

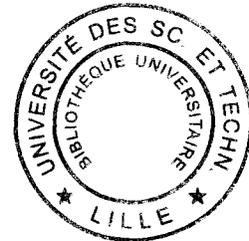
50376
1999
417

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE I

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

EN SCIENCES DE LA VIE

ET DE LA SANTE



Présentée par

Fabienne WAVRANT-DE VRIEZE

IDENTIFICATION DE NOUVEAUX LOCUS

DANS LES FORMES TARDIVES

DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

Directeur de thèse: Marie-Christine CHARTIER-HARLIN

Composition du Jury:

*Madame le Professeur Geneviève Spik,
Monsieur le Docteur Luc Buée,
Monsieur le Professeur Mike Owen,
Madame le Docteur Marie-Christine Chartier-Harlin,
Monsieur le Professeur John Hardy,*

*Présidente du Jury
Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur*

Date de soutenance: le 16 Novembre 1999

A mon père, à ma mère,

Et mon ami Jordi

*Cette thèse est le témoignage
de l'influence considérable que vous avez eue dans ma vie.*

Je dédie aussi cette thèse aux familles des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, ainsi qu'aux personnes participant aux études scientifiques, pour leur généreuse et indispensable coopération dans le seul but de faire avancer la recherche.

Finalement, je dédie cette thèse à toutes les personnes qui ont participé à la réalisation de ce rêve: être chercheur en Sciences et ainsi à me construire un futur attirant et prometteur.

Identification

de nouveaux locus

dans les formes tardives

de la maladie d'Alzheimer.

RESUME

La maladie d'Alzheimer est la forme la plus courante de démence observée chez les personnes âgées. C'est une maladie multifactorielle dans laquelle des facteurs génétiques, comme le gène *ApoE*, interviennent sur le risque de développer la pathologie.

Afin d'identifier d'autres locus de susceptibilité, nous avons étudié les gènes candidats *LRP*, *A2M*, *PS-I*, *PS-II* et *APP* par des études d'association en population cas-témoins, mais également par des études de liaison génétique sur une population de paires de germains. Nos résultats mettent en évidence une association des polymorphismes présents au niveau des gènes *LRP*, *A2M* et *APP* avec les formes tardives de la maladie. Le gène *LRP* pourrait être un facteur de susceptibilité des formes sporadiques tardives alors que les gènes *A2M* et *APP* seraient peut-être impliqués dans certaines formes familiales tardives. En complément, nous avons entrepris une recherche génomique sur une population de cas familiaux à début tardif, ce qui nous a permis d'appuyer nos premiers résultats, mais aussi d'identifier de nouvelles régions chromosomiques potentiellement impliquées dans le développement de la maladie d'Alzheimer (chromosomes 1, 2, 5, 6, 9, 10, 12, 13, 14, 19, 21 et X). Ces régions contiennent des gènes candidats.

Ce travail a été réalisé

sous la tutelle de Madame le Docteur Marie-Christine Chartier-Harlin,

dans l'Unité INSERM 508, Epidémiologie des maladies chroniques,

de l'Institut Pasteur de Lille.

Unité dirigée par Monsieur le Professeur Philippe Amouyel.

Une partie de ces travaux a aussi été réalisée

en collaboration avec Monsieur le Professeur John Hardy

dans le "Laboratory of Neurogenetics"

à la "Mayo Clinic of Jacksonville" (FL).

J'exprime tous mes remerciements à,

Madame le Professeur Geneviève Spik.

C'est un grand honneur pour moi que vous ayez accepté de présider ce Jury afin de juger mon travail de thèse.

Monsieur le Docteur Luc Buée.

Je vous suis très reconnaissante de la bienveillance et de la sympathie que vous m'avez toujours témoignées, tout d'abord en tant que collègue de travail dans le service du Docteur André Delacourte, puis en tant qu'enseignant lors de mon cursus universitaire, mais aussi en tant qu'ami durant ces dernières années d'études. Votre venue en tant que rapporteur m'honore tout particulièrement.

Monsieur le Professeur Mike Owen.

Je vous remercie de m'avoir généreusement accueillie dans votre laboratoire lors de notre collaboration. Vous m'avez ainsi aidée à élargir mes connaissances scientifiques et à progresser rapidement dans la réalisation de mes travaux personnels. Votre présence en tant que rapporteur est un privilège.

Madame le Docteur Marie-Christine Chartier-Harlin.

Vous m'avez soutenue dans la poursuite de mes études en acceptant d'être mon tuteur de thèse et en me dirigeant tout au long de ces années. Vous m'avez offert ce privilège de découvrir le domaine de la recherche scientifique et ouverte à de nombreuses opportunités. Pour cela, je vous en remercie sincèrement.

Monsieur le Professeur John Hardy.

Je vous remercie tout particulièrement de m'avoir accueillie dans votre laboratoire dans le cadre de notre collaboration; vous avez ainsi permis la réalisation d'une grande partie de ces travaux de thèse. La confiance que vous m'avez accordée en m'accueillant dans votre équipe est pour moi un grand honneur. Vous avez su, en me dirigeant, me faire partager votre dynamisme dans un domaine où la compétition internationale est farouche.

Monsieur le Professeur Philippe Amouyel. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude pour m'avoir acceptée au sein de votre équipe sympathique et dynamique. Je vous suis très reconnaissante de la confiance que vous m'avez témoignée.

Par-dessus tout, je tiens particulièrement à remercier Monsieur le Docteur Jordi Pérez-Tur de ses conseils, son soutien et sa confiance. J'ai appris énormément en travaillant à tes côtés: que ce soit la rigueur du travail, la persévérance mais aussi la beauté de la recherche scientifique. Surtout, je te remercie de l'amitié que tu m'as toujours témoignée quelles que soient les circonstances. Durant ces difficiles dernières années d'études, tu m'as fait apprécier le domaine de la recherche scientifique et tu es toujours resté à mes côtés pour m'épauler et me diriger. Tu resteras pour toujours mon ami.

J'exprime également tous mes remerciements à Madame le Professeur Alison Goate et à Monsieur le Professeur Fred Van Leuven pour leur collaboration dans ces études génétiques; ainsi que Messieurs les Professeurs Mike Hutton et Dennis Dickson, pour leur aide, leurs encouragements et leurs précieux conseils, sans oublier leur bonne humeur.

Merci aussi à chacun des Docteurs en Médecine qui participent à nos travaux de Recherche en prenant la patience de sélectionner et de consulter des sujets potentiels, afin de nous obtenir les nombreuses informations et précieux échantillons biologiques qui sont indispensables pour la réalisation de nos études .

Je voudrais également remercier Jean-Charles Lambert et tous les membres de l'Unité INSERM 508, pour le soutien et la gentillesse qu'ils m'ont témoignés; ainsi que les membres du laboratoire du Professeur John Hardy, pour leur formidable accueil et amitié qu'ils m'ont offerts lors de mes "vacances" en Floride.

Merci aussi à Géraldine Plays pour être restée mon amie à travers toutes ces années d'université, ainsi que pour m'avoir aidée en toutes circonstances (et aussi pour avoir supporté toutes mes questions lors des révisions pour les examens). Ton amitié sera toujours très importante pour moi.

Je n'oublie pas mon oncle Didier De Vrièze qui a toujours eu une petite note à m'envoyer pour me montrer son soutien lors de mes voyages en Floride. Tu m'as ainsi souvent rendu le sourire.

Que cette thèse soit le témoignage de ma reconnaissance et de ma gratitude envers toutes ces personnes ainsi que celles qui sont intervenues dans ma vie, d'une façon ou d'une autre pour me soutenir dans ma vie quotidienne ou pour m'épauler dans mon orientation professionnelle et m'aider ainsi à construire mon avenir. La liste ne serait que trop longue, j'espère donc que ces personnes réalisent à quel point leur passage dans ma vie a été significatif et que leur gentillesse d'action n'est pas restée sans répercussion. Leurs noms resteront toujours imprimés dans ma mémoire.

LISTE DES PUBLICATIONS

Ce travail de thèse a donné lieu aux publications et communications suivantes

PUBLICATIONS AVEC COMITE DE LECTURE

◆ **Wavrant-De Vrièze F**, Pérez-Tur J, Frigard B, Amouyel P, Chartier-Harlin M-C and Hardy J (1997) Association between the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) and Alzheimer's Disease, *Neuroscience Letters*, 227:68-70.

◆ Lambert J-C, **Wavrant-De Vrièze F**, Amouyel P, Chartier-Harlin M-C (1998) Association at LRP gene locus with sporadic late-onset Alzheimer's disease, *The Lancet*, 351(9118): 1787-1788.

◆ Wu B, Holmans P, **Wavrant-De Vrièze F**, Shears S, Kehoe P, Crook R, Booth J, Williams N, Pérez-Tur J, Roehl K, Fenton I, Chartier-Harlin M-C, Lovestone S, Williams J, Hutton M, Hardy J, Owen M, Goate A (1998) Genetics Studies on chromosome 12 in late onset Alzheimer's disease, *JAMA*, 280(7): 619-622.

Farrer M, **Wavrant-De Vrièze F**, Crook R, Boles L, Pérez-Tur J, Hardy J, Johnson W, Steele J, Maraganore D, Gwinn K and Lynch T (1998) Low frequency of α -synuclein mutations in familial Parkinson's disease, *Annals of Neurology*, 43(3):394-397.

Isaacs A, Baker M, **Wavrant-De Vrièze F** and Hutton M (1998) Determination of the gene structure of human GFAP and absence of coding region mutations associated with Frontotemporal Dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17, *Genomics*, 51(1):152-154.

◆ **Wavrant-De Vrièze F**, Lambert J-C, Stas L, Chartier-Harlin M-C, Crook R, Cattel D, Pasquier F, Frigard B, Lambrechts M, Thiry E, Amouyel P, Pérez-Tur J, Hardy J and Van Leuven F (1999) Association between coding variability in the LRP gene and the risk of Late-Onset Alzheimer's Disease, *Human Genetics*, 104: 432-4.

◆ **Wavrant-De Vrièze F**, Crook R, Holmans P, Kehoe P, Owen M, Williams J, Roehl K, Lahiri D, Shears S, Booth J, Wu W, Goate A, Chartier-Harlin M-C, Hardy J and Pérez-Tur J (1999) Genetic variability at the amyloid- β precursor protein locus may contribute to the risk of late-onset Alzheimer's disease, *Neuroscience Letters*, 269:67-70.

