtenir la meilleure résolution et ceux qui donnent le plus de contraste aux profils d'auto-anticorps avec le moins de bruit de fond.

FIGURE 10

Comparaison de l'immunoréactivité obtenue avec l'anticorps secondaire et la protéine G



Légende: Immuno-empreinte réalisée avec deux sérums (N°1 «Alzheimer» et N°2 témoin) utilisés comme anticorps primaires. Ces sérums ont été visualisés soit avec un anticorps secondaire anti-IgG humaines Fc spécifique, soit avec une protéine G marquée à la péroxydase. Notons que la bande aspécifique à 55 kDa n'est pas détectée par la protéine G. Cependant, les bandelettes révélées avec l'anticorps secondaire présentent moins de bruit de fond que celles révélées avec la protéine G.

bruit de fond, nous avons diminué la concentration de la protéine G: de 1/3000 à 1/10000, mais dans ces conditions l'intensité des auto-anticorps révélés par la protéine G diminue proportionnellement au bruit de fond, et les bandes deviennent de moins en moins visibles. Par conséquent, nous avons poursuivi notre étude en utilisant les anti-IgG Fc spécifiques comme anticorps secondaires.

I.1.3. TISSU CÉRÉBRAL

I.1.3.1. Nature du tissu cérébral

• Substance blanche

Au début de notre thèse, les anticorps anti-NF ont été mis en évidence par immuno-empreintes à partir de la substance blanche du cerveau humain. La substance blanche est formée de fibres de conduction, c'est-à-dire des prolongements des cellules nerveuses (accumulées, elles, au sein de la substance grise). La couleur de ces derniers provient de leur enveloppe blanchâtre formée par la gaine de myéline. C'est donc avec ce matériel que nous pouvons mettre en évidence les auto-anticorps anti-NF.

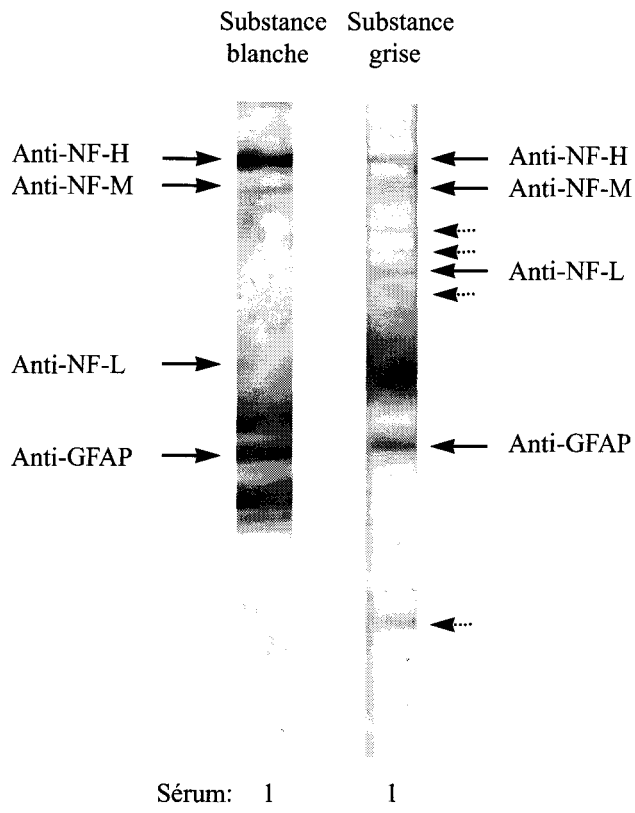
Cependant, pour détecter les auto-anticorps spécifiques des lésions de la MA qui se situent dans le cortex cérébral (substance grise), nous avons utilisé la substance grise.

• Substance grise

Notre étude a principalement été réalisée avec le cortex cérébral d'un sujet "Alzheimer certain". La **Figure 11** montre la différence de profil obtenu par immuno-empreintes avec un sérum dirigé contre la substance blanche d'une part et la substance grise d'autre part. Il faut noter que la substance grise permet non seulement la détection des anti-NF, des anticorps dirigés contre la GFAP (50 kDa) et ses produits de dégradation (comme le fait la substance blanche), mais elle permet aussi de visualiser d'autres types d'auto-anticorps non détectés dans la substance blanche.

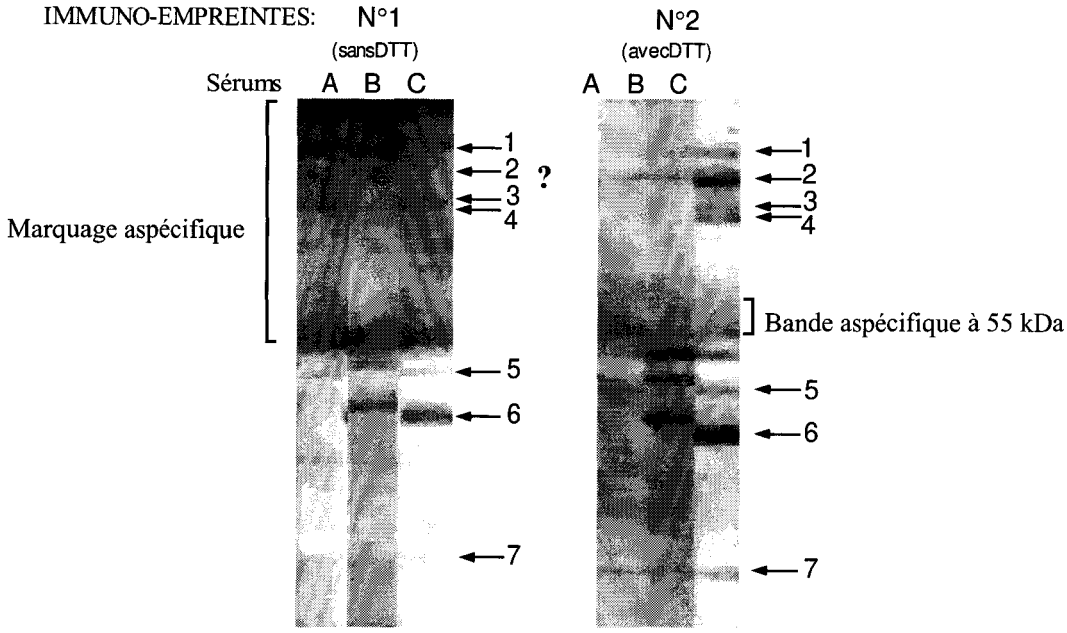
FIGURE 11

Recherche d'auto-anticorps à partir de la substance grise et de la substance blanche



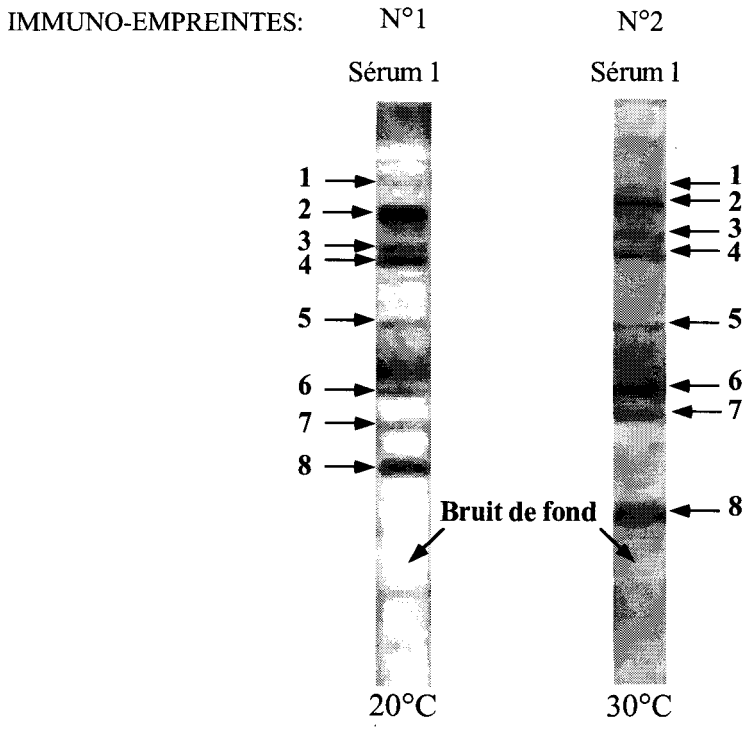
Légende: Un sérum N°1 a été testé sur deux bandelettes provenant de deux immuno-empreintes différentes; l'une réalisée avec un homogénat de substance blanche humaine (moelle), l'autre avec un homogénat de cortex cérébral frontal humain (substance grise). La substance blanche permet la détection des auto-anticorps anti-NF-H; anti-NF-M; anti-NF-L et anti-GFAP. Par contre la substance grise permet de détecter d'autres types d'auto-anticorps (◄···) en plus des anti-NF et anti-GFAP.

FIGURE 12



Légende de la Figure 12: Importance du Dithiothréitol (DTT) dans l'homogénat de cortex cérébral "Alzheimer Certain". Trois sérums A, B et C (provenant de trois sujets "Alzheimer") ont été testés par immuno-empreintes. En absence de DTT (Immuno-empreinte N°1), les profils d'auto-anticorps (numérotés de 1 à 7 dans le cas du sérum C) sont moins nets (les bandes 1, 2, 3 et 4 sont absentes). L'homogénat utilisé pour l'immuno-empreinte doit être préalablement traité au DTT puis chauffé 10 min à 100°C pour obtenir une bonne résolution (Immuno-empreinte N°2).

FIGURE 13



Légende de la Figure 13: Rôle de la température d'incubation. Le même sérum (N°1) a été testé sur deux immuno-empreintes réalisées dans des conditions différentes (à 20 et à 30°C). Lorsque l'immuno-empreinte est réalisée à 20°C (Immuno-empreinte N°1), le profil d'auto-anticorps (numérotés de 1 à 8) est plus net et le bruit de fond est moins intense qu'à 30°C (Immuno-empreinte N°2).

Finalement, l'ensemble des immuno-empreintes de la thèse a été réalisé à partir du cortex cérébral (aires frontales sévèrement touchées au cours de la MA) car il contient une multitude d'antigènes normaux et pathologiques.

I.1.3.2. Préparation du tissu cérébral

Lorsque l'homogénat "Alzheimer certain" utilisé pour l'immuno-empreinte est préalablement traité au dithiothréitol (ou DTT: agent réducteur coupant les ponts disulfures des protéines cérébrales), la résolution du profil d'auto-anticorps (numérotés de 1 à 7 pour le sérum C de la **Figure 12**) est plus nette. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'en coupant les ponts disulfures des protéines cérébrales, le DTT réduit la taille de ces dernières, il permet donc leur migration vers de plus faibles poids moléculaires. Le gel de polyacrylamide est par conséquent moins "chargé" vers les hauts poids moléculaires, le marquage aspécifique est alors réduit, d'autant plus que les IgG cérébrales détectées par l'anticorps secondaire voient, elles aussi, leur masse moléculaire réduite par le DTT. En effet, la masse moléculaire d'une IgG variant de 146 kDa (pour les IgG1, 2 et 3) à 170 kDa (pour les IgG3) est réduite en présence de DTT aux environs de 55 kDa (la masse moléculaire d'une chaine lourde d'IgG étant pour les IgG 1,2 et 4 égale à 51 kDa et pour les IgG3 égale à 60 kDa). Par conséquent, la bande aspécifique (décrite dans le paragraphe I.1.2.) détectée par l'anticorps secondaire seul aux environs de 55 kDa (**Figures 10 et 12**) pourrait correspondre au moins en partie aux chaînes lourdes des IgG présentes dans le cerveau au sein des PS (Eikelenboom *et al.*, 1982; Ishii *et al.*, 1975).

I.1.4. CONDITIONS D'INCUBATION

Le maintien de la température d'incubation des sérums et des anticorps secondaires à 20°C (pièce climatisée), permet une meilleure précision de l'immuno-empreinte. En effet, à 20°C, le bruit de fond est moins intense et le profil révélé par les auto-anticorps est plus net qu'à 30°C (exemple du sérum 1: antigène numéroté de 1 à 8 sur la **Figure 13**). Par ailleurs,

TABLEAU 12

Reproductibilité de la technique des immuno-empreintes

Masse moléculaire des protéines détectées (en kDa)	N°1 de sérum	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Nombre total d'anticorps pour 1 immuno-empreinte	Nombre total d'anticorps pour les 3 immuno-empreintes	Valeur du seuil de signification (p)
210	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	3	
160	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	
140	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	3	9	0,739
130	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	3	
110	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	4	12	0,5928
107	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	
105	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	6	18	0,5077
100	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0,5
94	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2	6	0,5
92	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	4	12	0,623
90	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	3	9	0,4547
82	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	3	9	0,3244
81	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	6	18	0,8483
80	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	3	9	0,1304
71	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3	9	0,2053
70	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	8	24	0,1631
69	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2	6	0,5
64	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	3	9	0,2923
62	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2	6	0,4627
55	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	3	
50	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	30	0,6361
PD50	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	30	0,4487
35	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2	6	0,5
33	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	6	0,5458
32	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	3	
30	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	6	0,3577
29	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	3	9	0,2001
28	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	3	
27	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2	6	0,4044
26	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	3	9	0,1005
25	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	3	9	**0,0407**
20	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	6	0,2126
19	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	3	
18	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	6	0,5248
Nombre total d'auto-anticorps	8	18	14	10	13	7	10	7	9	7	Moyenne: 10,3 +/- 2,57*		

Légende: les cases ombrées correspondent aux auto-anticorps éliminés lors de la vérification de la reproductibilité;

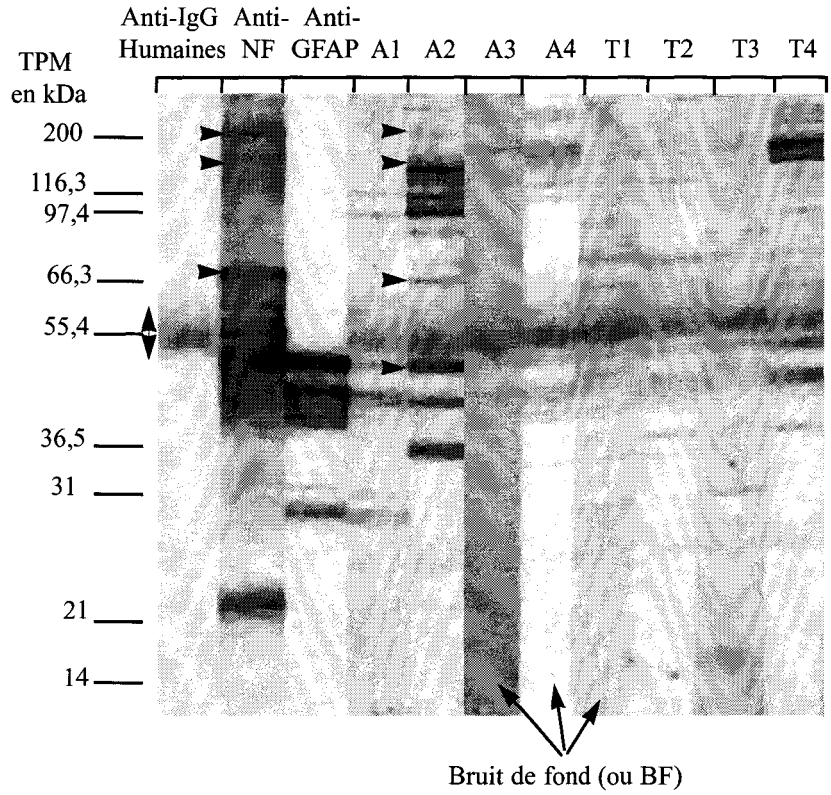
1 = présence de l'auto-anticorps; 0 = absence de l'auto-anticorps; * = la moyenne est suivie de l'intervalle de confiance +/-2,57

Le sérum N° 3 correspond au témoin interne.

Ce tableau présente les profils de 10 sérums, testés sur trois immuno-empreintes différentes. Le profil d'auto-anticorps est le même sur les 3 immuno-empreintes. 34 auto-anticorps ont été détectés. L'intensité des différentes bandes sur les trois immuno-empreintes, a été mesurée et la comparaison des intensité de chaque bande sur les trois immuno-empreintes a été réalisée par une analyse de variance. La différence d'intensité d'une bande, d'une immuno-empreinte à une autre, est significative lorsque le p (seuil de signification) est $< 0,05$.

FIGURE 14

Exemple d'immuno-empreinte réalisée pour la détection d'auto-anticorps sériques



Légende: Les sérums de 4 «Alzheimer» (A1; A2; A3 et A4) et de 4 témoins (T1; T2; T3 et T4) ont été testés par immuno-empreintes. Les trois premières bandelettes ont été incubées avec l'anti-IgG humaines seul; un anti-NF et un anti-GFAP. Des témoins de masses moléculaires (TPM) ont été utilisés pour déterminer la masse de chaque antigène détecté. L'anticorps secondaire seul permet de localiser la bande aspécifique à 55 kDa (double-flêche). Les anticorps anti-NF-H, M et L et anti-GFAP (respectivement repérés par les pointes de flêches allant du haut vers le bas de l'immuno-empreinte) permettent d'identifier les auto-anticorps anti-NF et anti-GFAP. Chaque sérum est caractérisé par un profil d'auto-anticorps différent et un bruit de fond différent.

nous avons réduit le temps d'incubation de l'anticorps primaire à 1h30 (habituellement fixé à 2h00) et de l'anticorps secondaire à 45 min (généralement fixé à 1h00) pour réduire le bruit de fond.

I.1.5. CONCLUSION

Toutes ces conditions: dilution, tampon de dilution des anticorps primaires et secondaires, présence de DTT, température et temps d'incubation réduits, ont contribué à obtenir des immuno-empreintes comme celle présentée sur la **Figure 14**: avec une bonne résolution et peu de bruit de fond (marquage aspécifique réduit). Néanmoins, il faut noter que l'intensité du bruit de fond restant est différente d'un sujet à un autre; ces variations font partie des caractéristiques d'un sérum. Ce bruit de fond (noté BF) sera d'ailleurs quantifié dans les tableaux de résultats (en unité arbitraire: 0 pour absence, 1 pour faible, 2 pour moyen et 3 pour bruit de fond intense). Il joue en effet un rôle très important car il permet de vérifier dans certains cas (sujet A3 de la **Figure 14** par exemple), si l'absence de détection de bandes est due au bruit de fond. En effet, plus le bruit de fond est intense, plus les bandes sont masquées.

I.2. REPRODUCTIBILITÉ DE LA TECHNIQUE

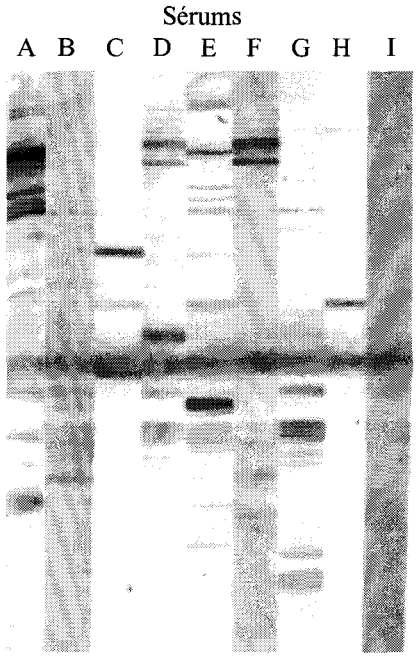
I.2.1. REPRODUCTIBILITÉ AU NIVEAU "PRÉSENCE" DES AUTO-ANTICORPS

10 sérums pris au hasard parmi les sujets de la population "Alzheimer" (**Tableau 4** page 107) ont été testés sur trois immuno-empreintes différentes. Les auto-anticorps sériques de chaque sujet révélés sur chaque immuno-empreinte ont été recensés dans le **Tableau 12.** Ces auto-anticorps sont nommés par la masse moléculaire des antigènes qu'ils détectent en kDa. Le profil d'auto-anticorps de chaque sujet est conservé quelle que soit l'immuno-

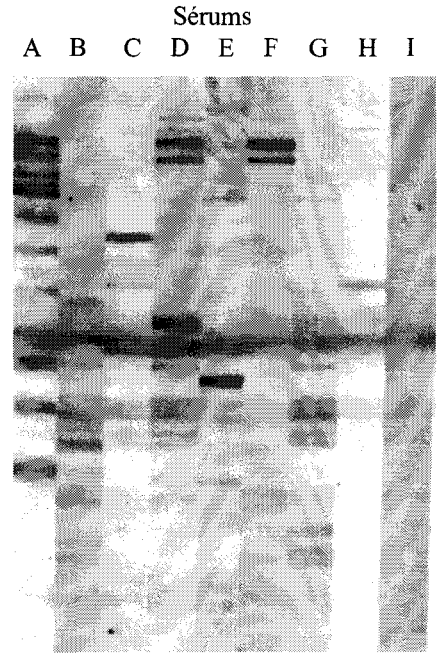
FIGURE 15

Reproductibilité de la technique

IMMUNO-EMPREINTE N°1



IMMUNO-EMPREINTE N°2



Légende: Les sérums de 9 sujets «Alzheimer» ou «témoins» (A à I) ont été testés sur deux immuno-empreintes différentes (Immuno-empreintes N°1 et N°2). Notons que chaque individu a un profil d'auto-anticorps qui lui est propre. Ce profil ainsi que l'intensité des bandes détectées sont conservés quelle que soit l'immuno-empreinte réalisée. Cette technique est donc reproductible en ce qui concerne la présence mais aussi l'intensité des auto-anticorps.

empreinte: quand un anticorps est détecté sur une des immuno-empreintes, il l'est aussi sur les deux autres (dans le **Tableau 12** le nombre total d'auto-anticorps détectés sur une immuno-empreinte est multiplié par trois pour trois immuno-empreintes). Nous pouvons donc conclure que la technique est reproductible au niveau de la présence des auto-anticorps. La **Figure 15** apporte un exemple de reproductibilité.

1.2.2. REPRODUCTIBILITÉ AU NIVEAU "INTENSITÉ" DE L'IMMUNORÉACTIVITÉ

1.2.2.1. Mesure de l'intensité des bandes

• Choix d'un "témoin interne"

Nous avons mis au point une technique permettant de quantifier l'intensité de l'immunoréactivité des auto-anticorps et de les comparer d'une immuno-empreinte à une autre. Pour ce faire, il a fallu choisir un "témoin interne" commun à chaque immuno-empreinte. Nous avons donc choisi d'utiliser un sérum, le N° 14 du **Tableau 4** page 107 (qui provient d'un sujet "Alzheimer"). Ce sérum, appelé "sérum de référence" a en effet été testé sur toutes les immuno-empreintes réalisées au cours de la thèse: il est nommé par exemple sérum A2 sur la **Figure 14** et A sur la **Figure 15**.

• Calcul des valeurs à imposer:

Trois immuno-empreintes sur lesquelles avait été testé le "sérum de référence" ont été analysées. 14 bandes détectées par ce sérum ont été mesurées par densitométrie à l'aide du logiciel Image Master (IM1D). L'unité de mesure est la densité optique par mm (DO/mm). Les valeurs de DO obtenues pour chaque bande sur les trois immuno-empreintes ainsi que la DO moyenne sont présentées dans le tableau suivant:

Sérum de référence N° de bande	DENSITE OPTIQUE (DO/mm)			
	Immuno-empreinte 1	Immuno-empreinte 2	Immuno-empreinte 3	DO moyenne
1	0,11	0,05	0,12	**0,09**
2	1,25	0,83	0,78	**0,95**
3	0,44	0,13	0,15	**0,24**
4	0,52	0,23	0,17	**0,3**
5	0,42	0,26	0,13	**0,26**
6	0,31	0,36	0,36	**0,34**
7	0,17	0,07	0,04	**0,09**
8	0,04	0,02	0,01	**0,02**
9	0,06	0,02	0,01	**0,03**
10	0,11	0,02	0,03	**0,05**
11	0,15	0,02	0,04	**0,07**
12	1,2	0,5	0,42	**0,71**
13	0,6	0,14	0,17	**0,3**
14	1,34	0,34	0,52	**0,73**

Nous avons volontairement choisi trois immuno-empreintes donnant des intensités relativement différentes, en effet, nous envisageons ainsi d'atténuer ces variations en imposant à chaque immuno-empreinte les valeurs moyennes du sérum de référence. Ces valeurs moyennes (en caractères gras dans le tableau ci-dessus) constituent donc des valeurs de référence. Lorsque nous mesurerons l'intensité de l'immunoréactivité des auto-anticorps sur une immuno-empreinte quelconque, ces valeurs de référence seront imposées aux 14 bandes du "sérum de référence". Le logiciel IM1D permet en effet de définir les intensités de références d'un témoin interne. La mesure de l'intensité des bandes des autres serums s'effectuera à partir de ces valeurs imposées.

• Conclusion

Ce type de mesures permettra donc de comparer les intensités des bandes d'une immuno-empreinte à une autre.

I.2.2.2. Mise en évidence de la reproductibilité des dosages quantitatifs

Pour mettre en évidence la reproductibilité des résultats densitométriques, nous avons utilisé les trois immuno-empreintes réalisées précédemment. Rappelons que 10 sérums (dont le "sérum de référence") pris au hasard dans la population "Alzheimer" ont été testés sur 3 immuno-empreintes différentes, réalisées à différents moments mais dans les mêmes conditions (définies dans le chapitre "Matériels et Méthodes"). Au total, 34 auto-anticorps ont été détectés sur les 3 immuno-empreintes (**Tableau 12**). Leur intensité a ensuite été déterminée à l'aide du logiciel IM1D en désignant un "témoin interne" à chaque immuno-empreinte: le "sérum de référence" (conditions décrites dans le paragraphe précédent). Dans le **Tableau 12** ce "sérum de référence" porte le numéro 3. Les coefficients de corrélation entre les valeurs imposées aux 14 bandes du "sérum de référence" et les valeurs réellement mesurées par le logiciel sur les trois immuno-empreintes 1, 2 et 3 sont respectivement égaux à 0,97, 0,94, et 0,97. Il existe donc une relation linéaire ($y = ax+b$) entre les valeurs imposées et celles mesurées.

Une analyse de variance ANOVA (pour le terme anglais "ANalysis Of VAriance") a été effectuée afin de comparer l'intensité de chaque auto-anticorps d'une immuno-empreinte à l'autre. Parmi les 34 auto-anticorps détectés, les huit suivants ont été éliminés de l'étude: ceux reconnaissant les protéines de 210, 160, 130, 107, 55, 32, 28 et 19 kDa (cases ombrées, dans le **Tableau 12**). En effet, chacune de ces protéines est détectée sur les trois immuno-empreintes par un même sérum. Leur unique présence par immuno-empreinte ne permet donc pas d'étudier leur variabilité.

Les valeurs du seuil de signification des 26 analyses de variances sont présentées dans le **Tableau 12.** Les intensités de chaque bande détectée sur chaque immuno-empreinte n'ont pas été retranscrites par souci de clarté.

Le risque global de trouver à tort une différence significative entre les intensités est fixé à 5%. Par conséquent, l'analyse de variance permet de conclure qu'il n'existe aucune différence significative au seuil de 5% entre les intensités des différentes bandes d'une immuno-empreinte à une autre, sauf pour les auto-anticorps dirigés contre la protéine de 25 kDa (ou anti-P25). Cependant, lorsque l'on observe les valeurs des intensités des auto-anticorps anti-P25 sur les trois immuno-empreintes (tableau ci-dessous), on remarque que les plus fortes variations d'intensité observées (en caractères gras dans le tableau) sont relativement faibles. Ces variations détectables à l'aide du logiciel présentent peu d'intérêt au niveau biologique car elles reflètent une très faible variation de concentration d'auto-anticorps.

Intensité des anti-P25 sur les trois immuno-empreintes (en DO/mm)

	Immuno-empreinte 1	**Immuno-empreinte 2**	**Immuno-empreinte 3**
Sérum n°5	0,03	0,05	0,04
Sérum n°7	**0,2**	**0,1**	**0,16**
Sérum n°8	**0,18**	**0,14**	**0,08**

Par ailleurs, un test non paramétrique de Krukall-Wallis, ne supposant aucune hypothèse de normalité des variables, a été réalisé et a conduit aux mêmes résultats.

On peut donc conclure que seul l'effet aléatoire intervient au niveau de la variation d'intensité entre les différentes immuno-empreintes et qu'il n'existe pas "d'effet immuno-empreinte".

I.2.3. CONCLUSION

Par conséquent, la technique des immuno-empreintes est non seulement reproductible au niveau de la présence et de l'absence des auto-anticorps mais elle l'est aussi au niveau de l'intensité des bandes (concentration des auto-anticorps). Cette technique de mesure par densitométrie avec "un témoin interne" pourra donc être utilisée pour la suite de nos recherches.

II. CARACTERISTIQUES DES PROFILS D'AUTO-ANTICORPS

Notons que l'origine cérébrale des antigènes détectés par les auto-anticorps a été confirmée par l'utilisation d'un anticorps anti-protéines sériques. Cette partie sera développée dans le chapitre VI "Caractérisation de certains auto-anticorps.

II.1. PROFIL PROPRE À CHAQUE INDIVIDU

La **Figure 16** représente le profil d'auto-anticorps de 5 sujets (3 "témoins âgés" A, B et C et 2 "Alzheimer probables" D et E).

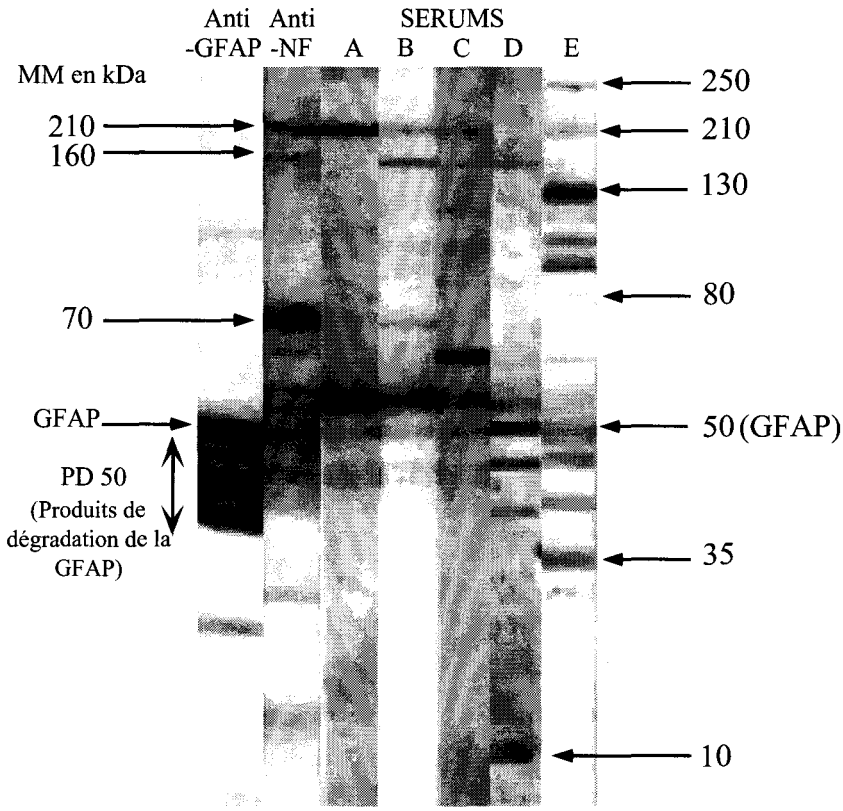
Chaque individu, malade ou non, possède des auto-anticorps sériques anti-protéines cérébrales. Ce profil d'auto-anticorps est une sorte de "code immunologique" propre à chaque individu. En effet, chaque sujet A, B, C, D ou E possède un profil bien particulier. Néanmoins, certains auto-anticorps (identifiés à l'aide de sondes immunologiques monoclonale (anti-GFAP) et polyclonale (anti-NF) sont communs à chaque sujet: les anticorps anti-NF-H (210 kDa); NF-M (160 kDa) et NF-L (70 kDa) mais aussi les auto-anticorps anti-GFAP (50 kDa) et ceux dirigés contre ses produits de dégradation (PD50). Le nombre moyen d'auto-anticorps par profil est de 10,3 (intervalle de confiance d'amplitude [7,73; 12,87]) soit 10,3 +/- 2,57 auto-anticorps (pour les 10 sujets du **Tableau 12**). Nous verrons dans le paragraphe III.1.3.2. que cette moyenne reste semblable pour un plus grand échantillon (n=79; moyenne = 9,46 +/- 0,88).

II.2. PRODUCTION D'AUTO-ANTICORPS AU COURS DU TEMPS

Pour analyser la production d'auto-anticorps au cours du temps, nous avons recherché dans notre banque de sérums les sujets ayant été prélevés plusieurs fois au cours de leur suivi. Nous avons sélectionné 3 sujets (**Figure 17**):

FIGURE 16

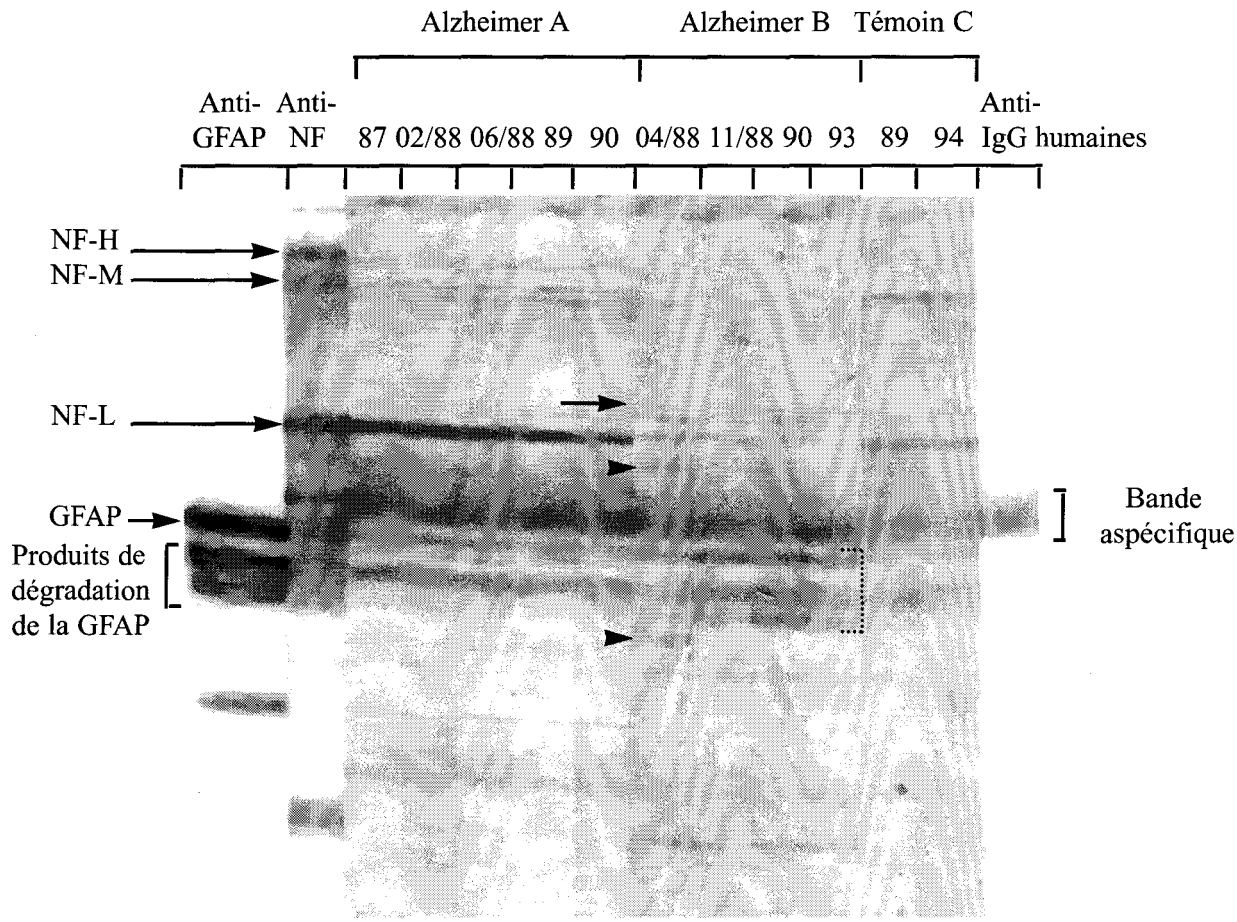
Profils d'auto-anticorps spécifiques à chaque individu



Légende: Immuno-empreinte obtenue à l'aide de sérums "Alzheimer Probable" et "Témoins âgés". Les sérums A, B, C (Témoins âgés), D et E ("Alzheimer ") un anti-NF et un anti-GFAP ont chacun été incubés avec une bandelette de nitrocellulose recouverte de protéines cérébrales "Alzheimer Certain". Les antigènes reconnus par les sérums humains apparaissent sous forme de bandes de masse moléculaire (MM) variant de 10 à 250 kDa. Les NF (210, 160 et 70 kDa) et la GFAP (50 kDa) ont été détectés par les sondes immunologiques correspondantes. Notons que les sérums A, B, C, D et E ont chacun un profil particulier. Cependant, la plupart de ces sujets (malades ou non) possèdent des auto-anticorps anti-NF et anti-GFAP sériques.

FIGURE 17

Production d'auto-anticorps au cours du temps



Légende: Les sérums de deux sujets «Alzheimer probable» (Alzheimer A et B) et d'un sujet «témoin âgé» (témoin C) prélevés à différents moments (suivi sur 5 ans), ont été analysés par la technique des immuno-empreintes contre un homogénat «Alzheimer certain». D'une manière générale, chaque individu malade ou non possède un profil d'auto-anticorps qui lui est propre («code immunologique»). Ce profil est conservé au cours du temps. Cependant, ce type d'analyse permet de suivre l'apparition (flèche) ou la disparition (pointes de flèche) ou encore les variations de concentration des auto-anticorps sériques (augmentation de la concentration des auto-anticorps anti-GFAP: pointillés). Ces modifications peuvent être fonction de l'âge ou de l'état de santé du sujet.

• un "Alzheimer probable" (A), qui a subi 5 prélèvements sanguins au cours des 4 années de son suivi clinique,

• un "Alzheimer probable" (B) prélevé 4 fois au cours de ses 6 années de suivi,

• et un témoin (C) prélevé deux fois à 5 ans d'intervalle.

D'une manière générale, chaque individu malade ou non possède un profil d'auto-anticorps qui lui est propre. Ce profil est conservé au cours du temps. Cependant, certaines différences peuvent apparaître. En effet, ce type d'analyse immunologique longitudinale (**Figure 17**) permet de suivre l'apparition (flèche), la disparition (pointes de flèche) ou encore les variations de concentration des auto-anticorps sériques (pointillés: augmentation de la concentration des auto-anticorps anti-GFAP chez le sujet B puis diminution avec un maximum en 1990). Ces modifications peuvent être dues soit à l'âge, soit à l'état de santé du sujet.