◆ Kehoe P⁺, **Wavrant-De Vrièze F**⁺, Crook R⁺, Wu W⁺, Holmans P⁺, Fenton I, Spurlock G, Norton N, Williams H, Williams N, Lovestone S, Pérez-Tur J, Hutton M, Chartier-Harlin M-C, Shears S, Roehl K, Booth J, Van Voorst W, Ramic D, Williams J, Goate A, Hardy J, Owen M (1999) A full genome scan for late-onset Alzheimer's Disease, *Human Molecular Genetics*, 8(2):237-245 (+ contributeurs équivalents).

◆ **Wavrant-De Vrièze F**⁺, Rudrasingham V⁺, Lambert J-C⁺, Chakraverty S⁺, Kehoe P, Crook R, Amouyel P, Wu W, Holmans P, Rice F, Pérez-Tur J, Frigard B, Morris J, Carty S, Cattel D, Tunstall N, Lovestone S, Petersen R, Chartier-Harlin M-C, Goate A, Owen M, Williams J, Hardy J (1999) No association between the alpha-2 macroglobulin I1000V polymorphism and Alzheimer's Disease, *Neuroscience Letters*, 262:137-139 (+ contributeurs équivalents).

◆ Rudrasingham V⁺, **Wavrant-De Vrièze F**⁺, Lambert J-C⁺, Chakraverty S⁺, Kehoe P, Crook R, Amouyel P, Wu W, Rice F, Pérez-Tur J, Frigard B, Morris J, Carty S, Petersen R, Cattel D, Tunstall N, Holmans P, Lovestone S, Chartier-Harlin M-C, Goate A, Hardy J, Owen M, Williams J (1999) Alpha-2 macroglobulin gene and Alzheimer's disease, *Nature Genetics*, 22(1): 17-19 (+ contributeurs équivalents).

Farrer M, Gwinn K, Muentner M, **Wavrant-De Vrièze F**, Crook R, Pérez-Tur J, Lincoln S, Maraganore D, Adler C, Newman S, MacElwee K, McCarthy P, Miller C, Waters C and Hardy J (1999) A chromosome 4p haplotype segregating with familial lewy body parkinsonism, *Human Molecular Genetics*, 8(1):81-85.

Pérez-Tur J, Buée L, Morris M, Waring S, Onstead L, **Wavrant-De Vrièze F**, Crook R, Buée-Scherrer V, Hof P, Petersen R, McGeer P, Delacourte A, Hutton M, Siddique T, Ahlskog E, Hardy J, Steele J (1999) Neurodegenerative diseases of Guam: Analysis of *TAU*, *Neurology*, 53: 411-3.

Farrer M, Amouyel P, Becquet E, Richard F, Mouroux V, Brique S, **Wavrant-De Vrièze F**, Hardy J, Destée A & Chartier-Harlin M-C (1999). Genetic heterogeneity in familial Parkinson's disease, *Am. J. Hum. Genet* (soumis pour publication).

REVUES SCIENTIFIQUES

Wavrant-De Vrièze F, Hutton M and Hardy J (1998) Les présénilines, le peptide amyloïde et la maladie d'Alzheimer, *Actualités sur la maladie d'Alzheimer et les syndromes apparentés* (Edition Solal), 107-21.

Wavrant-De Vrièze F, Pérez-Tur J, Lambert J-C, Pasquier F, Delacourte A, Frigard B, Hardy J and Chartier-Harlin M-C (1999) Genetic risk factors for Late-Onset Alzheimer's Disease, *Annals of Psychiatry. Basic and Clinical Neurosciences*, 7:19-27.

COMMUNICATIONS AFFICHEES

Wavrant-De Vrièze F, Pérez-Tur J, Lambert J-C, Dupire M-J, Vermersch P, Petit H, Pasquier F, Delacourte A and Chartier-Harlin M-C (1996) Genetic risk factors for Late-Onset Alzheimer's Disease. 26th Annual Meeting of the **Society for Neurosciences**. Washington (USA).

Wavrant-De Vrièze F for the Late Onset Alzheimer's Disease Consortium (1998) An assessment of the contribution of genetic variability at the candidate genes to late-onset Alzheimer's disease. **6th International conference on Alzheimer's Disease**. Amsterdam (Hollande).

Owen M, Williams J, Lovestone S, Tunstall N, Rice F, Carty S, Lillystone S, Wu B, Holmans P, **Wavrant-De Vrièze F**, Shears S, Kehoe P, Crook R, Booth J, Williams J, Pérez-Tur J, Roehl K, Chartier-Harlin M-C, Fenton I, Hutton M, Goate A, Hardy J (1998) An Affected Sib Pair Genome Screen for late onset Alzheimer's Disease. **6th International conference on Alzheimer's Disease**. Amsterdam (Hollande).

Chartier-Harlin M-C, Lambert J-C, **Wavrant-De Vrièze F**, Helbecque N, Amouyel P (1998) Genetic susceptibility factors and Alzheimer's disease. **6th International conference on Alzheimer's Disease**. Amsterdam (Hollande).

COMMUNICATIONS ORALES

Goate A, Wu W, Holmans P, **Wavrant-De Vrièze F**, Shears S, Kehoe P, Crook R, Booth J, Williams N, Pérez-Tur J, Roeh K, Chartier-Harlin M-C, Lovestone S, Fenton I, Hutton M, Williams J, Hardy J, Owen M (1998) Failure to confirm a locus at chromosome 12p11-12 in late onset Alzheimer's disease. **6th International conference on Alzheimer's Disease**. Amsterdam (Hollande).

Pérez-Tur J, Steele J, **Wavrant-De Vrièze F**, Onstead L, Crook R, Morris H, Wood N, McGeer P, Siddique T, Hardy J (1998) Parkinsonism Dementia Complex of Guam: A genetic disease? **6th International conference on Alzheimer's Disease**. Amsterdam (Hollande)

◆: Publications présentées dans cette thèse.

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ	2
LISTE DES PUBLICATIONS	7
TABLE DES MATIÈRES	12
TABLE DES ILLUSTRATIONS	16
LISTE DES TABLEAUX	17
LISTE DES ABRÉVIATIONS	18
GLOSSAIRE	20
INTRODUCTION	25
LA MALADIE D'ALZHEIMER	26
I.1 Aspects cliniques	27
I.1.1 Les symptômes.....	27
I.1.2 Les critères diagnostiques.....	28
I.1.3 Fréquence de la maladie.....	30
I.1.4 Les différentes formes de la maladie.....	32
I.2 Aspects neuropathologiques	34
I.2.1 Aspects macroscopiques.....	34
I.2.2 Les dépôts de substance amyloïde.....	38
I.2.3 La dégénérescence neurofibrillaire.....	40
I.2.4 La réaction gliale.....	41
I.2.5 Conclusion.....	43
I.3 Aspects biochimiques	44

I.3.1 Les neurotransmetteurs.....	44
I.3.2 La substance amyloïde.....	46
I.3.2.1 Le peptide A β	46
I.3.2.2 Précurseur du Peptide Amyloïde (APP)	47
I.3.2.3 Fonction biologique de l'APP	48
I.3.2.4 Métabolisme du peptide A β	50
I.3.2.5 Formation des dépôts de peptides amyloïdes.....	53
I.3.2.6 Toxicité du peptide A β	55
I.3.3 Les protéines Tau.....	57
I.3.3.1 Les protéines Tau normales	57
I.3.3.2 Les protéines Tau dans la maladie d'Alzheimer	59
I.3.3.3 Phosphorylation pathologique.....	61
I.3.4 L'apolipoprotéine E.....	63
I.3.4.1 Les différentes isoformes	63
I.3.4.2 Fonctions de l'apolipoprotéine E	64
I.3.4.3 Implication dans la maladie d'Alzheimer	64
I.3.5 Autres composants des lésions de type Alzheimer.....	68
I.3.5.1 Les présénilines	69
I.3.5.2 Les protéoglycannes	72
I.3.5.3 Les facteurs inflammatoires	73
I.3.5.4 Les facteurs de la phase aiguë.....	75
I.3.5.5 Les récepteurs de l'ApoE.....	76
I.3.6 Hypothèse de la cascade amyloïde.....	79

I.4 Facteurs modulant le développement de la MA	81
I.4.1 Facteurs environnementaux.....	82
I.4.1.1 Facteurs de risque	82
I.4.1.2 Facteurs protecteurs.....	83
I.4.2 Facteurs génétiques.....	85
I.4.2.1 Les gènes mutés.....	85
I.4.2.2 Les gènes de susceptibilité.....	90
I.4.2.3 Les facteurs de protection	99
OBJECTIFS DE TRAVAIL	101
APPROCHES GENETIQUES	103
II.1 Généralités	104
II.2 Les marqueurs génétiques	105
II.2.1 Les polymorphismes de restriction.....	105
II.2.2 Les polymorphismes de répétition.....	106
II.3 Etudes d’association génétique	107
II.3.1 Principes.....	107
II.3.2 Le gène de susceptibilité <i>LRP</i>	109
II.3.2.1 Présentation du <i>LRP</i>	109
II.3.2.2 Le gène <i>LRP</i> et la maladie d’Alzheimer.....	110
-“Association between the low-density lipoprotein receptor-related protein (<i>LRP</i>) and Alzheimer’s Disease” (p112)	
-“Association at <i>LRP</i> gene locus with sporadic late-onset Alzheimer’s disease” (p116)	
-“Association between coding variability in the <i>LRP</i> gene and the risk of Late-Onset Alzheimer’s Disease” (p120)	
II.3.2.3 Conclusion sur le gène <i>LRP</i>	123
II.3.3 Le gène de susceptibilité <i>A2M</i>	125

II.3.3.1 Présentation de l'A2M	125
- "No association between the alpha-2 macroglobulin I1000V polymorphism and Alzheimer's Disease" (p128)	
- "Alpha-2 macroglobulin gene and Alzheimer's disease" (p132)	
II.3.3.2 Le gène A2M et la maladie d'Alzheimer	126
II.3.3.3 Conclusion sur le gène A2M	136
II.4 Etudes de liaison génétique	137
II.4.1 Principes	137
II.4.2 Les gènes de susceptibilité	139
II.4.2.1 Le chromosome 12	140
- "Genetics Studies on chromosome 12 in late onset Alzheimer's disease" (p141)	
II.4.2.2 Les gènes de susceptibilité de la MA	145
- "Genetic variability at the amyloid- β precursor protein locus may contribute to the risk of Late-Onset Alzheimer's disease" (p146)	
II.4.2.3 Conclusion	149
II.4.3 Recherche génomique	150
- "A full genome scan for late-onset Alzheimer's Disease" (p152)	
II.4.4 Conclusion sur les études de liaison génétique	155
II.5 Problèmes liés à ces études	155
II.6 Conclusion générale	157
DISCUSSION	158
PERSPECTIVES DE TRAVAIL	166
DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES	169
ANNEXE	203