II.3. CONCLUSION

Ce type d'analyse pourrait être utilisé pour effectuer un suivi longitudinal, dans le but de détecter l'émergence de la MA avant même l'apparition des signes cliniques. A cette fin, nous avons recherché des variations spécifiques à la MA comme la présence ou l'absence de certains types d'auto-anticorps et des variations de la production d'auto-anticorps (chapitre III). Les résultats de ces recherches nous ont conduit à comparer les profils d'auto-anticorps des malades à ceux de sujets témoins non déments, afin de distinguer les variations liées à l'âge de celles liées à la MA (chapitre IV).

III. LES AUTO-ANTICORPS PRODUITS AU COURS DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

Nous avons effectué deux types d'analyses, l'une qualitative étudiant la présence et l'absence des auto-anticorps et l'autre quantitative tenant compte de leur concentration.

III.1. ETUDE QUALITATIVE

III.1.1. DESCRIPTION DE L'ÉCHANTILLON

Pour l'étude qualitative (présence / absence des auto-anticorps), la population de base est formée d'une part de sujets témoins âgés non déments provenant de l'étude "EVA" et d'autre part de sujets "Alzheimer probables" ou "confirmés" (population "Alzheimer"). Ces deux populations "EVA" et "Alzheimer" ont été décrites dans le chapitre "Matériel et Méthodes": **Tableaux 3 et 4** (pages 106 et 107).

III.1.1.1. Population "EVA"

Les caractéristiques des témoins âgés non déments de l'étude "EVA" sont les suivantes:

- n = 33,
- 17 femmes et 16 hommes,
- MMS à T0 et T2 ≥ 28,
- La moyenne d'âge de cet échantillon est de 64,18 ans (intervalle de confiance = 1,76), on notera 64,18 +/- 1,76 ans,
- Age minimum = 59 ans; âge maximum = 71 ans.

III.1.1.2. Population "Alzheimer"

Les caractéristiques de ces sujets sont les suivantes:

TABLEAU 13: Population "EVA"

N° Sérum	250	210	190	180	160	150	145	140	130	129	110	107	106	105	103	100	94	92	90	84	82	81	80,5	80	70	69,5	69	68	66	64	62	55	50	PD 50	35	33	32	31	30	29	28	27	26,5	26	25	24	23	22	21	20	18	16	13	11	10	BF	Diagnostic clinique	Age	Sexe	MMS 0-2	Nombre d'auto-anticorps
1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	Témoin âgé	59	F	29-30	7
2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	Témoin âgé	59	F	29-29	8
3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	3	Témoin âgé	59	F	30-30	11
4	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	Témoin âgé	60	F	29-30	7
5	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Témoin âgé	60	F	30-30	11
6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	Témoin âgé	60	F	30-29	6
7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Témoin âgé	60	F	30-30	8
8	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	Témoin âgé	60	F	29-29	24
9	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	Témoin âgé	60	F	30-28	8
10	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	Témoin âgé	60	F	30-30	15
11	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	Témoin âgé	70	F	30-28	11
12	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	Témoin âgé	70	F	30-30	11
13	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	Témoin âgé	70	F	29-29	6
14	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	Témoin âgé	70	F	29-30	10
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	Témoin âgé	70	F	30-29	7
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	Témoin âgé	70	F	30-28	6
17	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	Témoin âgé	71	F	30-30	7
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	Témoin âgé	59	H	30-29	9
19	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	Témoin âgé	60	H	30-30	9
20	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	Témoin âgé	60	H	29-30	8
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	3	Témoin âgé	60	H	30-30	7
22	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	Témoin âgé	60	H	30-29	13
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	Témoin âgé	60	H	30-29	7
24	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	Témoin âgé	60	H	30-28	11
25	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	Témoin âgé	60	H	28-28	9
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	Témoin âgé	61	H	29-30	8
27	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	Témoin âgé	70	H	30-30	6
28	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	Témoin âgé	70	H	30-30	15
29	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	Témoin âgé	70	H	30-29	9
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	Témoin âgé	70	H	29-30	5
31	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	Témoin âgé	70	H	30-30	12
32	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Témoin âgé	70	H	30-29	9
33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	Témoin âgé	70	H	29-29	7

Légende: BF = bruit de fond en unité arbitraire (0: pas de bruit de fond; 1: faible; 2: moyen; 3 très intense); H= homme; F = femme;

MMS= "Mini Mental State" à T0 (au début de l'étude) et T2 (2 ans plus tard).

- n = 46,
- 32 femmes et 14 hommes,
- Critères diagnostiques: NINCDS - ADRDA,
- Moyenne d'âge 72,08 +/- 2,11 ans,
- Age minimum = 53 ans; âge maximum = 84 ans.

III.1.1.3. Comparaison des deux populations

• La comparaison des moyennes d'âge par un test de Student donne un t calculé de 5,649 (niveau de signification < 0,0001 c'est-à-dire $p < 0,0001$). La moyenne d'âge des sujets malades est donc significativement supérieure à celle des sujets sains. Cette différence devra être prise en compte lors de l'interprétation des résultats.

• En ce qui concerne la variable sexe, la répartition est homogène pour le groupe "témoins âgés EVA" (17 femmes pour 16 hommes), par contre le groupe "Alzheimer" comporte 32 femmes pour 14 hommes. Cette différence pourrait s'expliquer, au moins en partie, par la prévalence de la MA dans la population féminine (Henderson, 1988).

III.1.2. RECUEIL DES DONNÉES

Les sérums provenant des 79 sujets (33 témoins "EVA" et 46 sujets "Alzheimer") ont été analysés par la technique des immuno-empreintes. Les résultats obtenus après cette analyse sont présentés dans les **Tableaux 13 et 14**. Les auto-anticorps ont été identifiés par la masse moléculaire de leurs antigènes, et les numéros de chaque auto-anticorps correspondent à cette masse moléculaire (par exemple, "250" sont les auto-anticorps dirigés contre une protéine de 250 kDa, ils seront aussi nommés anti-P250). La présence de ces auto-anticorps dans le sérum du sujet est signalé par "1" et l'absence par "0".

TABLEAU 14: Population "Alzheimer"

N° Sérum	250	210	190	180	160	150	145	140	130	129	110	107	106	105	103	100	94	92	90	84	82	81	80,5	80	70	69,5	69	68	66	64	62	55	50	PD 50	35	33	32	31	30	29	28	27	26,5	26	25	24	23	22	21	20	18	16	13	11	10	BF	Diagnostic clinique	Age	Sexe	Nombre d'auto-anticorps
1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	2	MA Probable	68	F	17
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	MA Probable	70	F	8
3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	MA Probable	70	F	5
4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	MA Probable	63	F	8
5	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	MA Probable	68	H	10
6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MA Probable	69	F	9
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	MA Probable	76	F	8
8	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	MA Probable	66	H	9
9	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	MA Probable	77	H	10
10	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	MA Probable	68	F	9
11	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MA Probable	72	F	12
12	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2	MA Probable	80	F	19
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	MA Probable	78	F	9
14	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	MA Probable	84	F	22
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	MA Probable	73	F	5
16	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MA Probable	79	F	5
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2	MA Probable	74	F	13
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	MA Probable	69	F	3
19	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	MA Probable	68	H	11
20	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	MA Probable	71	F	15
21	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2	MA Probable	79	F	13
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	MA Probable	82	H	5
23	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	MA Probable	63	F	12
24	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	MA Probable	73	H	13
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	MA Probable	79	F	4
26	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	MA Probable	73	F	13
27	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	2	MA Probable	75	F	13
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	MA Probable	75	F	5
29	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	MA Probable	67	F	9
30	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	MA Probable	69	F	13
31	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	MA Probable	81	F	9
32	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	MA Probable	68	F	10
33	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	MA Probable	58	F	9
34	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	MA Probable	77	H	11
35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	MA Probable	80	H	11
36	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	MA Probable	80	H	16
37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	MA Probable	82	H	8
38	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	MA Probable	84	F	9
39	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	MA Probable	64	F	5
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	MA Probable	74	H	2
41	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	MA certifiée	79	H	8
42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	MA certifiée	58	H	9
43	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	MA certifiée	64	F	12
44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	MA certifiée	73	H	3
45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	MA certifiée	63	F	4
46	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	MA certifiée	53	F	8

Légende: BF = intensité du bruit de fond en unité arbitraire (0: pas de bruit de fond; 1: faible; 2: moyen; 3: très intense); MA = Maladie d'Alzheimer; F = Femme; H = homme.

III.1.3. ANALYSE GÉNÉRALE DES RÉSULTATS

L'analyse des 79 sérums par la technique des immuno-empreintes a permis d'identifier 55 types d'auto-anticorps différents dirigés contre 55 antigènes cérébraux différents dont la masse moléculaire varie de 250 à 10 kDa (**Tableaux 13 et 14**).

III.1.3.1. Nature des auto-anticorps

Comme nous l'avons vu dans le chapitre II "Caractéristiques des profils d'auto-anticorps", certains de ces auto-anticorps ont pu être identifiés à l'aide de sondes immunologiques monoclonales (anticorps anti-GFAP) et polyclonales (anticorps anti-NF). Ainsi, les auto-anticorps 210, 160, 70, 50, PD50 correspondent respectivement aux auto-anticorps anti-NF-H, anti-NF-M, anti-NF-L, anti-GFAP et les anticorps dirigés contre les produits de dégradation de la GFAP. Parmi les 50 autres types d'auto-anticorps, certains ont été identifiés: nous en ferons le bilan dans le chapitre VI.

III.1.3.2. Nombre moyen d'auto-anticorps produits

La dernière colonne des **Tableaux 13 et 14** indique le nombre d'auto-anticorps anti-protéines cérébrales détectés pour chaque individu. Le nombre moyen d'auto-anticorps produits:

- par les "témoins" (n=33) est: 9,3 +/- 1,24 auto-anticorps par sujet,
- par les "Alzheimer" (n=46) est: 9,58 +/- 1,23,
- donc par la population totale (n=79) est: 9,46 +/- 0,88.

Aucune différence significative entre "Alzheimer" et "témoins" n'a été révélée par un test de Student. Finalement, un sujet malade ou non possède en moyenne 9 à 10 types d'auto-anticorps anti-protéines cérébrales.

TABLEAU 15

Auto-anticorps	Nombre de témoins /33 ayant l'anticorps	Nombre d'Alzheimer/46 ayant l'anticorps	Tests (Chi-2, Fischer)
250	0	2	NS
210	11	16	NS
190	1	3	NS
180	1	1	NS
160	15	13	NS
150	0	1	NS
145	0	1	NS
140	2	21	S: Chi-2= 14,59 p=0,001
130	13	7	S: Chi-2= 5,94 p=0,015
129	0	3	NS
110	7	7	NS
107	1	4	NS
106	2	3	NS
105	5	10	NS
103	0	1	NS
100	3	4	NS
94	13	18	NS
92	0	3	NS
90	6	13	NS
84	2	1	NS
82	5	5	NS
81	4	12	NS
80,5	4	4	NS
80	8	3	NS
70	19	34	NS
69,5	1	7	NS
69	3	7	NS
68	9	7	NS
66	4	6	NS
64	10	12	NS
62	4	9	NS
55	2	2	NS
50	33	45	NS
PD 50	33	46	NS
35	8	15	NS
33	2	3	NS
32	1	1	NS
31	19	16	S: Chi-2= 4,05 p<0,05
30	1	1	NS
29	1	0	NS
28	1	6	NS
27	10	7	NS
26,5	0	2	NS
26	3	7	NS
25	6	14	NS
24	4	5	NS
23	1	3	NS
22	2	1	NS
21	1	3	NS
20	8	8	NS
18	6	10	NS
16	2	2	NS
13	2	2	NS
11	2	0	NS
10	6	6	NS

Légende: NS = différence non-significative; S = différence significative.

III.1.3.3. Auto-anticorps spécifiques du vieillissement ou de la maladie d'Alzheimer

L'analyse des **Tableaux 13 et 14** semble délicate au premier abord. Néanmoins, nous pouvons remarquer que les auto-anticorps anti-GFAP et anti-PD50 (produits de dégradation de la GFAP) sont produits par la totalité des sujets sauf un: le sujet "Alzheimer" N°40 (**Tableau 14**), qui ne produit pas d'anti-GFAP. Cependant, ce sujet produit des auto-anticorps dirigés contre les produits de dégradation de la GFAP. L'absence d'auto-anticorps anti-GFAP peut refléter l'absence de réponse auto-immune contre la GFAP ou la présence d'une réponse, mais si infime qu'elle n'est pas décelable par la technique des immuno-empreintes.

Une première analyse des résultats a consisté à comparer les pourcentages de présence des différents auto-anticorps entre les deux échantillons "Alzheimer" et "témoin". Elle a été réalisée par le test du Chi-2 (**Tableau 15**). Dans le cas où les pourcentages étaient faibles, le test de Fischer exact a été employé. Outre la présence fréquente d'auto-anticorps anti-GFAP et anti-PD50, l'analyse du **Tableau 15** montre la présence fréquente (différence non significative entre "témoins" et "Alzheimer") d'auto-anticorps dirigés contre le triplet de NF (NF-H; NF-M; NF-L correspondant respectivement aux auto-anticorps nommés 210, 160 et 70). Par ailleurs, ce test du Chi-2 révèle la présence significative de 3 types d'auto-anticorps: les anti-P140, anti-P130 et anti-P31.

	Nombre d'Auto- anticorps chez			
Anticorps	**les témoins / 33**	**les Alzheimer / 46**	**Chi-2**	**p**
Anti-P140	2	21	14,59	0,001
Anti-P130	13	7	5,94	0,015
Anti-P31	19	16	4,05	0,05

Compte tenu de leur répartition dans les deux populations, il semblerait que les auto-anticorps anti-P140 représentent un marqueur de la MA alors que les anti-P130 et anti-P31 seraient spécifiques des sujets non déments. Ces résultats préliminaires suggèrent une

importance considérable de ces trois types d'auto-anticorps qui pourraient être utilisés dans un test diagnostique. Une combinaison de certains types d'auto-anticorps, incluant ou non les anti-P140, anti-P130, anti-P31 mais aussi d'autres types non significatifs de manière individuelle (**Tableau 15**), pourrait être utile pour le diagnostic précoce de la MA. Il s'agit, en fait, de mettre au point un *modèle mathématique*. Pour cela, nous avons eu recours à des outils statistiques appropriés (Logiciel SAS).

III.1.4. MISE AU POINT D'UN MODÈLE MATHÉMATIQUE

III.1.4.1. Analyse des liaisons entre les différentes variables

Une régression logistique a été utilisée pour essayer d'expliquer la présence chez les sujets étudiés des auto-anticorps, dont la nature a été identifiée (210, 160, 70 et 50), par les variables qui semblent les plus importantes (140, "AGE", "SEXE" et "PATHOLOGIE"). Les auto-anticorps anti-P31, anti-P130 et les autres n'ont pas été sélectionnés car les résultats de leur analyse ne sont pas significatifs.

Anti-P140:

• Liaisons entre les anti-P140, l'âge, le sexe et la pathologie dans la population totale (n=79)

La régression logistique réalisée avec ces 4 variables dans la population totale donne le modèle mathématique suivant:

$$\text{Logit}(p) = -2{,}0157 + 0{,}0139 \times \text{AGE} - 0{,}8193 \times \text{SEXE} + 2{,}5918 \times \text{PATHOLOGIE}$$

où $\text{Logit}(p) = \log(p/1-p)$

où $p = \dfrac{e^{\text{Logit}(p)}}{1 + e^{\text{Logit}(p)}}$

Dans ce modèle:

. la variable "AGE" prend la valeur de l'âge du sujet (en années),

. la variable "SEXE" prend la valeur 1 pour les hommes et 2 pour les femmes,

. la variable "PATHOLOGIE" prend la valeur 1 pour "malade" et 2 pour "témoin",

. p est la probabilité pour un sujet d'avoir les auto-anticorps anti-P140.

Ce modèle permet de prédire, à partir de l'âge, du sexe et de la pathologie, les sujets possédant des anti-P140. Pour notre échantillon, la sensibilité de ce modèle est égale à 73,2% et sa spécificité à 60,9%.

En résumé, la présence des auto-anticorps anti-P140 peut être expliquée par la pathologie, l'âge, et le sexe. La liaison des anti-P140 avec la pathologie avait déjà été suggérée dans le paragraphe précédent (III.1.3.3.) avec le test du Chi-2. Cette liaison multiple AGE/SEXE/PATHOLOGIE/ANTI-P140 sera à prendre en compte lors de la caractérisation de la protéine P140.

Anti-P210, anti-P160, anti-P70 et anti-P50 (ou anti-GFAP):

Une régression logistique ne révèle aucune liaison importante entre chacun de ces quatre types d'auto-anticorps et les trois variables: AGE, SEXE et PATHOLOGIE. Cela signifie que la présence fréquente des auto-anticorps anti-NF et anti-GFAP n'est pas liée à la MA ni au vieillissement et ni au sexe. Nos résultats sont contradictoires avec les données de la littérature (Mecocci *et al.*, 1995; Toh *et al.*, 1985; Elizan *et al.*, 1983; Tanaka *et al.*, 1988) (**Tableaux 1** et **2** du chapitre Généralités).

Cependant, ces auto-anticorps pourraient devenir marqueurs de la MA ou du vieillissement dans un modèle faisant intervenir des combinaisons d'auto-anticorps.

III.1.4.2. Recherche des combinaisons d'auto-anticorps

La recherche des combinaisons d'auto-anticorps a été réalisée selon une méthode statistique: la régression logistique "Stepwise" ou "pas à pas" (avec le logiciel SAS). Ce type de procédure consiste à choisir la variable la plus discriminante (celle qui différencie le mieux les malades des témoins), puis la seconde la plus discriminante et de les tester ensemble dans un modèle de régression logistique. Si elles intéragissent positivement, c'est-à-dire si une

fois associées elles augmentent la spécificité et la sensibilité du modèle, alors elles sont conservées pour le constituer. Sinon, la moins discriminante est rejetée et la troisième variable la plus discriminante est testée à son tour et est conservée uniquement si elle améliore le modèle. Et ainsi de suite, jusqu'à la dernière variable.

La procédure permet donc d'établir un modèle mathématique de régression logistique avec les variables donnant la meilleure sensibilité et la meillleure spécificité.

Les données utilisées sont celles des **Tableaux 13 et 14.**

Rappelons que la régression logistique permet d'explorer les relations associant une variable Y binaire (ici 1 pour "Alzheimer" et 2 pour "Témoin"), à une série de variables qualitatives (présence (1) ou absence (0) de certains auto-anticorps et le sexe (1 pour les hommes et 2 pour les femmes)) et quantitative (âge).

La régression logistique "pas à pas"a abouti à un modèle mathématique dépendant de 7 variables de la forme:

$$\text{Logit (p)} = -24{,}6943 + 6{,}9327 \times X_{140} + 3{,}3683 \times X_{81} - 2{,}9577 \times X_{27} - 6{,}8581 \times X_{22} - 5{,}5362 \times X_{106} + 2{,}5717 \times X_{70} + 0{,}3374 \times \text{AGE}$$

$$\text{où } p = \frac{e^{\text{Logit (p)}}}{1 + e^{\text{Logit (p)}}}$$

p étant la probabilité pour que le sujet soit malade. Les variables notées X_{mm} correspondent aux auto-anticorps dirigés contre l'antigène de masse moléculaire mm kDa (exemple: X_{140}= auto-anticorps anti-P140 ou anti-protéines de 140 kDa). Elles prennent la valeur 1 quand l'anticorps est présent et la valeur 0 quand il est absent. La variable AGE prend la valeur de l'âge du sujet. Le seuil s est fixé à s = 0,5. Si p<s, le sujet n'est pas malade, sinon (p>s) il est atteint de la MA. A ce seuil, la spécificité est définie par le rapport suivant:

TABLEAU 16

Diagnostic des sujets témoins "EVA" établi à partir du modèle à 7 variables

N° Sérum TÉMOIN	140	106	81	70	27	22	Diagnostic clinique	Age	Logit p	p	Diagnostic du Test
1	0	0	0	0	0	0	Témoin	59	-4,7877	0,0083	Témoin
2	0	0	0	0	0	0	Témoin	59	-4,7877	0,0083	Témoin
3	0	0	0	1	0	1	Témoin	59	-9,0741	0,0001	Témoin
4	0	0	0	1	0	0	Témoin	60	-1,8786	0,1325	Témoin
5	0	0	0	0	0	0	Témoin	60	-4,4503	0,0115	Témoin
6	0	0	0	1	0	0	Témoin	60	-1,8786	0,1325	Témoin
7	0	0	0	1	0	0	Témoin	60	-1,8786	0,1325	Témoin
8	0	0	1	1	1	0	Témoin	60	-1,4680	0,1872	Témoin
9	0	0	0	1	0	0	Témoin	60	-1,8786	0,1325	Témoin
10	0	0	1	1	1	0	Témoin	60	-1,4680	0,1872	Témoin
11	0	1	0	1	0	0	Témoin	70	-4,0408	0,0173	Témoin
12	0	0	0	1	1	0	Témoin	70	-1,4623	0,1881	Témoin
13	1	0	0	0	0	0	Témoin	70	5,8564	0,9971	Alzheimer
14	0	0	0	1	1	0	Témoin	70	-1,4623	0,1881	Témoin
15	0	0	0	0	1	0	Témoin	70	-4,0340	0,0174	Témoin
16	0	0	0	0	0	0	Témoin	70	-1,0763	0,2542	Témoin
17	0	0	0	1	0	0	Témoin	71	1,8328	0,8621	Alzheimer
18	0	0	0	1	0	0	Témoin	59	-2,2160	0,0983	Témoin
19	0	0	0	1	0	0	Témoin	60	-1,8786	0,1325	Témoin
20	0	0	0	0	0	0	Témoin	60	-4,4503	0,0115	Témoin
21	0	0	0	0	0	0	Témoin	60	-4,4503	0,0115	Témoin
22	0	0	1	0	1	0	Témoin	60	-4,0397	0,0173	Témoin
23	0	0	0	1	0	0	Témoin	60	-1,8786	0,1325	Témoin
24	0	0	0	1	1	0	Témoin	60	-4,8363	0,0079	Témoin
25	0	0	0	0	0	0	Témoin	60	-4,4503	0,0115	Témoin
26	0	0	0	1	0	0	Témoin	61	-1,5412	0,1764	Témoin
27	0	0	0	0	0	0	Témoin	70	-1,0763	0,2542	Témoin
28	0	0	0	1	1	0	Témoin	70	-1,4623	0,1881	Témoin
29	1	0	0	1	1	1	Témoin	70	-1,3877	0,1998	Témoin
30	0	0	0	0	0	0	Témoin	70	-1,0763	0,2542	Témoin
31	0	0	0	0	1	0	Témoin	70	-4,0340	0,0174	Témoin
32	0	1	1	1	0	0	Témoin	70	-0,6725	0,3379	Témoin
33	0	0	0	0	0	0	Témoin	70	-1,0763	0,2542	Témoin

2 Témoins mal classés (cases ombrées)

Spécificité = 93,94%

$$\frac{\text{Nombre de témoins bien classés}}{\text{Nombre total de "vrais témoins"}} = \frac{31}{33} = 93{,}94\%$$ de spécificité (**Tableau 16**).

La sensibilité est définie par le rapport:

$$\frac{\text{Nombre de malades bien classés}}{\text{Nombre total de "vrais malades"}} = \frac{42}{46} = 91{,}3\%$$ de sensibilité (**Tableau 17**).

Au total 73 sujets (cases blanches des **Tableaux 16 et 17**) sur 79 soit 92,4% des sujets sont correctement diagnostiqués. Les **Tableaux 16 et 17** présentent les profils d'auto-anticorps des sujets "Témoins" et "Alzheimer" de l'étude (0 absence et 1 présence des auto-anticorps), le diagnostic clinique, la valeur prise par le Logit de p, la valeur de p ainsi que le diagnostic de l'équation-test.

Exemple: Le sujet N°1 du **Tableau 13** (femme témoin de 59 ans) ne possède aucun des auto-anticorps utilisés dans l'équation-test à 7 variables. Par conséquent, pour ce sujet l'équation s'écrit:

Logit p = -24,6943 + 0,3374 x 59 = - 4,7877 (Sérum N°1 du **Tableau 16**)

$$\text{donc } p = \frac{e^{\text{Logit}\,(-4{,}7877)}}{1 + e^{\text{Logit}\,(-4{,}7877)}} = 0{,}0083$$

$p<0,5$ ce sujet est donc non malade (groupe témoin).

Notons qu'aucune autre variable n'est suffisamment discriminante pour être inclue dans le modèle afin d'augmenter la sensibilité et/ou la spécificité de ce test logistique. Par conséquent, ce modèle logistique faisant intervenir 7 variables, donc simple d'application et avec une forte sensibilité et spécificité, pourrait être utilisé pour établir le diagnostic de la

TABLEAU 17

Diagnostic des sujets "Alzheimer" établi à partir du modèle à 7 variables

N° Sérum ALZHEIMER	140	106	81	70	27	22	Diagnostic clinique	Age	Logit p	p	Diagnostic du Test
1	0	0	1	1	1	0	AD Prob	68	1,2312	0,7740	Alzheimer
2	0	0	1	1	1	0	AD Prob	70	1,9060	0,8706	Alzheimer
3	1	0	0	1	0	0	AD Prob	70	8,4281	0,9998	Alzheimer
4	1	0	0	1	0	0	AD Prob	63	6,0663	0,9977	Alzheimer
5	0	0	0	1	0	0	AD Prob	68	0,8206	0,6944	Alzheimer
6	1	0	0	1	0	0	AD Prob	69	8,0907	0,9997	Alzheimer
7	0	0	0	1	0	0	AD Prob	76	3,5198	0,9712	Alzheimer
8	0	0	1	1	0	0	AD Prob	66	3,5141	0,9711	Alzheimer
9	0	0	1	1	0	0	AD Prob	77	7,2255	0,9993	Alzheimer
10	0	0	0	0	0	0	AD Prob	68	-1,7511	0,1479	Témoin
11	1	1	0	1	1	0	AD Prob	72	0,6090	0,6477	Alzheimer
12	0	0	1	1	0	1	AD Prob	80	1,3796	0,7989	Alzheimer
13	0	0	0	1	0	0	AD Prob	78	4,1946	0,9851	Alzheimer
14	1	0	0	0	0	0	AD Prob	84	10,5800	1,0000	Alzheimer
15	0	0	0	0	0	0	AD Prob	73	-0,0641	0,4840	Témoin
16	0	0	0	1	0	0	AD Prob	79	4,5320	0,9894	Alzheimer
17	0	0	0	1	0	0	AD Prob	74	2,8450	0,9451	Alzheimer
18	0	0	0	1	0	0	AD Prob	69	1,1580	0,7610	Alzheimer
19	0	0	0	1	0	0	AD Prob	68	0,8206	0,6944	Alzheimer
20	1	0	0	1	1	0	AD Prob	71	5,8078	0,9970	Alzheimer
21	0	0	1	1	0	0	AD Prob	79	7,9003	0,9996	Alzheimer
22	0	0	0	0	0	0	AD Prob	82	2,9725	0,9513	Alzheimer
23	1	0	0	1	0	0	AD Prob	63	6,0663	0,9977	Alzheimer
24	1	0	1	1	0	0	AD Prob	73	12,8086	1,0000	Alzheimer
25	0	0	0	1	0	0	AD Prob	79	4,5320	0,9894	Alzheimer
26	1	0	1	1	0	0	AD Prob	73	12,8086	1,0000	Alzheimer
27	1	0	0	0	0	0	AD Prob	75	7,5434	0,9995	Alzheimer
28	0	0	0	1	0	0	AD Prob	75	3,1824	0,9602	Alzheimer
29	1	0	0	0	0	0	AD Prob	67	4,8442	0,9922	Alzheimer
30	0	0	1	1	0	0	AD Prob	69	4,5263	0,9893	Alzheimer
31	1	0	0	1	0	0	AD Prob	81	12,1395	1,0000	Alzheimer
32	1	0	0	0	1	0	AD Prob	68	2,2239	0,9024	Alzheimer
33	1	0	0	0	0	0	AD Prob	58	1,8076	0,8591	Alzheimer
34	1	0	1	0	0	0	AD Prob	77	11,5865	1,0000	Alzheimer
35	0	0	0	1	0	0	AD Prob	80	4,8694	0,9924	Alzheimer
36	1	1	0	1	0	0	AD Prob	80	6,2659	0,9981	Alzheimer
37	0	0	0	1	0	0	AD Prob	82	5,5442	0,9961	Alzheimer
38	1	0	0	0	1	0	AD Prob	84	7,6223	0,9995	Alzheimer
39	1	0	0	0	0	0	AD Prob	64	3,8320	0,9788	Alzheimer
40	0	0	0	0	0	0	AD Prob	74	0,2733	0,5679	Alzheimer
41	1	1	0	1	0	0	AD CONF	79	5,9285	0,9973	Alzheimer
42	0	0	1	1	0	0	AD CONF	58	0,8149	0,6932	Alzheimer
43	1	0	1	1	0	0	AD CONF	64	9,7720	0,9999	Alzheimer
44	0	0	0	1	0	0	AD CONF	73	2,5076	0,9247	Alzheimer
45	0	0	0	1	0	0	AD CONF	63	-0,8664	0,2960	Témoin
46	1	0	0	1	1	0	AD CONF	53	-0,2654	0,4340	Témoin

4 "Alzheimer" mal classés (cases ombrées)

Sensibilité =91,3 %

MA. Cependant, une validation par une étude en aveugle sur une nouvelle population s'avère nécessaire.

III.1.5. CONCLUSION

L'analyse qualitative des résultats immunologiques (présence / absence des auto-anticorps) a permis de montrer:

1) que chaque sujet malade ou non possède un profil d'auto-anticorps anti-protéines cérébrales formé en moyenne de 9 à 10 types d'auto-anticorps;

2) la présence fréquente des auto-anticorps anti-NF et anti-GFAP aussi bien chez les sujets "Alzheimer" que chez les "témoins". Aucune différence significative n'a été décelée;

3) la présence d'un marqueur sérique de la MA: les auto-anticorps dirigés contre une protéine de 140 kDa (anti-P140) qui sont non seulement liés à la maladie mais aussi à l'âge;

4) la présence de deux marqueurs du vieillissement: les anti-P130 et anti-P31;

5) que le diagnostic *ante-mortem* de la MA pourrait être réalisé à l'aide d'une équation obtenue avec une régression logistique dont la sensibilité est égale à 91,3% et la spécificité à 93,94%.

6) que ce test diagnostique est défini par l'équation à 7 variables suivante:

$$\text{Logit (p)} = -24{,}6943 + 6{,}9327 \times X_{140} + 3{,}3683 \times X_{81} - 2{,}9577 \times X_{27} - 6{,}8581 \times X_{22} - 5{,}5362 \times X_{106} + 2{,}5717 \times X_{70} + 0{,}3374 \times \text{AGE}$$

$$\text{où } p = \frac{e^{\text{Logit (p)}}}{1 + e^{\text{Logit (p)}}}$$

Ce test est sensible et facile à utiliser. Il dépend de 7 variables dont les anti-P140, anti-P70 et l'âge. Les anti-P140 avaient déjà été isolés par un simple test du Chi-2. Par contre, les anti-P70 (ou anti-NF-L) n'intervenaient pas de manière individuelle (aucune différence significative n'a été révélée entre les "Alzheimer" et les témoins par un simple test du Chi-2).

Ici, au contraire ces anti-NF semblent interagir positivement avec les 5 autres auto-anticorps de l'équation. De plus, le biais dû à la différence d'âge entre les sujets "Azheimer" et les sujets témoins "EVA" utilisés pour établir l'équation, est minimisé car il est pris en compte dans le test diagnostique. Enfin, il faut noter que les deux variables "AGE" et 140 qui présentaient une forte liaison avec la pathologie, gardent leur importance puisqu'elles sont retrouvées combinées dans l'équation.

Une validation par une étude en aveugle et sur une nouvelle population sera réalisée dans le chapitre III.3. afin de confirmer ces résultats.

III.2. ÉTUDE QUANTITATIVE

Par une seconde approche nous avons voulu vérifier si l'aspect quantitatif pouvait améliorer le test.

III.2.1. DESCRIPTION DE L'ÉCHANTILLON

Pour l'étude quantitative (étude tenant compte de l'intensité des bandes révélées par les auto-anticorps), la population utilisée est formée de certains des sujets "Alzheimer" et "Témoins EVA" utilisés au cours de l'étude qualitative. En effet, pour limiter le travail de densitométrie, nous avons uniquement sélectionnés les sujets d'âge inférieur ou égal à 67 ans. Cette limite à 67 ans a été établie après avoir testés plusieurs échantillons ($\leq$ 70 ans, $\leq$ 67 ans...). Elle permet d'obtenir deux échantillons "Alzheimer" et "témoin" d'effectifs suffisamment grands, et qui, lorsqu'ils sont analysés par une régression logistique, donnent la meilleure spécificité et la meilleure sensibilité.

III.2.1.1. Population "EVA" d'âge ≤ 67 ans

Les caractéristiques de ces sujets âgés non déments sont les suivantes (sujets de moins de 67 ans du **Tableau 3** page 106 du chapitre "Matériels et Methodes"):

- n = 19,
- 10 femmes et 9 hommes,
- MMS à T0 et à T8 ≥ 28,
- Moyenne d'âge = 59,84 +/- 0,24 ans.

III.2.1.2. Population "Alzheimer" d'âge ≤ 67 ans

Les caractéristiques de ces sujets sont les suivantes (sujets de moins de 67 ans du **Tableau 4** page 107 du chapitre "Matériels et Méthodes"):

- n = 10,
- 8 femmes et 2 hommes,
- Critères diagnostiques: NINCDS-ADRDA,
- Moyenne d'âge = 61,9 +/- 3,02 ans.

III.2.1.3. Comparaison des deux populations

La comparaison des moyennes d'âge par un test de Student donne un t calculé de 1,5149 et un p = 0,1637. Il n'y a donc pas de différence significative entre la moyenne d'âge des sujets "Alzheimer" par rapport à celle des sujets "témoins". Cette sélection a donc permis d'éliminer le biais dû à l'âge existant lors de l'étude qualitative.

En ce qui concerne la variable "sexe", la répartition reste homogène pour les "témoins" (10 hommes, 9 femmes) par contre le groupe "Alzheimer" est toujours hétérogène (2 hommes, 8 femmes).

TABLEAU 18: Population de base ≤ 67 ans (1ère partie)

N° Sérum Alzheimer	210	190	160	150	145	140	130	129	110	107	106	105	100	94	90	84	82	81	80,5	80	70	69,5	69	68	66
4	0	0	0	0	0	0,42	0	0	0,08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05	0,02	0	0	0	0,18
8	0	0	0	0,001	0	0	0,001	0	0	0	0	0,001	0	0,001	0	0	0	0,07	0	0	0,08	0	0	0	0
23	0,77	0,04	0	0	0	0,23	0	0,07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,14	0	0	0	0
29	0,001	0	0	0	0	0,001	0	0	0	0	0	0	0	0,001	0	0	0	0	0	0	0	0	0,03	0	0
33	0,18	0	0	0	0	0,08	0	0	0	0	0	0	0	0	0,15	0	0,09	0	0	0	0	0	0	0	0
39	0	0	0,001	0	0	0,001	0	0	0	0	0	0	0	0,001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,13	0	0	0	0,11	0	0	0,09	0	0,18	0	0,11
43	0,15	0	0	0	0	0,17	0,08	0	0	0	0	0	0	0	0,09	0	0	0,04	0	0	0,06	0	0	0	0
45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,22	0	0	0	0
46	0	0	0,001	0	0	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N° Sérum Témoin	210	190	160	150	145	140	130	129	110	107	106	105	100	94	90	84	82	81	80,5	80	70	69,5	69	68	66
1	0	0	0	0	0	0	0,07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0
2	0	0	0,18	0	0	0	0,14	0	0	0	0	0	0,05	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0,001	0	0,001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,001	0	0	0,32	0
4	0	0	0,001	0	0	0	0,001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,01	0	0,25	0	0	0	0
5	0,09	0	0,09	0	0	0	0,11	0	0	0	0	0,07	0	0,13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,37	0
6	0	0	0	0	0	0	0,07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,14	0,1	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0,001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,12	0	0	0,02	0,04
8	0,001	0	0,19	0	0	0	0,15	0	0,13	0,26	0	0	0	0,1	0,13	0	0	0,07	0	0,23	0,16	0	0,17	0	0,18
9	0,43	0	0,41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05	0	0	0,03	0	0	0	0,15	0	0	0	0
10	0,23	0	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0,001	0	0,001	0,001	0	0	0,24	0,27	0	0,001	0	0,03	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,001	0	0	0	0	0	0,05	0	0,09	0,02	0
19	0,12	0	0,18	0	0	0	0,13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,17	0	0	0	0,46	0	0	0	0
20	0	0	0,09	0	0	0	0,08	0	0	0	0	0	0,21	0,12	0	0	0	0	0	0,18	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0,07	0	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,02	0	0,001	0,001	0,001	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,26	0	0	0,16	0
24	0	0	0,16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,08	0	0,3	0	0	0	0,36	0,09	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0,09	0	0	0,08	0	0	0	0	0,11	0	0	0	0	0	0	0	0,45
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,07	0	0	0,08	0	0	0	0,11	0	0	0	0

TABLEAU 18: Population de base ≤ 67 ans (2ième partie)

N° Sérum Alzheimer	64	62	55	50	PD50	35	33	32	31	28	27	26	25	24	23	22	21	20	18	16	13	11	10	BF	Age	Sexe	Coef Corr	Diagnostic clinique
4	0	0	0	0,24	0,8	0	0	0	0	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	63	F	0,96	MA Probable
8	0	0,12	0	0,01	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	66	H	0,92	MA Probable
23	0,18	0,39	0	0,03	1	0,15	0	0	0,15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,33	0	0	1	63	F	0,91	MA Probable
29	0	0,65	0	0,001	0,07	0	0	0	0	0	0	0	0	0,18	0	0	0,001	0	0	0	0	0	0	1	67	F	0,91	MA Probable
33	0,53	0	0	0,1	0,71	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,26	0	0	0	0	2	58	F	0,93	MA Probable
39	0	0	0	0,09	0,51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	64	F	0,91	MA Probable
42	0	0	0,52	0,49	0,49	0	0	0	0,27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	58	H	0,96	MA Confirmée
43	0	0,15	0	0,83	1,86	0,12	0	0,07	0	0	0	0	0	0,18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	64	F	0,96	MA Confirmée
45	0,24	0	0	0,4	1,17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	63	F	0,96	MA Confirmée
46	0	0	0	0,31	0,85	0,001	0	0	0	0	0,08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,02	1	53	F	0,94	MA Confirmée
N° Sérum Témoin	64	62	55	50	PD50	35	33	32	31	28	27	26	25	24	23	22	21	20	18	16	13	11	10	BF	Age	Sexe	Coef Corr	Diagnostic clinique
1	0,49	0	0	0,23	0,74	0	0	0	0,17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,11	0	0	0	0	2	59	F	0,93	Témoin âgé
2	0	0,6	0	0,07	0,96	0	0	0	0,16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	59	F	0,93	Témoin âgé
3	0	0	0	0,24	0,05	0	0	0	0,001	0	0	0	0	0	0	0,001	0	0,001	0,001	0	0	0,001	0	3	59	F	0,93	Témoin âgé
4	0	0	0	0,08	0,32	0	0	0	0,001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	60	F	0,96	Témoin âgé
5	0	0	1,32	0,17	0,8	0	0	0	0,05	0,08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	F	0,95	Témoin âgé
6	0	0	0	0,22	0,6	0	0	0	0,13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	60	F	0,96	Témoin âgé
7	0	0	0	0,001	0,01	0	0	0	0,001	0	0	0	0	0,001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	F	0,96	Témoin âgé
8	0	0,69	1,23	0,42	0,27	0,02	0	0	0,06	0	0,32	0	0,69	0	0,18	0	0	0,13	1,27	0,32	0	0	0	1	60	F	0,95	Témoin âgé
9	0	0	0	0,09	0,43	0	0	0	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	60	F	0,93	Témoin âgé
10	0,05	0	0	0,56	0,93	0	0	0	0,001	0	0,56	0	0,07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	60	F	0,94	Témoin âgé
18	0	0	0	0,14	0,39	0	0	0	0	0	0	0	0,01	0	0	0	0	0,41	0	0	0	0	0,001	2	59	H	0,92	Témoin âgé
19	0	0	0	0,53	1,01	0	0	0,26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,23	0	0	0	0	2	60	H	0,94	Témoin âgé
20	0	0	0	0,11	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,06	1	60	H	0,98	Témoin âgé
21	0,36	0	0	0,33	0,55	0,29	0	0	0,28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,59	0	0	0	0,57	3	60	H	0,9	Témoin âgé
22	0,16	0	0	0,82	1,86	0	0,09	0	0,11	0	0,27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,98	0	0	2	60	H	0,94	Témoin âgé
23	0,2	0	0	0,25	0,61	0	0	0	0,16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,11	0	0	0	0	0	60	H	0,94	Témoin âgé
24	0,54	0,34	0	0,35	0,89	0	0	0	0	0	0,25	0,31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	60	H	0,94	Témoin âgé
25	0	0,37	0	0,4	1,43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,21	0	0	0	2	60	H	0,93	Témoin âgé
26	0	0	0	0,04	0,4	0	0	0	0,03	0	0	0	0	0,06	0	0	0,03	0	0	0	0	0	0	1	61	H	0,98	Témoin âgé

Légende: Ce tableau présente l'intensité des bandes détectées par les auto-anticorps en DO/mm chez les sujets ≤ 67 ans. BF = intensité du bruit de fond en unité arbitraire; Coef Corr = coefficient de corrélation entre les valeurs d'intensité imposées aux 14 bandes du sérum de référence (valeurs de référence) et les 14 valeurs réellement mésurées; H = homme; F = femme: MA = maladie d'Alzheimer; la valeur d'intensité 0,001 indique une trace.

III.2.2. RECUEIL DES DONNÉES

Les sérums provenant des 29 sujets (19 "témoins" et 10 "Alzheimer") de moins de 67 ans et testés par la technique des immuno-empreintes lors de la première étude (III.1.) ont été analysés par densitométrie à l'aide du logiciel IM1D, selon la technique développée dans le chapitre "Matériel et Méthodes". Les résultats sont présentés dans le **Tableau 18.** Ce tableau montre:

• la présence (notée par une valeur d'intensité en Do/mm) et l'absence (valeur 0) des 48 auto-anticorps recensés au cours de cette étude,

• la liste des coefficients de corrélation (Coef Corr) entre les 14 valeurs de Do/mm imposées aux 14 bandes du "sérum de référence" et les 14 valeurs de DO réellement mesurées par le logiciel. Ce calcul a été effectué pour chacune des immuno-empreintes sur lesquelles ont été testés les sérums du **Tableau 18.** On notera que tous ces coefficients sont élevés ($\geq 0,9$), ce qui montre que les mesures d'intensité sont fiables.

III.2.3. MISE AU POINT D'UN MODÈLE MATHÉMATIQUE

Deux analyses ont été réalisées en parallèle, pour obtenir deux équations comparables afin de vérifier si la prise en compte de l'intensité améliore le test diagnostique:

a) Une régression logistique "pas à pas" sur la population d'âge inférieur à 67 ans (n=29) et tenant compte de la présence ou de l'absence des auto-anticorps: variables binaires 0 ou 1.

b) Une régression logistique "pas à pas" sur les sujets de moins de 67 ans (n=29) tenant compte non seulement de la présence et de l'absence des auto-anticorps mais aussi de l'intensité des bandes: variables quantitatives (en Do/mm). Dans cette procédure, les variables quantitatives sont nommées par la masse moléculaire (mm) de l'antigène (en kDa) (exemple: (140), (130), ...). De plus, chaque variable a été recodée afin de mieux mettre en

relief leurs caractères semi discret et semi quantitatif. Il a fallu en effet renforcer la distinction entre la notion de traces (notées 0,001 intensité de DO/mm dans le **Tableau 18**) et la notion d'absence d'auto-anticorps (notée 0 dans le tableau). Lorsqu'une bande avait une intensité ≤ 0,001, elle était considérée comme "trace" et on lui a attribuée la valeur minimale de 0,001 intensité de DO/mm. Cette trace 0,001 étant très proche de 0 (signifiant l'absence), le recodage était nécessaire. Les variables recodées ont été notées mmB (pour auto-anticorps dirigés contre une protéine de mm kDa: exemple 140B, 130B...). Dans l'équation ces variables sont notées XmmB pour faciliter la lecture et prennent la valeur 0 quand l'anticorps est présent et la valeur 1 quand l'anticorps est absent. Ainsi, les traces (0,001 intensité de DO) peuvent être distinguées de l'absence (notée 0 dans le tableau) car les auto-anticorps sont définies par deux variables: X_{mm} et X_{mmB}.

En résumé, une trace d'auto-anticorps anti-P140 sera définie par les variables:

$(X_{mm}) = (X_{140}) = 0{,}001$

$(X_{mmB}) = (X_{140B}) = 0$

alors qu'une absence d'anti-P140 sera définie par

$(X_{mm}) = (X_{140}) = 0$

$(X_{mmB}) = (X_{140B}) = 1$

III.2.3.1. Régression logistique avec les variables binaires (présence (1) et absence (0) des auto-anticorps), l'âge et le sexe

Cette analyse a abouti à l'équation à 2 variables suivante:

$\text{Logit } p = -3{,}3823 - 3{,}4330\, X_{31} + 2{,}6323\, \text{SEXE}$

où la probabilité d'avoir la MA = $p = \dfrac{e^{\text{Logit (p)}}}{1 + e^{\text{Logit (p)}}}$

X_{31} prend la valeur 1 quand l'anticorps anti-P31 est présent et la valeur 0 quand il est absent. La variable "SEXE" prend la valeur 1 pour les hommes et 2 pour les femmes.

TABLEAU 19

Diagnostic de la population de base (≤ 67 ans) avec l'équation à 2 variables

N° Sérum Alzheimer	31	Valeur sexe	Diagnostic clinique	Logit p	p	Diagnostic du Test
4	0	2	MA Probable	1,8823	0,8679	Alzheimer
8	0	1	MA Probable	-0,7500	0,3208	Témoin
23	1	2	MA Probable	-1,5507	0,1750	Témoin
29	0	2	MA Probable	1,8823	0,8679	Alzheimer
33	0	2	MA Probable	1,8823	0,8679	Alzheimer
39	0	2	MA Probable	1,8823	0,8679	Alzheimer
42	1	1	MA Confirmée	-4,1830	0,0150	Témoin
43	0	2	MA Confirmée	1,8823	0,8679	Alzheimer
45	0	2	MA Confirmée	1,8823	0,8679	Alzheimer
46	0	2	MA Confirmée	1,8823	0,8679	Alzheimer
N° Sérum Témoin	**31**	**Valeur sexe**	**Diagnostic clinique**	**Logit p**	**p**	**Diagnostic du Test**
1	1	2	Témoin âgé	-1,5507	0,1750	Témoin
2	1	2	Témoin âgé	-1,5507	0,1750	Témoin
3	1	2	Témoin âgé	-1,5507	0,1750	Témoin
4	1	2	Témoin âgé	-1,5507	0,1750	Témoin
5	1	2	Témoin âgé	-1,5507	0,1750	Témoin
6	1	2	Témoin âgé	-1,5507	0,1750	Témoin
7	1	2	Témoin âgé	-1,5507	0,1750	Témoin
8	1	2	Témoin âgé	-1,5507	0,1750	Témoin
9	1	2	Témoin âgé	-1,5507	0,1750	Témoin
10	1	2	Témoin âgé	-1,5507	0,1750	Témoin
18	0	1	Témoin âgé	-0,7500	0,3208	Témoin
19	0	1	Témoin âgé	-0,7500	0,3208	Témoin
20	0	1	Témoin âgé	-0,7500	0,3208	Témoin
21	1	1	Témoin âgé	-4,1830	0,0150	Témoin
22	1	1	Témoin âgé	-4,1830	0,0150	Témoin
23	1	1	Témoin âgé	-4,1830	0,0150	Témoin
24	0	1	Témoin âgé	-0,7500	0,3208	Témoin
25	0	1	Témoin âgé	-0,7500	0,3208	Témoin
26	1	1	Témoin âgé	-4,1830	0,0150	Témoin

Sensibilité = 70% Spécificité = 100%

Légende: 31 = Présence (1) ou absence (0) de l'auto-anticorps anti-P31 (protéines de 31 kDa); Valeur sexe = valeur prise par la variable "sexe" dans l'équation; MA = Maladie d'Alzheimer; p = probabilité pour que le sujet soit malade.

Cette équation a une spécificité de 100% et une sensibilité de 70% (**Tableau 19**). En effet, tous les sujets témoins sont "bien classés" ($p<0,5$) et trois "Alzheimer" sont diagnostiqués "témoins" avec cette équation logistique ($p<0,5$, cases ombrées du **Tableau 19**). Ce tableau présente les valeurs prises par le Logit p et la probabilité p d'être malade ainsi que le diagnostic qui en découle.

Notons que cette équation à 2 variables établie à partir des sujets de moins de 67 ans a les caractéristiques suivantes:

• elle ne fait pas intervenir la variable "AGE": le biais dû à l'âge a été éliminé lors de la sélection des sujets de moins de 67 ans,

• elle fait intervenir la variable "SEXE": la différence significative décelée au début de l'étude (paragraphe III.2.1.3) est atténuée par l'entrée de la variable "SEXE" dans l'équation. Cette variable est associée à un coefficient positif (2,6323). Cela signifie que la probabilité p d'avoir la MA est plus grande pour les sujets du sexe féminin (car la variable SEXE = 2). Les femmes ont plus de risque d'avoir la MA. Ces résultats corroborent les données de la littérature (Henderson, 1988),

• elle ne fait pas intervenir les anti-P140 (X_{140}). Cette variable a malheureusement dû être éliminée; la méthode logistique ne permettant pas de la conserver. En effet, dans notre échantillon aucun des témoins (de moins de 67 ans) ne produit d'anti-P140. La probabilité pour un témoin de notre échantillon d'avoir les anti-P140 = 0. Comme la régression logistique est construite sur le Logit:

Logit p = Log (p / 1-p) = Log (0 / 1) or le Log (0) n'existe pas.

Le logiciel SAS ne pouvant pas tester les données des anti-P140 de notre échantillon, nous avons dû éliminer cette variable pour établir le modèle mathématique.

• Néanmoins, sans ces anti-P140 nous avons pu obtenir un modèle mathématique avec deux variables, qui donne une meilleure spécificité (100%) que celle de l'équation

TABLEAU 20

Diagnostic de la population de base ≤ 67 ans avec l'équation à 4 variables

N° Sérum Alzheimer	81B	31B	31	Valeur sexe	Diagnostic clinique	Logit p	p	Diagnostic du Test
4	1	1	0	2	MA Probable	7,2156	0,9993	Alzheimer
8	0	1	0	1	MA Probable	2,5977	0,9307	Alzheimer
23	1	0	0,15	2	MA Probable	-1,7924	0,1428	Témoin
29	1	1	0	2	MA Probable	7,2156	0,9993	Alzheimer
33	1	1	0	2	MA Probable	7,2156	0,9993	Alzheimer
39	1	1	0	2	MA Probable	7,2156	0,9993	Alzheimer
42	0	0	0,27	1	MA Confirmée	2,9596	0,9507	Alzheimer
43	0	1	0	2	MA Confirmée	14,0158	1,0000	Alzheimer
45	1	1	0	2	MA Confirmée	7,2156	0,9993	Alzheimer
46	1	1	0	2	MA Confirmée	7,2156	0,9993	Alzheimer
N° Sérum Témoin	81B	31B	31	Valeur sexe	Diagnostic clinique	Logit p	p	Diagnostic du Test
1	1	0	0,17	2	Témoin âgé	-0,2307	0,4426	Témoin
2	1	0	0,16	2	Témoin âgé	-1,0115	0,2667	Témoin
3	1	0	0,001	2	Témoin âgé	-13,4266	0,0000	Témoin
4	1	0	0,001	2	Témoin âgé	-13,4266	0,0000	Témoin
5	1	0	0,05	2	Témoin âgé	-9,6006	0,0001	Témoin
6	1	0	0,13	2	Témoin âgé	-3,3540	0,0338	Témoin
7	1	0	0,001	2	Témoin âgé	-13,4266	0,0000	Témoin
8	0	0	0,06	2	Témoin âgé	-2,0196	0,1172	Témoin
9	1	0	0,01	2	Témoin âgé	-12,7239	0,0000	Témoin
10	0	0	0,001	2	Témoin âgé	-6,6264	0,0013	Témoin
18	1	1	0	1	Témoin âgé	-4,2025	0,0147	Témoin
19	1	1	0	1	Témoin âgé	-4,2025	0,0147	Témoin
20	1	1	0	1	Témoin âgé	-4,2025	0,0147	Témoin
21	1	0	0,28	1	Témoin âgé	-3,0598	0,0448	Témoin
22	0	0	0,11	1	Témoin âgé	-9,5336	0,0001	Témoin
23	1	0	0,16	1	Témoin âgé	-12,4296	0,0000	Témoin
24	1	1	0	1	Témoin âgé	-4,2025	0,0147	Témoin
25	1	1	0	1	Témoin âgé	-4,2025	0,0147	Témoin
26	1	0	0,03	1	Témoin âgé	-22,5803	0,0000	Témoin

Sensibilité = 90% Spécificité = 100%

Légende: 81B et 31B = variables recodées correspondant respectivement aux auto-anticorps anti-P81 et anti-P31; 31 = intensité du signal (en DO/mm) révélé par les auto-anticorps anti-P31; valeur sexe = valeur prise par la variable "sexe" dans l'équation; p = probabilité pour que le sujet soit malade.

précédemment établie avec la population totale (n=79). Cependant, sa sensibilité (70%) est plus faible, mais elle reste relativement élevée.

Un modèle mathématique intégrant des variables quantitatives (intensité des bandes) pourrait améliorer le test diagnostique si dans ce nouveau modèle la spécificité reste égale à 100% et la sensibilité est supérieure à 70%.

III.2.3.2 Régression logistique avec les variables qualitatives et quantitatives (intensité des bandes)

Cette analyse a abouti à l'équation à 4 variables suivante:

$$\text{Logit } p = -29{,}5407 - 6{,}8002\, X_{81B} + 78{,}0822\, X_{31} + 20{,}7203\, X_{31B} + 11{,}4181\, \text{SEXE}$$

où la probabilité d'avoir la MA = $p = \dfrac{e^{\text{Logit (p)}}}{1 + e^{\text{Logit (p)}}}$

et où les variables (X_{mmB}) prennent la valeur 1 quand l'anticorps est absent, 0 quand il est présent; les variables (X_{mm}) la valeur de l'intensité en Do/mm et la variable SEXE 1 pour les hommes et 2 pour les femmes. Là encore, les anti-P140 ont été exclus de l'étude pour les mêmes raisons que précédemment.

Cette équation a néanmoins une spécificité de 100% et une sensibilité de 90% (**Tableau 20**). Tous les sujets sont bien classés sauf un Alzheimer (Sérum N°23, case ombrée du tableau) qui a une probabilité $p < 0{,}5$. Il semblerait que cette équation à 4 variables (tenant compte de l'intensité) améliore le diagnostic: la sensibilité est passée de 70% à 90%. En particulier, la concentration des auto-anticorps dirigés contre une protéine de 31 kDa jouerait un rôle important dans le diagnostic de la MA.

Une validation par une étude en aveugle est nécessaire avant de conclure quant à l'efficacité d'une des trois équations établies au cours des différentes études.

III.3. VALIDATION DES MODÈLES

Nous avons donc établi en parallèle trois équations-tests:

a) *Equation à 7 variables (Population totale; n = 79): Présence/Absence*

Logit (p) = - 24,6943 + 6,9327 x X_{140} + 3,3683 x X_{81} - 2,9577 x X_{27} - 6,8581 x X_{22} - 5,5362 x X_{106} + 2,5717 x X_{70} + 0,3374 x AGE

où la probabilité d'être malade = $p = \frac{e^{\text{Logit (p)}}}{1 + e^{\text{Logit (p)}}}$

avec une sensibilité=91,3%, une spécificité=93,94% et un seuil de probabilité s = 0,5.

b) *Equation à 2 variables (Population ≤ 67 ans, n=29): Présence/Absence*

Logit p = - 3,3823 - 3,4330 X_{31} + 2,6323 SEXE

avec une sensibilité=70%, une spécificité=100% et un seuil de probabilité s = 0,5.

c) *Equation à 4 variables (Population ≤ 67 ans, n = 29): Présence/Absence/Intensité*

Logit p = - 29,5407 - 6,8002 X_{81B} + 78,0822 X_{31} + 20,7203 X_{31B} + 11,4181 SEXE

avec une sensibilité=90%, une spécificité=100% et un seuil de probabilité s = 0,5.

Une validation par une étude en aveugle a donc été nécessaire afin de vérifier la sensibilité et la spécificité de ces modèles.

L'étude en aveugle a été réalisée sur des nouvelles populations de la façon suivante: les sérums ont été testés par immuno-empreintes sans connaître le diagnostic des sujets. Une fois le diagnostic établi avec les équations-tests, l'état de santé des sujets nous a été révélé par une tierce personne.

TABLEAU 21

Test de l'équation à 7 variables sur des sujets témoins jeunes (âgés de 17 à 52 ans).

N° Sérum	140	106	81	70	27	22	Age	Logit p	p	Diagnostic
1	0	0	1	0	0	1	17	-22,4483	0,0000	Témoin
2	1	1	1	1	0	0	29	-7,5732	0,0005	Témoin
3	0	0	0	0	0	0	29	-14,9097	0,0000	Témoin
4	0	1	0	1	0	0	23	-19,8986	0,0000	Témoin
5	1	0	1	1	0	0	21	-4,7362	0,0087	Témoin
6	0	0	0	1	0	0	24	-14,0250	0,0000	Témoin
7	0	0	0	0	0	0	24	-16,5967	0,0000	Témoin
8	0	0	1	0	0	0	23	-13,5658	0,0000	Témoin
9	1	0	1	1	0	0	26	-3,0492	0,0453	Témoin
10	1	0	1	1	0	0	28	-2,3744	0,0851	Témoin
11	0	0	0	1	0	0	25	-13,6876	0,0000	Témoin
12	1	0	0	1	0	0	27	-6,0801	0,0023	Témoin
13	0	0	0	0	1	0	27	-18,5422	0,0000	Témoin
14	0	0	0	1	0	0	25	-13,6876	0,0000	Témoin
15	0	1	1	0	0	0	37	-14,3784	0,0000	Témoin
16	0	0	0	0	0	1	34	-20,0808	0,0000	Témoin
17	0	1	0	0	0	1	37	-24,6048	0,0000	Témoin
18	0	1	1	1	1	0	31	-16,7888	0,0000	Témoin
19	0	0	1	1	0	0	37	-6,2705	0,0019	Témoin
20	0	0	0	1	0	0	36	-9,9762	0,0000	Témoin
21	0	0	0	0	0	0	39	-11,5357	0,0000	Témoin
22	0	1	0	1	0	0	38	-14,8376	0,0000	Témoin
23	1	0	0	1	0	1	32	-11,2512	0,0000	Témoin
24	1	0	0	1	0	1	33	-10,9138	0,0000	Témoin
25	0	0	0	0	0	0	31	-14,2349	0,0000	Témoin
26	0	0	0	0	1	0	33	-16,5178	0,0000	Témoin
27	1	0	0	1	0	0	33	-4,0557	0,0170	Témoin
28	1	0	0	1	0	0	42	-1,0191	0,2652	Témoin
29	0	0	1	1	0	0	43	-4,2461	0,0141	Témoin
30	0	0	0	0	0	0	47	-8,8365	0,0001	Témoin
31	0	0	0	0	0	0	50	-7,8243	0,0004	Témoin
32	0	0	1	0	0	0	44	-6,4804	0,0015	Témoin
33	1	0	1	0	0	0	47	1,4645	0,8122	Alzheimer
34	0	0	1	1	0	1	46	-10,0920	0,0000	Témoin
35	1	1	0	0	0	1	48	-13,9607	0,0000	Témoin
36	1	0	1	0	0	0	42	-0,2225	0,4446	Témoin
37	0	0	1	1	0	0	46	-3,2339	0,0379	Témoin
38	0	0	1	0	1	0	41	-10,4503	0,0000	Témoin
39	0	0	0	1	0	0	49	-5,5900	0,0037	Témoin
40	1	1	1	1	0	0	42	-3,1870	0,0397	Témoin
41	1	0	1	1	0	0	52	5,7232	0,9967	Alzheimer
42	0	0	0	1	0	1	52	-11,4359	0,0000	Témoin

Spécificité = 95,24%

III.3.1. MODÈLE À 7 VARIABLES DE L'ÉTUDE QUALITATIVE

III.3.1.1. Validation sur des populations de témoins

• Population jeune (décrite dans le **Tableau 7** page 110 du chapitre "Matériel et Méthodes")

La population jeune utilisée pour valider le modèle à 7 variables de l'étude qualitative a les caractéristiques suivantes:

- n = 42,
- 17 femmes et 25 hommes,
- Moyenne d'âge = 35,5 +/- 2,87 ans,
- Personnel de laboratoire.

Le **Tableau 21** présente la liste des auto-anticorps détectés par immuno-empreintes chez ces sujets (présence = 1 et absence = 0), la liste des p calculés (probabilité p du sujet d'être malade) et les diagnostics obtenus avec cette équation-test au seuil s = 0,5.

Deux témoins jeunes sur 42 sont mal classés (cases ombrées du **Tableau 21**). La spécificité est donc égale à 95,24%.

• Population témoin "EVA"

Ces sujets "EVA" sont différents de ceux utilisés lors de la mise au point de l'équation. Cependant, les critères de recrutement sont les mêmes (MMS supérieur ou égal à 28, suivi longitudinal pendant deux ans). Les caractéristiques de cette population sont les suivantes:

- n = 17,
- 7 femmes et 25 hommes,
- Moyenne d'âge = 64,34 +/- 1,24 ans.

Le **Tableau 22** présente les profils d'auto-anticorps des différents sujets, les p calculés à partir de l'équation à 7 variables (s = 0,5), ainsi que les diagnostics qui en découlent.

TABLEAU 22
Test de l'équation à 7 variables sur des sujets témoins âgés (Etude EVA)

Nom	140	106	81	70	27	22	Age	Logit p	p	Diagnostic
ROU 305	1	0	1	1	0	0	64	9,7720	0,9999	Alzheimer
GAS 368	0	0	0	0	0	0	70	-1,0763	0,2542	Témoin
BOU 382	1	0	0	0	0	0	62	3,1572	0,9592	Alzheimer
WIL 308	1	0	1	1	0	0	67	10,7842	1,0000	Alzheimer
JOS 294	1	0	0	1	0	1	65	-0,1170	0,4708	Témoin
ROU 370	1	0	1	1	1	0	65	7,1517	0,9992	Alzheimer
BOU 383	1	1	1	1	0	0	65	4,5732	0,9898	Alzheimer
HUB 274	1	0	1	1	0	0	63	9,4346	0,9999	Alzheimer
ROU 371	1	0	1	1	1	0	61	5,8021	0,9970	Alzheimer
PIG 304	1	1	0	1	0	0	64	0,8675	0,7042	Alzheimer
AIR 335	1	0	0	0	0	0	65	4,1694	0,9848	Alzheimer
CAL 393	1	0	0	1	0	0	62	5,7289	0,9968	Alzheimer
VIN 358	1	0	0	1	1	0	63	3,1086	0,9572	Alzheimer
CHA 413	1	1	0	1	0	0	67	1,8797	0,8676	Alzheimer
SAL 328	1	1	1	1	0	1	61	-3,6345	0,0257	Témoin
CAL 394	1	1	1	1	0	0	63	3,8984	0,9801	Alzheimer
CHA 414	1	1	1	0	0	0	67	2,6763	0,9356	Alzheimer

Spécificité = 17,65%

TABLEAU 23: Test de l'équation à 7 variables sur des sujets atteints de la MA répondeurs et non répondeurs à la tacrine et des sujets témoins (Etude Tacrine)

Nom	140	106	81	70	27	22	Age	Diagnostic clinique	Logit p	p	Diagnostic Test	
NA 2	1	0	1	1	0	0	62	MA répondeur	9,0972	0,9999	Alzheimer	
MB 29	1	0	1	1	1	0	85	MA répondeur	13,8997	1,0000	Alzheimer	
GB 28	0	0	0	1	1	0	73	MA répondeur	-0,4501	0,3893	Témoin	
CB 31	0	0	1	1	1	0	76	MA répondeur	3,9304	0,9807	Alzheimer	
FD 7	1	0	1	1	0	0	78	MA répondeur	14,4956	1,0000	Alzheimer	
JD 12	1	0	1	1	1	0	69	MA répondeur	8,5013	0,9998	Alzheimer	
GF 8	1	0	0	1	0	0	75	MA répondeur	10,1151	1,0000	Alzheimer	
AN 6	0	0	0	1	0	0	89	MA répondeur	7,9060	0,9996	Alzheimer	
MV 18	0	0	1	1	0	0	79	MA répondeur	7,9003	0,9996	Alzheimer	
MS 33	1	0	1	1	0	0	79	MA répondeur	14,8330	1,0000	Alzheimer	
PR 37	1	1	0	1	0	0	78	MA répondeur	5,5911	0,9963	Alzheimer	Sensibilité
ET 49	1	1	0	1	0	0	84	MA répondeur	7,6155	0,9995	Alzheimer	
MLP 23	1	0	0	1	0	1	83	MA répondeur	5,9562	0,9974	Alzheimer	= 95,45%
LMD 36	0	0	0	1	0	0	83	MA répondeur	5,8816	0,9972	Alzheimer	
IM 10	1	0	0	1	0	1	80	MA répondeur	4,9440	0,9929	Alzheimer	
MM 9	1	0	0	1	1	0	88	MA répondeur	11,5436	1,0000	Alzheimer	
DL 15	0	0	0	1	0	1	86	MA répondeur	0,0357	0,5089	Alzheimer	
MD 14	1	0	0	1	0	0	86	MA répondeur	13,8265	1,0000	Alzheimer	
MD 30	1	0	0	0	0	1	86	MA répondeur	4,3967	0,9878	Alzheimer	
NZ 38	1	0	0	0	0	0	86	MA répondeur	11,2548	1,0000	Alzheimer	
MR 47	1	1	0	1	1	0	86	MA répondeur	5,3326	0,9952	Alzheimer	
JB 32	1	0	1	1	1	1	75	MA répondeur	3,6676	0,9751	Alzheimer	
SB 27	1	0	1	1	0	0	73	Témoin	12,8086	1,0000	Alzheimer	
DD 17	0	0	0	0	0	0	70	Témoin	-1,0763	0,2542	Témoin	
RB 21	1	0	0	1	0	1	79	Témoin	4,6066	0,9901	Alzheimer	
JD 25	1	0	0	1	1	1	86	Témoin	4,0107	0,9822	Alzheimer	
JGR 22	0	0	0	1	0	0	67	Témoin	0,4832	0,6185	Alzheimer	
GM 11	0	0	1	1	0	0	70	Témoin	4,8637	0,9923	Alzheimer	Spécificité
JJN 5	0	0	0	1	1	0	89	Témoin	4,9483	0,9930	Alzheimer	
MP 4	0	0	0	1	0	0	75	Témoin	3,1824	0,9602	Alzheimer	= 11,76 %
MA 52	1	1	1	1	0	1	80	Témoin	2,7761	0,9414	Alzheimer	
JT 50	0	0	1	1	0	0	84	Témoin	9,5873	0,9999	Alzheimer	
VR 54	1	0	0	1	1	1	67	Témoin	-2,3999	0,0832	Témoin	
RL 44	1	1	1	1	1	0	83	Témoin	7,6887	0,9995	Alzheimer	
GA 41	1	1	0	1	1	0	74	Témoin	1,2838	0,7831	Alzheimer	
LP 56	1	0	0	1	0	1	70	Témoin	1,5700	0,8278	Alzheimer	
RS 34	0	1	1	1	1	0	86	Témoin	1,7682	0,8542	Alzheimer	
EL 46	1	0	0	1	0	0	74	Témoin	9,7777	0,9999	Alzheimer	
SR 48	1	1	1	1	0	0	70	Témoin	6,2602	0,9981	Alzheimer	
SC 13	1	0	0	0	0	0	75	MA non-répondeur	7,5434	0,9995	Alzheimer	
GE 26	0	0	0	1	0	1	84	MA non-répondeur	-0,6391	0,3455	Témoin	Sensibilité
JD 16	1	0	1	1	0	0	70	MA non-répondeur	11,7964	1,0000	Alzheimer	
RP 3	0	0	1	1	1	0	73	MA non-répondeur	2,9182	0,9487	Alzheimer	= 71,42%
LR 24	1	0	0	1	1	0	85	MA non-répondeur	10,5314	1,0000	Alzheimer	
JS 20	1	0	1	1	0	1	74	MA non-répondeur	6,2879	0,9981	Alzheimer	
SZ35	0	0	1	1	1	1	74	MA non-répondeur	-3,6025	0,0265	Témoin	

Sensibilité totale = 89,65% Spécificité = 11,76%

Légende: MA = maladie d'Alzheimer.

14 sujets "témoins âgés" sont mal classés (cases ombrées du **Tableau 22**). La spécificité est donc de 17,65%.

• Population témoin "tacrine"

Ces sujets témoins (**Tableau 11** page 113 du chapitre "Matériels et Méthodes") obtenus au cours de l'étude "Tacrine" ont les caractéristiques suivantes:

- n = 17,
- 6 femmes et 11 hommes,
- Moyenne d'âge = 75,9 +/- 3,63 ans,
- MMS ≥ 29.

La partie centrale du **Tableau 23** présente la liste des sujets témoins "tacrine" (de SB27 à SR48) ainsi que leur profil d'auto-anticorps. La présence (1) et l'absence (0) de ces auto-anticorps ainsi que l'âge a permis d'établir le diagnostic-test. Pour être "bien classés" (classé dans le groupe "témoin"), les sujets doivent avoir un $p<0,5$ (**Tableau 23**).

2 sujets uniquement sont bien diagnostiqués (cases blanches du **Tableau 23**), les autres sont mal classés (cases ombrées). La spécificité est de 11,76 %. Les autres sujets du tableau seront utilisés plus loin pour le calcul de la sensibilité.

• Population témoins "PAQUID" (**Tableau 5** page 109 du chapitre "Matériels et Méthodes")

Ces témoins recrutés au cours de l'étude "PAQUID" ont les caractéristiques suivantes:

- n = 17,
- 16 femmes et 1 homme,
- Moyenne d'âge = 73,47 +/- 2,97 ans,
- MMS ≥ 28.

Les sérums de ces sujets ont été testés par immuno-empreintes. Les résultats de la validation sur l'équation à 7 variables sont présentés dans le **Tableau 24**. Les valeurs des p

TABLEAU 24
Test de l'équation à 7 variables sur des sujets témoins âgés (PAQUID)

Nom	140	106	81	70	27	22	Age	Diagnostic clinique	Logit p	p	Diagnostic
96 T0	1	1	1	1	0	0	67	Témoin	5,2480	0,9948	Alzheimer
110 T0	1	1	1	1	1	0	77	Témoin	5,6643	0,9965	Alzheimer
206 T0	1	0	1	1	1	1	67	Témoin	0,9684	0,7248	Alzheimer
237 T0	0	0	1	1	1	0	67	Témoin	0,8938	0,7097	Alzheimer
248 T0	1	0	0	1	0	0	66	Témoin	7,0785	0,9992	Alzheimer
357 T0	1	1	1	1	0	0	76	Témoin	8,2846	0,9997	Alzheimer
384 T0	0	0	1	1	0	1	78	Témoin	0,7048	0,6693	Alzheimer
409 T0	0	0	1	1	1	1	67	Témoin	-5,9643	0,0026	Témoin
469 T0	1	1	1	1	1	0	81	Témoin	7,0139	0,9991	Alzheimer
550 T0	1	0	1	1	1	0	75	Témoin	10,5257	1,0000	Alzheimer
1102 T0	1	1	0	1	0	0	66	Témoin	1,5423	0,8238	Alzheimer
1168 T0	1	0	0	1	1	1	78	Témoin	1,3115	0,7878	Alzheimer
1222 T0	1	0	1	1	0	0	69	Témoin	11,4590	1,0000	Alzheimer
1319 T0	1	0	1	0	1	0	79	Témoin	9,3036	0,9999	Alzheimer
1644 T0	1	0	0	1	1	0	77	Témoin	7,8322	0,9996	Alzheimer
1654 T0	1	0	0	1	0	0	81	Témoin	12,1395	1,0000	Alzheimer
1670 T0	1	0	0	1	1	0	78	Témoin	8,1696	0,9997	Alzheimer

Spécificité = 5,88%

ont été calculées à partir des profils d'auto-anticorps et de l'âge des sujets. Ainsi, le diagnostic-test a pu être établi.

La spécificité pour cet échantillon test est de 5,88 (16 sujets sur 17 sont mal diagnostiqués: cases ombrées du **Tableau 24**; leur p étant supérieur à 0,5).

III.3.1.2. Validation sur des populations "Alzheimer"

• Population "Alzheimer tacrine" (**Tableau 10** page 113 du chapitre "Matériels et Méthodes")

Ces sujets "Alzheimer" ont été traités par la tacrine, certains d'entre eux ont répondu au traitement, d'autres non. Ils ont néanmoins été utilisés pour valider la sensibilité de l'équation de l'étude qualitative. Cet échantillon a les caractéristiques suivantes:

a) Alzheimer répondeur à la tacrine

- n = 22,
- 14 femmes et 8 hommes,
- Moyenne d'âge = 80,27 +/- 2,98 ans,
- Critères diagnostiques: NINCDS-ADRDA.

b) Alzheimer non répondeur à la tacrine

- n = 7,
- 5 femmes et 2 hommes,
- Moyenne d'âge = 76,43 +/- 5,13 ans,
- Critères diagnostiques: NINCDS-ADRDA.

Une fois analysé par immuno-empreintes, le profil d'auto-anticorps de ces sujets a été testé dans l'équation à 7 variables (**Tableau 23**). Le seuil de probabilité est toujours s=0,5.

Un "Alzheimer" répondeur et deux "non répondeurs" sont mal classés (diagnostiqués "témoins"). La sensibilité de ces deux échantillons "Alzheimer répondeurs" et "Alzheimer

TABLEAU 25: Test de l'équation à 7 variables sur des Alzheimer incidents et prévalents (PAQUID)

Nom	140	106	81	70	27	22	Age	Diagnostic clinique	Logit p	p	Diagnostic
112 T0	1	1	1	1	0	0	83	MA incidente	10,6464	1,0000	Alzheimer
265 T0	0	0	1	1	0	0	79	MA incidente	7,9003	0,9996	Alzheimer
359 T0	0	0	0	1	0	0	92	MA incidente	8,9182	0,9999	Alzheimer
390 T0	1	1	1	1	1	1	75	MA incidente	-1,8686	0,1337	Témoin
423 T0	1	1	1	1	1	0	82	MA incidente	7,3513	0,9994	Alzheimer
532 T0	1	0	1	0	1	0	85	MA incidente	11,3280	1,0000	Alzheimer
915 T0	0	0	1	1	0	0	89	MA incidente	11,2743	1,0000	Alzheimer
1010 T0	0	0	0	0	0	0	75	MA incidente	0,6107	0,6481	Alzheimer
1104 T0	1	1	0	1	0	0	78	MA incidente	5,5911	0,9963	Alzheimer
1153 T0	1	0	0	1	1	0	93	MA incidente	13,2306	1,0000	Alzheimer
1348 T0	1	0	0	1	0	1	78	MA incidente	4,2692	0,9862	Alzheimer
1513 T0	1	0	0	1	1	0	80	MA incidente	8,8444	0,9999	Alzheimer
1590 T0	1	0	0	1	1	1	81	MA incidente	2,3237	0,9108	Alzheimer
1821 T0	0	0	1	1	0	0	87	MA incidente	10,5995	1,0000	Alzheimer
2013 T0	1	0	0	1	0	0	88	MA incidente	14,5013	1,0000	Alzheimer
2056 T0	1	0	1	1	0	0	82	MA incidente	15,8452	1,0000	Alzheimer
2155 T0	0	0	0	0	0	0	90	MA incidente	5,6717	0,9966	Alzheimer
2302 T0	0	0	0	1	0	0	84	MA incidente	6,2190	0,9980	Alzheimer
2617 T0	1	0	1	0	0	1	80	MA incidente	5,7406	0,9968	Alzheimer
5028 T0	1	0	0	0	0	0	84	MA incidente	10,5800	1,0000	Alzheimer
5061 T0	0	1	0	0	0	0	68	MA incidente	-7,2873	0,0007	Témoin
244 T0	0	1	0	0	0	0	77	MA prévalente	-4,2507	0,0141	Témoin
430 T0	1	0	0	1	1	1	80	MA prévalente	1,9863	0,8794	Alzheimer
431 T0	0	0	1	0	0	0	79	MA prévalente	5,3286	0,9952	Alzheimer
452 T0	1	0	1	0	1	0	102	MA prévalente	17,0638	1,0000	Alzheimer
709 T0	1	0	0	0	0	0	75	MA prévalente	7,5434	0,9995	Alzheimer
801 T0	1	1	0	1	1	1	85	MA prévalente	-1,8629	0,1344	Témoin
1063 T0	1	0	0	1	0	1	82	MA prévalente	5,6188	0,9964	Alzheimer
1233 T0	1	1	1	1	0	0	85	MA prévalente	11,3212	1,0000	Alzheimer
1650 T0	1	0	0	0	0	0	93	MA prévalente	13,6166	1,0000	Alzheimer
1766 T0	0	0	0	0	0	0	78	MA prévalente	1,6229	0,8352	Alzheimer
1925 T0	1	0	0	1	0	0	89	MA prévalente	14,8387	1,0000	Alzheimer
1926 T0	1	0	1	1	1	0	79	MA prévalente	11,8753	1,0000	Alzheimer
2200 T0	0	0	0	0	0	0	85	MA prévalente	3,9847	0,9817	Alzheimer
2496 T0	1	0	0	1	0	0	87	MA prévalente	14,1639	1,0000	Alzheimer
2498 T0	1	0	0	1	0	0	95	MA prévalente	16,8631	1,0000	Alzheimer
2588 T0	0	0	0	1	0	0	80	MA prévalente	4,8694	0,9924	Alzheimer
3098 T0	0	0	1	1	0	0	75	MA prévalente	6,5507	0,9986	Alzheimer
3108 T0	0	0	0	1	0	1	81	MA prévalente	-1,6513	0,1609	Témoin

Sensibilité = 90,5%

Sensibilité = 83,33%

Sensibilité totale = 87,18%

non répondeurs" est respectivement de 95,45% et 71,42%. Soit une sensibilité totale de 89,65% sur l'ensemble des deux échantillons.