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Coupes comparatives de cerveaux provenant d'un sujet témoin et d'un sujet atteint de la MA.	34
Figure 2: Progression spatio-temporelle de la pathologie d'Alzheimer.	35
Figure 3: Distribution comparative des lésions cérébrales dans la maladie d'Alzheimer.	37
Figure 4: Les différents types de dépôts de substance amyloïde.	38
Figure 5: La dégénérescence neurofibrillaire.	40
Figure 6: Les différentes isoformes de l'APP dans le système nerveux central.	47
Figure 7: Les différentes voies métaboliques de l'APP.	50
Figure 8: Représentation schématique du mécanisme de formation des fibrilles amyloïdes.	54
Figure 9: Les différentes isoformes des protéines Tau.	57
Figure 10: Les différentes voies d'action des présénilines et conséquences de leurs mutations.	70
Figure 11: Hypothèses (a, b, c et d) d'intervention du LRP au niveau des plaques séniles.	77
Figure 12: Implication des mutations de l'APP et de PS-I dans le métabolisme de l'APP.	88
Figure 13: Le chromosome 12 et les régions candidates.	144

Remarque: Les photos dans les figures 1, 4 et 5 ont été obtenues grâce à la gentillesse du Professeur Dennis Dickson et celle de la figure 9, du Docteur Luc Buée.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Prévalence (%) de la MA en fonction de l'âge et de l'origine ethnique.....	31
Tableau 2: Les différentes mutations de l' <i>APP</i> et leur implication sur son métabolisme.....	87
Tableau 3: Distributions génotypiques et alléliques du polymorphisme présent dans la région 5'UTR du gène <i>LRP</i>	114
Tableau 4: Distributions génotypiques et alléliques du polymorphisme présent dans l'exon 3 du gène <i>LRP</i>	117
Tableau 5: Distributions génotypiques et alléliques du polymorphisme présent dans l'exon 6 du gène <i>LRP</i>	122
Tableau 6: Distributions génotypiques et alléliques du polymorphisme présent dans l'exon 24 du gène <i>A2M</i> dans la population cas-témoins.	129
Tableau 7: Distributions génotypiques et alléliques du polymorphisme présent dans l'exon 24 du gène <i>A2M</i> dans la population cas index-germains témoins.	130
Tableau 8: Distributions génotypiques et alléliques du polymorphisme présent dans l'exon 18 du gène <i>A2M</i> dans la population cas-témoins.	134
Tableau 9: Distributions génotypiques et alléliques du polymorphisme présent dans l'exon 18 du gène <i>A2M</i> dans la population cas index-germains témoins.	134

LISTE DES ABREVIATIONS

ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
ACT	Alpha 1-antichymotrypsine
A2M	Alpha 2-macroglobuline
ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine (Angiotensin-Converting Enzyme)
Aβ	Peptide amyloïde
APP	Précurseur du peptide amyloïde (Amyloid Protein Precursor)
ApoE	Apolipoprotéine E
BCHE	Butyrylcholinestérase
C1	Facteur I du complément
CAT	Choline acétyle transférase
CAM	Complexe d'attaque membranaire
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GSK-3β	Kinase 3-beta de synthèse du glycogène (Glycogen Synthase Kinase 3 β)
HLA	Antigène de leucocyte humain (Human Leukocyte Antigen)
IL	Interleukine
KPI	Inhibiteur de protéinase de type Kunitz (Kunitz proteinase inhibitor)
LDL	Lipoprotéine de basse densité (Low-Density Lipoprotein)
LDL-r	Récepteur de LDL (LDL receptor)
LRP	Protéine apparentée au récepteur du LDL (LDL-receptor Related Protein)
MA	Maladie d'Alzheimer

MLS	Lods score à multipoint (Multipoint Lods Score)
PP2A	Phosphoprotéine phosphatase de type 2A
PS-I	Préséniline I
PS-II	Préséniline II
RFLP	Polymorphisme de restriction donnant des fragments de longueur différente (Restriction Fragment Length Polymorphism)
Tau-PHF	Protéines Tau hyperphorylées appariées en formation hélicoïdale
VLDL	Lipoprotéine de très basse densité (Very Low-Density Lipoprotein)
VLDL-r	Récepteur de VLDL (VLDL-receptor)

Remarque: Les gènes sont écrits en italique pour les différencier des protéines.

GLOSSAIRE

Remarque: Ces mots sont repérables dans le texte par leur encadrement.

Agnosie: Trouble de la capacité à identifier des objets malgré des fonctions sensorielles intactes (se reconnaître dans le miroir).

Allèles: Variations d'un gène qui diffère par sa séquence nucléotidique. Ils assurent la même fonction mais selon des modalités qui leur sont propres. On parle d'allèle délétère lorsque celui-ci est associé à l'apparition d'une pathologie.

Aphasie: Trouble de la capacité à s'exprimer et à communiquer par le langage écrit et parlé.

Apoptose: Mécanisme de mort cellulaire programmée.

Apraxie: Trouble de l'exécution des mouvements coordonnés malgré une compréhension et des fonctions motrices intactes.

Cellules gliales: Cellules non-neuronales de support du système nerveux central, qui entourent les neurones. Elles leur fournissent des nutriments et aident à l'équilibre environnant en recyclant les substances sécrétées par ces derniers. Les **cellules microgliales** et les **astrocytes** appartiennent à ce type cellulaire.

Cognitif: Qui se rapporte aux processus par lesquels un être vivant acquiert des informations sur son environnement.

Complément: Ensemble de protéines plasmatiques interagissant avec les anticorps et les récepteurs membranaires dans le mécanisme d'inflammation (réaction immunitaire non spécifique) contre la lutte des corps pathogènes.

Démence: Trouble des fonctions cognitives.

Déséquilibre de liaison: Situation dans laquelle la fréquence de l'association de deux allèles distincts est différente de celle attendue, celle-ci étant égale au produit de leur fréquence allélique dans la population générale. Une telle association allélique est favorisée par la proximité physique des locus.

Epissage alternatif: Mécanisme, ayant lieu durant la transcription, par lequel les introns (régions non-codantes) sont enlevés des transcrits primaires et les exons (régions codantes) sont liés ensemble selon des combinaisons différentes afin de former des ARN messagers distincts (ou transcrits).

Etiologie: Etude des causes des maladies.

Génome: Patrimoine génétique et héréditaire. Il contient l'ensemble des gènes portés par les 23 paires de chromosomes.

Génotype: Ensemble d'allèles, pour un gène déterminé, spécifique à un individu.

Glycation: Procédé non-enzymatique qui conduit à la fixation d'un carbohydrate sur les groupes amine des protéines.

Glycosylation: Procédé enzymatique conduisant à la fixation d'un carbohydrate sur les groupes hydroxyle ou amide des protéines.

Haplotype: Combinaison d'allèles de gènes différents, se situant sur le même fragment d'ADN, caractéristique à un individu.

Incidence: Fréquence de l'apparition de nouveaux malades pendant un temps donné et dans une population donnée.

Isoforme: Forme variée d'une protéine possédant une fonction biologique similaire à celle des autres formes existantes. Elle provient soit d'un allèle distinct, soit de l'épissage alternatif de l'ARN messager, voire de la combinaison des deux.

Liaison génétique: Association d'allèles définis qui sont transmis ensemble (ou coségrégent) au cours des générations.

λ s: Ratio du risque de transmission d'un trait caractéristique à un parent par rapport au risque de la population générale pour le locus étudié.

Locus: Localisation chromosomique d'un gène ou d'un marqueur.

Marqueur génétique: Séquence d'ADN possédant différents variants et se comportant comme un trait génétique héréditaire, mais ne possédant pas de fonction biologique connue.

MLS ou Lods Score à Multipoint: Mesure statistique de liaison entre un groupe de marqueurs et la maladie. Il est calculé pour chacun des marqueurs en prenant en compte simultanément les génotypes aux locus avoisinants.

Mutation: Changement de la séquence d'ADN d'une région chromosomique. Si elle ne concerne qu'un nucléotide (ou base), on parle de mutation ponctuelle. Elle peut aussi résulter de l'insertion ou de la délétion de nucléotides. Lorsqu'elle modifie la fonction biologique de la molécule obtenue, c'est une **mutation fonctionnelle**. Une mutation qui cause l'apparition d'une pathologie est appelée **mutation pathogène**. Dans le cas où la mutation ne change pas la séquence protéique, on parle de **mutation silencieuse**.

Nécrose: Mécanisme de destruction tissulaire.

Neurotransmetteur: Médiateur chimique, libéré par les neurones et permettant la communication entre eux (neuromédiateur).

Pénétrance: Probabilité de l'expression d'un trait caractéristique (phénotype) pour un génotype déterminé. Lorsque les individus possédant le même génotype, développent un phénotype identique, on parle de pénétrance complète pour la différencier de la pénétrance incomplète ou réduite (génotype identique, différent phénotype).

Phagocytose: Processus d'internalisation et de dégradation de molécules dans la cellule.

Phénotype: Caractère apparent (morphologique, biochimique...) résultant de l'expression du génotype et de l'influence du milieu.

Polymorphisme génétique: Caractère d'une séquence d'ADN qui présente au moins deux **variants** dont la fréquence est supérieure à 1% dans la population générale.

Prévalence: Fréquence de la maladie à un moment donné dans la population générale.

Radical libre: Molécule possédant un électron impair la rendant très réactive. Les radicaux libres réagissent avec les acides aminés des protéines et lipides, ainsi que les nucléotides de l'ADN provoquant leur mauvais fonctionnement.

Réaction inflammatoire: Réaction de défense du système immunitaire.

Réaction gliale: Phénomène de multiplication des cellules gliales en compensation de la perte neuronale, en addition de la sécrétion de facteurs inflammatoires.

Transcription: Mécanisme de synthèse de l'ARN à partir de l'ADN. Une copie du gène, ne contenant que les informations codantes, est obtenue pour la production de protéines.