• Population "Alzheimer PAQUID" (**Tableau 6** page 109 du chapitre "Matériels et Méthodes")

Nous disposons de sujets "Alzheimer" incidents et prévalents. Les caractéristiques de ces échantillons sont les suivantes:

a) "Alzheimer" incidents:

- n = 21,
- 15 femmes et 6 hommes,
- Moyenne d'âge = 82,5 +/- 2,77 ans,
- Critères diagnostiques: NINCDS-ADRDA.

b) "Alzheimer" prévalents:

- n = 18,
- 13 femmes et 5 hommes,
- Moyenne d'âge = 83,7 +/- 3,61 ans,
- Critères diagnostiques: NINCDS-ADRDA.

L'analyse de ces sérums par la technique des immuno-empreintes a permis d'obtenir les résultats présentés dans le **Tableau 25**.

Cette population testée sur l'équation à 7 variables, a permis d'obtenir les résultats suivants:

- 19 "Alzheimer" incidents sur 21 sont bien classés (les 2 sujets "mal classés" sont dans les cases ombrées du **Tableau 25**). La sensibilité est donc de 90,5%.

- 15 "Alzheimer" prévalents sur 18 sont bien classés (3 sujets sont mal classés; cases ombrées du **Tableau 25**). La sensibilité pour ce sous-groupe est donc de 83,33%.

TABLEAU 26

Test de l'équation à 7 variables sur des sujets diagnostiqués "certains"

Nom	140	106	81	70	27	22	Diagnostic neuropathologique	Age	Logit p	p	Diagnostic
Poz	1	0	0	1	0	1	Témoin	98	11,0172	1,0000	Alzheimer
Pey	1	0	1	1	0	0	Témoin	93	19,5566	1,0000	Alzheimer
Var	1	0	1	1	0	0	Témoin	84	16,5200	1,0000	Alzheimer
Cros	1	0	1	1	0	0	Témoin	72	12,4712	1,0000	Alzheimer
Coa	1	1	1	1	0	0	Témoin	76	8,2846	0,9997	Alzheimer
Delu	1	0	1	1	0	0	Témoin	98	21,2436	1,0000	Alzheimer
Mag	1	0	1	1	0	0	Témoin	95	20,2314	1,0000	Alzheimer
Joa	0	0	0	1	0	0	Témoin-début d'atteinte	92	8,9182	0,9999	Alzheimer
Mal	1	0	0	1	0	0	MA Certifiée	37	-2,7061	0,0626	Témoin
Fai	1	0	0	0	0	0	Démence mixte	92	13,2792	1,0000	Alzheimer
Ord	1	0	1	1	0	0	Démence de type frontal	58	7,7476	0,9996	Alzheimer
Har	1	1	0	0	0	0	Démence mixte	85	5,3812	0,9954	Alzheimer
Han	0	0	0	0	1	0	Témoin	95	4,4010	0,9879	Alzheimer

Légende: MA = maladie d'Alzheimer.

TABLEAU 27: Test de l'équation à 7 paramètres sur des sujets atteints d'autres maladies neurodégénératives

Nom	140	106	81	70	27	22	Pathologie	Age	Logit p	p	Diagnostic
7067	1	1	1	0	0	0	DTF	47	-4,0717	0,0168	Témoin
7049	1	0	1	1	1	1	DTF	61	-1,0560	0,2581	Témoin
7019	1	1	0	1	0	0	DTF	72	3,5667	0,9725	Alzheimer
1497	1	1	0	1	0	0	DTF	73	3,9041	0,9802	Alzheimer
1486	1	0	0	1	0	0	DTF	69	8,0907	0,9997	Alzheimer
1485	1	0	1	1	0	0	DTF	66	10,4468	1,0000	Alzheimer
1479	1	0	0	1	0	0	DTF	63	6,0663	0,9977	Alzheimer
1474	0	1	0	1	0	0	DTF	62	-6,7400	0,0012	Témoin
7151	1	1	1	1	0	0	DV	86	11,6586	1,0000	Alzheimer
7072	1	0	0	1	0	0	DV	71	8,7655	0,9998	Alzheimer
7068	1	0	0	1	0	0	DV	70	8,4281	0,9998	Alzheimer
1473	1	0	0	1	0	1	DV	82	5,6188	0,9964	Alzheimer
7104	0	0	0	1	0	0	DV	65	-0,1916	0,4522	Témoin
5193	0	0	0	1	0	1	DV	71	-5,0253	0,0065	Témoin
1449	0	0	1	1	0	0	DV	69	4,5263	0,9893	Alzheimer
1081	1	1	1	1	1	0	DV	76	5,3269	0,9952	Alzheimer
7361	1	1	1	1	0	1	PSP	70	-0,5979	0,3548	Témoin
7367	1	0	1	1	0	0	PSP	72	12,4712	1,0000	Alzheimer
1477	0	0	1	1	0	1	PSP	64	-4,0188	0,0177	Témoin
7363	1	0	0	1	0	0	HPN	69	8,0907	0,9997	Alzheimer
7362	0	0	0	1	0	0	HPN	58	-2,5534	0,0722	Témoin
7206	0	0	0	1	0	1	HPN	61	-8,3993	0,0002	Témoin

Légende: DTF = démence de type frontal; DV = démence vasculaire; PSP = paralysie supranucléaire progressive; HPN = hydrocéphalie à pression normale.

Par conséquent, la sensibilité totale de l'échantillon Alzheimer "PAQUID" pour l'équation à 7 variables est égale à 87,18%.

III.3.1.3. Validation sur d'autres populations

L'équation à 7 variables a été testée sur deux autres populations:

• Population avec un diagnostic "certain" (**Tableau 8** page 110 du chapitre "Matériels et Méthodes")

Différents types de sérums ont été analysés par immuno-empreintes et les sujets ont été diagnostiqués avec l'équation. Le **Tableau 26** présente les résultats de cette étude.

Les témoins sont tous mal classés, le seul sujet "Alzheimer certain" de cet échantillon est lui aussi mal classé, et les sujets atteints d'autres maladies neurodégénératives comme une démence mixte (démence dégénérative et démence vasculaire) et la démence de type frontal sont diagnostiqués "Alzheimer".

• Population atteints d'autres maladies neurodégénératives (**Tableau 9** page 111 du chapitre "Matériels et Méthodes")

Les résultats de l'analyse par immuno-empreintes de ces différents sérums ainsi que le calcul de la probabilité p d'être malade et le diagnostic qui en découle, sont présentés dans le **Tableau 27.**

L'équation-test à 7 variables classe la majorité des DTF (démences de type frontal) et des DV (démences vasculaires) "Alzheimer". Par contre, 2 sujets sur 3 atteints d'HPN (hydrocéphalie à pression normale) et 2 sujets sur 3 atteints de PSP (paralysie supranucléaire progressive) sont classés dans le groupe "témoin".

III.3.1.4. Discussion et conclusion

La **Figure 18** résume l'ensemble de l'étude qualitative (mise au point de l'équation et validations).

FIGURE 18: RÉSUMÉ DE L'ÉTUDE QUALITATIVE

Population de base

Témoins âgés non déments
n=33
17 femmes et 16 hommes
Age=64,18+/-1,76
MMS≥ 28

Alzheimer "Probables" ou "Certains"
n=46
32 femmes et 14 hommes
Age=72,08+/-2,11
NINCDS-ADRDA ou
diagnostic neuropathologique

ANALYSE DE REGRESSION LOGISTIQUE

Equation-Test à 7 variables
X140, X106, X81, X70, X27, X22, AGE

Spécificité= 93,94%	**Sensibilité= 91,3%**

VALIDATIONS DU MODELE

TÉMOINS

Témoins Jeunes (Tableau 21)
n=42
17 femmes et 25 hommes
Age= 35,5 +/- 2,87
Personnel de laboratoire
Spécificité= 95,24%

Témoins EVA (Tableau 22)
n=17
7 femmes et 10 hommes
Age= 64,34 +/- 1,24
MMS ≥ 28
Spécificité=17,64%

Témoins Tacrine (Tableau 23)
n=17
6 femmes et 11 hommes
Age= 75,9 +/- 3,63
MMS ≥ 29
Spécificité=11,76%

Témoins Paquid (Tableau 24)
n=17
16 femmes et 1 hommes
Age= 73,47 +/- 2,97
MMS ≥ 28
Spécificité=5,88%

Spécificité générale = 49,46%

ALZHEIMER

Alzheimer Tacrine (Tableau 23)

Répondeurs	Non Répondeurs
n=22	n=7
14 femmes et 8 hommes	5 femmes et 2 hommes
Age= 80,27 +/- 2,98	Age=76,43 +/-5,13
NINCDS-ADRDA	NINCDS-ADRDA
Sensibilité= 95,45%	**Sensibilité= 71,42%**

Sensibilité totale= 89,65%

Alzheimer Paquid (Tableau 25)

Incidents	Prévalents
n=21	n=18
15 femmes et 6 hommes	13 femmes et 5 hommes
Age=82,5 +/-2,77	Age=83,7+/-3,61
NINCDS-ADRDA	NINCDS-ADRDA
Sensibilité=90,7%	**Sensibilité=83,33%**

Sensibilité totale= 87,18%

Sensibilité générale = 88,24%

CONCLUSION: L'âge est un facteur très important. Plus l'âge augmente, plus les sujets témoins se confondent avec les Alzheimer. Le test diagnostique doit être réalisé tôt (avant 65 ans par exemple).

• Nous avons donc mis au point un modèle mathématique à 7 variables permettant de diagnostiquer les sujets atteints de la MA. Ce modèle établi à l'aide d'une régression logistique a une sensibilité égale à 91,3% et une spécificité égale à 93,94%.

• La sensibilité reste très importante avec les populations "Alzheimer tacrine" et "PAQUID" (elle est respectivement égale à 89,65% et 87,18%).

• La validation sur les sous-groupes "Alzheimer incidents" et "Alzheimer prévalents" apporte un renseignement de poids. En effet, les sujets "Alzheimer PAQUID" prévalents et incidents sont d'un grand intérêt: ils permettent de montrer que les tests sont non seulement efficaces sur les sujets malades lors du prélèvement (Alzheimer prévalents: sensibilité de 83,33%) mais aussi sur les sujets qui ne présentent encore aucun signe clinique de démence (Alzheimer incidents: sensibilité de 90,7% pour l'équation à 7 variables). Ce diagnostic est donc précoce car il a été réalisé ici (chez les "Alzheimer incidents") avant même l'apparition des signes cliniques de la MA sur des prélèvements sanguins effectués à T0; lorsque les sujets étaient encore diagnostiqués cliniquement "témoins".

• Par ailleurs, la validation sur la population "tacrine" montre une différence de sensibilité entre les sujets répondeurs et non répondeurs. Cependant, aucune différence significative n'a été révélée par un test de Fischer exact entre ces deux sensibilités.

Les relations entre les profils d'auto-anticorps et le fait de répondre ou non à la tacrine seront analysées dans le chapitre V.

• La validation de la spécificité a été plus délicate. Néanmoins, la validation de l'équation sur des groupes témoins d'âges différents nous a permis de mettre en évidence le rôle très important joué par l'âge dans le diagnostic de la MA. Il faut noter que plus l'âge augmente, plus la spécificité diminue pour atteindre des valeurs entre 6 et 15% après 70 ans.

Résultats de la validation de l'équation à 7 variables

Groupe témoin	Jeune	EVA	PAQUID	Tacrine
Moyenne d'âge	35,5+/-2,87	64,34+/-1,24	73,47+/-2,97	75,9+/-3,63
Spécificité	95,24%	17,64%	11,76%	5,88%

Il semblerait donc que pour être efficace ce test diagnostique à 7 variables doit être appliqué relativement tôt.

• Les résultats de la validation de l'équation sur des sujets atteints d'autres maladies neurodégénératives sont les suivants (**Tableau 27**):

- 3 sujets sur 8 atteints de DTF sont diagnostiqués "témoins".
- 2 sujets sur 8 atteints de démence vasculaire sont diagnostiqués "témoins".
- 2 sujets sur 3 atteints de PSP et HPN sont diagnostiqués "témoins".

Il aurait été préférable que tous ces sujets soient classés "témoins", pour pouvoir les différencier des "Alzheimer". Cependant, ces résultats ne sont pas surprenants. En effet, l'équation-test a été établie pour discriminer des sujets "Alzheimer" des témoins. Pour différencier les autres maladies neurodégénératives, des témoins et des "Alzheimer", il conviendrait d'établir une nouvelle équation à partir des trois populations: "Alzheimer", témoins et autres maladies neurodégénératives.

• En ce qui concerne les sujets "certains" (**Tableau 26**), leur analyse apporte un renseignement considérable. En effet, nous pouvons noter que sans tenir compte de la pathologie, tous les sujets témoins âgés (> 70 ans) sont diagnostiqués Alzheimer à tort. Un sujet témoin n'est identifié que s'il a moins de 70 ans environ. En effet, c'est le cas des sujets témoins "PAQUID" (**Tableau 24**), et des sujets Témoins jeunes (**Tableau 21**). Nous avons donc mis en évidence la nécessité d'appliquer le test diagnostique à 7 variables de manière précoce.

C'est pourquoi, pour la réalisation de l'étude quantitative, nous avons choisi de réduire l'échantillon en ne travaillant que sur les sujets de moins de 67 ans. La limite à 67 ans a été établie après avoir effectuée une régression logistique sur plusieurs échantillons: formés avec des sujets de moins de 70 ans, 65 ans, 67 ans...

L'équation-test établie à partir des sujets de moins de 67 ans ayant une meilleure spécificité et une meilleure sensibilité, l'étude quantitative a été réalisée sur cet échantillon. Ainsi, nous pouvons suposer que le biais dû à l'âge a été amoindri: la MA n'est plus masquée par l'âge en terme de profil immunologique.

III.3.2. MODÈLES DE L'ÉTUDE QUANTITATIVE À 2 ET 4 VARIABLES

III.3.2.1. Validation avec des sujets de moins de 67 ans

Deux échantillons de moins de 67 ans; une population de témoins et une population de patients atteints de la MA, ont été utilisées pour valider:

- d'une part, l'équation à 2 variables établie à partir des sujets de moins de 67 ans et tenant compte uniquement de la présence ou de l'absence de ces auto-anticorps.
- et d'autre part, l'équation à 4 variables tenant compte non seulement de la présence et de l'absence des auto-anticorps mais aussi de l'intensité des bandes révélées en immuno-empreintes par les auto-anticorps.

Le seuil s de ces deux équations est toujours égal à 0,5.

1) La population de témoins est formée à partir des sujets de moins de 67 ans des populations "jeune" (n = 6) et "PAQUID" (n = 6) présentées dans le **Tableau 7** page 110 (sérums 9; 15; 19; 24; 32 et 36) et le **Tableau 5** page 109 (sérums 1; 3; 4; 5; 8 et 11) du chapitre "Matériels et Méthodes". Ces sujets ont les caractéristiques suivantes:

- Témoins "PAQUID" (**Tableau 28**)
  - n = 6,
  - 6 femmes,
  - Moyenne d'âge = 66,67 +/- 0,52 ans,
  - MMS ≥ 28.

TABLEAU 28

Test des équations à 2 variables (Présence/Absence) et 4 variables (Intensité) établies à partir de sujets ≤67 ans

Population	N° Sérum	Nom	81B	31	31B	Age	Valeur sexe	Coef Corr	Logit p (équation à 4 variables)	P	Diagnostic de l'équation à 4 variables	Logit p (équation à 2 variables)	P	Diagnostic de l'équation à 2 variables	Diagnostic clinique	Classe d'âge
	1	96 T0	0	0	1	67	2	0,9	14,0158	1,0000	Alzheimer	1,8823	0,8679	Alzheimer	Témoin	≤ 67 ans
Témoins	3	206 T0	0	0,49	0	67	2	0,9	31,5558	1,0000	Alzheimer	-1,5507	0,1750	Témoin	Témoin	≤ 67 ans
"PAQUID"	4	237 T0	0	0,001	0	67	2	0,9	-6,6264	0,0013	Témoin	-1,5507	0,1750	Témoin	Témoin	≤ 67 ans
(Tableau 5)	5	248 T0	1	0,001	0	66	2	0,88	-13,4266	0,0000	Témoin	-1,5507	0,1750	Témoin	Témoin	≤ 67 ans
	8	409 T0	0	0,001	0	67	2	0,83	-6,6264	0,0013	Témoin	-1,5507	0,1750	Témoin	Témoin	≤ 67 ans
	11	1102 T0	1	0,001	0	66	2	0,8	-13,4266	0,0000	Témoin	-1,5507	0,1750	Témoin	Témoin	≤ 67 ans
	9	SJ3	0	0	1	26	1	0,89	2,5977	0,9307	Alzheimer	-0,7500	0,3208	Témoin	Témoin	≤ 67 ans
	24	SJ6	1	0,16	0	33	1	0,89	-12,4296	0,0000	Témoin	-4,1830	0,0150	Témoin	Témoin	≤ 67 ans
Témoins	15	Aub	0	0,65	0	37	1	0,91	32,6308	1,0000	Alzheimer	-4,1830	0,0150	Témoin	Témoin	≤ 67 ans
JEUNE	19	Del	0	0,001	0	37	1	0,91	-18,0445	0,0000	Témoin	-4,1830	0,0150	Témoin	Témoin	≤ 67 ans
(Tableau 6)	32	Cor	0	0	1	44	2	0,97	14,0158	1,0000	Alzheimer	1,8823	0,8679	Alzheimer	Témoin	≤ 67 ans
	36	Sam	0	0,29	0	42	1	0,97	4,5212	0,9892	Alzheimer	-4,1830	0,0150	Témoin	Témoin	≤ 67 ans
	414	Ghi	1	0,13	0	55	1	0,86	-14,7721	0,0000	Témoin	-4,1830	0,0150	Témoin	MA probable	≤ 67 ans
	450	Tie	0	0	1	66	1	0,86	2,5977	0,9307	Alzheimer	-0,7500	0,3208	Témoin	MA probable	≤ 67 ans
	501	Waj	0	0	1	65	1	0,86	2,5977	0,9307	Alzheimer	-0,7500	0,3208	Témoin	MA probable	≤ 67 ans
	662	Lin	1	0	1	64	1	0,86	-4,2025	0,0147	Témoin	-0,7500	0,3208	Témoin	MA probable	≤ 67 ans
	953	Sav	0	0	1	62	1	0,86	2,5977	0,9307	Alzheimer	-0,7500	0,3208	Témoin	MA probable	≤ 67 ans
Alzheimer	999	Pri	0	0	1	65	1	0,86	2,5977	0,9307	Alzheimer	-0,7500	0,3208	Témoin	MA probable	≤ 67 ans
(nouvelle	1703	Bla	0	0	1	58	2	0,86	14,0158	1,0000	Alzheimer	1,8823	0,8679	Alzheimer	MA probable	≤ 67 ans
population)	1146	Dela	0	0,001	0	54	2	0,86	-6,6264	0,0013	Témoin	-1,5507	0,1750	Témoin	MA probable	≤ 67 ans
	1186	Van	0	0	1	57	1	0,86	2,5977	0,9307	Alzheimer	-0,7500	0,3208	Témoin	MA probable	≤ 67 ans
	1401	Glo	0	0	1	60	1	0,86	2,5977	0,9307	Alzheimer	-0,7500	0,3208	Témoin	MA probable	≤ 67 ans
	1414	Fol	1	0,001	0	66	2	0,86	-13,4266	0,0000	Témoin	-1,5507	0,1750	Témoin	MA probable	≤ 67 ans
	1419	Gri	1	0	1	54	2	0,86	7,2156	0,9993	Alzheimer	1,8823	0,8679	Alzheimer	MA probable	≤ 67 ans
	1454	Hil	0	0,001	0	67	2	0,86	-6,6264	0,0013	Témoin	-1,5507	0,1750	Témoin	MA probable	≤ 67 ans
	30	653 BOD	1	1,22	0	70	1	0,97	70,3375	1,0000	Alzheimer	-4,1830	0,0150	Témoin	Témoin	> 67 ans
	33	759 JOJ	1	0	1	70	1	0,97	-4,2025	0,0147	Témoin	-0,7500	0,3208	Témoin	Témoin	> 67 ans
Témoins	28	295 DEL	1	0,01	0	70	1	0,97	-24,1420	0,0000	Témoin	-4,1830	0,0150	Témoin	Témoin	> 67 ans
"EVA"	15	202 PIE	1	0	1	70	2	0,91	7,2156	0,9993	Alzheimer	1,8823	0,8679	Alzheimer	Témoin	> 67 ans
(Tableau 3)	16	828 MOU	1	0	1	70	2	0,91	7,2156	0,9993	Alzheimer	1,8823	0,8679	Alzheimer	Témoin	> 67 ans
	17	871 GER	1	0	1	71	2	0,91	7,2156	0,9993	Alzheimer	1,8823	0,8679	Alzheimer	Témoin	> 67 ans
	41	Alg	1	0	1	79	1	0,9	-4,2025	0,0147	Témoin	-0,7500	0,3208	Témoin	MA confirmée	> 67 ans
	37	95033	1	0	1	82	1	0,9	-4,2025	0,0147	Témoin	-0,7500	0,3208	Témoin	MA probable	> 67 ans
Alzheimer	34	Bel	0	0,07	0	77	1	0,9	-12,6568	0,0000	Témoin	-4,1830	0,0150	Témoin	MA probable	> 67 ans
(Tableau 4)	27	Lep	1	0	1	75	2	0,9	7,2156	0,9993	Alzheimer	1,8823	0,8679	Alzheimer	MA probable	> 67 ans
	12	Paw	0	0,38	0	80	2	0,89	22,9667	1,0000	Alzheimer	-1,5507	0,1750	Témoin	MA probable	> 67 ans
	2	Zal	0	0	1	70	2	0,89	14,0158	1,0000	Alzheimer	1,8823	0,8679	Alzheimer	MA probable	> 67 ans

• Témoins jeunes (**Tableau 28**)

- n = 6,

-1 femme et 5 hommes,

- Moyenne d'âge = 36,5 +/- 6,46 ans.

• La population totale ≤ 67 ans à donc les caractéristiques suivantes:

- n = 12,

- 7 femmes et 5 hommes,

- Moyenne d'âge = 51,58 +/- 3,46 ans.

Les deux premières parties du **Tableau 28** présentent les profils immunologiques de ces sujets, l'intensité de l'immunoréactivité des bandes (en DO/mm pour les anti-P31 notés 31 dans le tableau) et les résultats du test des deux équations sur les deux populations témoins "PAQUID" et jeune (Logit p et p).

L'équation à 2 variables permet de bien classer 5 sujet "PAQUID" (sur 6) et 5 sujets jeunes sur 6. La spécificité totale est égale à 83,33%.

L'équation à 4 variables classe 6 de ces sujets dans le groupe "témoin" (2 jeunes et 4 "PAQUID"). La spécificité est donc de 50%.

2) Les sujets atteints de la MA (**Tableau 28**) ont été sélectionnés pour la validation: ils sont donc différents de ceux utilisés à la base de l'étude. Cependant, le mode de recrutement est le même que celui de la population "Alzheimer" décrit dans le chapitre I.1.2. des "Matériels et Méthodes".

Les caractéristiques de ces sujets sont les suivantes:

- n=13,

- 5 femmes et 8 hommes,

- Critères diagnostiques= NINCDS-ADRDA (Hôpital B, Lille),

- Moyenne d'âge = 61 +/- 2,94 ans.

Les profils d'auto-anticorps de ces sujets, l'intensité de l'immunoréactivité (en DO/mm pour la variable 31) ainsi que les diagnostics obtenus avec les deux types de tests sont présentés dans la troisième partie du **Tableau 28**.

L'équation à 2 variables permet de bien diagnostiquer seulement 2 "Alzheimer" sur 13. La sensibilité est donc égale à 15,38%.

L'équation à 4 variables permet de bien diagnostiquer 8 "Alzheimer" sur 13 ; la sensibilité est donc égale à 61,54%.

III.3.2.2. Comportement de l'équation avec des sujets de plus de 67 ans

Nous avons voulu savoir comment se comportaient les équations lorsqu'elles étaient testées sur des sujets de plus de 67 ans.

Deux groupes ont été constitués (**Tableau 28**):

1) Une population "EVA" de plus de 67 ans formée de sujets (n = 6) déjà utilisés pour la mise au point de la première équation à 7 variables (sérums 15; 16; 17; 18; 30 et 33 des **Tableaux 3** page 106 **ou 13** page 144):

- n = 6,
- 3 femmes et 3 hommes,
- Moyenne d'âge = 70,16 +/- 0,4 ans.

La quatrième partie du **Tableau 28** montre que 3 sujets témoins EVA sont bien diagnostiqués avec l'équation à 2 variables (spécificité = 50%), et l'équation à 4 variables, tenant compte de l'intensité, diagnostique correctement 2 sujets sur 6 (spécificité = 33,33%).

2) Une population "Alzheimer" de plus de 67 ans formée de 6 sujets déjà utilisés lors de la mise au point de l'équation à 7 variables (sérums 41; 37; 34; 27; 12 et 2 des **Tableaux 4** page 107 ou **14** page 144):

- n = 6,
- 3 femmes et 3 hommes,
- Critères diagnostiques = NINCDS-ADRDA (Hôpital B, Lille),
- Moyenne d'âge = 77,16 +/- 4,26 ans.

Les résultats de l'analyse par immuno-empreintes de ces sérums, de la quantification par densitométrie (en DO/mm) ainsi que les diagnostics établis pour cette population sont présentés dans la dernière partie du **Tableau 28.** Notons que l'ensemble des mesures de l'intensité est fiable car les coefficients de corrélations ("Coef Corr" dans le **Tableau 28**) entre l'intensité imposée au "sérum de référence" et l'intensité réelle sont toujours > 0,8.

Avec cette population "Alzheimer" de plus de 67 ans, la sensibilité de l'équation à 2 variables est de 33,33% (2/6 sujets bien classés) et la sensibilité de l'équation à 4 variables est de 50 % (3/6 sujets bien classés).

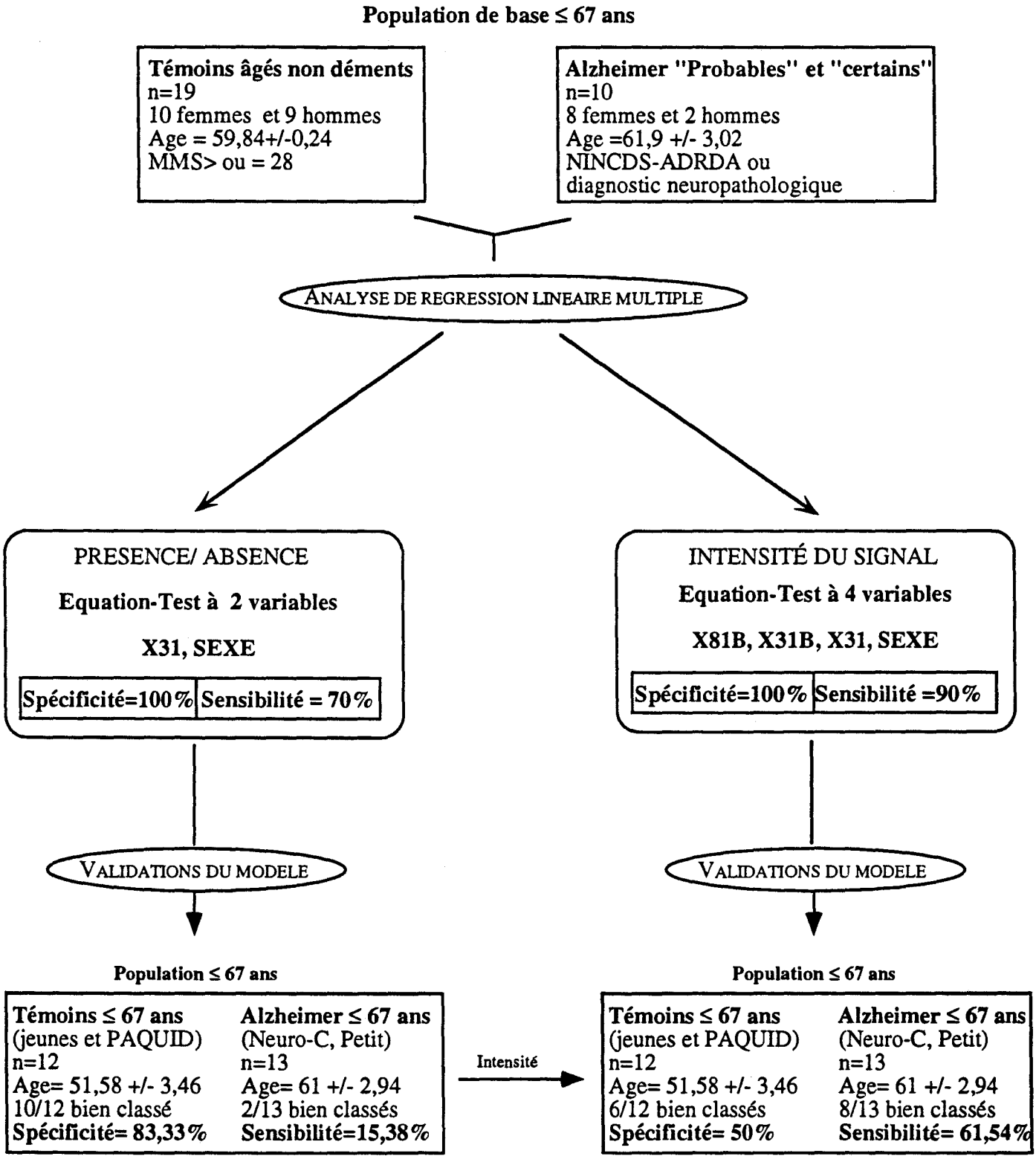
Un sujet (Sérum N°12) est donc mieux classé lorsque l'intensité est prise en compte.

Ces résultats confirment le fait que cette équation ne peut pas être appliquée aux sujets de plus de 67 ans (sensibilité et spécificité trop faibles).

III.3.2.3 Conclusion

L'ensemble de l'étude quantitative est résumé sur la **Figure 19.** Les validations de ces 2 modèles, montrent que l'équation à 4 variables, faisant intervenir l'intensité des bandes de 31 kDa, améliore la sensibilité du test (61,54% au lieu de 15,38%), mais diminue sa spécificité (50% au lieu de 83,33%). Finalement, ce type de test diagnostique (analyse du profil immunologique) appliqué à la population générale a une spécificité et une sensibilité qui reste faible lorsque l'intensité des bandes (concentration d'auto-anticorps) est prise en compte. Cette dernière ne semble donc pas améliorer le test. Néanmoins, il faut noter que ces équations ont été établies sans les anti-P140 (variables à fort pouvoir discriminant), ce qui

FIGURE 19: RÉSUMÉ DE L'ÉTUDE QUANTITATIVE



CONCLUSION: En résumé, la spécificité et la sensibilité restent faibles pour un test diagnostique lorsque l'intensité est prise en compte.

renforce l'importance des variables 31, 81 et du sexe dans la mise au point d'un test diagnostique à partir de la concentration des auto-anticorps. De plus, les équations ont été établies et validées avec un faible nombre de sujets. C'est pourquoi, les valeurs obtenues avec l'approche quantitative doivent être validées sur un plus grand échantillon. Ce type d'équation applicable sur des sujets de moins de 67 ans, pourrait être utilisé comme test diagnostique "précoce", c'est pourquoi ces résultats préliminaires nécessitent des investigations complémentaires.

III.4. CONCLUSION GÉNÉRALE

L'équation à 7 variables établie à partir de la population générale (n=79) a permis de montrer qu'un test diagnostique peut-être réalisé à partir du profil immunologique du sujet (présence et absence des auto-anticorps), à condition d'appliquer le test de manière précoce pour avoir une bonne spécificité (**Figure 18**).

L'équation à 4 variables établie chez les sujets de moins de 67 ans (n=29), donne une idée d'un test diagnostique précoce utilisant l'intensité des bandes. Il faut noter que la spécificité reste faible malgré que le test soit appliqué de manière précoce. Cependant, ces résultats devront être vérifiés sur un plus grand échantillon.

Le fait d'avoir fait cette sélection des sujets de moins de 67 ans a permis:

- d'une part, de mettre en évidence pour ces sujets, les trois variables les plus importantes dans une équation dépendant de l'intensité: les auto-anticorps anti-P31 et anti-P81 et le "Sexe",

- d'autre part, de visualiser l'importance des anti-P140 car tous les sujets témoins de moins de 67 ans de notre échantillon ne possédaient pas ces anticorps. Cette distribution des auto-anticorps anti-P140 dans notre échantillon de base (≤67 ans) confirme leur importance dans la discrimination des "Alzheimer" par rapport aux témoins. En effet, un sujet témoin de moins de 67 ans ne produit pas d'anti-P140, mais après 67 ans il semble en produire (voir

répartition des anti-P140 sur les **Tableaux 13 et 14** et les résultats du chapitre suivant concernant le vieillissement). Par contre un "Alzheimer" produit ces auto-anticorps quelquesoit son âge. Voici encore un argument qui tend à montrer que le diagnostic doit donc être réalisé de manière précoce.

TABLEAU 29: Présence (+) et absence (-) des auto-anticorps anti-P140

	≤ 67 ans	> 67 ans
Témoins	anti-P140 -	anti-P140 +
Alzheimer	anti-P140 +	anti-P140 +

Finalement, compte tenu de la taille de l'échantillon (n=29), nous ne pouvons pas dire si l'intensité des bandes détectées par les auto-anticorps améliore le diagnostic. Néanmoins, nous avons pû mettre en évidence que certains auto-anticorps, comme les anti-P31, sont produits en plus grande quantité par les malades. Un malade peut donc être différencié d'un témoin par la concentration d'auto-anticorps qu'il produit.

Les résultats des études qualitative (**Figure 18**) et quantitative (**Figure 19**) ont montré que l'âge des témoins avait une très grande importance. Par conséquent, l'insuffisance de spécificité pourrait être liée à l'âge. C'est pourquoi, nous avons entrepris d'éclaircir le rôle de l'âge en étudiant le vieillissement normal. Ainsi, notre objectif est de mettre en évidence la variable "AGE" à travers le profil d'auto-anticorps afin d'éliminer ou d'atténuer le biais dû au vieillissement lors du diagnostic.

IV. LES AUTO-ANTICORPS PRODUITS AU COURS DU VIEILLISSEMENT CEREBRAL NORMAL

IV.1. DESCRIPTION DES ÉCHANTILLONS

Pour mettre en évidence les auto-anticorps spécifiques du vieillissement, nous avons constitué une population "témoin" différente de celle utilisée lors de la première étude ("Auto-anticorps produits au cours de la MA"). En effet, la population "EVA" (**Tableau 3** du chapitre "Matériel et Méthodes") a suffisament été exploitée lors de la recherche des auto-anticorps spécifiques de la MA.

Rappel concernant le problème de multiplicité des tests statistiques:

En théorie, l'idéal dans une étude, serait d'effectuer une seule analyse statistique sur un seul échantillon pour ne répondre qu'à une seule question, afin d'éviter le problème des "tests multiples". En effet, il a été montré statistiquement que lorsque l'on multiplie le nombre d'analyses statistiques sur un même échantillon, on augmente le risque de conclure à une différence significative, même si celle-ci ne l'est pas (le risque d'erreur α augmente).

Cependant, en pratique ces conditions idéales ne sont jamais remplies car la plupart des chercheurs sont limités par les données. Nous ne disposons pas en effet de source infinie de données. Cela a d'ailleurs été l'un de nos premiers soucis. La population de base (**Tableaux 3 et 4** du "Matériel et Méthodes") a été sélectionnée avec des critères d'inclusion très stricts: suivi longitudinal sur plusieurs années, séries de tests neuropsychologiques.... C'est pourquoi, nous avons basé nos principales recherches (mise au point de trois équations) sur cette population.

A ce stade de l'étude, nous avons donc décidé d'exploiter une autre population de base. Cette population a néanmoins été constituée autour des 33 sujets "EVA" de la première étude. Ces sujets ont en effet été conservés car nous ne disposions à l'époque que de très peu

de sujets témoins âgés aussi fiables que les sujets "EVA" (suivi longitudinal, tests neuropsychologiques, ...).

Deux nouveaux groupes de sujets témoins ont donc été constitués:

1) Le premier sera utilisé pour mettre au point un modèle mathématique spécifique du vieillissement: "population de base",

2) Le second permettra de valider ce modèle: "population-test".

Ces populations ont été constituées de la façon suivante:

1) Nous avons regroupé dans un même échantillon:

- 42 sujets "jeunes" (**Tableau 7** page 110 du chapitre "Matériels et Méthodes"),

- 33 sujets témoins "EVA" (**Tableau 3** page 106 du chapitre "Matériels et Méthodes"),

- 16 sujets témoins "PAQUID" (**Tableau 5** page 109), prélevés à T8 (huit ans après le début de l'étude "PAQUID"). Nous avons utilisé les prélèvements à T8 afin de disposer de sujets d'âge ≥ 70 ans. Le sujet 409 (**Tableau 5**) n'a pas été étudié car nous ne disposons pas du prélèvement à T8 (409T8).

- et 17 sujets témoins "tacrine" (**Tableau 10** page 113).

2) A partir de ces 108 sujets, deux groupes de 54 sujets ont été constitués par tirage au sort avec une stratification sur l'âge, afin d'obtenir deux populations ayant des caractéristiques semblables.

La "population de base" a les caractéristiques suivantes:

- n = 54,
- 27 femmes et 27 hommes,
- Moyenne d'âge = 57,74 +/- 5,53 ans,
- Age minimum = 17 ans et âge maximum = 89 ans.

La "population-test" a les caractéristiques suivantes:

- n = 54,
- 28 femmes et 26 hommes,
- Moyenne d'âge = 57,91 +/- 5,38 ans,
- Age minimum = 21 ans et âge maximum = 89 ans.

IV.2. COMPARAISON DES DEUX POPULATIONS

La comparaison des moyennes d'âge de ces deux populations par un test de Student ne révèle aucune différence significative.

En ce qui concerne la variable "sexe" , la répartition dans les deux échantillons est homogène (27 femmes et 27 hommes pour la "population de base", 28 femmes et 26 hommes pour la "population-test"). Aucune différence significative n'a été révélée par un test de Student.

Nous avons donc constitué pour l'étude du vieillissement, deux groupes de sujets ayant des caractéristiques très proches.

IV.3. RECUEIL DES DONNÉES

Les profils immunologiques des sujets constituant la "population de base" et la "population-test" sont présentés respectivement dans les **Tableaux 30 et 31.**

Les auto-anticorps ont été identifiés par la masse moléculaire de leurs antigènes, et les numéros de chaque auto-anticorps correspondent à cette masse moléculaire. La présence des auto-anticorps dans le sérum du sujet est signalé par "1" et l'absence par "0". 54 auto-

TABLEAU 30: "Population de base" pour l'étude du vieillissement.

Nom	250	210	190	180	160	150	145	140	130	129	110	107	106	105	103	100	94	92	90	84	82	81	80,5	80	70	69,5	69	68	66	64	62	55	50	PD 50	35	33	32	31	30	29	28	27	26,5	26	25	24	23	22	21	20	18	16	13	11	10	BF	Population	Age	Sexe
Hio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	Jeune	17	H
Blar	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	2	Jeune	23	F
Mor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	Jeune	24	F
SJ5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	Jeune	25	F
SJ3	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	Jeune	26	H
SJ8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	3	Jeune	27	H
Dev	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	Jeune	29	H
Deb	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	Jeune	31	F
Hid	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	Jeune	32	F
SJ10	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	Jeune	33	H
Now	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	3	Jeune	34	H
Aub	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	Jeune	37	H
Del	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	Jeune	37	H
Dho	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	Jeune	39	H
SJ13	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	Jeune	42	F
Bir	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2	Jeune	42	H
Cor	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2	Jeune	44	F
Fri	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	Jeune	46	H
Koc	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	Jeune	47	H
SJ14	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	Jeune	49	H
Da	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	Jeune	52	H
238MON	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	EVA	59	F
594COU	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	3	EVA	59	F
110BUR	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	EVA	60	F
301LIO	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	EVA	60	F
158CRO	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	EVA	60	F
276BON	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	EVA	60	F
86NOE	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	EVA	60	H
886LEG	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	EVA	60	H
170RAV	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	EVA	60	H
673LEF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	EVA	61	H
VR 54	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	Tacrine	67	H
388BRU	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	EVA	70	F
750RUA	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	EVA	70	F
828MOU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	EVA	70	F
295DEL	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	EVA	70	H
653BOD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	EVA	70	H
957GUE	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	EVA	70	H
DD 17	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	Tacrine	70	F
LP 56	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	Tacrine	70	F
871GER	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	EVA	71	F
GA 41	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	Tacrine	74	H
148T8	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	PAQUID	74	F
MP 4	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	Tacrine	75	H
206T8	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	PAQUID	75	F
1222T8	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	PAQUID	77	F
MA 52	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	Tacrine	80	H
550T8	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	PAQUID	83	H
357T8	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	PAQUID	84	F
1644T8	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	PAQUID	85	F
RS 34	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	Tacrine	86	H
1168T8	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	PAQUID	86	F
1319T8	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	PAQUID	87	F
469T8	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	PAQUID	89	F

Légende: 0 = absence; 1 = présence de l'auto-anticorps; BF = bruit de fond en unité arbitraire (0 = absence, 1 = faible, 2 = moyen, 3 = intense bruit de fond); H = homme; F = femme.

TABLEAU 31: "Population-test" de l'étude vieillissement.

Nom	250	210	190	180	160	150	145	140	130	129	110	107	106	105	103	100	94	92	90	84	82	81	80,5	80	70	69,5	69	68	66	64	62	55	50	PD 50	35	33	32	31	30	29	28	27	26,5	26	25	24	23	22	21	20	18	16	13	11	10	BF	Population	Age	Sexe
Bil	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	Jeune	21	F
SJ2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	Jeune	23	F
SJ1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	Jeune	24	H
SJ12	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	Jeune	25	F
SJ7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	Jeune	27	F
SJ4	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	Jeune	28	F
Des	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	Jeune	29	H
SJ9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2	Jeune	31	H
SJ6	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	Jeune	33	H
SJ11	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	2	Jeune	33	F
Blar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	Jeune	36	H
Dhon	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	Jeune	37	H
Ven	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	Jeune	38	F
Lan	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	Jeune	41	F
Sam	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	Jeune	42	H
Meu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	Jeune	43	H
Les	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	Jeune	46	H
Pan	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	Jeune	47	H
Lec	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	Jeune	48	F
Car	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	Jeune	50	F
Del	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	Jeune	52	H
253LEB	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	EVA	59	F
377GIR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2	EVA	59	H
182DEV	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	EVA	60	F
359GAZ	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	EVA	60	F
342BER	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	EVA	60	F
697NGU	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	EVA	60	H
460BOU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	EVA	60	H
177ROP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	EVA	60	H
724COU	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	EVA	60	H
JGR 22	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	Tacrine	67	F
475LEP	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	EVA	70	F
817MAE	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	EVA	70	F
202PIE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	EVA	70	F
870GER	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	EVA	70	H
532PER	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	EVA	70	H
570FOU	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	EVA	70	H
759JOJ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	EVA	70	H
GM 11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Tacrine	70	H
SR 48	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	Tacrine	70	F
SB 27	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Tacrine	73	F
EL 46	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	Tacrine	74	F
1102T8	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	PAQUID	74	F
96T8	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	PAQUID	75	F
237T8	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	PAQUID	75	F
RB 21	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	Tacrine	79	H
RL 44	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	Tacrine	83	H
JT 50	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	Tacrine	84	H
110T8	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	PAQUID	85	F
JD 25	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	Tacrine	86	H
384T8	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	PAQUID	86	F
1670T8	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	PAQUID	86	F
JJN 5	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	Tacrine	89	H
1654T8	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	PAQUID	89	F

Légende: 0 = absence; 1 = présence de l'auto-anticorps; BF = bruit de fond en unité arbitraire; H = homme; F = femme.

anticorps différents dirigés contre 54 antigènes différents dont la masse moléculaire varie de 250 à 10 kDa, ont été mis en évidence avec ces deux populations témoins. Les anti-P150 ne sont pas détectés par ces sujets témoins comparativement aux sujets de la première étude (**Tableaux 13 et 14** page 144).

IV.4. RECHERCHE DES AUTO-ANTICORPS LIÉS À L'ÂGE

Pour étudier la production d'auto-anticorps au cours du vieillissement, nous n'avons pas réalisé de test du Chi-2 car ceci aurait impliqué la division de la "population de base" en deux groupes de tranches d'âges différentes. Or, il est difficile de choisir un seuil au delà duquel le sujet peut être considéré comme "âgé" et en deçà duquel il est considéré comme "jeune". En effet, le phénomène de "vieillissement" et le comportement du système immunitaire avec l'âge sont peu connus.

C'est pourquoi, une régression logistique a été réalisée avec les sujets de la "population de base" afin de rechercher les auto-anticorps liés à l'âge. Cette méthode permet d'établir un modèle mathématique de la forme:

$$\text{Logit}(p) = a_0 + a_1 \times \text{AGE}$$

$$\text{où } p = \frac{e^{\text{Logit}(p)}}{1 + e^{\text{Logit}(p)}}$$

Dans ce modèle, a_0 et a_1 sont deux constantes caractérisant chaque auto-anticorps, et p, dans le cas précis du vieillissement, est la probabilité pour un sujet de ne pas avoir un type d'auto-anticorps donné. Ainsi, ce modèle permet de quantifier la liaison de chaque type d'auto-anticorps avec l'âge. Le degré de signification du modèle est estimé par le

pourcentage de “sujets bien classés” (dans le groupe "avec" ou le groupe "sans auto-anticorps") et par d'autres tests d'ajustement statistique.

Cette procédure a abouti à la mise au point de 10 modèles mathématiques hautement significatifs, elle a donc permis d'isoler 10 types d'auto-anticorps (parmi les 54) significativement liés à l'âge. Les 10 modèles établis ont ensuite été validés sur la "population-test" afin de vérifier la fiabilité du modèle.

Les 10 modèles établis pour ces 10 auto-anticorps sont les suivants:

Auto-anticorps	Modèles
160	Logit (p) = 2,3702 - 0,0399 x AGE
145	Logit (p) = 28,6604 - 0,3113 x AGE
140	Logit (p) = 2,4403 - 0,0310 x AGE
110	Logit (p) = 30,0081 - 0,0341 x AGE
92	Logit (p) = 38,8190 - 0,4403 x AGE
35	Logit (p) = -0,6238 + 0,0351 x AGE
32	Logit (p) = 38,8190 - 0,4403 x AGE
27	Logit (p) = 3,3588 - 0,0473 x AGE
26	Logit (p) = 8,0276 - 0,0879 x AGE
21	Logit (p) = -0,3642 - 0,0349 x AGE

Ces modèles ont les caractéristiques suivantes:

Auto-anticorps	% de "sujets bien classés" dans l'échantillon de base	% de "sujets bien classés" dans l'échantillon test (validation)
160	53,7	66,7
145	96,3	100
140	74,1	68,5
110	68,5	64,8
92	94,4	96,3
35	75,9	74,1
32	96,3	94,4
27	61,1	78,8
26	88,9	90,7
21	79,6	90,7

Prenons par exemple, le modèle établi pour l'anticorps anti-P140 à partir de la population de base:

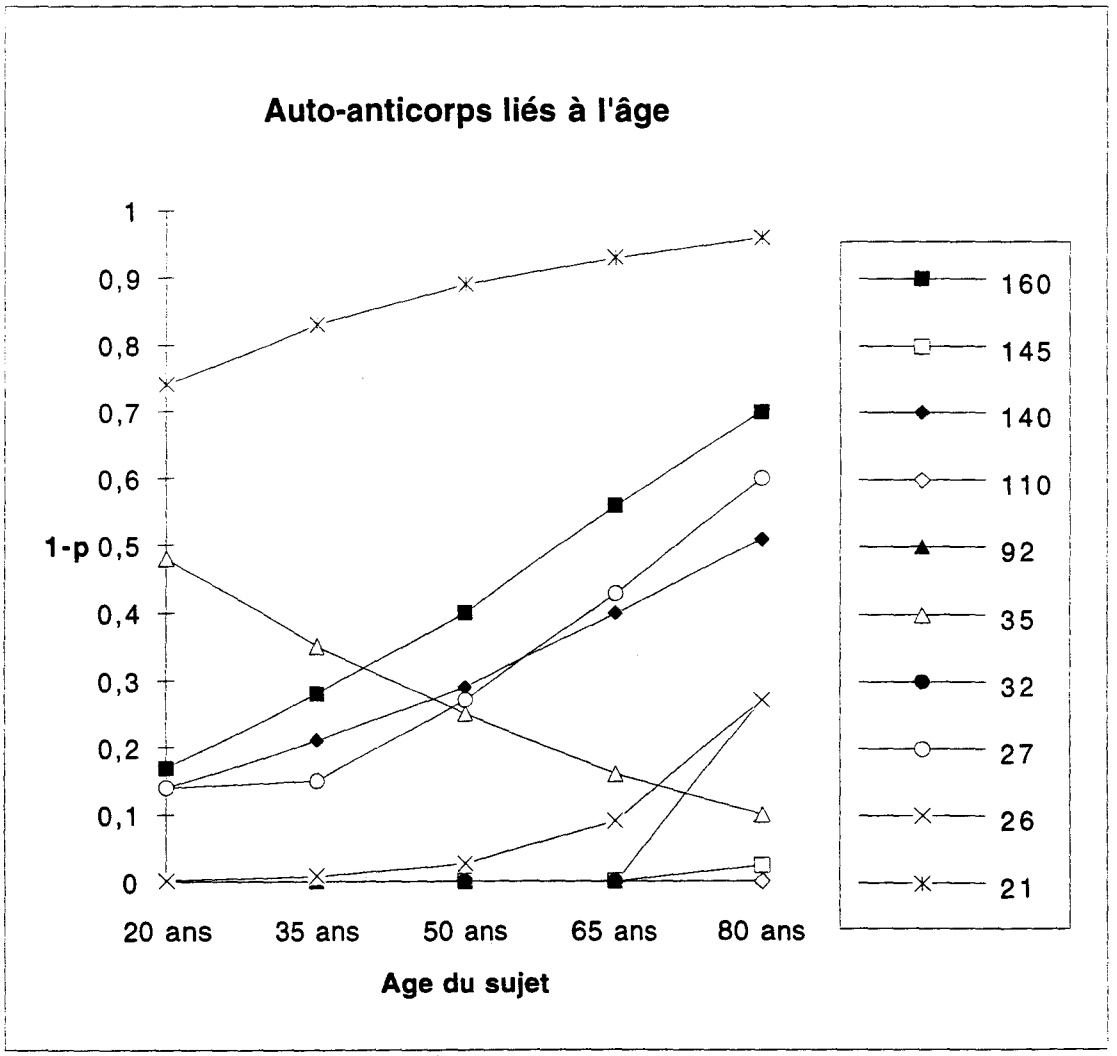
Logit (p) = Logit (probabilité de ne pas avoir les anti-P140) = 2,4403 - 0,0310 x AGE

Ce modèle permet de déterminer en fonction de l'âge du patient, si ce dernier possède ou non les auto-anticorps anti-P140. La constante a_1 ici égale à - 0,0310 est négative. Ainsi dans l'équation, lorsque l'âge augmente la probabilité pour que l'auto-anticorps soit absent diminue. Cela signifie que les anticorps anti-P140 sont plus souvent présents chez les sujets âgés.

Ce modèle permet de prédire (à partir de l'âge du sujet) dans 74,1% des cas (40 sujets sur 54) si le sujet possède ou non les anti-P140. Lorsque cette équation est validée, le pourcentage de "sujets bien classés" est égal à 68,5%.

TABLEAU 32

	1-p = Probabilité d'avoir l'auto-anticorps à:				
Auto-anticorps	20 ans	35 ans	50 ans	65 ans	80 ans
160	0,17	0,28	0,4	0,56	0,7
145	0	0	0,0001	0,0002	0,023
140	0,14	0,21	0,29	0,4	0,51
110	0	0	0	0	0
92	0	0	0,0001	0,0001	0,27
35	0,48	0,35	0,25	0,16	0,1
32	0	0	0,0001	0,0001	0,27
27	0,14	0,15	0,27	0,43	0,6
26	0,002	0,007	0,026	0,09	0,27
21	0,74	0,83	0,89	0,93	0,96



Notons que pour chaque auto-anticorps, la validation confirme la fiabilité de l'équation.

Par ailleurs, nous avons analysé l'évolution de la probabilité d'avoir ces 10 types d'auto-anticorps (1-p) au cours du temps (**Tableau 32**). Cette probabilité a été calculée entre 20 et 80 ans. Ainsi, la probabilité d'avoir les anti-P140 à 20 ans est 14% (14% de chance d'avoir les anti-P140), par contre à 80 ans elle est de 51% (une chance sur deux).

Les courbes issues de ce tableau visualisent l'apparition ou la disparition (pour les anti-P35) de ces auto-anticorps au cours du temps et montrent que chaque type d'auto-anticorps apparaît plus ou moins tôt au cours du vieillissement (les anti-P140, anti-P160 et anti-P21 apparaissent dès l'âge de 20 ans) et plus ou moins rapidement (les anti-P26 apparaissent lentement dès l'âge de 20 ans, et les anti-P92 et anti-P32 apparaissent brutalement après 65 ans). Notons que les anti-P160, anti-P140, anti-P27 et anti-P21 sont produits dès l'âge de 20 ans, cette production augmente ensuite avec l'âge. Par contre les anti-P35 sont produits dès 20 ans mais disparaissent progressivement au cours du temps. Ces résultats pourront être utilisés lors de la caractérisation des auto-anticorps.

IV.5. CONCLUSION

Cette étude du vieillissement a permis de mettre en évidence 10 types d'auto-anticorps fortement liés à l'âge (160, 145, 140, 110, 92, 35, 32, 27, 26 et 21) parmi lesquels un seul type (anti-P35) est caractéristique des sujets jeunes ($a_1 > 0$). Les autres auto-anticorps sont spécifiques du vieillissement, ils sont donc plus souvent présents chez les personnes âgées.

Notons que les auto-anticorps anti-P160 ou anti-NF-M sont présents de manière significative chez les personnes âgées. Ces résultats vont dans le même sens que les données de la littérature (Elizan *et al.*, 1983).

Par ailleurs, la liaison des anti-P140 à l'âge, déjà observée dans le chapitre précédent (Chapitre III. "Les auto-anticorps produits au cours de la MA"), est confirmée par cette nouvelle étude.

Finalement, cette étude du "phénomène vieillissement" montre que:

- l'équation à 4 variables (tenant compte de l'intensité des bandes), ne fait intervenir aucun auto-anticorps lié à l'âge: le biais dû à l'âge a donc bien été éliminé lors de la sélection des sujets de moins de 67 ans de notre échantillon,

- l'équation à 7 variables mise au point dans le chapitre III. ("Les auto-anticorps produits au cours de la MA") et permettant d'établir le diagnostic de la MA, fait intervenir, elle, des auto-anticorps liés à l'âge: les anti-P140, et anti-P27. Cela explique en partie les erreurs de diagnostic, surtout celles observées chez les sujets témoins (Tableau du Chapitre III.3.1.4.). En effet, dans ce chapitre, nous avions montré que plus l'âge du témoin augmente, moins le test diagnostique est fiable. En conclusion, le test diagnostique idéal serait un modèle mathématique faisant intervenir les 6 mêmes auto-anticorps (140, 106, 81, 70, 27, et 22), mais qui leur donnerait un "poids" différent en fonction de leur liaison avec l'âge. Ainsi, le biais dû à l'âge serait atténué. Ce modèle devra être établi à partir d'une nouvelle population (nouveaux sujets) pour limiter le biais dû à la multiplicité des tests.

V. COMPARAISON DES PROFILS IMMUNOLOGIQUES DES SUJETS MALADES RÉPONDEURS ET NON RÉPONDEURS À LA TACRINE

Le but de cette étude "Tacrine" est d'identifier un profil d'auto-anticorps sériques anti-protéines cérébrales et de le corréler à la réponse à la tacrine. Cette étude étant toujours en cours, nous n'avons disposé pour notre thèse que de très peu de sujets (n=29 pour les deux groupes "Alzheimer répondeurs" et "Alzheimer non répondeurs"). Néanmoins, cet échantillon a permis, par une première approche, d'avoir une idée des profils d'auto-anticorps des sujets répondeurs et non répondeurs à la tacrine.

V.1. DESCRIPTION DE L'ÉCHANTILLON

Les sujets utilisés pour cette étude sont des patients atteints de la MA et traités par la tacrine depuis 6 mois. Les prélèvements sanguins ont été réalisés six mois après le début du traitement (T6mois). Les critères d'inclusion et d'exclusion sont décrits dans le paragraphe I.1.7 du chapitre "Matériels et Méthodes". La liste de ces sujets est présentée dans le **Tableau 10** page 113.

En résumé, les caractéristiques de ces sujets sont les suivantes:

a) "Alzheimer répondeurs":

- n = 22,
- 14 femmes et 8 hommes,
- Critères diagnostiques = NINCDS-ADRDA,
- Moyenne d'âge = 80,27 +/- 4,69 ans,
- Age minimum = 62 ans; âge maximum = 89 ans.

TABLEAU 33

Nom	250	210	190	180	160	140	130	110	107	106	105	100	94	92	90	82	81	80,5	80	70	69,5	69	68	66	64	62	55	52	50	PD 50	35	33	32	31	30	28	27	26	25	24	23	22	21	19	20	18	16	15	12	10	BF	Age	Sexe	Diagnostic clinique
NA 2	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	62	F	MA répondeur
MB 29	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	85	F	MA répondeur
GB 28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	73	H	MA répondeur
CB 31	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	76	F	MA répondeur
FD 7	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	78	H	MA répondeur
JD 12	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	69	H	MA répondeur
GF 8	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	75	H	MA répondeur
AN 6	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	89	F	MA répondeur
MV 18	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	79	F	MA répondeur
MS 33	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	79	F	MA répondeur
PR 37	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	78	H	MA répondeur
ET 49	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	84	F	MA répondeur
MLP 23	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	83	F	MA répondeur
LMD 36	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	83	F	MA répondeur
IM 10	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	80	F	MA répondeur
MM 9	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	88	F	MA répondeur
DL 15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	86	F	MA répondeur
MD 14	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	2	86	H	MA répondeur
MD 30	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2	86	F	MA répondeur
NZ 38	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	86	F	MA répondeur
MR 47	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	86	H	MA répondeur
JB 32	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	3	75	H	MA répondeur
SC 13	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	75	F	MA non répondeur
GE 26	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	84	F	MA non répondeur
JD 16	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	70	H	MA non répondeur
RP 3	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	73	F	MA non répondeur
LR 24	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	85	F	MA non répondeur
JS 20	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	74	H	MA non répondeur
SZ 35	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	3	74	F	MA non répondeur

Légende: Liste des sujets "Alzheimer répondeurs" (MA répondeurs) et "non répondeurs" (MA non répondeurs) au traitement par la tacrine. H = homme; F = femme; BF = intensité du bruit de fond en unité arbitraire.

b) "Alzheimer non répondeurs":

- n = 7,
- 5 femmes et 2 hommes,
- Critères diagnostiques = NINCDS-ADRDA,
- Moyenne d'âge = 76,43 +/- 5,13 ans,
- Age minimum = 70 ans; âge maximum = 85 ans.

La comparaison des moyennes d'âge de ces deux populations par un test de Student donne un t calculé égal à 1,4776 et un p = 0,1658. Il n'y a donc pas de différence significative entre les moyennes d'âge des sujets "Alzheimer répondeurs" et "non répondeurs".

En ce qui concerne la variable "sexe", la répartition est hétérogène pour les deux groupes "répondeurs": 14 femmes et 8 hommes et "non répondeurs": 5 femmes et 2 hommes. Cependant, un test du Chi-2 ne révèle aucune liaison entre le sexe et la réponse vis à vis de la tacrine.

V.2. RECUEIL DES DONNÉES

Les sérums des 29 sujets Alzheimer "tacrine" ont été analysés par la technique des immuno-empreintes. Les résultats obtenus après cette analyse sont présentés dans le **Tableau 33.**

V.3. ANALYSE GÉNÉRALE DE RÉSULTATS

L'analyse des 29 sérums par immuno-empreintes a permis d'identifier 50 types d'auto-anticorps différents dirigés contre 50 antigènes cérébraux différents dont la masse moléculaire varie de 250 à 10 kDa.

Un test du Chi-2 a été réalisé pour comparer la production d'auto-anticorps des sujets "Alzheimer répondeurs" par rapport aux "non répondeurs" à la tacrine. Les résultats sont les suivants:

* Production des anti-NF et anti-GFAP:

Notons que les auto-anticorps anti-NF-H (210), anti-NF-M (160), anti-NF-L (70) et anti-GFAP (50) sont fréquemment présents dans le sérum des sujets "répondeurs" et "non répondeurs" à la tacrine. Cependant, aucune différence significative n'est révélée par un test du Chi-2 entre ces deux populations.

* Production des anti-P140:

La production des anti-P140, auto-anticorps liés au vieillissement et à la MA, a été analysée par un test du Chi-2:

	Absence (0)	Présence (1)	Total
Alzheimer "répondeurs"	6	16	22
Alzheimer "non répondeurs"	3	4	7
Total	9	20	n = 29 sujets

Chi-2 = 0,094 après correction de Yates (différence non significative).

Ces auto-anticorps anti-P140 ne permettent pas de distinguer les sujets "répondeurs" des "non répondeurs" à la tacrine.

Aucun autre auto-anticorps ne permet de faire cette distinction dans notre population "tacrine".

V.4. MISE AU POINT D'UN MODÈLE MATHÉMATIQUE

Une régression logistique "pas à pas" a été utilisée pour mettre au point un modèle mathématique permettant de différencier les profils d'auto-anticorps des sujets "répondeurs" des "non répondeurs".

Cependant, "le meilleur" modèle logistique obtenu donne une sensibilité de 4,5% et une spécificité de 14,3% au seuil de s = 0,5 (une chance sur deux d'être répondeur à la tacrine).

Aucun modèle significatif n'a donc pû être établi pour différencier les sujets "répondeurs" des "non répondeurs". Cela semble signifier que la réponse à la tacrine n'est pas liée aux profils d'auto-anticorps.

V.5. CONCLUSION

Cette première approche a donc permis de montrer que le profil immunologique ne permet pas de différencier les sujets "répondeurs" à la tacrine des "non répondeurs". Par ailleurs, aucun modèle mathématique n'a pu être établi à partir de notre population. Cependant il faut noter que cette étude a été réalisée à partir d'un faible nombre de sujets (n = 29, le groupe des "non répondeurs" étant formé de 7 sujets seulement), cela suggère qu'elle

devrait être élargie à un plus grand échantillon. L'analyse d'une autre population pourrait donner des résultats différents.

VI. CARACTÉRISATION DE CERTAINS AUTO-ANTICORPS

VI.1. NATURE DES AUTO-ANTICORPS

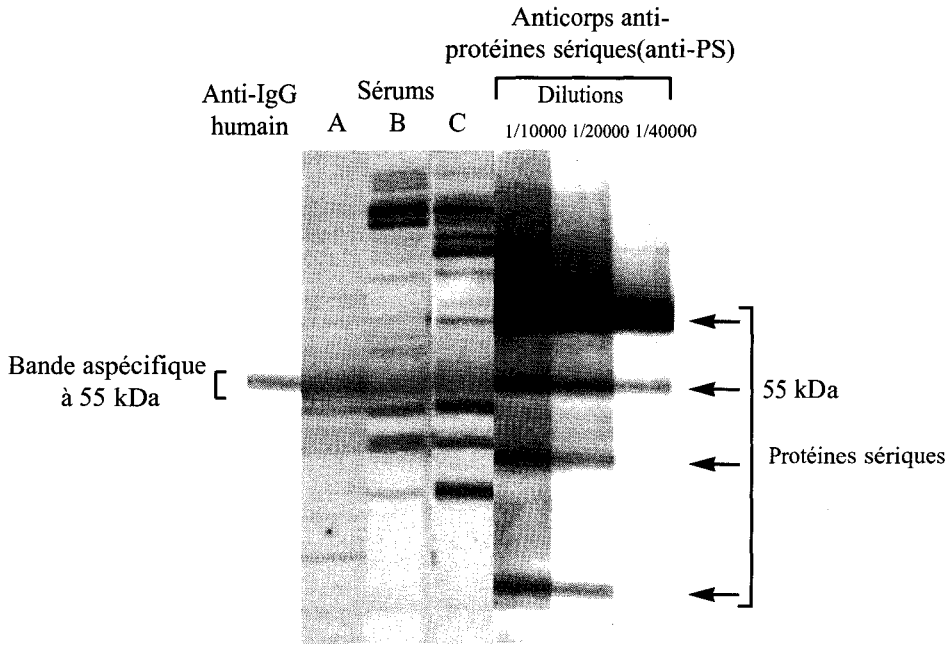
Lors de la dissection du tissu cérébral, les vaisseaux sanguins irriguant le cerveau ainsi que leur contenu sont prélevés. La préparation de cortex cérébral utilisée lors de l'immuno-empreinte contient probablement des protéines sériques. Afin de vérifier que tous les auto-anticorps mis en évidence au cours de cette étude sont bien spécifiques du tissu cérébral, nous avons comparé le profil immunologique des sérums avec celui d'un anticorps anti-protéines sériques.

La **Figure 20** montre que l'ensemble des auto-anticorps sériques isolés par la technique des immuno-empreintes est dirigé contre des protéines d'origine cérébrale. Une seule bande (aspécifique) à 55 kDa est d'origine sérique. Cela confirme les résultats obtenus dans le chapitre I.1.3.2.; la bande à 55 kDa correspondrait aux IgG présents au sein des plaques séniles.

VI.2. LES AUTO-ANTICORPS ANTI-P140

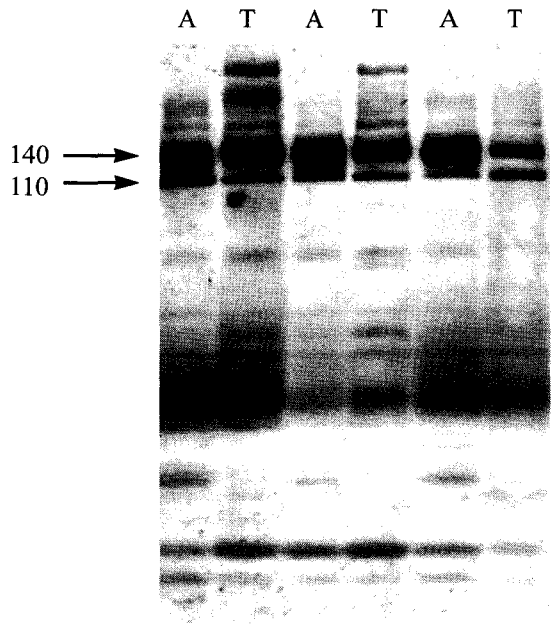
Des auto-anticorps spécifiques de la MA et dirigés contre une protéine cérébrale de 140 kDa (appelée P140) ont été identifiés au cours de notre thèse. Afin de mieux comprendre leur rôle dans la pathogénèse de la MA, nous avons caractérisé les antigènes correspondants.

FIGURE 20



Légende: L'anticorps secondaire seul, trois sérums humains A, B et C et un anticorps anti-protéines sériques (anti-PS) ont été testés contre l'ensemble des protéines cérébrales d'un sujet «Alzheimer certain». L'anti-PS a été testé à différentes dilutions. Cet anticorps détecte quatre bandes majeures, une seule est reconnue par les sérums humains (Sérums A, B et C). Cette bande est la bande aspécifique de 55 kDa. En effet, la comparaison des profils de l'anticorps secondaire seul (anti-IgG humaines), de l'anti-PS et des trois sérums humains (A, B et C), montre que la bande à 55 kDa est commune à chaque bandelette.

FIGURE 21



Légende: Un sérum humain riche en anti-P140 a été incubé avec une membrane de nitrocellulose recouverte de tissu cérébral de sujets «Alzheimer» (A) et «témoins» (T). Ce sérum détecte la bande à 140 kDa (mais aussi celle à 110 kDa) à la fois chez les sujets «Alzheimer» et «témoins». Notons que le doublet «140-110» est plus diffus chez les «Alzheimer».

VI.2.1. CARACTÉRISATION PAR ÉLECTROPHORÈSE MONODIMENSIONNELLE

VI.2.1.1. Recherche de la protéine P140 dans le cerveau de sujets sains

Au cours de notre thèse, l'analyse des profils immunologiques a été réalisée par immuno-empreintes à partir du cortex cérébral d'un sujet diagnostiqué "Alzheimer certain". La protéine P140 a été détectée dans le cerveau de ce sujet. Toutefois, nous avons voulu vérifier si cette protéine n'est pas spécifique des lésions de la MA.

Un sérum contenant des auto-anticorps anti-P140 a donc été testé sur gel de polyacrylamide 10-20% (SDS-PAGE), contre une alternance de tissu cérébral (cortex frontal) provenant de sujets "Alzheimer" et "témoins". La **Figure 21** montre que les antigènes P140 sont présents dans le cortex frontal des sujets atteints de la MA, mais aussi dans celui des sujets sains. Il ne s'agit donc pas d'une protéine spécifique de lésions de la MA.

De plus, il faut noter que la bande à 140 kDa détectée dans les homogénats cérébraux "Alzheimer" est plus large (plus "étalée" vers les bas poids moléculaires) que celle des sujets témoins. Cela suggère par exemple une modification post-traductionnelle de l'antigène (phosphorylation, glycosylation ou autre) chez les sujets atteints de la MA.

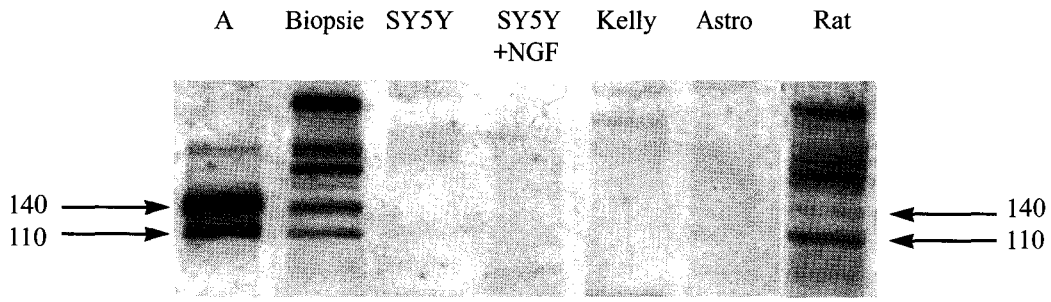
Cette protéine de 140 kDa (P140) n'est pas spécifique de la MA, seule les auto-anticorps qui la reconnaissent le sont.

VI.2.1.2. Recherche de la P140 dans différents tissus et préparations cellulaires

Un sérum contenant des anti-P140 a été testé par immuno-empreintes (**Figure 22**) contre:

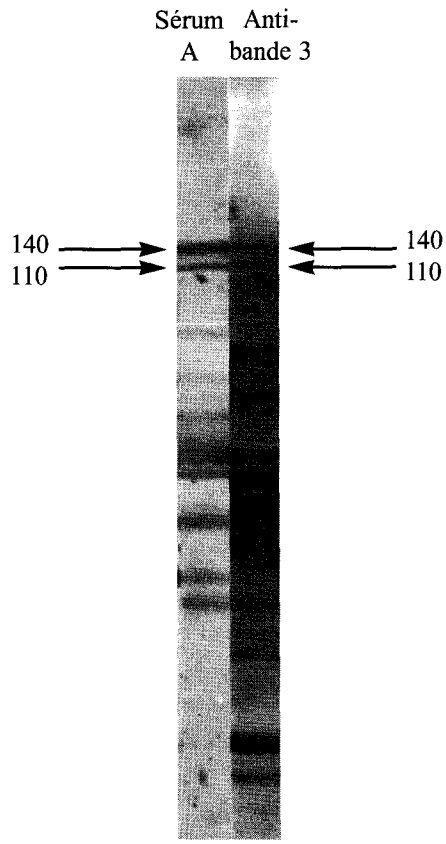
1- du tissu cérébral "Alzheimer" autopsique,

FIGURE 22



Légende: Un sérum humain riche en anti-P140 a été testé contre du tissu cérébral «Alzheimer» autopsique (A); du tissu cérébral sain biopsique (Biopsie); des préparations de cellules de neuroblastomes humains (SY5Y ou Kelly) différenciées ou non au NGF; d'astrocytomes (Astro) et du tissu cérébral de rat (Rat). Seuls les tissus cérébraux autopsique et biopsique ainsi que le cerveau de rat contiennent la P140 ainsi que la P110.

FIGURE 23



Légende: Deux bandelettes d'une même immuno-empreinte réalisée avec le cortex cérébral d'un «Alzheimer certain» ont été incubées avec un sérum (A) humain riche en anti-P140 et anti-P110 et avec un anticorps monoclonal anti-bande 3. Ce dernier reconnaît les deux protéines de 140 et 110 kDa.

2- du tissu cérébral sain biopsique,

3- des préparations de cellules de neuroblastome humain: SKNSH SY5Y (Biedler *et al.*, 1973) différenciées ou non au NGF; et Kelly (Schwab *et al.*, 1983),

4- une préparation de cellules d'astrocytome humain (Barna *et al.*, 1985),

5- et du tissu cérébral de rat (âge: 1 an).

Cette immuno-empreinte montre que seuls les tissus autopsique et biopsique humains ainsi que le cerveau de rat contiennent cette protéine P140. Néanmoins, une autre immuno-empreinte a été réalisée avec des préparations de cellules de neuroblastome très concentrées, il semblerait qu'une très faible bande soit détectée à 140 kDa. Toutefois, ces résultats non présentés du fait de la faible intensité du signal, doivent être vérifiés.

VI.2.1.3. Recherche de la nature de la P140

De nombreuses sondes immunologiques monoclonales et polyclonales ont été testées (anti-Apo-E; anti-APP; anti-Aβ; anti-préalbumine; anti-spectrine; anti-fodrine; anti-bande 3...) afin de déterminer la nature de la P140. L'anticorps monoclonal anti-bande 3 détecte la P140 par immuno-empreintes à la dilution de 1/500. La **Figure 23** montre que le doublet 140-110 (bandes à 140 et à 110 kDa) est détecté par l'anti-bande 3.