Transduction: Transformation d'un stimulus (chimique, mécanique, thermique...) en un signal électrique au niveau d'un récepteur, permettant la transmission des informations biologiques.

Transmission autosomique: Passage d'une information génétique des autosomes (autre que celles comprises sur les chromosomes sexuels) d'une génération à une autre. Lorsque la possession d'un allèle est associée à l'expression d'un phénotype déterminé, on parle de transmission **dominante**, pour la différencier de la transmission récessive où la présence de deux allèles identiques est nécessaire pour l'expression du phénotype associé.

Phase aiguë: Réponse primaire et rapide de la réaction inflammatoire.

INTRODUCTION

Les caractéristiques cliniques et neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer ont été décrites en 1907 par le neuropathologiste allemand Aloïs Alzheimer. Cependant, ce n'est qu'en 1911 que le nom de: "Maladie d'Alzheimer" (MA) est attribué à ce type de **démence** qui affecte principalement les personnes âgées. Depuis, de nombreux cas ont été rapportés, avec une augmentation du nombre de nouveaux cas chaque année. En effet, l'amélioration des conditions de vie augmente l'espérance de vie au détriment de la capacité à lutter contre le vieillissement et les symptômes qui l'accompagnent.

Depuis une quinzaine d'années, les études biochimiques et génétiques réalisées ont permis de comprendre les mécanismes impliqués dans le développement de la pathologie. En effet, les connaissances actuelles sur l'**étiologie** de la MA ont permis de découvrir certains facteurs qui prédisposent au développement de la pathologie. Cependant, la majeure partie est associée au développement d'une forme précoce de la maladie, qui apparaît rarement et qui est, dans la plupart des cas, familiale; alors que ce sont principalement les personnes âgées qui sont atteintes par la forme dite sporadique.

Dans le cadre de notre thèse, nos travaux ont porté sur la recherche de facteurs qui provoquent ou influencent le développement de la maladie d'Alzheimer à début tardif.

Dans un premier temps, nous introduirons la maladie d'Alzheimer et son étiologie; puis nous présenterons les travaux réalisés au cours de notre thèse.

CHAPITRE I:

LA MALADIE D'ALZHEIMER

I.1 Aspects cliniques

I.1.1 Les symptômes

La MA est une affection neurologique atteignant, dans la majorité des cas, les personnes âgées de plus de 65 ans. Au fil des années, les différents symptômes s'aggravent, de façon variable en fonction des individus, pour laisser place à la démence puis à la mort.

L'état déficitaire mental de la MA se définit par des troubles de la mémoire, une désorientation spatiale, ainsi qu'une triade caractéristique de troubles cognitifs (aphasie-apraxie-agnosie).

Les troubles de la mémoire sont les premiers symptômes à se manifester et sont souvent les raisons qui conduisent le patient à consulter un neurologue. La mémoire à court terme est affectée: le sujet peut répéter des mots immédiatement après les avoir entendus, mais il les oublie si on lui demande d'exercer un autre type de test entre temps. De même, la mémoire à long terme est altérée s'il s'agit de celle explicite, telle que donner la définition d'un mot ou le prénom d'une personne familière; alors que la mémoire procédurale, celle des automatismes appris, est relativement préservée. Les patients ont toutefois du mal à connecter leurs actions, donner un sens à ce qu'ils sont en train de faire ou une raison à l'endroit où ils se dirigent.

Les troubles du langage (aphasie) sont ensuite les plus fréquents: les sujets ont du mal à s'exprimer oralement, ainsi que par écrit, à cause de la perte de la compréhension des mots. Par contre, la lecture en elle-même reste préservée.

D'autres symptômes tels que les perturbations des praxies, les troubles agnosiques, les altérations du jugement et du raisonnement apparaissent aussi couramment durant l'évolution de la maladie. Après une durée variable de deux à quatre ans en moyenne, la symptomatologie est au complet et on atteint la phase de démence qui touche toutes les fonctions intellectuelles. Ces symptômes, qui apparaissent en dernier stade, entravent la vie quotidienne avec un retentissement social important, car les sujets ne sont plus autonomes et le besoin d'assistance devient important.

Des troubles affectifs et comportementaux peuvent être aussi observés chez les malades. En effet, il n'est pas rare que ces personnes souffrent de dépression, de manifestations psychotiques (idées délirantes, hallucinations) et de modifications de la personnalité.

Lorsque la maladie est complètement développée, les patients sont entièrement dépendants, car ils sont profondément déments, muets, incontinents et restent alités.

Cliniquement, l'altération de ces fonctions cognitives est caractérisée par la lenteur de son installation, ainsi que par son évolution progressive qui la différencie de la plupart des autres démences.

1.1.2 Les critères diagnostiques

Le diagnostic de la MA est basé sur les seules données cliniques du vivant du malade, car il ne peut être confirmé qu'après un examen anatomo-pathologique du cerveau. En effet, seule l'étude des lésions du cerveau permet l'établissement du diagnostic de certitude

de la maladie. Le patient est donc évalué par des séances d'épreuves psychométriques et de tests cliniques.

Il existe un grand nombre d'épreuves psychométriques standard destinées à quantifier le déficit cognitif. Une des plus simples et des plus utilisées est le Mini Mental State Examination (MMSE) de Folstein (Folstein *et al*, 1975) qui permet une estimation rapide des troubles de la fonction exécutive. Le test évalue l'orientation, l'attention, la mémoire immédiate et à court terme, le langage et l'habilité à suivre de simples commandes verbales et écrites. Ces différentes épreuves aident à déterminer l'état de démence du sujet.

Les tests cliniques comportent des examens biologiques et anatomiques, qui sont surtout réalisés dans le but de détecter d'autres causes aux troubles cognitifs dont souffre le patient. Les examens du sang et du liquide céphalorachidien sont utiles pour exclure les infections telles que méningite et syphilis qui peuvent causer un état de démence. De même, certaines tumeurs, les syndromes dépressifs ou encore les démences vasculaires donnent des symptômes similaires à ceux de la MA. Des examens d'imageries morphologiques et fonctionnelles du cerveau sont donc réalisés afin d'éliminer les autres diagnostics possibles.

Le diagnostic clinique de la MA a grandement bénéficié d'un consensus sur les critères de démence établis par l'Association Psychiatrique Américaine (Gmitrowicz *et al*, 1994) qui publie périodiquement un manuel diagnostique et statistique des maladies mentales (édition actuelle: DSM IV) et sur les critères spécifiques proposés par le National Institut of Neurological Disorders and Stroke (NINCDS) et l'Alzheimer's Disease Association (ADA, anciennement ADRDA) (McKhann *et al*, 1984). Ces critères établissent trois niveaux de confiance pour le diagnostic de la MA : "certain", "probable" ou "possible" (voir Annexe).

Le diagnostic “Alzheimer possible” est appliqué lorsque les données cliniques suggèrent une affection par la MA, mais des variations telles que l’âge d’apparition des symptômes ou le cours que suit la maladie ne permettent pas le diagnostic de “probable”. Ce statut est aussi conforté lorsque la personne démente a été touchée par d’autres maladies associées potentiellement à une démence (infarctus par exemple), mais qui ne sont pas considérées comme responsables de la démence.

Une personne démente est diagnostiquée “Alzheimer probable” lorsque la démence est caractérisée par un début et une progression graduelle et lorsque toutes autres affections neurologiques ou systémiques qui pourraient éventuellement être la cause de la démence, sont absentes.

Le diagnostic “Alzheimer certain” nécessite, quant à lui, à la fois les caractéristiques cliniques de la maladie et les caractéristiques histopathologiques obtenues après autopsie. Le progrès des connaissances sémiologiques et des tests psychométriques permettent une bonne concordance anatomo-clinique dans plus de 85 pour cent des cas (**Wade *et al*, 1987; Joachim *et al*, 1988; Morris *et al*, 1988; Burns *et al*, 1990**).

I.1.3 Fréquence de la maladie

L’évolution socio-démographique des pays industrialisés et l’augmentation de l’espérance de vie expliquent l’émergence de la MA que l’on nomme “La peste noire du XXème siècle”. Une étude réalisée sur une population américaine révèle que l’**incidence** de la maladie, c’est-à-dire le nombre de nouveaux malades apparus pendant une période de

temps déterminée, a augmenté considérablement sur ces derniers 25 ans (Kokmen *et al*, 1996).

La **prévalence**, c'est-à-dire le nombre de cas recensés à un moment donné sur l'ensemble de cette population étudiée, était de 201 en 1975, puis 361 en 1980, pour devenir 521 en 1985 (sur une population de 70000 personnes) (Kokmen *et al*, 1996). Les autres études réalisées ne peuvent pas vraiment juger de cette expansion de la maladie car aucune ne couvre une période de temps si importante. Les résultats de ces études ont été rassemblés par Breteler et collaborateurs (Breteler *et al*, 1992a) et se trouvent dans le tableau 1 avec les données d'études additionnelles.

Tableau 1: Prévalence (%) de la MA en fonction de l'âge et de l'origine ethnique.

Origine	Référence	Tranches d'âge (années)								
		30-54	55-59	60-64	65-69	70-74	75-79	80-84	85-89	> 90
Europe	(Rocca et al, 1991)	0,02		0,30		3,20		10,80		
	(Breteler et al, 1992a; Breteler et al, 1992b)			0,30		2,90		11,50		28,00
Etats-Unis	(Evans et al, 1989)				3,00		18,70		47,20	
	(Breteler et al, 1992a)				1,10		7,50		17,95	
Inde	(Chandra et al, 1998)		0,12		0,50		1,01		9,85	
Chine	(Liu et al, 1998)				0,50		2,90		12,00	
Japon	(Breteler et al, 1992a)				0,20	0,60	1,20	4,00	7,70	

(les données de Breteler représentent les moyennes calculées à partir des résultats publiés)

De manière générale, ces données sont assez homogènes et montrent une augmentation considérable de la prévalence de la MA à travers les tranches d'âge et ce, quelle que soit l'ethnie. Inférieure à 1% avant 75 ans, elle atteint jusqu'à 12% après 85 ans (Liu *et al*, 1998). De même, l'incidence de la maladie varie énormément à travers les tranches d'âge, les octogénaires étant les plus touchés. Elle passe de 0,5% entre 65 et 74 ans, à 13,1% au-delà de 85 ans (Schoenberg *et al*, 1987). Ces résultats dénotent l'importance de la MA dans le monde et révèlent l'implication de l'âge dans l'apparition de la maladie. De même, ils indiquent l'amélioration des conditions de vie de ces personnes grâce aux progrès réalisés dans la prise en charge des malades, la durée de survie des patients étant ainsi prolongée.