Plusieurs arguments nous ont conduit à analyser le lien entre la protéine P140 et l'âge:

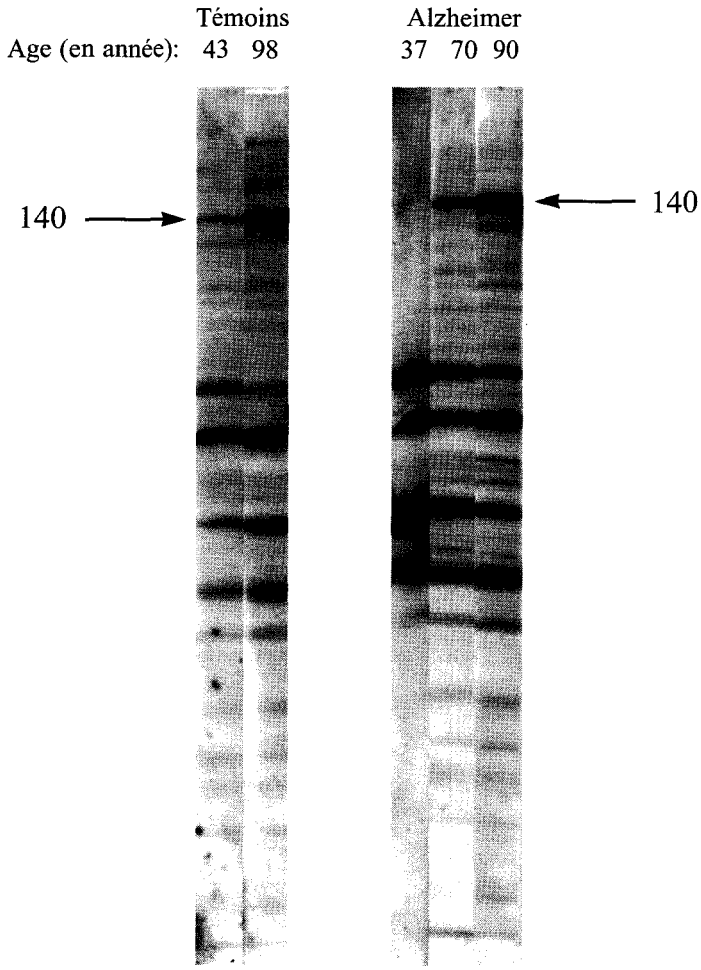
1) le fait que la P140 soit détectée par les anticorps anti-bande 3,

2) le fait que la bande 3 soit une protéine liée à l'âge (voir chapitre VI.2.1.1 des Généralités),

3) et enfin, le lien entre les auto-anticorps anti-P140 et l'âge mis en évidence dans le chapitre III.

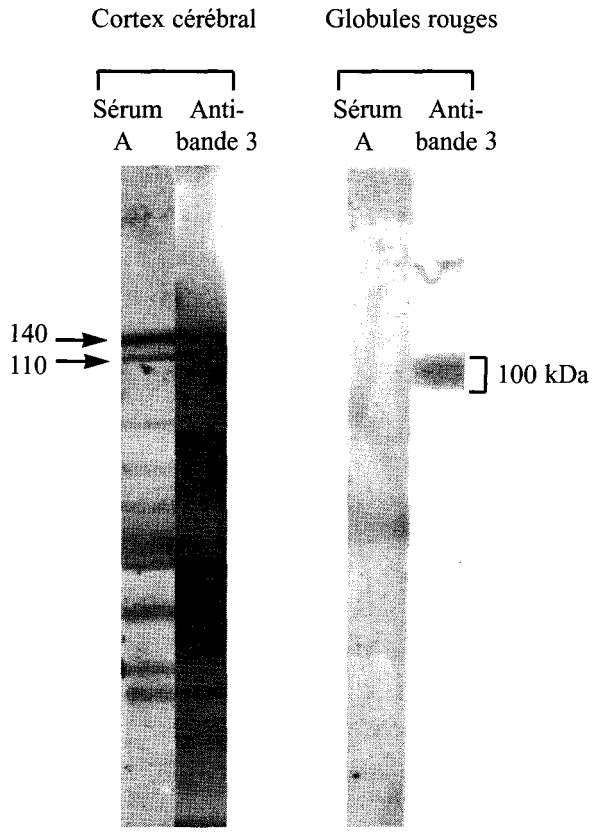
Nous avons donc analysé par immuno-empreintes le profil des auto-anticorps anti-P140 contre une série de sujets témoins ou atteints de la MA plus ou moins âgés (**Figure**

FIGURE 24



Légende: Un sérum A riche en anti-P140 a été testé sur des bandelettes recouvertes de protéines cérébrales provenant de deux sujets témoins (âgés de 43 et 98 ans) et de trois sujets «Alzheimer» (âgés de 37, 70 et 90 ans). L'intensité du signal de la P140 augmente avec l'âge chez les témoins comme chez les sujets atteints de la MA. Il semble donc que la quantité de protéines cérébrales P140 augmente au cours du vieillissement.

FIGURE 25



Légende: Un sérum humain A et un anticorps monoclonal anti-bande 3 ont été testés par immuno-empreintes, d'une part contre une préparation de cortex cérébral d'un sujet «Alzheimer certain» (à gauche) et d'autre part, contre une préparation de globules rouges (à droite). L'anti-bande 3 détecte, dans la préparation de globules rouges, une bande à 100 kDa qui correspond à la bande 3 érythrocytaire, alors que le sérum A ne détecte aucune protéine érythrocytaire de haut poids moléculaire. Par contre, dans la préparation de cortex cérébral, le sérum et l'anti-bande 3 détectent le doublet «140-110» mais pas la bande à 100 kDa. Ceci montre que la P140 ne correspond pas à la bande 3 érythrocytaire (sinon cette dernière serait détectée par le sérum), mais à une protéine ayant un épitope commun avec cette bande 3.

24). La quantité de protéine de 140 kDa semble augmenter avec l'âge du sujet qu'il soit malade ou non.

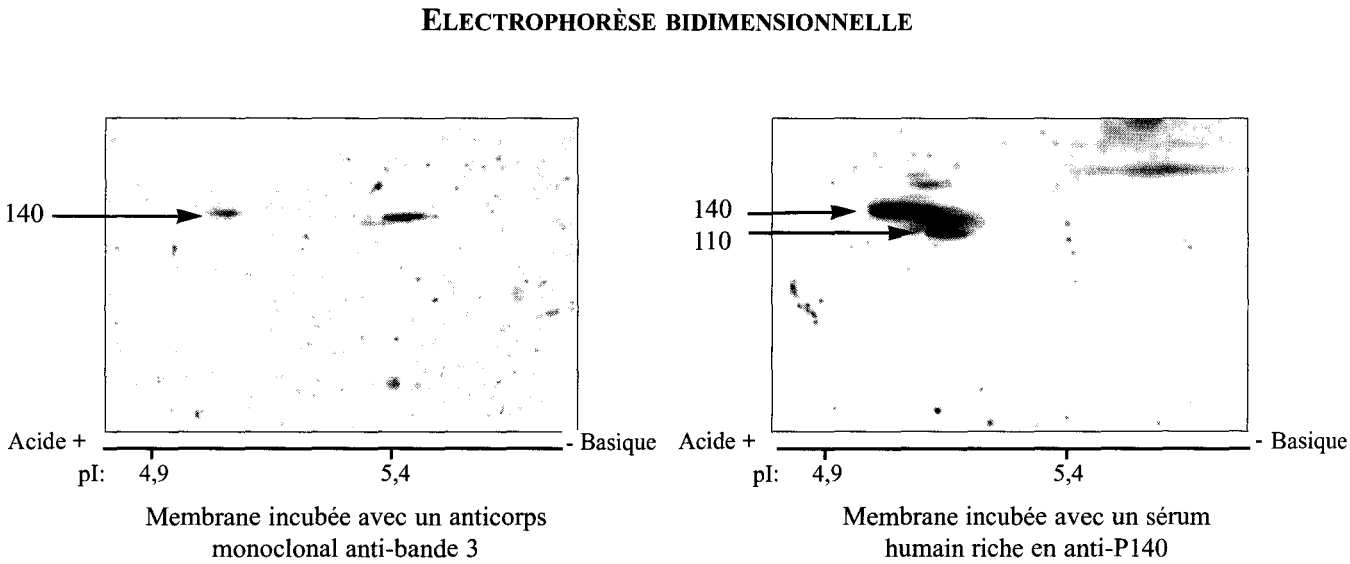
Par ailleurs, nous avons voulu vérifier que l'anticorps monoclonal anti-bande 3 reconnaît bien l'antigène contre lequel il a été produit: à savoir la bande 3 érythrocytaire. La **Figure 25** compare l'immuno-marquage obtenu avec un sérum humain riche en anti-P140 et celui obtenu avec l'anticorps monoclonal anti-bande 3, à la fois contre le tissu cérébral d'un sujet "Alzheimer certain" et une préparation de globule rouge. Après centrifugation à 1800 tours / min, le culot sanguin d'un sérum "Alzheimer" a été homogénéisé comme le tissu cérébral dans le tampon de Laemmli (10% p/v) et déposé sur gel de polyacrylamide 10-20%. Cette immuno-empreinte montre que les anti-P140 ne sont pas spécifiques de la bande 3 érythrocytaire mais qu'ils reconnaissent un épitope homologue à cette protéine.

VI.2.2. CARATÉRISATION PAR ÉLECTROPHORÈSE BIDIMENSIONNELLE

Une électrophorèse bidimensionnelle a été réalisée à partir du cortex cérébral du sujet "Alzheimer certain" utilisé en monodimensionnelle tout au long de la thèse. L'anticorps monoclonal anti-bande 3 a d'abord été testé sur cette immuno-empreinte. Puis après rinçage et élimination du signal dans un bain contenant du tampon TNT à 10% d'eau oxygénée (v/v), un second anticorps primaire: un sérum humain riche en auto-anticorps anti-P140 a été incubé avec cette membrane de nitrocellulose (**Figure 26**).

Les résultats observés en monodimensionnelle ont été confirmés par la technique bidimensionnelle: la P140 est détectée par l'anticorps monoclonal anti-bande 3. Cette P140 possède donc un épitope commun avec la bande 3 érythrocytaire, et a une masse moléculaire supérieure (140 kDa au lieu de 100 kDa). Par ailleurs, l'analyse bidimensionnelle a permis de déterminer le pI de la P140. Il est égal à 5,1. Ainsi, avec les renseignements dont nous disposions; la masse moléculaire apparente (déterminée en électrophorèse

FIGURE 26



Légende: Une électrophorèse bidimensionnelle a été réalisée à partir du cortex cérébral d'un «Alzheimer certain», la membrane de nitrocellulose a été incubée d'une part (à gauche), avec un anticorps monoclonal anti-bande 3, puis d'autre part (à droite), après rinçage et élimination du signal, cette membrane a été incubée avec un sérum humain riche en anti-P140. Le sérum humain comme l'anticorps anti-bande 3 détectent la P140. La bande à 110 kDa n'est pas visible en bidimensionnelle avec l'anti-bande 3. Les anti-P140 contenus dans le sérum humain ont un épitope commun avec les anticorps anti-bande 3 érythrocytaire.

monodimensionnelle) et le pI de cette protéine, nous avons recherché dans une banque de données sur le site internet "www.expasy.ch", les protéines ayant ces caractéristiques.

Les renseignements complémentaires que nous avons pu obtenir sont les suivants:

- La protéine bande 3 érythrocytaire a une masse moléculaire de 101,92 kDa et un pI=5,08.

- Deux protéines appelées "B3A2 Human" et "B3A3 Human" ou "Anion exchange protein 2" et "Anion exchange protein 3", qui sont des "non-erythroid band 3-like protein", ont un degré d'homologie élevé (30%) avec la bande 3 érythrocytaire. Elles sont spécifiques du tissu cardiaque et du cerveau. Leur masse moléculaire respective est de 136,81 et 135,7 kDa et leur pI théorique de 6,16 et 6,02.

La P140 pourrait être une des "non-erythroid band 3-like proteins" car, comme nous l'avons vu précédemment, elle n'est pas spécifique des érythrocytes mais du tissu cérébral. Cependant, le pI (5,1) de la P140 est différent de ceux des "non-erythroid band 3-like proteins". Cette différence peut s'expliquer, en partie, par le fait que le pI de la P140 correspond au pI apparent, et ceux des "non-erythroid band 3-like proteins" aux pI théoriques. Aussi, une modification post-traductionnelle comme une phosphorylation pourrait acidifier le pI de ces transporteurs d'anions B3A2 ou B3A3. Ainsi, cette phosphorylation induirait l'apparition de nouveaux épitopes (ACS?) donc la production d'auto-anticorps. La P140 qui a un lien avec ces transporteurs neuronaux pourrait correspondre à une de ces protéines "hyperphosphorylées".

Actuellement, une collaboration avec le Laboratoire de Biologie du développement de Lille I (USTL) est entamée afin de déterminer la nature de la P140 par spectrométrie de masse.

VI.2.3. CARACTÉRISATION PAR IMMUNOHISTOCHIMIE

Un sérum humain riche en anti-P140 (dilutions utilisées: 1/1000 à 1/200) a été testé par immuno-empreintes sur des coupes de cerveaux de sujets atteints de la MA. Malheureusement, aucune structure n'a été marquée de manière spécifique. Cette absence d'immuno-marquage pourrait être due à la faible concentration sérique d'auto-anticorps anti-P140. Il semble donc qu'une étape préalable de purification des auto-anticorps anti-P140, par immuno-précipitation par exemple, soit nécessaire pour analyser les anti-P140 par immunohistochimie.

VI.2.4. CONCLUSION

Nous avons donc montré que cette protéine de 140 kDa:

- induit la production d'auto-anticorps sériques chez les patients atteints de la MA, cette production est liée à l'âge,
- elle n'est pas spécifique des lésions de la MA, puisqu'elle est détectée non seulement dans le tissu cérébral de malade mais aussi dans le cerveau sain,
- elle subirait des modifications post-traductionnelles chez les patients atteints de la MA,
- elle est présente dans le tissu cérébral humain autopsique et biopsique ainsi que dans le cerveau de rat. Nous n'avons pas confirmé sa présence dans les cellules neuronales humaines,
- elle possède une séquence homologue à la bande 3 érythrocytaire,
- elle a une masse moléculaire d'environ 140 kDa et un pI de 5,1,
- et elle est elle-même liée à l'âge.

En conclusion, nous pouvons supposer que cette protéine de 140 kDa est l'une des "non-erythroid band 3-like protein" ayant subi des modifications post-traductionnelles. Ainsi, les auto-anticorps anti-P140 seraient impliqués dans la dégradation des cellules neuronales sénescentes et endommagées présentes dans le cerveau des sujets âgés non dément et dans celui de sujets atteints de la MA (selon le processus décrit dans le chapitre VI.2.1.1 des Généralités). Le mécanisme de production des auto-anticorps anti-P140 reste encore inconnu.

VI.2. LES AUTRES AUTO-ANTICORPS

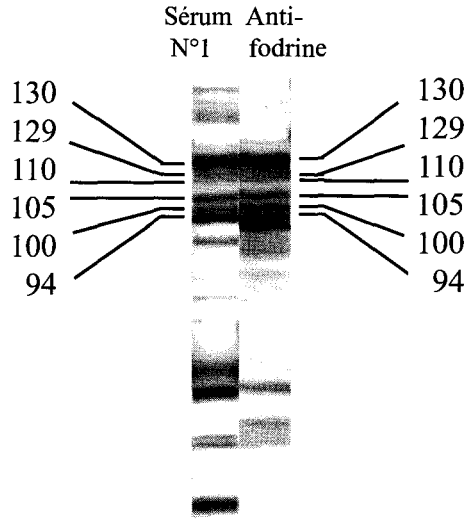
• Rappelons qu'au cours de notre thèse nous avons caractérisé 5 types d'auto-anticorps parmi la cinquantaine mis en évidence:

Nom de l'auto-anticorps	Antigène reconnu
210	NF-H
160	NF-M
70	NH-L
50	GFAP
PD50	produits de dégradation de la GFAP

• Plusieurs anticorps monoclonaux et polyclonaux (anti-tau, anti-Apo-E; anti-APP; anti-Aβ; anti-préalbumine; anti-spectrine; anti-fodrine; anti-bande 3...) ont été testés et comparés avec les profils d'auto-anticorps.

Notons que nous avons pu montrer que les auto-anticorps anti-P69, anti-P64 et anti-P55 ne correspondent pas aux anticorps anti-protéines tau 55, 64 et 69, mais à d'autres types de protéines de même poids moléculaire et encore non identifiées.

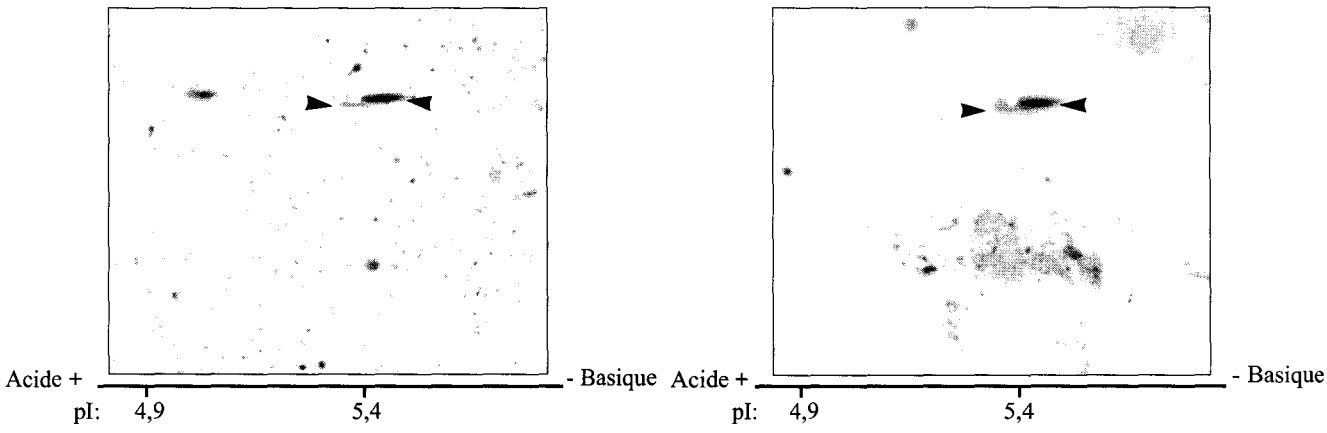
FIGURE 27



Légende: Un sérum N°1 et un anticorps polyclonal anti-fodrine ont été testés sur deux bandelettes de nitrocellulose obtenues après électrophorèse monodimensionnelle et transfert des protéines cérébrales d'un patient diagnostiqué «Alzheimer certain». Le profil d'auto-anticorps du sujet N°1 est très proche de celui obtenu avec l'anticorps anti-fodrine; en particulier les protéines 130, 129, 110, 105, 100 et 94 sont détectées par les deux sérums.

FIGURE 28

ELECTROPHORÈSE BIDIMENSIONNELLE



Membrane incubée avec le sérum humain N°1 (riche en anti-P130 et P129) utilisé dans la figure 27

Membrane incubée avec un anticorps polyclonal anti-fodrine

Légende: Une électrophorèse bidimensionnelle a été réalisée à partir du cortex cérébral d'un «Alzheimer certain», la membrane de nitrocellulose a été incubée d'une part (à gauche), avec le sérum humain N°1 riche en anti-P130 et anti-P129, puis d'autre part, après rinçage et élimination du signal, cette membrane a été incubée avec un anticorps polyclonale anti-fodrine (à droite). En bidimensionnelle, le sérum humain comme l'anticorps anti-fodrine détectent (pointes de flèche) uniquement la P130 (plus basique) et la P110.

Rappelons que la P110 est présente dans le tissu autopsique "témoin" et "Alzheimer" (**Figure 21**), dans le tissu cérébral biopsique et le cerveau de rat (**Figure 22**). De plus, l'anti-bande 3 détecte la bande à 110 kDa. En analyse bidimensionnelle ce marquage est absent du fait de la faible quantité d'antigènes présente sur l'immuno-empreinte (**Figure 26**). En effet, la quantité d'antigènes déposés (100 µl d'homogénat) est plus faible qu'en monodimensionnelle (500 µl). La nature de cette protéine reste à identifier.

L'anticorps polyclonal anti-fodrine a permis d'avoir une idée de la nature de certains auto-anticorps (**Figure 27**). Une série de bandes (250, 130, 129, 105, 100 et 94) pourrait avoir un lien avec la spectrine cérébrale ou fodrine. Une analyse bidimensionnelle (**Figure 28**) montre que les deux bandes à 130 et 129 kDa sont reconnus par l'anticorps polyclonal anti-fodrine humaine. L'absence de détection des autres bandes pourrait être due à la faible quantité d'antigènes présente sur l'immuno-empreinte. Des analyses complémentaires devront être réalisées afin de vérifier cette hypothèse.

VI.3. CONCLUSION

Nos recherches ayant porté principalement sur l'identification d'un profil d'auto-anticorps spécifique de la MA, les travaux concernant la caractérisation de ces auto-anticorps ont simplement été entamés. Ces recherches devront être poursuivies, en particulier la caractérisation des auto-anticorps spécifiques de la MA, du vieillissement et des sujets "répondeurs" à la tacrine apporteront des informations complémentaires et indispensables pour la compréhension de la pathogénèse de la MA.

CONCLUSION

CONCLUSION

Depuis 1910, année où KRAEPELIN donna le nom de maladie d'Alzheimer à une démence dégénérative présénile, de nombreuses découvertes ont permis de mieux comprendre le mécanisme d'"Alzheimerisation" sans pour autant le maîtriser totalement.

Les lésions caractéristiques de la maladie (plaques séniles et neurones en dégénérescence neurofibrillaire), ainsi que la plupart de leurs constituants (peptide Aβ, protéines tau, APP, Apo-E,...) ont été mis en évidence. De plus, la recherche de marqueurs de la MA dans les liquides biologiques (sang et LCR) a permis d'isoler d'autres molécules impliquées dans la pathogénèse de la maladie, en particulier des auto-anticorps et des marqueurs de l'inflammation. Ces résultats ont montré l'implication du système immunitaire dans la MA. Néanmoins, toutes ces découvertes, n'ont pas abouti à la mise au point d'un test diagnostique de certitude précoce de la MA.

Ce type de diagnostic *ante-mortem* est indispensable pour l'avancée des recherches et le traitement précoce de la maladie. C'est pourquoi, l'objectif général de notre thèse était la mise au point d'un test diagnostique de la MA à partir d'un liquide biologique facilement accessible: le sang.

Parmi toutes les hypothèses formulées au sujet de l'étiologie de la MA, celle impliquant le rôle d'un mécanisme auto-immun nous a paru la plus intéressante. En effet, de nombreux auteurs ont mis en évidence d'une part, la présence de marqueurs de l'inflammation dans le cerveau, le sang et le LCR des malades, et d'autre part, la présence d'auto-anticorps dans le sérum des malades (pour revue Rogers, 1994). Bien que les recherches concernant les auto-anticorps soient multiples et variées, aucune n'a réellement permis d'effectuer la synthèse globale des découvertes dans ce domaine. L'objectif précis de notre thèse a donc été d'établir le bilan de tous les auto-anticorps produits au cours de la MA, afin d'en isoler un ou

plusieurs qui pourraient être utilisés comme outil dans un test diagnostique. En effet, certains de ces auto-anticorps pourraient être spécifiques des lésions de la MA et leur détection en périphérie serait un moyen de déceler la maladie avec certitude et du vivant du patient.

Dans un premier temps, nous avons mis au point une technique originale, peu onéreuse, reproductible, fiable et simple d'application en pratique quotidienne, permettant de détecter les auto-anticorps sériques (technique des immuno-empreintes).

Dans un deuxième temps, nous avons analysé les profils d'auto-anticorps d'une série de 33 témoins âgés non déments et de 46 sujets atteints de la MA. L'analyse de ces profils a permis de mettre en évidence d'une part, des auto-anticorps spécifiques de la maladie d'Alzheimer, et d'autre part, des auto-anticorps spécifiques des sujets âgés. Parmi la cinquantaine d'auto-anticorps mis en évidence, 6 ont été utilisés pour établir un modèle mathématique permettant de diagnostiquer les sujets "Alzheimer" à partir de la présence ou de l'absence de ces auto-anticorps. Ce test diagnostique, établi à partir d'une régression logistique et qui possède une spécificité de 93,94% et une sensibilité de 91,3%, a ensuite été validé. Après cette validation, qui a permis de confirmer la forte sensibilité et non la spécificité, nous avons voulu améliorer ce test en utilisant l'intensité du signal (soit la concentration des auto-anticorps). Finalement, les modèles établis après cette analyse quantitative, montrent que la concentration de certains auto-anticorps permet de discriminer les sujets "Alzheimer" des témoins. Cependant, l'échantillon utilisé (n=29) ne permet pas de conclure. Les résultats devront être vérifiés sur une plus grande population.

Face aux premiers résultats impliquant l'absence et la présence des auto-anticorps (étude qualitative) et en particulier lorsque nous nous sommes rendu compte de l'importance de l'âge dans la réponse auto-immune de la MA, nous avons analysé cette réponse au cours du vieillissement. Ainsi, une population formée de 54 sujets témoins âgés de 17 à 89 ans a été analysée par la technique des immuno-empreintes. Après la validation de nos résultats, nous avons pu conclure que 10 types d'auto-anticorps, aussi détectés chez les sujets "Alzheimer", sont fortement liés à l'âge. Le fait que parmi ces 10 types d'auto-anticorps, 2

aient été utilisés comme outils dans le test diagnostique à 7 variables que nous avions établi, révèle l'importance du phénomène de vieillissement dans ce test.

Par ailleurs, notre étude a été réalisée à partir de sujets diagnostiqués "Alzheimer probables", cela signifie que notre population de base contient environ 20% de "faux diagnostics positifs" (Tierney *et al.*, 1988) même si nous avons travaillé avec des sujets ayant un suivi longitudinal poussé. Par ailleurs, en plus de ces erreurs de diagnostic, vient s'ajouter, à notre test immunologique, le biais dû à l'âge. Ces deux phénomènes "faux diagnostics" et "vieillissement" expliquent la faible spécificité obtenue lors de la validation du test. Cette étude a donc permis de mettre en évidence le phénomène de vieillissement à travers le profil immunologique des sujets, mais aussi de comprendre le rôle "parasite" de l'âge dans l'établissement d'un test diagnostique à partir du profil d'auto-anticorps.

Ces résultats suggèrent donc que le test diagnostique idéal (impliquant les auto-anticorps) devrait pouvoir éliminer complétement le phénomène "vieillissement" (biais dû à l'âge) pour ne visualiser que le phénomène de MA. Ceci serait possible en pondérant le pouvoir discriminant des auto-anticorps par l'âge. Cependant, cette nouvelle étude nécessite la sélection d'une nouvelle population pour éviter le biais de multiplicité des tests décrits page 170.

De plus, les résultats de la caractérisation de certains auto-anticorps s'avèrent très intéressants; en particulier les anti-P140 pourraient correspondre à des anticorps anti-ACS. Ceci expliquerait non seulement l'augmentation de la production de ces auto-anticorps au cours de la MA, mais aussi la forte liaison, observée au cours de notre étude, entre ces anti-P140 et l'âge.

Enfin, une ébauche d'étude a été entamée pour analyser les profils immunologiques des sujets "répondeurs" et "non répondeurs" au traitement par la tacrine. Cependant, les résultats obtenus devront être confirmés par des analyses complémentaires.

PERSPECTIVES

PERSPECTIVES

Le bilan que nous avons établi concernant les auto-anticorps produits au cours du vieillissement et de la MA, a permis de répondre à certaines questions (il existe des auto-anticorps spécifiques du vieillissement; un test diagnostique *ante-mortem* et précoce à partir des auto-anticorps peut être envisagé...), mais il a suscité aussi de nouvelles interrogations: comment éliminer le phénomène "vieillissement"? Quelle est la nature de ces auto-anticorps?...

A travers cette étude, nous avons pu nous rendre compte de la difficulté à établir un test diagnostique de la MA à partir des profils immunologiques. En effet, si un lien existe entre la MA et le vieillissement au niveau des lésions neuropathologiques, il semble d'après nos résultats que ce lien existe aussi au niveau de la réponse auto-immune vis à vis du cerveau. Finalement, la meilleure façon d'établir ce type de diagnostic serait d'éliminer le biais dû à l'âge. Pour cela, il faut d'abord mieux comprendre le phénomène de vieillissement immunologique, c'est-à-dire identifier par exemple les protéines cérébrales reconnues par les auto-anticorps spécifiques du vieillissement. De même, la caractérisation des auto-anticorps spécifiques de la MA pourrait apporter des renseignements et peut être même un outil diagnostique de la maladie. Enfin, l'analyse des profils immunologiques des sujets "répondeurs" et "non répondeurs" à la tacrine pourrait aider à mieux comprendre l'action différentielle de la tacrine, ce qui favoriserait la découverte de nouvelles thérapeutiques.

La démarche la plus cohérente pour rechercher un marqueur de la MA est celle suivie par la majorité des chercheurs: comparer deux populations "Alzheimer" et témoin. La plupart du temps, la population "Alzheimer" est confirmée par un examen *post-mortem* lorsqu'il

s'agit de rechercher des marqueurs neuropathologiques, mais elle est "Alzheimer probable" lorsqu'il s'agit, comme au cours de notre thèse, d'identifier des marqueurs biologiques.

Selon Litvan de l'"Alzheimer's Association Ronald and Nancy Reagan Research Institute" (1997), la meilleure façon d'isoler un marqueur spécifique de la MA est d'appliquer les trois phases suivantes:

La **phase I** consiste à comparer une population "Alzheimer confirmée" avec une population de sujets "témoins sains". Si le marqueur permet une bonne discrimination de ces deux populations, la **phase II** peut être appliquée. Celle-ci consiste à comparer une population "Alzheimer confirmée" et une population contenant des sujets sains et des sujets atteints d'autres maladies neurodégénératives. Si le marqueur permet de différencier ces deux populations, alors l'étude s'étend à la **phase III**. Cette dernière phase consiste à tester le marqueur sur une série de sujets diagnostiqués cliniquement et suivis au cours d'une étude longitudinale.

Cette méthode permettrait d'éliminer le biais dû aux "faux diagnostics" et "purifierait" notre test des éventuels auto-anticorps spécifiques des autres maladies neurodégénératives. La validation de ce test sur des populations atteintes d'autres maladies neurodégénératives donnerait des résultats meilleurs que ceux obtenus au cours de notre thèse (Chapitre "Résultats-Discussion" paragraphe III.3.1.3.).

En effet, la recherche de marqueurs auto-immuns périphériques réalisée au cours de notre thèse, a été effectuée sur des sujets diagnostiqués “Alzheimer probables”. Ces sujets ont, certes, été suivis au cours d'une étude longitudinale, ce qui réduit le risque d'erreurs de diagnostic mais ne l'élimine pas totalement. L'idéal aurait été de disposer d'une banque de liquides biologiques (sang et LCR) avec confirmation neuropathologique des diagnostics ("MA certain"). Cependant, ceci demande des moyens considérables et en particulier la constitution d'une banque de liquides biologiques "certifiés" nécessite du temps. Certains pays commencent à mettre au point ce type de banque, ce qui permettra certainement d'ici

quelques années de progresser dans la mise au point d'un test diagnostique *ante-mortem* de certitude de la MA et donc dans le traitement précoce de la MA.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Abraham CR, Selkoe DJ, Potter H (1988) Immunochemical identification of the serine protease inhibitor, alpha-1-antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. Cell 52:487-501.

Aisen PS, Davis KL (1994) Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: Implications for therapy. American Journal of Psychiatry 151:1105-1113.

Alvarez XA, Franco A, Fernandez-Novoa L, Cacabelos R (1996) Blood levels of histamine, IL-1 beta, and TNF-alpha in patients with mild to moderate Alzheimer disease. Molecular and Chemical Neuropathology 29:237-252.

American Psychiatric Association DSM IV (1996) Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux. Paris, Edition Masson: 1056 pages.

Anderson JP, Esch FS, Keim PS, Sambamurti K, Leiberburg I, Robakis NK (1991) Exact cleavage site of Alzheimer amyloid precursor in neuronal PC-12 cells. Neuroscience Letters 128:126-128.

Andersen K, Launer LJ, Ott A, Hoes AW, Breteler MMB, Hofman A (1995) Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease the risk for Alzheimer's disease? The Rotterdam study. Neurology 45:1441-1445.

Anderton BH, Brion JP, Couck AM, Davis DR, Gallo JM, Hanger DP, Latimer DA, Lovestone S, Miller CCJ, Reynolds CH, Smith C, Woodgett J (1994) Factors affecting tau hyperphosphorylation in cells. The cytoskeleton in Alzheimer's disease, Rochester, 21-23 Mai.

Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW (1991) The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. Cerebral Cortex 1:103-116.

Arriagada PV, Growdon JH, Hedleywhyte ET, Hyman BT (1992) Neurofibrillary Tangles But Not Senile Plaques Parallel Duration and Severity of Alzheimer's Disease. Neurology 42:631-639.

Bahmanyar S, Gajdusek DC, Sotelo J, Gibbs CJ (1982) Longitudinal spinal cord sections as substratum for anti-neurofilament antibody detection. Journal of Neurological Sciences 53:85-90.

Bahr BA, Vanderklish PW, Ha LT, Tin MT, Lynch G (1991) Spectrin breakdown products increase with age in telencephalon of mouse brain. Neuroscience Letters 131:237-240.

BU LILLE

Bancher C, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Fried VA, Smith HT, Wisniewski HM (1991) Abnormal phosphorylation of tau-precedes ubiquitination in neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. Brain Research 539:11-18.

Barna BP, Chou SM, Jacobs B, Ransohoff RM, Hahn JF, Bay JW (1985) Enhanced DNA synthesis of human glia cells exposed to human leucocytes products. Journal of Neuroimmunology 10:151-158.

Bauer J, Strauss S, Schreiter-Gasser P, Schlegel I, Witt I, Yolk B, Berger M (1991) Interleukin-6 and alpha 2-macroglobulin indicate an acute phase state in Alzheimer's disease cortices. FEBS Letters 285:111-114.

Bell MA, Ball MJ (1981) Morphometric comparison of hippocampal microvasculature in ageing and demented people: diameters and densities. Acta Neuropathologica 53:299-318.

Benton AL (1963) Manuel du test de rétention visuelle. Paris, Centre de Psychologie Appliquée. 80 pages.

Biedler JL, Helson L, Splenger BA (1973) Morphology and growth, tumorigenecity, and cytogenics of human neuroblastoma cells in continus culture. Cancer Research 33:2643-2652.

Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI (1985) The distribution of Tau in the mammalian central nervous system. Journal of Cellular Biology 101:1371-1378.

Blennow K, Hesse C, Fredman P (1994) Cerebrospinal fluid apolipoprotein E is reduced in Alzheimer's disease. Neuroreport 5:2534-2536.

Blennow K, Wallin A, Chong JK. (1995) Cerebrospinal fluid 'neuronal thread protein' comes from serum by passage over the blood-brain barrier. Neurodegeneration 4:187-193.

Blessed G, Tomlinson BE, Roth M (1968) The association between quantitative measures of dementia and senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. British Journal of Psychiatry 114:797-811.

Bons N, Mestre N, Ritchie K, Petter A, Podlisny M, Selkoe D (1994) Identification of Amyloid Beta Protein in the Brain of the Small, Short-Lived Lemurian Primate Microcebus marinus . Neurobiology of Aging. 15/2:215-220.

Bouras C, Hof PR, Morrison JH (1993) Neurofibrillary tangle densities in the hippocampal formation in a non-demented population define subgroups of patients with differential early pathologic changes. Neuroscience Letters 153:131-135

Braak H, Braak E (1991) Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathologica 82:239-259.

Breitner JCS, Gau BA, Welsh KA, Plassman BL, McDonald WM, Helms MJ, Anthony CJ (1994) Inverse association of anti-inflammatory treatments and Alzheimer's disease: initial results of a co-turn central study. Neurology 44:227-232.

Breitner JCS, Welsh KA, Helms MJ, Gaskell PC, Gau BA, Roses AD, Pericak-Vance MA, Saunders AM (1996a) Delayed onset of Alzheimer's disease with non-steroidal anti-inflammatory and histamine H2-blocking drugs. Neurobiology of Aging 16:523-530.

Breitner JCS (1996b) The role of anti-inflammatory drugs in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. Annual Review of Medicine 47:401-411.

Brion JP, Passareiro H, Nunez J, Flament-Durand J (1985) Immunological detection of tau protein in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. Archives of Biology 95:229-235.

Brion JP, Guilleminot J, Couchie D, Flament-Durand J, Nunez J (1988) Both adult and juvenile tau microtubule-associated proteins are axon specific in the developing and adult rat cerebellum. Neuroscience 25:139-146.

Buée L, Ding W, Anderson JP, Narindrasorasak S, Kisilevsky R, Boyle NJ, Robakis NK, Delacourte A, Greenberg B, Fillit HM (1993a) Binding of vascular heparan sulfate proteoglycan to Alzheimer's amyloid precursor protein is mediated in part by the N-terminal region of A4 peptide. Brain Research 627:199-204.

Buée L, Ding W, Delacourte A, Fillit H (1993b) Binding of secreted human neuroblastoma proteoglycans to the Alzheimer's amyloid A4 peptide. Brain Research 601:154-163.

Buée L, Hof PR, Bouras C, Delacourte A, Perl DP, Morrison JH, Fillit HM (1994) Pathological alterations of the cerebral microvasculature in Alzheimer's disease and related dementing disorders. Acta Neuropathologica 87:469-480.

Buée L, David JP, Podevin-Dimster V, Bussière T, Permanne B, Buee-Scherrer V, Sergeant N, Ghozali F, Vermersch P, Lebert F, Pasquier F, DiMenza C, Delacourte A (1997a) Diagnostic de la maladie d'Alzheimer: Etablissement de critères biochimiques (CEBDAD). 4ième Réunion Francophone sur la maladie d'Alzheimer et les syndromes apparentés. Montpellier, 2-3-4 Octobre 1997.

Buée L, Hof PR, Delacourte A. (1997b) Brain microvascular changes in Alzheimer's disease and other dementias. Annals New York Academy of Sciences.Eds. De la Torre, J.C. Hachinski, V New York. Vol. 826: sous press.

Buée-Scherrer V, Buée L, Hof PR, Leveugle B, Gilles C, Loerzel AJ, Perl DP, Delacourte A (1995) Neurofibrillary degeneration in amyotrophic lateral sclerosis/ parkinsonism-dementia complex of Guam - Immunochemical characterization of tau proteins. American Journal of Pathology 146:924-932.

Buée-Scherrer V, Condamines O, Mourton-Gilles C, Jakes R, Goedert M, Pau B, Delacourte A (1996a) AD2, a phosphorylation-dependent monoclonal antibody directed against tau proteins found in Alzheimer's disease. Molecular Brain Research 39:79-88.

Buée-Scherrer V, Hof PR, Buée L, Leveugle B, Vermersch P, Perl DP, Olanow CW, Delacourte A (1996b) Hyperphosphorylated tau proteins differentiate corticobasal degeneration and Pick's disease. Acta Neuropathologica 91:351-359.

Burdick D, Soreghan B, Kwon M, Kosmoski J, Knauer M, Henschen A, Yates J, Cotman C, Glabe C (1992) Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/ß amyloid peptide analogs. Journal of Biological Chemistry 267:546-554.

Bush AI, Martins RN, Rumble B et al. (1990) The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is released by human platelets. Journal of Biological Chemistry 265/26:15977-15983.

Bush AI, Moir R, Li QX et al. (1991) Plasma amyloid precursor protein is a marker for Alzheimer's disease. Society of Neuroscience Abstracts 17:1294.

Bush AI, Whyte S, Thomas LD, Williamson TG, Vantiggelen CJ, Currie. (1992) An Abnormality of Plasma Amyloid Protein Precursor in Alzheimer's Disease. Annals of Neurology 32:57-65.

Caceres A et Kosik KS (1990) Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. Nature 343:461-463.

Candore G, Di Lorenzo G, Melluso M, Cigna D, Colucci AT, Modica MA, Caruso C (1993) Gamma-Interferon, interleukin-4 and interleukin-6 in vitro production in old subjects. Autoimmunity 16(4):275-280.

Carlsson J, Armstrong VW, Reiber H, Felgenhauer K, Seidel D (1991) Clinical relevance of the quantification of apoE in cerebrospinal fluid. Clinical Chemistry Acta 196:167-176.

Chapman J, Sela BA, Wertman E, Michaelson DM (1988) Antibodies to ganglioside GM1 in patients with Alzheimer's disease. Neuroscience Letters 86:235-240.

Chapman J, Alroy G, Weiss Z, Faigon M, Feldon J, Michaelson DM (1991) Anti-neuronal antibodies similar to those found in Alzheimer's disease induce memory dysfunction in rats. Neuroscience 40:297-305.

Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L *et al.* (1991) Early-Onset Alzheimer's Disease Caused by Mutations at Codon-717 of the beta-Amyloid Precursor Protein Gene. Nature 353:844-846.

Chartier-Harlin MC, Parfitt M, Legrain S, Pérez-Tur J, Brousseau T, Evans A, Berr C, Vidal O, Roques P, Gourlet V, Fruchart JC, Delacourte A, Rossor M, Amouyel P

(1994) Apolipoprotein E, e4 allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset forms of Alzheimer's disease: analysis of the 19q13.2 chromosomal region. Human Molecular Genetic 3:569-574.

Chartier-Harlin MC, Pérez-Tur J (1995) Apolipoprotéine E: une protéine aux multiples facettes. Alzheimer Actualités, Fondation IPSEN, 96:6-11.

Checler F (1995) Processing of β-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. Journal of Neurochemistry 65:1431-1444.

Chong JK, Cantrell L, Husain M, Riesing S, Miller BE, Wands J, Delamonte (1992) Automated microparticle enzyme immunoassay for neural thread protein in cerebrospinal fluid from alzheimers disease patients. Journal of Clinical Laboratory Analysis 6:379-383.

Citron M, Oltersdorf T, Haass C, Mc Conlogue L, Hung AY Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ (1992) Mutation of the beta-Amyloid precursor protein in familial alzheimers disease increases beta-Protein production. Nature 360:672-674.

Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977a) Purification of tau, a microtubule-associated protein that induce assembly of microtubules from purified tubulin. Journal Molecular Biology 116:207-225.

Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977b) Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. Journal Molecular Biology 116:227-247.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. Science 261:921-923.

Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmader KE, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1994) Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. Nature Genetics 7:180-184.

Cover CC, Poulin JE, Gustafson MR, Wyant T, Gamble DN, Kay MMB (1996) Posttranslational changes in band 3 in adult and aging brain following treatment with ergoloid mesylates, comparison to changes observed in Alzheimer's disease. Life Sciences 58:655-664.

Cserr HF, Knopf PM (1992) Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. Immunological Today 13:507-512.

Dahlström A, Mcrae A, Polinsky R, Nee L, Sadasivan B, Ling EA (1994) Alzheimer's disease cerebrospinal fluid antibodies display selectivity for microglia - Investigations with cell cultures and human cortical biopsies. Molecular Neurobiology 9:41-54.

Davies L, Wolska B, Hilbich C, Multhaup G, Martins R, Simms G, Beyreuther K, Masters CL (1988) A4 amyloid protein deposition and the diagnosis of Alzheimer's disease: Prevalence in aged brains determined by immunocytochemistry compared with conventional neuropathologic techniques. Neurology 38:1688-1693.

Delacourte A et Défossez A (1986) Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. Journal of Neurological Science 76:173-186.

Delacourte A, Défossez A, Persuy P, Peers MC (1987) Observation of morphological relationships between angiopathic blood vessels and neurites in Alzheimer's disease. Virchows Archives A 411:199-204.

Delacourte A, Buée L (1989) Maladie d'Alzheimer: la réaction gliale est générale et intense dans tous les territoires du système nerveux central. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences (Paris) 308:359-365.

Delacourte A (1990) General and dramatic glial reaction in Alzheimer brains. Neurology 40:33-37.

Delacourte A, Sautiere PE, Wattez A, Mourton-Gilles C, Petter A, Bons N (1995) Biochemical characterization of Tau proteins during cerebral aging of the lemurian primate Microcebus murinus. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris. 318:85-89.

Delacourte A, Robitaille Y, Sergeant N, Buée L, Hof PR, Wattez A, Laroche-Cholette A, Mathieu J, Chagnon P, Gauvreau D (1996) Specific pathological tau protein variants characterize Pick's disease. Journal of Neuropathology And Experimental Neurology 55:159-168.

Delacourte A et Buée L (1997) Normal and pathological tau proteins as factors for microtubule assembly. International Review of Cytology 171:167-224.

Delaere P, Duyckaerts C, Masters C, Beyreuther K, Piette F, Hauw JJ (1990) Large Amounts of Neocortical Beta-A4 Deposits Without Neuritic Plaques Nor Tangles in a Psychometrically Assessed, Non-Demented Person. Neuroscience Letters 116:87-93.

Delamonte SM, Volicer L, Hauser SL, Wands JR (1992) Increased levels of neuronal thread protein in cerebrospinal fluid of patients with alzheimer's disease. Annals of Neurology 32:733-742.

Dickson DW, Crystal HA, Mattiace LA, Masur DM, Blau AD, Davies P, Yen SH, Aronson MK (1991) Identification of normal and pathological aging in prospctively studied nondemented elderly humans. Neurobiology of Aging 13:179-189.

Dickson DW, Lee SC, Mattice LA, Yen SC, Brosnan C (1993) Microglia and cytokine in neurological diseases, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. Glia 7:75-83.

Drewes G, Lichtenberg-Kraag B, Döring F, Mandelkow EM, Biernat J, Goris J, Dorée M, Mandelkow E (1992) Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. EMBO Journal 11:2131-2138.

Drubin DG, Kirschner MW (1986) Tau protein function in living cells. Journal of Cellular Biology 103:2739-2746.

Eikelenboom P, Stam FC (1982) Immunoglobulins and complement factors in senile plaques: an immunohistoperoxidase study. Acta Neuropathologica 57:239-242.

Eikelenboom P, Hack CE, Rozemuller JM, Stam FC (1989) Complement activation in amyloid plaques in Alzheimer's disease. Virchows Archives, Cell Pathology 56:259-262.

Eikelenboom P, Rozemuller JM, Kraal G, Stam FC, McBride PA, Bruce ME, Fraser H (1991) Cerebral amyloid plaques in Alzheimer's disease but not in scrapie affected mice are closely associated with a local inflammatory process. Virchows Archives B, Cell Pathology 60:329-336.

Eikelenboom P, Zhan SS, Kamphorst W, Van Der Valk P, Rozemuller JM (1994) Cellular and substrate adhesion molecules (integrins) and their ligands in cerebral deposits in Alzheimer's disease. Virchows Archives 424:421-427.

Eikelenboom P (1996) Inflammation et maladie d'Alzheimer. Alzheimer Actualites. Février 1996 N°107.

Elizan T, Casals J, Yahr MD (1983) Antineurofilament antibodies in postencephalitic and idiopathic Parkinson's disease. Journal of Neurological Sciences 59:341-347.

Ellis RJ, Olichney JM, Thal LJ, Mirra SS, Morris JC, Beekly, Heyman A (1996) Cerebral amyloid angiopathy in the brains of patients with Alzheimer's disease: the CERAD experience, Part XV. Neurology. 46(6):1592-1596.

Emsley J, White HE, O'hara BP, Oliva G, Srinivasan N, Tickle IJ, Blundell TL, Pepys MB, Wood SP (1994) Sructure of pentameric human serum amyloid P component. Nature. 367:338-345.

Ershler WB, Sun WH, Binkley N, Gravenstein S, Volk MJ, Kamoske G, Klopp RG, Roecker EB, Daynes RA, Weindruch R (1993) Interleukin-6 and aging: blood levels

and mononuclear cell production increase with advancing age and in vitro production is modifiable by dietary restriction. Lymphokine Cytokine Research. 12:225-230.

Estus S, Golde TE, Kunishita T, Blades D, Lowery D, Eisen M, Usiak M, Qu X, Tabira T, Greenberg BD, Younkin SG (1992) Potentially amyloidogenic, carboxy-terminal derivatives of the amyloid protein precursor. Science 255:726-728.

Evans DA, Funkenstein H, Albert MA *et al.* (1989) Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. JAMA. 262:2551-2556.

Evans KC, Berger EP, Cho CG, Weisgraber KH, Lansbury PT (1995) Apolipoprotein E is a kinetic but not thermodynamic inhibitor of amyloid formation: implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 92:763-767.

Ewins DL, Rossor MN, Butler J, Roques PK, Mullan MJ, McGregor AM (1991) Association between autoimmune thyroid disease and familial Alzheimer's disease. Clinical Endocrinology 35:93-96.

Fillit H, Luine VN, Reisberg B, Amador R, Mcewen B, Zabriskie JB (1985) Studies of the specificity of antibrain antibodies in Alzheimer's disease. Neurological Neurobiology 18:307-318.

Fillit HM, Kemeny E, Luine V, Weksler ME, Zabriskie JB (1987) Antivascular antibodies in the sera of patients with senile dementia of the Alzheimer's type. Journal of Gerontology 42:180-184 .

Fillit H, Foley P, Bradford HF, Bucht G *et al.* (1988) Autoimmunity to cholinergic-specific antigens of the brain in senile dementia of Alzheimer's type. Drug Development Research 15:143-151.

Fillit H, Ding W, Buee L, Kalman J, Altstiel L, Lawlor B, Wolf-Klein G (1991) Elevated circulatingtumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. Neuroscience Letters 129:318-320.

Fitzsimon JS, Waring SC, Kokmen E, McLaren JW, Brubaker RF (1997) Response of the pupil to tropicamide is not a reliable test for Alzheimer's disease. Archives of Neurology 54 (2):155-159.

Flament S, Delacourte A, Hémon B, Défossez A (1989) Characterization of two pathological Tau protein variants in Alzheimer brain cortices. Journal of Neurological Sciences 92:133-141.

Flament S, Delacourte A, Verny M, Hauw JJ, Javoy-Agid F (1991) Abnormal tau proteins in progressive supranuclear palsy. Similarities and differences with the neurofibrillary degeneration of the Alzheimer type. Acta Neuropathologica 81:591-596.

Foley P, Bradford HF, Docherty M *et al.* (1988) Evidence for the presence of antibodies to cholinergic neurons in the serum of patients with Alzheimer's disease. Journal of Neurology 235:466-471.

Folstein MF, Folstein SE, Mc Hugh PR (1975) "Mini Mental State": a practical method for grading the cognitive state of patients for clinician. Journal Psychiatric Research 12:189-198.

Folstein MF (1989) Heterogeneity in Alzheimer's disease. Neurobiology Aging 10:435-436.

Fraser PE, Levesque L, McLachlan DR (1993) Biochemistry of Alzheimer's disease amyloid plaques. Clinical Biochemistry 26:339-349.

Frautschy SA, Baird A, Cole GM (1991) Effects of injected Alzheimer ß-amyloid cores in rat brain. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 88:8362-8366.

Frautschy SA, Cole GM, Baird A (1992) Phagocytosis and deposition of vascular ß-amyloid in rat brains injected with Alzheimer ß-amyloid. American Journal of Pathology 140:1389-1399.

Frebourg T, Dumanchin C, Campion D (1997) Formes autosomiques dominantes de la maladie d'Alzheimer. Médecine Thérapeutique 3(5):364-368.

Frederickson RCA (1992) Astroglia in Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging 13:239-253.

Gallyas F (1971) Silver staining of Alzheimer's neurofibrillary changes by mean of physical development. Acta Morphologica Academy of Sciences, Hungry 19:1-8.

Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, Guido T, Hagopian S, Johnsonwood K, Khan K, Lee M, Leibowitz P, Lieberburg I, Little S, Masliah E, Mcconlogue L, Montoyazavala M, Mucke L, Paganini L, Penniman E, Power M, Schenk D, Seubert P, Snyder B, Soriano F, Tan H, Vitale J, Wadsworth S, Wolozin B, Zhao J (1995) Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. Nature 373: 523-527.

Gaskin F, Kingsley BS, Fu SM (1987) Auto-antibodies to neurofibrillary tangles and brain tissue in Alzheimer's disease. Establishment of Epstein-Barr virus-transformed antibody producing cell lines. Journal of Experimental Medicine 165:245-250.

Gaskin F, Fu SM (1992) Antineurofibrillary tangles, antineural and anti-ß-amyloid protein in Alzheimer's disease and related disorders. Research in Immunology 143:668-670.

Gaskin F, Finley J, Fang Q, Xu SH, Fu SM (1993) Human antibodies reactive with beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. Journal of Experimental Medicine 177:1181-1186.

Gearing M, Mirra SS, Hedreen JC, Sumi SM, Hansen LA, Heymen A (1995) The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disaese (CERAD). Part X. Neuropathology confirmation of the clinical diagnosis of Alzheimer's disease. Neurology. 45(3 Pt1):461-466.

Genovesi G, Paolini P, Marcellini L, Vernillo E, Salvati G, Polidori G, Rcciardi D, de Nuccio I, Re M (1996) Relationship between autoimmune thyroid disease and Alzheimer's disease. Panminerva Medicine. 38:61-63.

Geokas C (1990) The aging process. Annals of Internal Medicine 113:455-466.

Glenner GG (1980) Amyloid deposits and amyloidosis: the ß-fibrilloses. New England Journal Medicine 302:1283-1292; 1333-1343.

Glenner GG, Wong CW (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebro-vascular amyloid protein. Biochemistry Biophysical Research Community 120:885-890.

Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Hardy J (1991) Segregation of a Missense Mutation in the Amyloid Precursor Protein Gene with Familial Alzheimer's Disease. Nature 349:704-706.

Godfroid E, Octave JN (1990) Glycosylation of the amyloid peptide precursor containing the Kunitz protein inhibitor domain improves the inhibition of trypsin. Biochemistry Biophysical Research Community 171:1015-1021.

Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (1989a) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. Neuron 3:519-526.

Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA (1989b) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. EMBO Journal 8:393-399.

Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA (1992a) Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. Neuron 8:159-168.

Goedert M, Cohen ES, Jakes R, Cohen P (1992b) p42 MAP kinase phosphorylation sites in microtubule-associated protein tau are dephosphorylated by protein phosphatase $2A_1$. Implication for Alzheimer's disease. FEBS Letters 312: 95-99.

Goedert M, Jakes R, Crowther RA, Cohen P, Vanmechelen E, Vandermeeren M, Cras P (1994) Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease: identification of phosphorylation sites in tau protein. Biochemistry Journal 301:871-877.

Golde TE, Estus S, Younkin LH, Selkoe DJ, Younkin SG (1992) Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. Science 255:728-730.

Goldgaber D, Lerman MI, McBride OW, Saffiotti U, Gajdusek DC (1987) Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. Science 235:877-880.

Gong CX, Singh TJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1993) Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. Journal of Neurochemistry 61:921-927.

Greenberg SB, Davies PA (1990) Preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau-proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 87:5827-5831.

Griffin WST, Stanley IC, Ling C, White L, McLeod V, Perrot LC, White CL, Araoz C (1989) Brain interleukin-1 and S100 immunoreactivity are elevated in Down's syndrome and Alzheimer's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 86:7611-7615.

Griffin WST, Sheng JG, Roberts GW, Mrak RE. (1995) Interleukin-1 expression in different plaque types in Alzheimer's disease: significance in plaque evolution. Journal of Neuropathological Experimental Pathology 54:276-281.

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlin M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM (1986a) Microtubule-associated protein tau, a component of Alzheimer paired helical filaments. Journal of Biological Chemistry 261:60-84.

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlin M, Wisniewski HM, Binder LI (1986b) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau in Alzheimer cytoskeletal pathology. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 83:4913-4917.

Haass C, Koo EH, Mellon A, Hung AY, Selkoe DJ (1992) Targeting of Cell-Surface beta-Amyloid Precursor Protein to Lysosomes - Alternative Processing into Amyloid-Bearing Fragments. Nature 357:500-503.

Hachinski VC, Iliff LD, Zilhka E, Du Boulay GH, Mc Allister VL, Marshall J, Russell RWR, Symon L (1975) Cerebral blood flow in dementia. Archives of Neurology 32:632-637.

Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH (1992) Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired hellical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. Neuroscience letters 147:58-62.

Hardy J, Adolfsson R, Alazuloff I, Bucht G et al. (1985) Transmitter defects in Alzheimer's disease. Neurochemistry internat 7:545-563.

Harling-Berg C, Knopf PM, Merriam J, Cserr HF (1989) Role of cervical lymph nodes in the systemic humoral immune response to human serum albumin microinfused into rat cerebrospinal fluid. Journal of Neuroimmunology 25:185-193.

Hart MN, Fabry Z (1995) CNS antigen presentation. Trends in Neurosciences 18:475-481.

Hartikainen P, Reinikainen KJ, Soininen H, Sirvio J, Soikkeli R, Riek (1992) Neurochemical Markers in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis and Normal Controls. Journal of Neural Transm-Park 4:53-68.

Hartmann T, Bieger SC, Brühl B, Tienari PJ, Ida N, Allsop D, Roberts GW, Masters CL, Dotti CG, Unsicker K, Beyreuther K (1997) Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease Aβ40/42 amyloid peptides. Nature Medicine 3(9):1016-1020.

Hasegawa M, Morishima-Kawashima M, Takio K, Suzuki M, Arai T, Titani K, Ihara Y (1992) Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in the Alzheimer's disease brain. Journal Biological Chemistry 267:17047-17054.

Haugh MC, Probst A, Ulrich J, Kahn J, Anderton BH (1986) Alzheimer neurofibrillary tangles contain phosphorylated and hidden neurofilament epitopes. Journal of Neurological Neurosurgery Psychiatry 49:1213-1220.

Heinonen O, Syrjänen S, Soininen H, Talasniemi S, Kaski M, Mäntyjärvi R, Syrjänen K, Riekkinen P (1993) Circulating immune complexes in sera from patients with Alzheimer's disease, multi-infract dementia and Down's syndrome. Neuroscience Letters. 149:67-70.

Henderson AS (1988) The risk factors for Alzheimer's disease: a review and hypothesis. Acta Psychiatrica Scandinavica 78:25-27.

Henneberg A, Gratzel M, Lemke MR (1995) Antibrain antibodies in the sera of patients suffering from Alzheimer's disease. European Journal of Neurology 2:62.

Hof PR, Morrison JH (1990) Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer's disease. II. Primary and secondary visual cortex. J. Comp. Neurol. 301:55-64.

Hof PR, Cox K, Morrison JH (1990a) Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer's disease: I. Superior frontal and inferior temporal cortex. J Comp. Neurol. 301:44-54.

Hof PR, Bouras C, Constantinidis J, Morrison JH (1990b) Selective Disconnection of Specific Visual Association Pathways in Cases of Alzheimers Disease Presenting with Balints Syndrome. Journal of Neuropathological Experiments 49:168-184.

Hu GR, Harrop P, Warlow RS, Gacis ML, Walls RS (1997) High resolution autoantibody detection by optimized protein G-horseradish peroxidase immunostaining in a Western blotting assay. Journal of Immunological Methods. 202:113-121.

Huberman M, Sredni B, Stern L, Kott E, Shalit F (1995) IL-2 and IL-6 secretion in dementia: correlation with type and severity of dementia. Journal of Neurological Science 130:161-164.

Huell M, Strauss S, Volk B, Berger M, Bauer J. (1995) Interleukin-6 is present in early stages of plaque formation and is restricted to brain Alzheimer's disease patients. Acta neuropathologica 89:544-551.

Hughes CP, Berg L, Danziger WL *et al.* (1982) A new clinical scale for the staging of dementia. British Journal of Psychiatry 140:566-572.

Hyman B, Trojanowski J, *et al.* (1997) Concensus recommendations for the *post-mortem* diagnosis of Alzheimer's disease: NIA-Reagan Institute Criteria. Neurobiology of Aging (sous presse).

IharaY, Nukina N, Miura R, Ogawara M (1986) Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. Journal of Biochemistry (Tokyo) 99:1807-1810.

Ikeda SI, Allsop D, Glenner GG (1989) Morphology and distribution of plaque and related deposits in the brains of Alzheimer's disease and controls cases: An Immunohistochemical Study Using Amyloid Beta-Protein Antibody. Laboratory Investigations 60:113-122.

Ikeda T, Furukawa Y, Mashimoto S, Takahashi K, Yamada M (1990) Vitamin B12 levels in serum and cerebrospinal fluid of people with Alzheimer's disease. Acta Psychiatrica Scandinavica 82:327-329.

Ingelson M, Benedikz E, Karlsson E, Lannfelt L (1997) Evidence for the presence of the microtubule-associated protein tau in human plasma. Society for Neuroscience 23:2221.

Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Zaidi T, Merz PA, Wen GY, Shaikh SS, Wisniewski HM, Alafuzoff I, Winblad B (1986) Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease. Lancet 2:421-426.

Ishii T, Haga S, Shimizu F (1975) Identification of components of immunoglobulins in senile plaques by means of fluorescent antibody technique. Acta Neuropathologica 32:157-162.

Jiang H, Bardick D, Glaber CG, Cotman CW, Tenner AJ (1994) ß amyloid activates complement by binding to a specific region of the collagen-like domain of the C14 A chain. Journal of Immunology 152:5050-5054.

Johnson SA, Lampert-Etchells M, Parsinetti GM, Rozovsky I, Finch CE (1992) Complement mRNA in the mammalian brain: responses to Alzheimer's disease and experimental brain lesioning. Neurobiology of Aging 13:641-648.

Kahle W, Leonhardt H, Platzer W (1995) Atlas d'Anatomie du système nerveux et des organes des sens. Edition Flammarion-Médecine-Sciences. Tome 3.

Kanai M, Matsubara E, Kawarabayashi T, Igeta Y, Tomidokoro Y, Ishiguro K and Shoji M (1996) CSF Tau and Aß 1-40/42 in Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 17S,184.

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

Karcher D, Soler Federsppiel BS, Lowenthal FD, Frank F, Lowenthal A (1986) Anti-neurofilament antibodies in the blood of patients with neurological diseases. Acta Neuropathologica (Berlin) 72:82-85.

Katzman R, Terry R, De Teresa R *et al.* (1988) Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. Annals of Neurology 23:138-144.

Kay MMB (1991) Band 3 in aging and neurological disease. Annals New York Academy of Sciences 621:179-204.

Kay MMB, Wyant T, Goodman J (1994) Autoantibodies to band 3 during aging and disease and aging interventions. Annals New York Academy of Sciences 719:419-447.

Kay MMB, Lake D, Cover C (1995) Alzheimer's disease: alterations and self recognition Advances in Experimental Medicine Biology 383:167-193.

Kay MMB, Rapcsak SZ, Bosman GJCGM, Goodman JR (1996) Posttranslational modifications of brain and erythrocyte band 3 during aging and disease. Cellular and Molecular Biology 42:919-944.

Kay MMB, Goodman J. (1997) Brain and erythrocyte anion transporter protein, band 3, as a marker for Alzheimer's disease: structural changes detected by electron microscopy, phosphorylation and antibodies. Gerontology 43:44-66.

Kennard ML, Feldman H, Yamada T, Jefferies WA. (1996) Serum levels of the iron binding protein p97 are elevated in Alzheimer's disease. Nature Medicine 2/11:1230-1235.

Khachaturian ZS (1985) Diagnosis of Alzheimer's disease. Archives of Neurology 42:1097-1105.

Kidd M (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. Nature 197:192-193.

Kingsley BS, Gaskin F, Fu SM (1988) Human antibodies to neurofibrillary tangles and astrocytes in Alzheimer's disease. Journal of Neuroimmunology 19:89-99.

Kisilevsky R, Lyon AW, Young ID (1992) A critical analysis of postulated pathogenetic mechanisms in amyloidogenesis. Critical Review of Laboratory Services 29:59-82.

Kisilevsky R, Lemieux LJ, Fraser PE, Kong X, Hultin PG, Szarek WA (1995) Arresting amyloidosis *in vivo* using small-molecule anionic or sulphates: implications for Alzheimer's disease. Nature Medicine 1:143-148.

Koh JV, Yang LL, Cotman CW (1990) Beta-amyloid increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage. Brain Research 533:315-320.

Kondo J, Honda T, Mori H, Hamada Y, Miura R, Ogawara M, Ihara Y (1988) The carboxyl third of tau is tightly bound to paired helical filaments. Neuron 1:827-834.

König G, Monning U, Czech C, Prior R, Banati R, Schreitergasser UB(1992) Identification and Differential Expression of a Novel Alternative Splice Isoform of the betaA4 Amyloid Precursor Protein (APP) Messenger RNA in Leukocytes and Brain Microglial Cells. Journal of Biological Chemistry 267:10804-10809.

Kosik KS, Duffy LK, Dowling MM, Abraham C, McCluskey A, Selkoe DJ (1984) Microtubule-associated protein 2: monoclonal antibodies demonstrate the selective incorporation of certain epitopes into Alzheimer neurofibrillary tangles. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81:7941-7945.

Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ (1986) Microtubule-associated protein tau is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 83:4044-4048.

Kowall NW et Kosik KS (1987) Axonal disruption and aberrant localization of Tau protein characterize the neuropil pathology of Alzheimer's disease. Annals of Neurology 22:639-643.

Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends in Neurosciences. 19:312-318.

Ksiezak-Reding H, Binder LI, Yen SH (1990) Alzheimer's disease proteins (A68) share epitopes with tau but show distinct biochemical properties. Journal of Neuroscience Research 25:420-430.

Kudo T, Iqbal K, Ravid R, Swaab DF, Grundke-Iqbal I (1994) Alzheimer disease - correlation of Cerebro-Spinal fluid and brain ubiquitin levels. Brain Research 639:1-7.

Ladu MJ, Falduto MT, Manelli AM, Reardon CA, Getz GS, Frail DE (1994) Isoform-specific binding of apolipoprotein E to ß-amyloid. Journal of Biological Chemistry 269:23403-23406.

Lannfelt L, Basun H, Wahlund LO, Rowe BA, Wagner SL (1995) Decreased alpha-secretase-cleaved amyloid precursor protein as a diagnostic marker for Alzheimer's disease. Nature Medicine 1:829-832.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during head assembly of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.

Ledesma MD, Correas I, Avila J, Diasnido J (1992) Implication of brain cdc2 and MAP2 kinases in the phosphorylation of tau protein in Alzheimer's disease. FEBS Letters 308:218-224.

Lee G, Cowan N, Kirschner M (1988) The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. Science 239:285-287.

Lemaire HG, Salbaum JM, Multhaup G, Kang J, Bayney RM, Unterbeck A, Beyreuther K, Müller-Hill (1989) The preA4695 precursor protein of Alzheimer's disease A4 amyloid is encoded by 16 exons. Nucleic Acids Research 17:517-522.

Lenders MB, Peers MP, Tramu G, Delacourte A, Défossez A, Petit H, Mazzuca M (1989) Dystrophic peptidergic neurites in senile plaques of Alzheimer's disease hippocampus precedes formation of paired helical filaments. Brain Research 481:344-349.

Letenneur L, Dequae L, Jacqmin H, Nuissier J, Decamps A, Barberger-Gateau P, Commenges D, Dartigues JF (1993) Prévalence de la démence en Gironde. Revue Epidémiologique de Santé Publique 41(2):139-145.

Letenneur L, Commenges D, Dartigues JF, Barberger-Gateau P (1994) Incidence of dementia and Alzheimer's disease in elderly community residents of south-western France. International Journal of Epidemiology 23(6):1256-1261.

Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu C, Jondro PD, Scmidt SD, Wang K, Crowley AC, Fu YH, Guenette SY, Galas D, Nemens E, Wijsman EM, Bird TD, Schellenberg GD, Tanzi RE (1995) Candidate Gene for the Chromosome I Familial Alzheimer's Disease Locus. Science 269:973-977.

Lewis DA, Campbell MJ, Terry RD, Morrison JH (1987) Laminar and regional distributions of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in Alzheimer's disease: a quantitative study of visual and auditory cortices. Journal of Neuroscience 7:1799-1808.

Licastro F, Parnetti L, Morini MC, Davis LJ, Cucinotta D, Gaiti A, Senin U (1995) Acute phase reactant alpha 1-antichymotrypsin is increased in cerebrospinal fluid and serum of patients with probable Alzheimer's disease. Alzheimer's Disease and Associated Disorders 9(2):112-118.

Lichtenberg-Kraag B, Mandelkow EM, Biernat J, Steiner B, Schröter C, Gustke N, Meyer HE, Mandelkow E (1992) Phosphorylation-dependent epitopes of neurofilament antibodies on tau protein and relationship with Alzheimer tau. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 89:5384-5388.

Lieberman J, Schleissner, Tachiki KH, Kling AS (1995) Serum alpha 1-antichymotrypsin level as a marker for Alzheimer-type dementia. Neurobiology of aging 16(5):747-753.

Ling EA, Dahlström A, Polinsky RJ, Nee LE, Mcrae A (1992) Studies of activated microglial cells and macrophages using Alzheimer's disease cerebrospinal fluid in adult rats with experimentally induced lesions. Neuroscience 51:815-825.

Litvan I (1997) Methodological and research issues in the evaluation of biological diagnostic markers for Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging, Juin.

Loeffler DA, Juneau PL, Nguyen HU, Najman D, Pomara N, LeWitt PA (1997) Immunocytochemical detection of anti-hippocampal antibodies in Alzheimer's disease and normal cerebrospinal fluid. Neurochemical Research 22:209-214.

Lopez OL, Rabin BS, Huff FJ (1991) Serum autoantibodies in Alzheimer's disease. Acta Neurologica Scandinavica 84:441-444.

Lopez OL, Rabin BS, Huff FJ, Rezek D, Reinmuth OM (1992) Serum autoantibodies in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia and in nondemented control subjects. Stroke 23:1078-1083.

Lynch G, Bahr BA, Vanderklish PW (1991) Induction and stabilization of long-term potentiation. In Glutamate, Cell Death and Memory., Eds. Ascher, P. Choi, D.W. Christen, Y. Springer-Verlag, Berlin, 45-60.

Ma J, Yee A, Brewer HB Jr, Das S, Potter H (1994) Amyloid-associated proteins a1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer ß-protein into filaments. Nature 372:92-94.

Mak K, Yang F, Vinters HV, Frautschy SA, Cole GM (1994) Polyclonals to ß-amyloid (1-42) identify most plaque and vascular deposits in Alzheimer cortex, but not striatum. Brain Research 667, 138-142.

Manaka H, Kato T, Kurita K, Katagiri T, Shikama Y, Kujirai K, Kawana (1992) Marked Increase in Cerebrospinal Fluid Ubiquitin in Creutzfeldt-Jakob Disease. Neuroscience Letters 139:47-49.

Mann DMA (1988) Neuropathological and neurochemical aspects of Alzheimer's disease. In: Handbook of psychopharmacology. Vol. 20, publié par LL Iversen, SD Iversen et SH Snyder. Plenum Press, New York.

Mann DMA, Jones D, Prinja D, Purkiss MS (1990) The prevalence of amyloid (A4) protein deposits within the cerebral and cerebellar cortex in Down's syndrome and Alzheimer's disease. Acta Neuropathologica 80:318-327.

Marchalonis JJ, Schluter SF, Wilson L, Yocum DE, Boyer JT, Kay MM (1993) Natural human antibodies to synthetic peptide autoantigens: correlations with age and autoimmune disease. Gerontology 39:65-79.

Masliah E, Iimoto DS, Saitoh T, Hansen LA, Terry RD. (1990) Increased immunoreactivity of brain spectrin in Alzheimer's disease - A marker for synapse loss. Brain Research 531:36-44.

Masliah E, Hansen L, Albright T, Mallory M, Terry RD (1991a) Immunoelectron microscopic study of synaptic pathology in Alzheimer's disease. Acta Neuropathologica 81:428-433.

Masliah E, Hansen L, Mallory M, Albright T, Terry RD (1991b) Abnormal brain spectrin immunoreactivity in sprouting neurons in Alzheimer's disease. Neuroscience Letters 129:1-5.

Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multaup G, Mc Donald BL, Beyreuther K (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down sydrome. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 82:4245-4249.

Matsubara E, Hirai S, Amari M, Shoji M, Yamaguchi H, Okamoto K, Ishiguro Kn Harigaya Y, Wakabayashi K (1990) Alpha 1-antichymotrypsin as a possible biochemical marker for Alzheimer-type dementia. Annals of Neurology 28:561-567.

Matsuo ES, Shin RW, Billingsley ML, Van de Voorde A, O'Connor M, Trojanowski JQ, Lee VMY (1994) Biopsy derived-adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filaments tau. Neuron 13:989-1002.

Mattiace IA, Davies P, Dickson DW. (1990) Detection of HLA-DR on microglia in the human brain is a function of both clinical and technical factors. American Journal of Pathology 136:1101-1114.

Mattis S (1976) Mental status examination for organic mental syndrome in the elderly patient: In: Bellack L, Karasu TB: Geriatric psychiatry. New York, Grune and Stratton. 77-121.

Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE (1992) Beta amyloid peptide destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. Journal of Neuroscience 12:376-389.

Mawal-Dewan M, Henley J, Vandevoorde A, Trojanowski JQ, Lee VMY (1994) The phosphorylation state of tau in the developing rat brain is regulated by phosphoprotein phosphatases. Journal of Biological Chemistry 269:30981-30987.

McGeer PL, Itagoki S, Tago H, McGeer FG (1987) Reactive microglia in patients with senile dementia of Alzheimer's type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR. Neuroscience Letters 79:195-200.

McGeer PL, Akiyama H, Itagaki S, McGeer EG (1989) Immune system response in Alzheimer's disease. Canadian Journal of Neurological Science 16:516-527.

McGeer PL, McGeer EG, Rogers J, Sibley J (1990) Anti-inflammatory drugs and Alzheimer's disease. Lancet 335:1037.

McGeer PL, Kawamata T, Walker DG, Akiyama H, Tooyama I, McGeer EG (1993) Microglia in degenerative neurological disease. Glia 7:84-92.

McGeer PL, Mc Geer EG (1995) The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative disease. Brain Research Review 21:195-218.

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan E (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work group under the auspices of Department of Health and Human Service Task Force of Alzheimer's disease. Neurology 34:939-944.

Mcrae-Degueurce A, Booj S, Haglid K, Rosengren L, Karlsson JE, Karlsson I, Wallin A (1987) Antibodies in cerebrospinal fluid of some Alzheimer's disease patients recognize cholinergic neurons in the rat central nervous system. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:9214-9218.

Mcrae-Degueurce A, Haglid K, Rosengren L, Wallin A (1988) Antibodies recognizing cholinergic neurons and thyroglobuline are found in the cerebrospinal fluid of a subgroup of patients with Alzheimer's disease. Drug Development Research 15:153-163.

Mcrae A, Blennow K, Gottfries CG, Wallin A, Dahlström A (1990a) Brain-specific antibodies in the CSF of patients with Alzheimer's disease and other types of dementia. Biological markers in dementia of Alzheimer's type. 135-148.

Mcrae A, Blennow K, Wallin A, Fredman P, Gottfries CG, Dahlström A (1990b) The presence of antibrain antibodies in the CSF of some Alzheimer's disease patients - Correlation with CSF parameters. Early markers in Parkinson's and Alzheimer's Diseases 1:257-265.

Mcrae A, Dahlstrom A, Polinsky R, Ling EA (1993) Cerebrospinal fluid microglial antibodies - potential diagnostic markers for immune mechanisms in Alzheimer's disease. Behavioural Brain Research 57:225-234.

Mcrae A, Ling EA, Wigander A, Dahlström A (1996) Microglial cerebrospinal fluid antibodies - Significance for Alzheimer's disease. Molecular And Chemical Neuropathology 28:89-95.

Mecocci P, Parnetti L, Donato R, Santucci C, Santucci A, Cadini DF (1992) Serum autoantibodies against glial fibrillary acidic protein in brain aging and senile dementias. Brain Behavior and Immunity 6:286-292.

Mecocci P, Ekman R, Parnetti L, Senin U (1993) Antihistone and Anti-dsDNA autoantibodies in Alzheimer's disease and vascular dementia. Biological Psychiatry 34:380-385.

Mecocci P, Parnetti L, Romano G, Scarelli A, Chionne F, Cecchetti R, Polidori MC, Palumbo B, Cherubini A, Senin U (1995) Serum anti-GFAP and anti-S100 autoantibodies in brain aging, Alzheimer's disease and vascular dementia. Journal of Neuroimmunology 57:165-170.

Mercken M, Vandermeeren M, Lübke U, Six J, Boons J, Van de Voorde A Martin JJ, Gheuens J (1992) Monoclonal antibodies with selective specificity for Alzheimer tau are against phosphatase-sensitive epitopes. Acta Neuropathologica 84:265-272.

Merz PA, Wisniewski HM, Sommerville RA, Bobin SA, Masters CL, Iqbal K (1983) Ultrastructural morphology of amyloid fibrils from neuritic and amyloid plaques. Acta neuropathologica 60:113-125.

Michaelson DM, Chapman J, Bachar O, Korczyn AD, Wertman E (1989) Serum antibodies to cholinergic neurons in Alzheimer's disease. Alzheimer's Disease and Related Disorders 317:689-694.

Miller CCJ, Brion JP, Calvert R, Chin TK, Eagles PAM, Downes MJ, Flament-Durand J, Haugh M, Kahn J, Probst A, Ulrich J, Anderton BH (1986) Alzheimer's paired helical filaments share epitopes with neurofilament side arms. EMBO Journal 5:269-276.