I.1.4 Les différentes formes de la maladie

L'étiologie de la MA n'est pas élucidée, cependant certains facteurs de risque ont été identifiés et permettent de distinguer les différentes formes de la maladie, les symptômes ne différant pas trop d'un cas à un autre. L'âge d'apparition de la maladie et l'existence d'antécédents familiaux de démence permettent ainsi de différencier respectivement les cas préséniles des cas séniles et les cas sporadiques des cas familiaux.

L'âge d'apparition des premiers symptômes délimite les cas séniles (début tardif) chez lesquels la maladie se déclare après 65 ans, des cas précoces où les malades sont atteints plus tôt (cas préséniles). Dans la majorité des cas, les malades n'ont pas d'antécédents familiaux connus de démence et sont donc classés en tant que cas sporadiques. Cependant, si le patient possède un ou plusieurs membres de sa famille affectés par la maladie, il appartient alors au groupe des cas familiaux.

Ainsi, les patients atteints de la MA peuvent être classés en sous-groupes: le plus important étant celui des cas sporadiques tardifs qui représente 45% des malades, suivi par les cas familiaux tardifs (30%) et les cas sporadiques précoces (15%), tandis que le plus petit est celui des cas familiaux précoces avec 10% (**Van Broeckhoven, 1995b**). Ces pourcentages varient en fonction des études réalisées, cependant le groupe des cas sporadiques reste toujours plus important par rapport à celui des cas familiaux qui représente 25-40% des cas de type Alzheimer (**Heston et al, 1981; Fitch et al, 1988**).

Une étiologie génétique de la maladie est fortement suggérée par les cas familiaux qui montrent clairement un mode de transmission autosomique dominant (**Davies, 1986**), c'est-à-dire que le risque de développer la MA pour un enfant dont un des parents est affecté, serait

de 50%; alors que celui d'un enfant de famille de témoins n'est que de 5% à l'âge de 65 ans. Cet aspect génétique a été démontré grâce à des études de jumeaux qui montrent une concordance supérieure à 50% chez les monozygotes (Breitner *et al*, 1993). Des facteurs environnementaux seraient aussi mis en cause dans le développement de la maladie. En effet, les premières études sur les cas familiaux ne donnaient une estimation que de 3 à 14% de risque de développer la maladie pour un apparenté de premier degré (St George-Hyslop *et al*, 1989).

Au niveau du groupe des cas familiaux affectés par la maladie à un âge tardif, il est difficile d'estimer si l'atteinte d'un autre apparenté par la même maladie est due à un déficit génétique ou si ce n'est pas plutôt un facteur environnemental commun qui augmente leur chance de développer la maladie. En effet, la date d'apparition des premiers symptômes entre chaque génération étant très éloignée, les études génétiques familiales sont difficiles à réaliser car, soit les descendants à risque n'ont pas encore atteint l'âge critique pour que la maladie se déclare, soit les parents du patient sont décédés et un diagnostic de démence chez ces derniers n'a pas toujours été établi, ou il est encore possible que ces personnes soient décédées avant de développer la MA. Les seuls cas familiaux exploitables dans le cadre des études génétiques, représentent donc un groupe restreint qui donne alors une estimation de 24 jusqu'à 50% de risque pour un apparenté de premier degré de développer la maladie (Breitner *et al*, 1988; Farrer *et al*, 1989).

I.2 Aspects neuropathologiques

I.2.1 Aspects macroscopiques

Le cerveau d'un patient atteint de la MA présente une atrophie globale des circonvolutions cérébrales qui conduit à l'élargissement des sillons corticaux, ainsi qu'une dilatation des ventricules latéraux (voir figure 1).

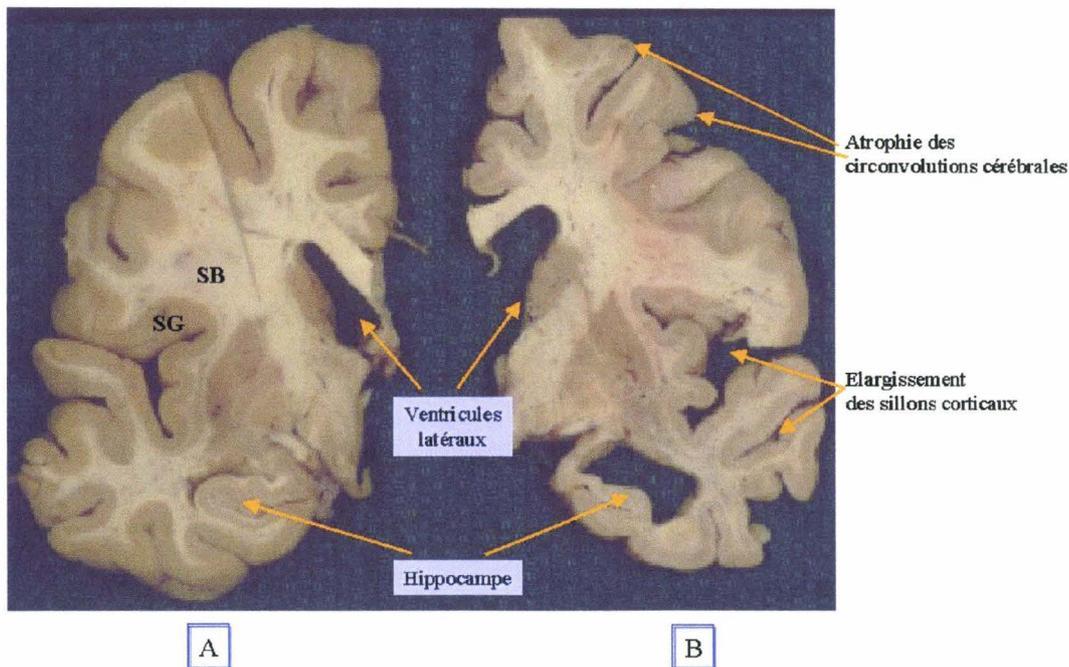


Figure 1: Coupes comparatives de cerveaux provenant d'un sujet témoin (A) et d'un sujet atteint de la MA (B).

Coupes transversales au niveau des régions temporo-pariétales; **SB**: substance blanche du cerveau dont le volume est diminué chez les sujets atteints de la MA; **SG**: substance grise dont l'épaisseur est diminuée chez les sujets atteints de la MA. Les régions atrophiées chez les malades sont indiquées par des flèches.

Cette atrophie du cerveau est causée par la disparition des neurones qui atteint principalement le cortex cérébral, en particulier les régions frontales, temporales et la formation limbique au début de la maladie, puis celle-ci s'étend au niveau des régions

pariétales et occipitales. La progression des symptômes de la MA est, en effet, en relation avec la progression des lésions affectant le cerveau du patient, ce qui s'établit de façon hiérarchique durant les différents stades d'évolution de la maladie (Braak & Braak, 1997c) (voir figure 2).

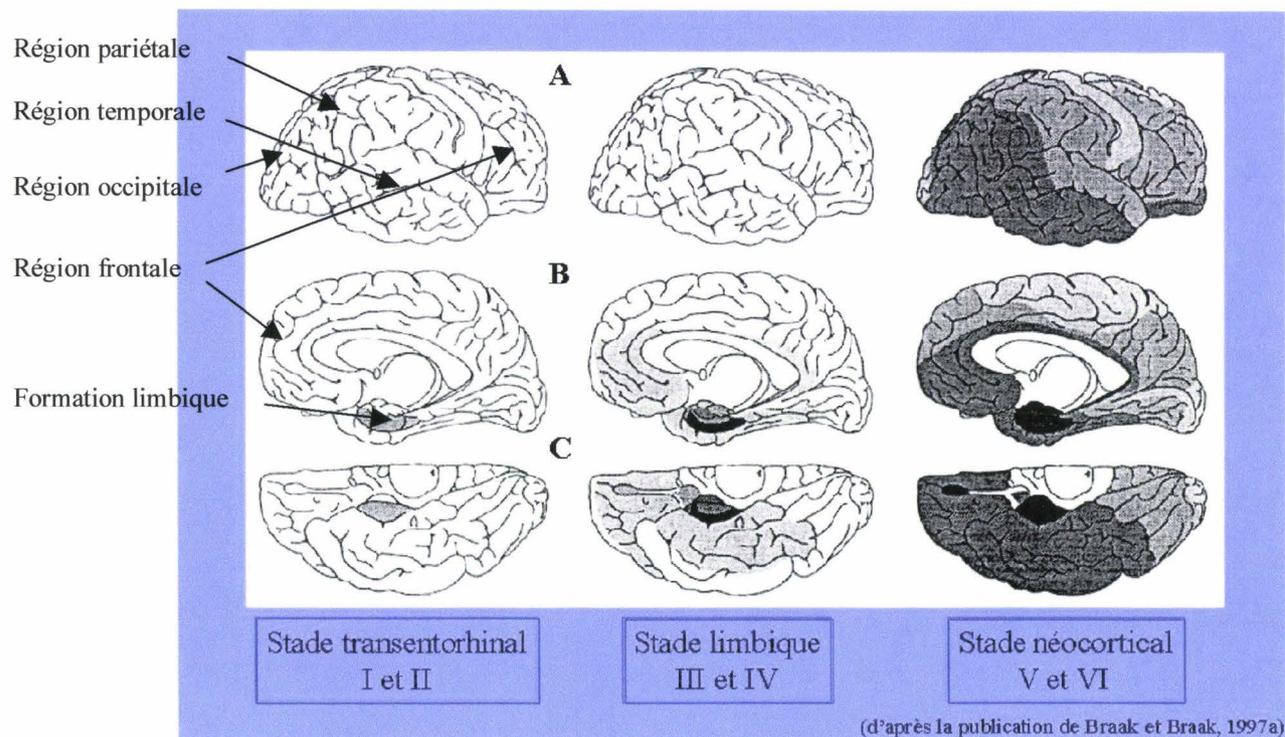


Figure 2: Progression spatio-temporelle de la pathologie d'Alzheimer.

A: Vue générale externe du lobe droit; **B:** Coupe médiane du cerveau, vue interne du lobe droit; **C:** Vue inférieure du lobe droit. L'intensité des lésions est représentée comme suit:

□ Intensité faible; □ Intensité moyenne; □ Intensité forte; ■ Intensité sévère.