Miller DL, Papayannopoulos IA, Styles J, Bobin SA, Lin YY, Biemann K, Iqbal K (1993) Peptide compositions of the cerebrovascular and senile plaque core amyloid deposits of alzheimer's disease. Archives of Biochemistry and Biophysic 301:41-52.

Mirra SS, Heyman A, Mckeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, Vogel FS, Hughes JP, Van Belle G, Berg L (1991) The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD), II: Standardization of the Neuropathological Assessment of Alzheimer's Disease. Neurology 41:479-486.

Mori H, Kondo J, Ihara Y (1987) Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. Science 235:1641-1644.

Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Yoshida H, Titani K, Ihara Y (1995) Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. Journal of Biological Chemistry 270:823-829.

Morris JC, Heyman A, Mohs RC, Hughes JP, Van Belle G, Fillenbaum G, Mellits ED, Clark C. (1989) The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part I. Clinical and neuropathological assessment of Alzheimer's disease. Neurology 41(4):479-486.

Motter R, Vigopelfrey C, Kholodenko D, Barbour R, Johnsonwood K, Galasko D, Chang L, Miller B, Clark C, Green R, Olson D, Southwick P, Wolfert R, Munroe B, Lieberburg I, Seubert P, Schenk D (1995) Reduction of beta-amyloid peptide (42), in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. Annals of Neurology 38:643-648.

Mountjoy CQ, Roth M, Evans NJR (1983) Cortical neuronal counts in normal elderly controls and demented patients. Neurobiology of Aging 4:1-11.

Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden, H, Lilius L, Winblad B, *et al.* (1992) A pathogenic mutation for probable alzheimer's disease in the APP gene at the N-Terminus of beta-Amyloid. Nature Genetics 1:345-347.

Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD (1991) A Mutation in the Amyloid Precursor Protein Associated with Hereditary Alzheimer's Disease. Science 253:97-98.

Nakamura K, Takeda M, Tanaka T, Tanaka J, Kato Y, Nishinuma K, Nishi (1992) Glial Fibrillary Acidic Protein stimulates proliferation and immunoglobulin synthesis of lymphocytes from Alzheimer's disease patients. Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology 14:141-149.

Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E, Ikeda K (1991) Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tanges in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeld-Jakob disease. Brain Research 541:163-166.

Namba Y, Tsuchiya H, Ikeda K (1992) Apolipoprotein B immunoreactivity in senile plaques and vascular amyloids and neurofibrillary tangles in the brains of patients with Alzheimer's disease. Neuroscience Letters 134:264-266.

Narindrasorasak S, Lowery D, Gonzalez-DeWhitt P, Poorman RA, Greenberg B, Kisilevsky R (1991) High affinity interactions between the Alzheimer's ß-amyloid precursor proteins and the basement membrane form of heparan sulfate proteoglycan. Journal of Biological Chemistry 266:12878-12883.

Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon DA (1986) Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein Tau and chromosomal location of genes for Tau and microtubule-associated protein 2. Molecular Brain Research 1:271-280.

Nukina N, Ihara Y (1986) One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. Journal of Biochemistry 99:1541-1544.

O'Farrell P (1975) High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. Journal of Biological Chemistry 250:4007-4021.

Oltersdorf T, Fritz LC, Schenk DB, Lieberburg I, Johnson-Wood KL, Beattie EC, Ward PJ, Blacher RW, Dovey HF, Sinha S (1989) The secreted form of the Alzheimer's amyloid precursor protein with the Kunitz domain is protease nexin-II. Nature 341:144-147.

Palmert MP, Podlisny MB, Witker DS, Oltersdorf T, Younkin LH, Selkoe DJ, Younkin S (1989) The amyloid protein precursor of Alzheimer disease has soluble derivatives found in human brain and cerebrospinal fluid. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 86:6338-6342.

Papasozomenos SC et Binder LI (1987) Phosphorylation determines two distincts species of Tau in the central nervous system. Cell Motility and Cytoskeleton 8:210-226.

Peltola JT, Hakkarainen K, Marttinen A, Soppi E, Molnar GK (1996) Circulating autoantibodies to a 240 kD fetal brain protein. Life Sciences 58:519-523.

Pentland B, Christie JE, Watson KC, Yap PL (1982) Immunological paramaters in Alzheimer's pre-senile dementia. Acta Psychiatrica Scandinavica 65:375-379.

Pérez-Tur J, Campion D, Martinez M, Brice A, Tardieu S, Hannequin D, Agid Y, Delacourte A, Clerget-Darpoux F, Chartier-Harlin and the French Alzheimer's disease collaborative study group (1995) Evidence for apolipoprotein E e4 association in early-onset Alzheimer's patients with late-onset relatives. American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics) 60:550-553.

Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell Jr. PC, Yamaoka LH, Hung WY, Alberts MJ, Walker AP, Bartlett RJ, Haynes CA, Welsh KA, Earl NL, Heyman A, Clark CM, Roses AD (1991) Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage. American Journal of Human Genetic 48:1034-1050.

Pericak-Vance MA, Bass MP, Yamaoka LH, Gaskell PC, Scott WK, Terwedow HA, Menold MM, Conneally PM, Small GW, Vance JM, Saunders AM, Roses AD, Haines JL (1997) Complete genomic screen in late-onset familial Alzheimer disease. Evidence for a new locus on chromosome 12. JAMA 278(15):1237-1241.

Permanne B, Buée L, David JP, Fallet-Bianco C, Dimenza C, Delacourte A (1995) Quantitation of Alzheimer's amyloid peptide and identification of related amyloid proteins by dot-blot immunoassay. Brain Research 685:154-162.

Peterson C, Vanderklish P, Seubert P, Cotman C, Lynch G (1991) Increased spectrin proteolysis in fibroblasts from aged and Alzheimer donors. Neuroscience Letters 121:239-243.

Pirttila T, Mehta PD, Frey H, Wisniewski M (1994) Alpha 1-antichymotrypsin and IL-1ß are not increased in CSF or serum in Alzheimer's disease. Neurobiology of aging 15(3):313-317.

Potter H, Abraham CR, Dressler D (1991) The Alzheimer amyloid components alpha-1-antichymotrypsin and ß-protein form a stable complex in vitro. Iqbal K, McLachlan DRC, Winblad B, Wisniewski HM, eds. Alzheimer's disease: basic mechanisms, diagnosis and therapeutic strategies. Chichester: Wiley and sons, 275-279.

Pouplard A (1983) Auto-anticorps circulants anticellules à prolactine de l'hypophyse et maladie d'Alzheimer. Review of Neurology (Paris) 139:187-191.

Price DL, Whitehouse PJ, Struble RG (1986) Alzheimer's disease. Annual Review of Medicine 36:349-356.

Price JL, Davis PB, Morris JC, and White DL (1991) The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging 12:295-312.

Prior R, Mönning U, Schreiter-Gasser U et al. (1991) Quantitative changes in the amyloid ß A4 precursor protein in Alzheimer cerebrospinal fluid. Neurosciences Letters 124:69-73.

Pullen RGL, Candy JM, Morris CM, Taylor G, Keith AB, Edwardson JA (1990) Gallium-67 as a potential marker for aluminium transport in rat brain: implication for Alzheimer's disease. Journal of Neurochemistry 55:251-259.

Quon D, Wang Y, Catalano R, Scardina JM, Murakami K, Cordell B (1991) Formation of beta-Amyloid Protein Deposits in Brains of Transgenic Mice. Nature 352:239-241.

Raven J (1981) Manuel des progressives matrices. Issy-les-Moulineaux, Editions scientifiques et psychologiques. 193 pages.

Reinikainen KJ, Soininen H, Riekkinen PJ (1990) Neurtransmitter changes in Alzheimer's disease: Implications in diagnostic and therapy. Journal of Neuroscience Research 27: 76-586.

Reisberg B, Ferris SH, De Leon MJ (1985) Senile dementia of the Alzheimer type: Diagnostic and differential diagnosis features with special reference to functional assessment staging. In: Traber J, Gispen WH: Senile dementia of Alzheimer type. Berlin, Springer. 18-37.

Riisoen H (1988) Reduced prealbumin (transthyretin) in CSF of severely demented patients with Alzheimer's disease. Acta Neurological Scandinavica. 78:455-459.

Robakis NK, Ramakrishna N, Wolfe G, Wisniewski HM (1987a) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:4190-4193.

Robakis NK, Wisniewski HM, Jenkins EC, Devine-Gage EA, Houck GE, Yao XL, Ramakrishna N, Wolfe G, Silverman WP, Brown WT (1987b) Chromosome 21q21 sublocalisation of gene encoding ß amyloid peptide in cerebral vessels and neuritic (senile) plaque of people with Alzheimer disease and Down syndrome. Lancet i:384-385.

Rogers J, Morrison JH (1985) Quantitative morphology and regional and laminar distribution of senile plaques in Alzheimer's disease. Journal of Neuroscience 5:2801-2808.

Rogers J, Kirby LC, Hempel-man SR, Berry DL, McGeer PL, Kazniak AW, Zalinsky J *et al.* (1993) Clinical trial of indomethocin in Alzheimer's disease. Neurology 43:1609-1611.

Rogers J (1994) Inflammation and Alzheimers Disease - Therapeutic Implications. CNS Drugs 1:241-244.

Rosen W (1983) Clinical and neuropsychological assessment of Alzheimer disease. In: Mayeux R, Rosen WG: The dementias. New York, Raven Press. 51-64.

Rosen WG, Mohs RC, Davies KL (1984) A new rating scalefor Alzheimer's disease. American Journal of Psychiatry. 141:1356-1364.

Roy BF, Sunderland T, Murphy DL, Morihisa JM (1988) Antibody for Nerve Growth Factor detected in patients with Alzheimer's disease. Annals New York Academy of Sciences 540:398-400.

Roy BF, Benkelfat C, Hill JL, Pierce PF, Dauphin MM, Kelly TM, Sunderland T, Weinberger DR, Breslin N. (1994) Serum antibody for somatostatin-14 and prodynorphin-209-240 in patients with obsessive-compulsive disorder, schizophrenia,

Alzheimer's disease, Multiple Sclerosis, and advanced HIV infection. Biological Psychiatry 35:335-344.

Rozemuller JM, Eikelenboom P, Stam FC (1989) Microglial cells around amyloid plaques in Alzheimer's disease express leucocyte adhesion molecules of the LFA-1. Neuroscience Letters 101:288-292.

Scheibel AB, Duong T, Tomiyasu U (1986) Microvascular changes in Alzheimer's disease. In The biological substrates of Alzheimer's disease. Scheibel, A.B. Wechsler, A.F. Brazier, M.A.B., Eds. UCLA Forum in Medical Sciences, 27:177-192. Academic Press. Orlando, FL.

Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonnycastle L, Weber JL, Alonso ME, Potter H, Heston LL, Martin GM (1992) Genetic linkage evidence for a familial alzheimer's disease locus on chromosome-14. Science 258:668-671.

Scheltens P, Vermersch P, Leys D (1993) Heterogeneity of alzheimer's disease. Review of Neurology 149:14-25.

Scheuner D (1995) Fibroblasts from carriers of familial AD linked to chromosome 14 show increased Aß production. Society of Neuroscience Abstracts 21:1500.

Schmidt ML, Lee VMY, Forman M, Chiu TS, Trojanowski JQ (1997) Monoclonal antibodies to a 100 kd protein reveal abundant Ab-negative plaques throughout gray matter of Alzheimer's disease brains. American Journal of Pathology 151(1):69-80.

Schott K, Wormstall H, Dietrich M, Klein R, Batra A (1996) Autoantibody reactivity in serum of patients with Alzheimer's disease and other age-related dementias. Psychiatry Research 59:251-254.

Schubert D, Cole G, Saitoh T, Oltersdorf T (1989a) Amyloid ß protein precursor is a mitogen. Biochemical Biophysical Research Community 162:83-88.

Schubert D, Jin LW, Saitoh T, Cole G (1989b) The regulation of amyloid ß protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. Neuron 3:689-694.

Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, Brodeur G, Goldstein M, Trent J (1983) Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and neuroblastoma tumor. Nature 305:245-248.

Scinto LF, Daffner KR, Dressler D, Ransil BI, Rentz D, Weintraub S, Mesulam M, Potter H (1994) A potential non-invasive neurobiological test for Alzheimer's disease. Science 266:1051-1054.

Selkoe DJ (1994) Normal and abnormal biology of the b-amyloid precursor protein. Annual Review of Neurosciences 17:489-517.

Sergeant N, Bussiere T, Vermersch P, Lejeune JP, Delacourte A (1995) Isoelectric point differentiates PHF-tau from biopsy-derived human brain tau proteins. Neuroreport 6:2217-2220.

Sergeant N, David JP, Goedert M, Jakes R, Vermersch P, Buée L, Lefranc D, Wattez A, Delacourte (1997) Two-dimensional characterisation of Paired Helical Filament-Tau from Alzheimer's disease: demonstration of an additional 74-kDa component and age related biochemical modifications. Journal of Neurochemistry 69:834-844.

Serot JM, Bene MC, Gobert B, Christmann D, Leheup B, Faure GC (1992) Antibodies to choroid plexus in senile dementia of Alzheimer's type. Journal of Clinical Pathology 45:781-783.

Serot JM, Bene MC, Faure GC (1995) Autoimmune alterations in choroid plexus basement membrane of some patients with Alzheimer's disease. Human Pathology 26:1169.

Seubert P (1996) Commentary: Diagnosing Alzheimer's disease: Tapping into new ideas. Alzheimer's disease Review 1:84-86

Shalit F, Sredni B, Stern L, Kott E, Huberman M (1994) Elevated interleukin-6 secretion levels by mononuclear cells of Alzheimer's patients. Neuroscience Letters 174:130-132.

Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Dasilva HAR, Haines JL, Pericakvance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St-GeorgeHyslop PH (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. Nature 375:754-760.

Shoji M, Golde TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, Mc Kay DM, Tintner R, Frangione B, Younkin SG (1992) Production of the alzheimer amyloid-beta protein by normal proteolytic processing. Science 258:126-129.

Signoret JL, Hauw JJ (1991) Maladie d'Alzheimer et autres démences. Edition Flammarion-Médecine-Sciences.

Singh VK, Fudenberg HH (1986) Detection of brain autoantibodies in the serum of patients with Alzheimer's disease but not Down's syndrome. Immunological Letters 12:277-280.

Singh VK, Fudenberg HH (1989) Increase of immunoglobulin G3 subclass is related to brain autoantibody in Alzheimer's disease but not in down's syndrome. Autoimmunity 3:95-101.

Singh VK, Yang YY, Singh EA (1992) Immunoblot detection of antibodies to myelin basic protein in Alzheimer's disease patients. Neuroscience Letters 147:25-28.

Singh VK (1994) Studies of neuroimmune markers in Alzheimer's disease. Molecular Neurobiology 9:73-81.

Singh VK (1997) Neuroautoimmunity: pathogenic implication for Alzheimer's disease. Gerontology 43:79-94.

Sinha S, Knops J, Esch F, Moyer ED, Oltersdorf T (1991) Conversion of the Alzheimer's ß-amyloid precursor protein (APP) Kunitz domain into a potent human neutrophil elastase inhibitor. Journal of Biological Chemistry 266:21011-21013.

Sisodia SS, Koo EH, Beyreuther K, Unterbeck A, Price DL (1990) Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. Science 248:492-495.

Smyth MD, Cribbs DH, Tenner AJ, Dick M, Kesslak JP, Cotman CW (1994) Decreased levels of C1q in cerebrospinal fluid of living Alzheimer patients correlate with disease state. Neurobiology of Aging 15:609-614.

Snow AD, Mar H, Nochlin D, Kimata K, Kato M, Suzuki S, Hassell J, Wight TN (1988) The presence of heparan sulfate proteoglycan in the neuritic plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer's disease. American Journal of Pathology 133:456-463.

Snow AD, Mar H, Nochlin D, Sekiguchi RT, Kimata K, Koike Y, Wight TN (1990) Early accumulation of heparan sulfate in neurons and in the ß-amyloid protein-containing lesions of Alzheimer's disease and Down's syndrome. American Journal of Pathology 137:1253-1270.

Snow A, Malouf AT (1993) *In vitro* and *in vivo* models to unravel the potential roles of ß/A4 in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Hippocampus. Eds, Nitsch R and Ohm TG. 3:257-268.

Soininen H, Heinonen O, Hallikainen M, Hänninen T, Koivisto K, Syrjänen S, Talasniemi S, Riekkinen PJ (1993) Circulating immune complexes in sera from patients with Alzheimer's disease and subjects with age-associated memory impairment. Journal of neural transmission 6:179-188.

Sorbi S, Nacmias B, Forleo P, Piacentini S, Sherrington R, Rogaev E, Hyslop PSG, Amaducci L (1995) Missense mutation of S182 gene in Italian families with early-onset Alzheimer's disease. Lancet 346:439-440.

Soussan L, Tchernakov K, Bacharlavi O, Yuvan T, Wertman E, Michaelson DM (1994) Antibodies to different isoforms of the heavy neurofilament protein (NF-H) in normal aging and Alzheimer's disease. Molecular Neurobiology 9:83-91.

Southwick PC, Yamagata SK, Echols CL, Higson GJ, Neynaber SA, Parson RE, Munroe WA (1996) Assessment of amyloid beta protein in cerebrospinal fluid as an aid in the diagnosis of Alzheimer's disease. Journal of Neurochemistry 66:259-265.

Stefansson K, Marton LS, Dieperink ME (1985) Circulating autoantibodies to the 200,000-Dalton protein of neurofilaments in the serum of healthy individuals. Science 228:1117-1119.

Sternberger N H, Sternberger L A, Ulrich J (1985) Aberrant neurofilament phosphorylation in Alzheimer's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 82:4274-4276.

Streit WJ and Kincaid-Colton CA (1995) The brain's immun system. Scientific American November:54-61.

Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD (1993a) Apolipoprotein E: high-avidity binding to ß-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. Proceedings of the National Academy of Sciences 90:1977-1981.

Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong L-M, Salvesen GS, Pericak-Vance M, Schmechel D, Saunders AM, Goldgaber D, Roses AD (1993b) Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid ß peptide: Isoform-specific effects and implication for late-onset Alzheimer disease. Proceedings of the National Academy of Sciences 90:8098-8102.

Sugiura M, Yokoi Y, Maruyama S, Ishido T, Tokunaga Y, Sasaki K (1989) Detection of anti-cerebral autoantibodies in schizophrenia and Alzheimer's disease. Journal of Clinical Laboratory Immunology 28:1-3.

Tamaoka A, Odaka A, Ishibashi Y, Usami M, Sahara N, Suzuki N, Nukina N, Mizusawa H, Shoji S, Kanazawa I, Mori H (1994) APP717 missense mutation affects the ratio of amyloid beta protein species (A beta 1-42/43 and A beta 1-40) in familial Alzheimer's disease brain. Journal oj Biological Chemistry 269:32721-32724.

Tamaoka A, Fukushima T, Sawamura N, Ishikawa K, Oguni E, Komatsuzaki Y, Shoji S (1996) Amyloid beta protein in plasma from patients with sporadic Alzheimer's disease.Journal of Neurological Science 141:65-68.

Tanaka J, Murakoshi K, Takeda M, Kato Y, Tada K, Hariguchi S, Nishimura T (1988) A high level of anti-GFAP autoantibody in the serum of patients with Alzheimer's disease. Biomedical Research 9(3):209-216.

Tanaka J, Nakamura K, Takeda M, Tada K, Suzuki H, Morita H, Okado T, Hariguchi S, Nishimur (1989) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for human autoantibody to

Glial Fibrillary Acidic Protein - Higher titer of the antibody is detected in serum of patients with Alzheimer's disease. Acta Neurologica Scandinavica 80:554-560.

Tanaka S, Shiojiri S, Takahashi Y, Kitaguichi N, Kimura J, Nakamura S, Ueda K (1991) Differential expression of three types of amyloid-ß protein precursor mRNA in the brain and nonneural tissues. In Iqbal K, McLachlan DRC, Winblad B, Wisniewski HM (eds). Alzheimer's disease: Basic mechanisms, diagnosis and therapeutic strategies. Chichester: Wiley & Sons, 331:528-530.

Tchernakov K, Soussan L, Hassinbaer S, Wertman E, Michaelson DM (1992) Alzheimer's disease and Down's syndrome antibodies bind to the heavy neurofilament protein of cholinergic neurons. Research in Immunology 143:671-675.

Terry RD, Peck A, De Teresa R, Schechter R, Horoupian DS (1981) Some morphometric aspects of the brain in senile dementia of the Alzheimer type. Annals of Neurology 10:184-192.

Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Kaztman R (1991) Physical Basis of Cognitive Alterations in Alzheimer's Disease: Synapse Loss Is the Major Correlate of Cognitive Impairment. Annals of Neurology 30:572-580.

Tierney MC, Fisher RH, Lewis AJ, Zorzitto ML, Snow WG, Reid DW, Nieuwstraten P (1988) Neurology. 38:359-364.

Toh BH, Gibbs CJ, Gajdusek DC, Goudsmit J, Dahl D (1985) The 200- and 150-kDa neurofilament proteins react with IgG autoantibodies from patients with Kuru, Creutzfeldt-Jakob disease and other neurological diseases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 82:3485-3489.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 76:4350-4354.

Treolar AJ, Assin M, MacDonald AJ (1996) Pupillary response to tropicamide as a marker for Alzheimer's disease. British Journal Clinical Pharmacology 41(3):256-257.

Vaitukaitis J, Robbins JB, Nieschlag V, Ross GT (1971) A method for producing antisera with small doses of immunogen. Journal of Clinical Endocrinology Metabolic. 33:988-991.

Van Broeckhoven C (1995) Molecular genetics of Alzheimer disease : identification of genes and gene mutations. European Neurology 35:8-19.

Van Nostrand WE, Wagner SL, Suzuki M, Choi BH, Farrow JS, Geddes JW, Cotman CW, Cunningham DD (1989) Protease nexin II, a potent antichymotrypsin, shows identity to amyloid ß-protein precursor. Nature 341:546-549.

Vandenabeele P, Fliers W. (1991) Is amyloidogenesis in Alzheimer's disease due to an IL-1/IL6-mediated acute phase response in the brain. Immunology Today 12:217-219.

Vazquez J, Fernandezshaw C, Marina A, Haas C, Cacabelos R, Valdivieso F (1996) Antibodies to human brain spectrin in Alzheimer's disease. Journal of Neuroimmunology 68:39-44.

Vermersch P, Frigard B, Delacourte A (1992) Mapping of neurofibrillary degeneration in alzheimer's disease: evaluation of heterogeneity using the quantification of abnormal tau proteins. Acta Neuropathologica 85:48-54.

Vermersch P, Bordet R, Ledoze F, Ruchoux MM, Chapon F, Thomas P, Destée A, Lechevallier B, Delacourte A (1995) Mise en évidence d'un profil électrophorétique particulier des protéines tau pathologiques dans les cas de démences fronto-temporales. Comptes Rendus Academie des Sciences Paris 318:439-445.

Vickers JC, Riederer BM, Marugg RA, Buée-scherrer V, Buée L, Delacourte A, Morrison JH (1994) Alterations in neurofilament protein immunoreactivity in human hippocampal neurons related to normal aging and Alzheimer's disease. Neuroscience 62:1-13.

Wang GP, Iqbal K, Bucht G, Winblad B, Wisniewski HM, Grundke-Iqbal I (1991) Alzheimer's Disease - Paired Helical Filament Immunoreactivity in Cerebrospinal Fluid. Acta Neuropathologica 82:6-12.

Weber F, Meinl E, Aloisi F, Nevinny-Stickel C, Albert E, Wekerle H; Hohlfeld R. (1994) Human astrocytes are only partially competent antigen presenting cells. Possible implications for lesion development in multiple sclerosis. Brain 117:59-69.

Wechsler D (1956) La mesure de l'intelligence de l'adulte. Paris, PUF, 292 pages.

Wechsler D (1969) Manuel de l'échelle clinique de mémoire. Paris, Centre de Psychologie Appliquées. 35 pages.

Wechsler D, Stone CP (1973) Manual: Wechsler memory scale. New York, Psychological Corp.

Wechsler D (1989) Echelle d'intelligence de Wechsler pour adultes, forme révisée (WAIS-R). Paris, Centre de psychologie appliquée 156 pages.

Weigle WO (1989) Effects of aging on the immune system. Hospital Practice.December.15.

Wilcock GK, Esiri MM (1982) Plaques, tangles and dementia, a qualitative study. Journal of Neurological Science 56:343-356.

Wischik CM, Novak HC, Thogersen HC, Edwards PC, Runswick MJ, Jakes R, Walker JE (1988a) Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical

filament of Alzheimer's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 85:4506-4510.

Wischik CM, Novak HC, Edwards PC, Klug A, Tichelaar W, Crowther RA (1988b) Structural alteration of the core of the paired helical filament of Alzheimer's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 85:4884-4888.

Wisniewski HM and Kozlowski PB (1982) Evidence for blood-brain barrier changes in Senile Dementia of the Alzheimer Type (SDAT). Annals New York Academy of Sciences 119-129

Wisniewski HM, Barcikowska M, Kida E (1991) Phagocytosis of ß/A4 amyloid fibrils of the neuritic neocortical plaques. Acta Neuropathologica 81:588-590.

Yang F, Mak K, Vinters HV, Frautschy SA, Cole GM (1994) Monoclonal antibody to the C-terminus of ß-amyloid. NeuroReport 5:2117-2120.

Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML, Neve RL (1989) Neurotoxicity of a Fragment of the Amyloid Precursor Associated with Alzheimer's Disease. Science 245:417-420.

Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA (1990) Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid ß protein: reversal by tachykinin neuropeptides. Science 250:279-282.

Yankner BA, Busciglio J (1992) Is ß amyloid neurotoxicity the cause of Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging 13:S82.

Younki SG (1995) Evidence that A beta 42 is the real culprit in Alzheimer's disease. Annals of Neurology 37:287-288.

Zannis VI, Breslow JL (1981) Human very low density lipoprotein apolipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and posttranslational modification. Biochemistry 20:1033-1041.

Zazzo R (1969) Manuel pour l'examen psychologique de l'enfant. Neuchatel, Delachaux et Niestle.

ABRÉVIATIONS

ABRÉVIATIONS

AchE	Acétylcholinestérase
ApoE	Apolipoprotéine E
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CJ	Creutzfeld Jacob
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes
DNF	Dégénérescence neurofibrillaire
DO	Densité optique
DTF	Démence de type frontale
DV	Démence vasculaire
EEG	Electroencéphalogramme
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
HPN	Hydrocéphalie à pression normale
HSPG	Héparane sulfate protéoglycannes
IFN-γ	Interféron gamma
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
LB	Lymphocyte B
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LT	Lymphocyte T
MA	Maladie d'Alzheimer
MMS	Mini Mental State
MP	Maladie de Parkinson
NF	Neurofilament
NGF	Nerve growth factor
PBM	Protéine basique de la myéline
pI	Point isoélectrique
PS	Plaque sénile
PSP	Paralysie supranucléaire progressive
RIA	Radioimmuno Assay
SLA	Sclérose latérale amyotrophique
SNC	Système nerveux central
TG	Thyroglobuline
THA	Tétrahydroacridine (Tacrine)
TPM	Témoin de poids moléculaire (masse moléculaire)

ANNEXES

ANNEXE 1

MINI MENTAL TEST

INSTRUCTIONS POUR LE PASSAGE DU TEST

ORIENTATION

1 à 5 : demander la date,
ensuite demander spécialement ce qui a été omis,
par exemple : « Pouvez-vous aussi me dire en quelle saison nous sommes ?
(1 point par bonne réponse)

6 à 10 : demander de la façon suivante : « Pouvez-vous me dire le nom de cet hôpital ? »
(la ville, le pays...) (1 point par bonne réponse)

ENREGISTREMENT DES DONNÉES

11 à 13 : Demander au patient s'il accepte de tester sa mémoire. Nommer alors 3 objets différents clairement et lentement (6 sec./objet). Après avoir cité les 3 noms, demandez-lui de répéter. Cette première répétition détermine son score. Continuer à lui citer les 3 objets jusqu'à ce qu'il puisse tous les répéter, effectuer 6 essais. S'il ne peut réellement pas apprendre les 3 noms, le test « mémoire rappel » ne peut être fait.

ATTENTION ET CALCUL MENTAL

14 à 18 : Demander au patient de soustraire le nombre de 7 de 100, et de soustraire à nouveau 7 du résultat obtenu et ainsi de suite 5 fois (soit 93, 86, 79, 72 et 65). Chiffrer le nombre total de bonnes réponses. Si le patient ne veut pas ou ne peut pas réaliser cette tâche, lui demander d'épeler le mot « rouge » à *l'envers*. Le score est déterminé par le nombre de lettres présentes à la bonne place (ex. EGUOR = 5 points, EGOUR = 3 points).

MÉMOIRE — RAPPEL

Redemander au sujet de vous citer les 3 objets (citron, clé, ballon) déjà appris (1 point par réponse correcte).

LANGAGE

22-23-24 : Montrer au patient une montre et lui demander ce que c'est, recommencer avec un crayon.
Demander au patient de répéter la phrase « pas de si ni de mais » après vous.
Ne permettre qu'un seul essai.

25-26-27 : Donner au patient une feuille de papier blanc, et lui donner l'ordre.
Compter 1 point pour chaque partie exécutée correctement.

28 : Sur une feuille de papier écrire la phrase « Fermez vos yeux » en lettres assez grandes pour que le patient lise facilement. Demandez-lui de lire et de faire ce qui est écrit. Compter 1 point s'il ferme effectivement ses yeux.

29 : Donner au patient une feuille de papier blanc et demandez-lui d'écrire une phrase. Ne pas dicter de phrase, elle doit être écrite spontanément. Elle doit posséder un sujet et un verbe et être sensée. L'orthographe et la ponctuation ne sont pas obligatoires — 1 point —.

ACTIVITÉ MOTRICE

30 : Sur une feuille de papier vierge dessiner 2 pentagones d'au moins 2 cm de côté qui se superposent. Demander au patient de recopier ce dessin exactement.
Les 10 angles doivent être présents et 2 angles doivent se croiser pour compter 1 point. Ne pas tenir compte d'un tremblement ou d'une rotation du dessin.

Plus le score est bas, plus le déficit est prononcé.

* *MINI MENTAL TEST — Folstein et coll. (1975), traduit par L. Israël.*

* *M.F. Folstein, S.E. Folstein, P.R. Mc Hugh : « Mini-Mental Test ». A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician, J. Psychiat. Res., 1975, vol. 12, 189-198.*

ANNEXE 2

CRITÈRES DIAGNOSTIQUES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

Diagnostic : « maladie d'Alzheimer *probable* »

I. Les critères du diagnostic clinique de « MA probable » sont les suivants :
- — démence diagnostiquée cliniquement et étayée par le Mini-mental test de Folstein, l'échelle de démence de Blessed ou d'autres examens identiques, et confirmée par des tests neuropsychologiques
- — déficit dans au moins 2 fonctions cognitives
- — altération progressive de la mémoire et d'autres fonctions cognitives
- — pas de trouble de la conscience
- — survenue entre 40 et 90 ans, le plus souvent après 65 ans
- — absence d'affection générale ou cérébrale qui, directement ou non, pourraient être responsables des déficits progressifs de la mémoire et des fonctions cognitives.

II. Le diagnostic de « MA probable » s'appuie sur :
- — une détérioration progressive des fonctions cognitives spécifiques comme le langage (aphasie), l'habileté motrice (apraxie) et la reconnaissance (agnosie)
- — diminution des activités de la vie quotidienne et altérations des modèles de comportement
- — troubles semblables dans les antécédents familiaux (surtout s'ils ont été confirmés par un examen neuropathologique)
- — examens de laboratoire :
  - ponction lombaire normale
  - EEG normal ou variations aspécifiques telles qu'une augmentation des ondes lentes
  - atrophie cérébrale progressive vérifiée par scanners successifs

III. D'autres caractéristiques cliniques *compatibles* avec un diagnostic de « MA probable » (après exclusion des autres causes de démences) sont :
- — plateau dans l'évolution de la maladie :
- — symptômes associés à type de dépression, insomnie, incontinence, hallucination, brusques manifestations verbales, émotionnelles, physiques, désordres sexuels, perte de poids,
- — troubles neurologiques surtout aux stades plus avancés de la maladie avec signes moteurs, hypertonie, myoclonies, troubles de la marche,
- — comas brutaux aux stades avancés de la maladie
- — scanner normal pour l'âge

IV. Caractéristiques rendant *aléatoire* le diagnostic de « maladie d'Alzheimer probable » :
- — survenue brusque
- — apparition de signes neurologiques focaux tels qu'hémiparésie, déficit sensitif, diminution du champ visuel, troubles de la coordination survenant précocément dans le cours de l'affection
- — attaque ou trouble de la marche à la phase initiale de la maladie

Diagnostic : « maladie d'Alzheimer *possible* »

V. Le diagnostic « MA possible » peut être fait sur la base d'un syndrome démentiel en l'absence d'autres étiologies reconnues de démence (maladie neurologique, psychiatrique ou générale) et en présence de formes atypiques quant à la survenue, le tableau clinique ou l'évolution

Peut être fait en présence d'une affection générale ou cérébrale suffisante pour être cause de démence mais qu'on ne considère pas être *LA* cause de la démence

Le diagnostic doit être utilisé au cours des études devant un déficit cognitif isolé sévère et graduellement progressif en l'absence d'autre cause identifiable.

Diagnostic : maladie d'Alzheimer *confirmée*

VI. La démence possède les caractéristiques cliniques d'une « maladie d'Alzheimer probable »

ET
la preuve histopathologique a été obtenue par biopsie ou autopsie.

VII. La classification de la maladie d'Alzheimer à des fins de recherche devra préciser les caractères qui peuvent différencier des sous-classes de la maladie comme :
- caractère familial
- survenue avant 65 ans
- présence de trisomie 21
- associations pathologiques notables (maladie de Parkinson...)

G. Mc KHANN, Neurology, 1984, vol. 34, 939-944.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION **5**

GÉNÉRALITÉS **9**

I. DIAGNOSTIC CLINIQUE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER 9

I.1. Les signes cliniques *10*

I.2. Progression et évaluation des signes cliniques *14*

I.3. Le diagnostic de la maladie d'Alzheimer *15*

II. DIAGNOSTIC NEUROPATHOLOGIQUE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER 21

II.1. Les lésions neuropathologiques *21*

II.2. L'atrophie cérébrale *25*

II.3. La réaction gliale *26*

II.4. Anomalies vasculaires *27*

II.5. Critères diagnostiques neuropathologiques *27*

II.6. Conclusion *29*

III. DIAGNOSTIC BIOCHIMIQUE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER 31

III.1. La dégénéréscence neurofibrillaire *31*

III.2. Les dépôts amyloïdes *36*

III.3. Altération des neurotransmetteurs *42*

III.4. Etablissement de critères biochimiques *46*

III.4. Conclusion *47*

IV. DIAGNOSTIC GENETIQUE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER 48

IV.1. Les facteurs de risques *48*

IV.2. Formes familiales autosomiques dominantes *49*

IV.3. Conclusion *51*

V. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER 52

V.1. Marqueurs en rapport avec la dégénérescence neurofibrillaire *52*

V.2. Marqueurs en rapport avec les dépôts amyloïdes *53*

V.3. Marqueurs en rapport avec des déficits neurochimiques *55*

V.4. Autres marqueurs *56*

V.5. Conclusion *56*

VI. APPROCHE IMMUNOLOGIQUE DU DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER 57

VI.1. Le système immunitaire et le systeme nerveux central *57*

VI.2. La réponse auto-immune de la Maladie d'Alzheimer *65*

VI.3. La réponse inflammatoire de la maladie d'Alzheimer *82*

VI.4. Hypothèse de la boucle autotoxique selon McGeer et McGeer, 1995 ..... *92*

VI.5. Les traitements anti-inflammatoires *93*

VI.6. Conclusion *94*

VII. LA MALADIE D'ALZHEIMER ET LE VIEILLISSEMENT 95

VIII. HÉTÉROGÉNÉITÉ DE LA MALADIE D'ALZHEIMER 96

IX. APPROCHES THÉRAPEUTIQUES 98

IX.1. Les modèles de la maladie d'Alzheimer *98*

IX.2. Traitement *99*

OBJECTIFS 102

MATÉRIELS ET MÉTHODES 104

I. MATÉRIELS 104

I.1. Description des populations étudiées *104*

I.2. Prélèvement et conservation des sérums *113*

I.3. Matériel autopsique *114*

I.4. Sondes immunologiques *114*

I.5. Témoins de masse moléculaire *117*

I.6. Matériel informatique *117*

II. MÉTHODES 117

II.1. Analyse biochimique *117*

II.2. Quantification par densitométrie *124*

II.3. Immunohistochimie *125*

II.4. Analyse statistique *126*

RESULTATS - DISCUSSION **129**

I. MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE DE DÉTECTION DES AUTO-ANTICORPS SERIQUES 130

I.1. Adaptation et optimisation de la technique des immuno-empreintes *130*

I.2. Reproductibilité de la technique *134*

II. CARACTERISTIQUES DES PROFILS D'AUTO-ANTICORPS 140

II.1. Profil propre à chaque individu *140*

II.2. Production d'auto-anticorps au cours du temps *140*

II.3. Conclusion *141*

III. LES AUTO-ANTICORPS PRODUITS AU COURS DE LA MALADIE D'ALZHEIMER 142

III.1. Etude qualitative *142*

III.2. Étude quantitative *151*

III.3. Validation des modèles *157*

III.4. Conclusion générale *169*

IV. LES AUTO-ANTICORPS PRODUITS AU COURS DU VIEILLISSEMENT CEREBRAL NORMAL 171

IV.1. Description des échantillons *171*

IV.2. Comparaison des deux populations *173*

IV.3. Recueil des données *173*

IV.4. Recherche des auto-anticorps liés à l'âge *174*

IV.5. Conclusion *177*

V. COMPARAISON DES PROFILS IMMUNOLOGIQUES DES SUJETS MALADES RÉPONDEURS ET NON RÉPONDEURS À LA TACRINE 179

V.1. Description de l'échantillon *179*

V.2. Recueil des données *180*

V.3. Analyse générale de résultats *181*

V.4. Mise au point d'un modèle mathématique *182*

V.5. Conclusion *182*

VI. CARACTÉRISATION DE CERTAINS AUTO-ANTICORPS 184

VI.1. Nature des auto-anticorps *184*

VI.2. Les auto-anticorps anti-P140 ..... *184*

VI.2. Les autres auto-anticorps *190*

VI.3. Conclusion *191*

CONCLUSION **192**

PERSPECTIVES **195**

BIBLIOGRAPHIE **198**

UNIVERSITÉ DES SC. ET TECHN. BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE LILLE