Il existe deux types principaux de lésions dans la MA: les plaques séniles et la dégénérescence neurofibrillaire qui se distinguent par leurs localisations, mais aussi leurs structures et leurs constituants (voir paragraphes suivants).

Les travaux de Braak et collaborateurs (Braak & Braak, 1997c) démontrent que les neurones du cortex transentorhinal et entorhinal sont les premiers touchés par le

développement des lésions de type dégénérescence neurofibrillaire, ce qui correspond aux stades I et II dans l'évolution de la maladie (stade transentorhinal) et représente la phase asymptomatique pré-clinique. Au cours des stades III et IV (stade limbique), les cellules de l'hippocampe et du cortex temporal sont progressivement affectées, ainsi que les cellules entorhinales spécifiques du transfert d'informations entre l'hippocampe et le néocortex, d'où découle l'apparition des premiers symptômes durant la phase infra-clinique de la maladie. Les stades V et VI (stade néocortical) représentent la phase finale dans l'évolution de la MA qui est la phase clinique. Les lésions neurodégénératives sont présentes dans pratiquement toutes les sous-divisions du cortex cérébral, tout particulièrement dans les aires d'association néocorticales qui sont responsables de la connexion entre les différentes régions du cerveau. Le stade VI est caractérisé par une propagation de la pathologie au niveau des aires primaires du cerveau (vue, langage...). C'est au cours du stade néocortical que les symptômes les plus sévères apparaissent et que la confirmation neuropathologique du diagnostic clinique de la MA est réalisable, basée sur les critères conventionnels utilisés (voir **Braak & Braak, 1997a** et **Braak & Braak, 1997b**).

La distribution des plaques séniles est quant à elle différente. En effet, contrairement à la dégénérescence neurofibrillaire qui se répartit de façon très homogène et se trouve préférentiellement au niveau de l'aire entorhinal et de l'hippocampe (figure 3A), les plaques séniles ont une distribution plus large dans le cerveau, affectant les aires associatives comme le cortex primaire (figure 3B) (**Price et al, 1991**).

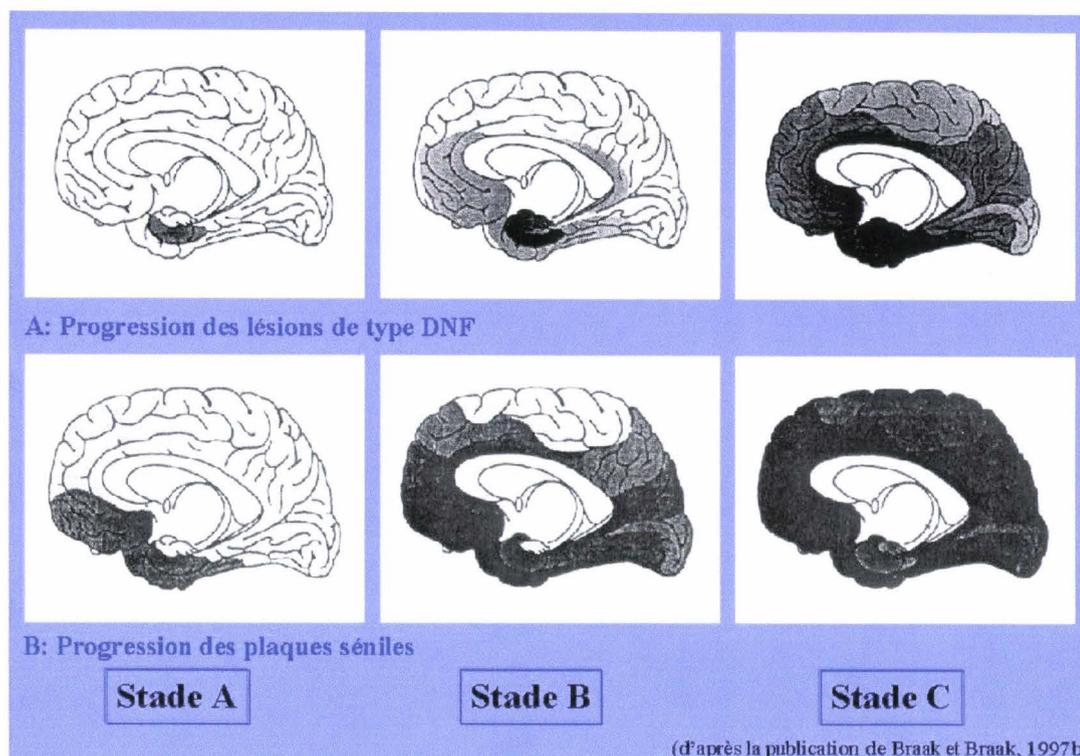


Figure 3: Distribution comparative des lésions cérébrales dans la maladie d'Alzheimer.

Coupes médianes de cerveaux exposant le lobe droit de patients atteints de la MA. L'intensité des lésions est représentée comme suit: □ Intensité faible; ◻ Intensité moyenne; ◼ Intensité forte; ◼ Intensité sévère.

Les premières plaques séniles apparaissent de façon typique dans les aires pauvrement myélinisées du néocortex basal (stade A) et se propagent dans les aires néocorticales adjacentes, ainsi que dans l'hippocampe (stade B). Ces lésions envahissent ensuite toutes les aires corticales, avec les aires primaires très myélinisées du néocortex en fin d'évolution (stade C) (Braak & Braak, 1997b).

D'autre part, la localisation cellulaire de ces lésions ainsi que la nature de leurs constituants sont différentes. Les plaques séniles sont des dépôts extracellulaires composés principalement de substance amyloïde (Glennner & Wong, 1984a), alors que la dégénérescence neurofibrillaire est un phénomène intraneuronal mettant en jeu des changements de phosphorylation protéique (Sternberger *et al*, 1985).

Une réaction inflammatoire à proximité ou à l'intérieur de ces lésions est aussi mise en évidence par la présence d'une réaction gliale et d'astrocytes activés, ainsi que la détection de facteurs d'inflammation à l'intérieur des plaques séniles (Aisen & Davis, 1994; McGeer *et al*, 1994b).

I.2.2 Les dépôts de substance amyloïde

Dans la MA, la substance amyloïde se dépose entre les cellules neurocorticales sous l'aspect de plaques diffuses (figure 4A) ou compactes (plaques neuritiques) (figure 4B) (Yamaguchi *et al*, 1988; Probst *et al*, 1991) et au niveau des parois des vaisseaux sanguins du cerveau (angiopathie amyloïde cérébrale) (figure 4C) (Glennner *et al*, 1981; Joachim *et al*, 1988; Ellis *et al*, 1996). Ces formations extraneuronales, bien que présentes dans le cerveau des personnes âgées non démentes, constituent une caractéristique neuropathologique pour le diagnostic de la MA (Mirra *et al*, 1991; Gomez-Isla *et al*, 1997), car leur densité est beaucoup plus importante chez les sujets affectés (Frucht & Koo, 1993; Terry, 1997).

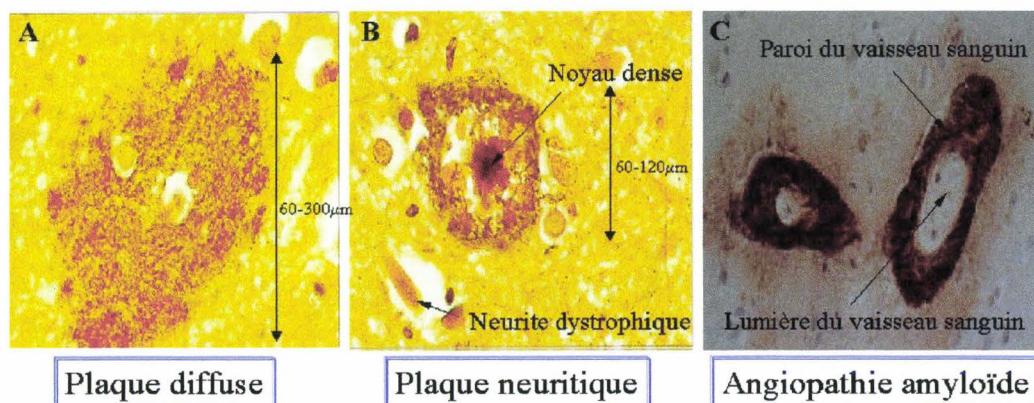


Figure 4: Les différents types de dépôts de substance amyloïde.

Vue microscopique de coupes de cerveaux de sujets atteints de la maladie d'Alzheimer, après immuno-marquage avec un anticorps reconnaissant le peptide A β .

Les plaques neuritiques classiques ont une structure sphérique constituée d'un noyau central dense couronné de neurites dystrophiques et sont souvent accompagnées par des astrocytes activés et des cellules microgliales (Mandybur & Chuirazzi, 1990), tandis que les plaques diffuses ne possèdent pas de lésion neuronale (Yamaguchi *et al*, 1988; Dickson, 1997). Les dépôts de substance amyloïde sont composés essentiellement de peptides amyloïdes, d'approximativement 4KDa (A β) (Glennner & Wong, 1984a), qui s'associent en fibrilles insolubles. Les études *in vitro* suggèrent que ces filaments de peptides A β se polymérisent et se déposent pour former le cœur des plaques séniles (Burdick *et al*, 1992; Jarrett *et al*, 1993). D'autres composants tels que l'apolipoprotéine E (ApoE), les protéoglycannes, des fractions du complément, des inhibiteurs de protéases (l'alpha-1-antichymotrypsine et l'alpha-2-macroglobuline) ainsi que des récepteurs de lipoprotéines (VLDL-r, LDL-r, LRP), sont aussi retrouvés au niveau des plaques neuritiques et pourraient, soit jouer un rôle de cofacteurs dans la formation des dépôts de substance amyloïde, soit être capturés dans les dépôts insolubles. Dans la première hypothèse, ces différents composés faciliteraient le dépôt des fibrilles insolubles de peptide A β pour former les plaques neuritiques. Toutefois, ils ne sont pas retrouvés au niveau des plaques diffuses (Yamaguchi *et al*, 1988; Probst *et al*, 1991). Ces dernières sont en effet considérées comme étant la première étape de la formation des plaques séniles et évolueraient progressivement en plaques neuritiques classiques (Selkoe, 1996). Alternativement, il est possible que certains composés soient présents dans les plaques neuritiques en raison de leur affinité pour les fibrilles amyloïdes insolubles.

I.2.3 La dégénérescence neurofibrillaire

La dégénérescence neurofibrillaire correspond à des lésions intracellulaires qui se trouvent au niveau du cytoplasme des cellules pyramidales du cortex. Elles se localisent dans le corps cellulaire des neurones, mais aussi au niveau des prolongements dendritiques et axonaux (neuropile) (voir figure5).

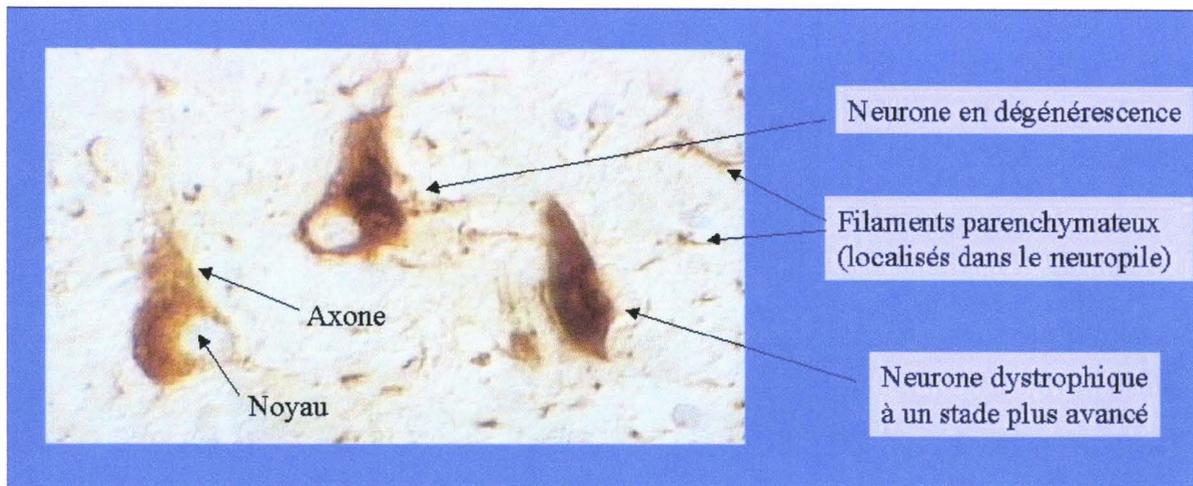


Figure 5: *La dégénérescence neurofibrillaire.*

Vue microscopique d'une coupe de cerveau de sujet atteint de la maladie d'Alzheimer, après immuno-marquage avec un anticorps reconnaissant les sites d'hyperphosphorylation spécifiques aux protéines Tau-PHF.

En microscopie électronique, cette dégénérescence neurofibrillaire correspond à un enchevêtrement de filaments ayant une conformation hélicoïdale (Kidd, 1963; Terry, 1963) que l'on appelle les "paires de filaments appariés en hélice" (acronyme anglais: PHF). Leur composant majeur est la protéine Tau (Brion *et al*, 1985; Grundke-Iqbal *et al*, 1986; Kosik *et al*, 1986; Goedert *et al*, 1988). Cette protéine est présente dans le cerveau humain et, régulée par la phosphorylation de sites spécifiques, module la polymérisation des microtubules pour former la matrice cellulaire. Cependant, pour des raisons encore méconnues, son degré de phosphorylation est modifié chez les sujets atteints de la MA (Sternberger *et al*, 1985);

certains des sites phosphorylés n'étant pas retrouvés au niveau des protéines Tau non pathologiques (Flament & Delacourte, 1989; Flament *et al*, 1990; Matsuo *et al*, 1994; Sergeant *et al*, 1995). Les protéines Tau des sujets malades sont, en effet, hyperphosphorylées par rapport aux protéines Tau trouvées chez l'adulte sain (Ksiazak-Reding *et al*, 1992), on les nomme alors les protéines Tau-PHF (pour protéines Tau formant les PHF). Cette phosphorylation différente serait responsable de leur agrégation (Mandelkow *et al*, 1995; Alonso *et al*, 1996), entraînant la formation des lésions de type dégénérescence neurofibrillaire. Elle empêcherait aussi les protéines Tau-PHF de se lier aux microtubules en formation (Bramblett *et al*, 1993; Lu & Wood, 1993), entraînant la désorganisation du cytosquelette cellulaire et possiblement la mort neuronale par arrêt du transport axonal à plus long terme. La pathologie neurofibrillaire serait donc la cause essentielle de la perte neuronale.

I.2.4 La réaction gliale

La réaction gliale est un système de défense contre l'intrusion de tout corps étranger dans le système nerveux central. Elle implique les astrocytes et les cellules microgliales, cellules non neuronales du système nerveux central, qui s'activent pour intervenir dans l'élimination du facteur pathogène. En effet, ces cellules sécrètent différentes molécules qui jouent un rôle essentiel dans la phagocytose des micro-organismes, des tissus nécrosés ou des dépôts anormaux de substance. Dans la MA, les cellules microgliales et astrocytaires sont présentes en nombre important au niveau des lésions (Itagaki *et al*, 1989; Mandybur & Chuirazzi, 1990; McGeer *et al*, 1993; McGeer *et al*, 1994a), essentiellement au niveau des dépôts de substance amyloïde. Elles sont activées afin d'éliminer le peptide A β qui est rapidement

incorporé et accumulé par les cellules microgliales. La dégradation est un procédé très lent qui ne compenserait apparemment pas la production de substance amyloïde (Paresce *et al*, 1997). Ces cellules pourraient donc participer à la formation des dépôts du fait de leur saturation en peptides A β .

Plusieurs molécules sécrétées par ces cellules sont retrouvées, colocalisées avec le peptide A β , au niveau des plaques séniles. En effet, les niveaux de la cytokine IL-6 sont élevés dans le cerveau de sujets diagnostiqués Alzheimer (Bauer *et al*, 1991; Strauss *et al*, 1992; Wood *et al*, 1993; Huell *et al*, 1995), tout comme le composé C1q de la cascade du complément (Afagh *et al*, 1996; Yasojima *et al*, 1999; J. Rogers, communication personnelle) et certains facteurs de la phase aiguë tels que les antiprotéases α 1-antichymotrypsine (ACT) (Abraham *et al*, 1988; Licastro *et al*, 1995a; Licastro *et al*, 1995b; Lieberman *et al*, 1995) et α 2-macroglobuline (A2M) (Bauer *et al*, 1991; Strauss *et al*, 1992). Ces produits, libérés par les astrocytes et les cellules microgliales, sont détectés essentiellement à l'intérieur des plaques séniles, mais aussi dans les plaques diffuses, suggérant leur intervention potentielle dans la formation des dépôts (Sasaki *et al*, 1997) ou leur élimination. Toutefois, ils sont toxiques pour les tissus sains environnant les lésions (Aisen & Davis, 1994; Dickson, 1997); une réaction inflammatoire prolongée pouvant souvent causer la destruction des tissus avoisinants. Ces observations conduisent ainsi à l'hypothèse d'un mécanisme d'autodestruction dans la MA.

I.2.5 Conclusion

Le peptide A β et les protéines Tau-PHF sont donc des marqueurs de la MA, car ils sont les composants majeurs des deux lésions qui caractérisent la pathologie, permettant la confirmation du diagnostic après autopsie. Bien que ces deux types de lésions soient aussi une caractéristique du vieillissement cérébral normal, elles sont en nombre considérablement plus faible que dans le cerveau des patients atteints de la MA et leur distribution est beaucoup moins dispersée. De plus, au niveau du liquide céphalorachidien, la concentration de ces deux composants principaux semble être beaucoup plus élevée par rapport à celle observée chez des témoins de même âge (Hulstaert *et al*, 1999), ce qui pourrait permettre le développement de nouveaux outils de dépistage de la maladie autorisant un diagnostic plus précoce mais aussi plus fiable.

Les constituants de ces lésions jouent certainement un rôle important dans le développement de la maladie, mais leur système d'intervention dans la pathogenèse reste encore controversé: l'amyloïdogénèse (précipitation du peptide amyloïde) serait la première étape, suivie par la dégénérescence neurofibrillaire. Progressivement, les plaques séniles et la dégénérescence neurofibrillaire envahiraient l'ensemble du cortex cérébral, entraînant de nombreux dérèglements conduisant à la mort neuronale, par conséquent à l'atrophie du cerveau et aux symptômes qui en découlent. L'extension de la dégénérescence neurofibrillaire est parfaitement corrélée avec la sévérité de la démence (Arriagada *et al*, 1992), alors qu'une telle corrélation n'est pas retrouvée pour les plaques séniles (Crystal *et al*, 1988). Cependant, la dégénérescence neurofibrillaire semble moins spécifique de la MA que ne le sont les plaques séniles. En effet, la dégénérescence neurofibrillaire est retrouvée dans d'autres maladies neurodégénératives telles que la

maladie de Pick, la paralysie progressive supra nucléaire, la dégénérescence corticobasale, la démence fronto-temporale, la maladie de Guam... Toutefois, on retrouve aussi des plaques séniles dans certaines formes d'épilepsie, la démence à corps de Lewy, la Trisomie 21 et la maladie de Parkinson avec démence.

I.3 Aspects biochimiques

I.3.1 Les neurotransmetteurs

L'Acétylcholine (ACh) est un neurotransmetteur fondamental dont la concentration est réduite de façon importante chez les patients atteints de la MA (Francis *et al*, 1985; Gsell *et al*, 1996). En effet, l'activité de la choline acétyltransférase (CAT), enzyme de synthèse de l'ACh, est diminuée dès le début de la maladie (Davies, 1978; Kuhl *et al*, 1999). Cette enzyme est principalement produite au niveau du cortex frontal, une des premières régions affectées par la neurodégénérescence. De même, l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE), enzyme qui hydrolyse l'ACh, est diminuée dans le cerveau et le liquide céphalorachidien provenant des personnes affectées par la maladie (Shen *et al*, 1993; Gsell *et al*, 1996; Kuhl *et al*, 1999). De plus, le déficit des niveaux de CAT, d'AChE et d'ACh est corrélé avec la sévérité de la démence, notamment au niveau des lobes temporaux (Wilcock *et al*, 1982; Francis *et al*, 1985; Oishi *et al*, 1996). Les systèmes cholinergiques jouant un rôle important dans la modulation des fonctions cognitives et de l'apprentissage de la mémoire, une activité déficitaire

pourrait donc entraîner l'apparition des troubles cognitifs observés chez les patients atteints de la MA.

Il est cependant intéressant de constater que, au niveau même des plaques séniles et des lésions de type dégénérescence neurofibrillaire, les concentrations d'AChE sont élevées (Ulrich *et al*, 1990; Moran *et al*, 1993). Cette augmentation localisée de l'expression d'AChE serait stimulée par le peptide A β (Sberna *et al*, 1998; Carroll *et al*, 1999) en provoquant une augmentation de l'influx du calcium (Mattson *et al*, 1992; Sberna *et al*, 1997). La diminution de la concentration d'ACh au niveau des plaques séniles pourrait donc être due à sa destruction rapide par les niveaux élevés d'AChE (Carroll *et al*, 1999). De plus, la synthèse d'ACh étant dépendante de la concentration du calcium, un déséquilibre homéostatique entraînerait un déficit de sa production (Gibson *et al*, 1989; Carroll *et al*, 1992). La libération de neurotransmetteurs tels que le glutamate ou la L-Dopamine qui sont potentiellement toxiques, serait plutôt augmentée par la perturbation du métabolisme oxydatif (Gibson *et al*, 1987; Gibson *et al*, 1989). Une autre cause possible de la diminution des niveaux d'ACh serait le résultat de la perte des neurones cholinergiques au cours de l'atrophie du cerveau (Carroll *et al*, 1999).

D'autres neurotransmetteurs, tels que la sérotonine, le GABA, la somatostatine et la norépinéphrine voient aussi leur concentration diminuer chez les malades atteints de la MA (Mann & Yates, 1986; Palmer *et al*, 1988). Les causes de ces déséquilibres ne sont cependant pas clairement établies.

Ces déficits en neurotransmetteurs affectent non seulement la mémoire et le système cognitif des malades, mais également leur comportement et leur faculté émotionnelle

(Palmer *et al*, 1988). Les troubles comme la dépression, l'anxiété, l'illusion se manifestent alors. Ces symptômes peuvent être diminués grâce à des traitements pharmacologiques tels que des agonistes cholinergiques, des inhibiteurs de cholinestérase ou des régulateurs de la balance homéostatique du calcium.

1.3.2 La substance amyloïde

1.3.2.1 Le peptide A β

Le constituant majeur de la substance amyloïde est le peptide A β , dont la taille varie de 39 à 43 acides aminés (Glennner & Wong, 1984a) et qui se trouve sous forme agrégée. La forme prédominante observée au niveau des plaques séniles est le peptide A β 42(43) (Iwatsubo *et al*, 1994), alors que le peptide A β 40 est plutôt retrouvé au niveau des amyloïdoses vasculaires (Gravina *et al*, 1995).

Ces peptides sont produits naturellement par l'organisme humain (Haass *et al*, 1992b; Seubert *et al*, 1992) à partir du précurseur de la protéine amyloïde (APP) (Kang *et al*, 1987; Tanzi *et al*, 1987). A concentration physiologique, la partie 25-35 du peptide A β possède des propriétés neurotrophiques; mais lorsque sa concentration augmente, elle devient neurotoxique (Yankner *et al*, 1990). La quantité de peptide A β sécrétée, infime dans les conditions normales, est en effet largement augmentée chez les patients atteints de la MA (Frucht & Koo, 1993). Une élévation des taux de peptide A β 42(43) est ainsi observée dans le liquide céphalorachidien en début de maladie (Jensen *et al*, 1999; Matsubara *et al*, 1999). Ils

diminuent ensuite inversement au nombre de dépôts de substance amyloïde apparaissant, jusqu'à atteindre des taux plus faibles encore par rapport à ceux des témoins (Mottet *et al*, 1995; Wang *et al*, 1999). L'augmentation de la production de peptide A β pourrait donc être le point initiateur de l'apparition des lésions.

I.3.2.2 Précurseur du Peptide Amyloïde (APP)

L'APP est une protéine de surface cellulaire qui constitue vraisemblablement un récepteur membranaire avec un domaine cytoplasmique de 47 acides aminés (Kang *et al*, 1987). Le gène codant cette protéine se trouve sur le chromosome 21 et contient 18 exons qui peuvent générer 7 ARN messagers différents par épissage alternatif (voir figure 6) (Robakis *et al*, 1987; Golde *et al*, 1990; Yoshikai *et al*, 1990).

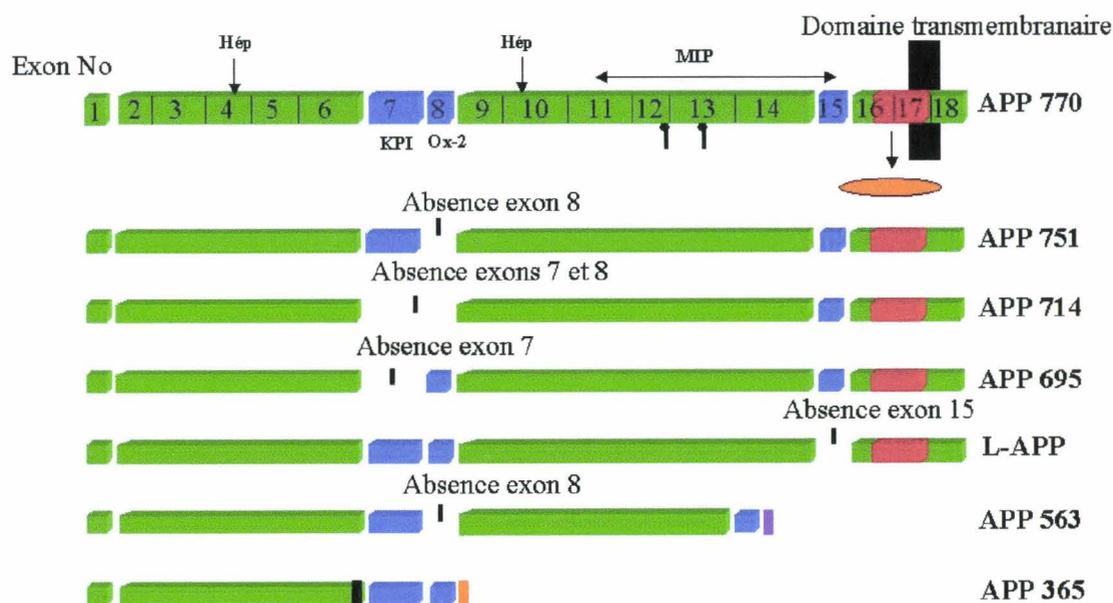


Figure 6: Les différentes isoformes de l'APP dans le système nerveux central.

Hép: Domaines de liaison à l'héparine; **KPI:** Domaine inhibiteur de protéases de type Kunitz; **Ox-2:** Domaine de type Ox-2; **MIP:** Région inhibitrice de métalloprotéases;  Peptide A β ; \uparrow Site de glycosylation;  Addition de séquences Alu;  Délétion de 3 acides aminés;  Addition de 6 acides aminés.

Les formes majoritaires sont celles de l'APP₆₉₅, fortement exprimée par les neurones différenciés et des APP₇₅₁ et APP₇₇₀ qui sont surtout produites par les cellules non neuronales (Tanzi *et al*, 1988a). Ces trois isoformes contiennent le peptide A β . Elles se différencient par la présence d'un domaine inhibiteur de sérine protéase de type Kunitz (KPI), codé par l'exon 7 et présent au niveau des isoformes APP₇₅₁ et APP₇₇₀ (Kitaguchi *et al*, 1988; Ponte *et al*, 1988). L'isoforme APP₇₇₀ se distingue, quant à elle par l'addition supplémentaire de 19 acides aminés, codés par l'exon 8 et présentant 50% d'homologie avec l'antigène Ox-2 trouvé à la surface des neurones (Kitaguchi *et al*, 1988). Une autre isoforme récemment identifiée est le L-APP chez lequel la région codée par l'exon 15 est absente (Konig *et al*, 1992). Cette isoforme est principalement sécrétée par les cellules microgliales (Sandbrink *et al*, 1994a). Les autres formes observées, qui sont l'APP₇₁₄, APP₅₆₃ et APP₃₆₅, sont des formes minoritaires.

La régulation de l'expression des différentes isoformes de l'APP semble varier au cours du développement. En effet, avec l'âge, il existe une augmentation de la sécrétion des isoformes contenant le domaine KPI, ainsi que celle du L-APP (Sandbrink *et al*, 1994b).

I.3.2.3 Fonction biologique de l'APP

L'APP existe sous forme sécrétée après clivage de la protéine membranaire par l'enzyme α -sécrétase selon la voie dite non-amyloïdogénique (Ghisso *et al*, 1989; Podlisny *et al*, 1990) (voir figure 7a). Cette activité protéasique non-identifiée, coupe la protéine APP dans

la région A β et libère le fragment N-terminal (APP soluble ou α APPs) dans le milieu extracellulaire. Cette voie prévient donc de la formation du peptide A β . L' α APPs est ainsi retrouvée en abondance dans le liquide céphalorachidien et le plasma (Ghiso *et al*, 1989; Podlisny *et al*, 1990), lui suggérant une fonction biologique particulière. Parmi les fonctions attribuées à l' α APPs et à l'APP membranaire se trouvent l'implication dans la croissance neuronale, la survie cellulaire et la plasticité neuronale (Mattson, 1997), ainsi qu'un rôle dans l'adhésion des neurones (Nishimoto *et al*, 1993) et la réparation des blessures du système nerveux (Smith-Swintosky *et al*, 1994; Saitoh & Mook-Jung, 1996; Small, 1998). En effet, l'expression de l'APP est fortement augmentée au cours du développement cérébral (Small *et al*, 1996) et, lorsqu'elle est phosphorylée, celle-ci stimule la croissance neuritique en culture cellulaire (Ando *et al*, 1999). De plus, la présence de deux domaines de liaison à l'héparine lui permet de fixer les protéoglycannes de type héparane sulfate, stimulant ainsi l'effet de l'APP sur la croissance neuritique (Small *et al*, 1996). Certaines formes de l' α APPs possédant le domaine KPI, il est possible que les propriétés antiprotéasiques de ce domaine confèrent des fonctions de régulation de la coagulation sanguine à l'APP soluble; tandis que la structure des APP membranaires leur suggère plutôt un rôle de récepteur (Saitoh & Mook-Jung, 1996).

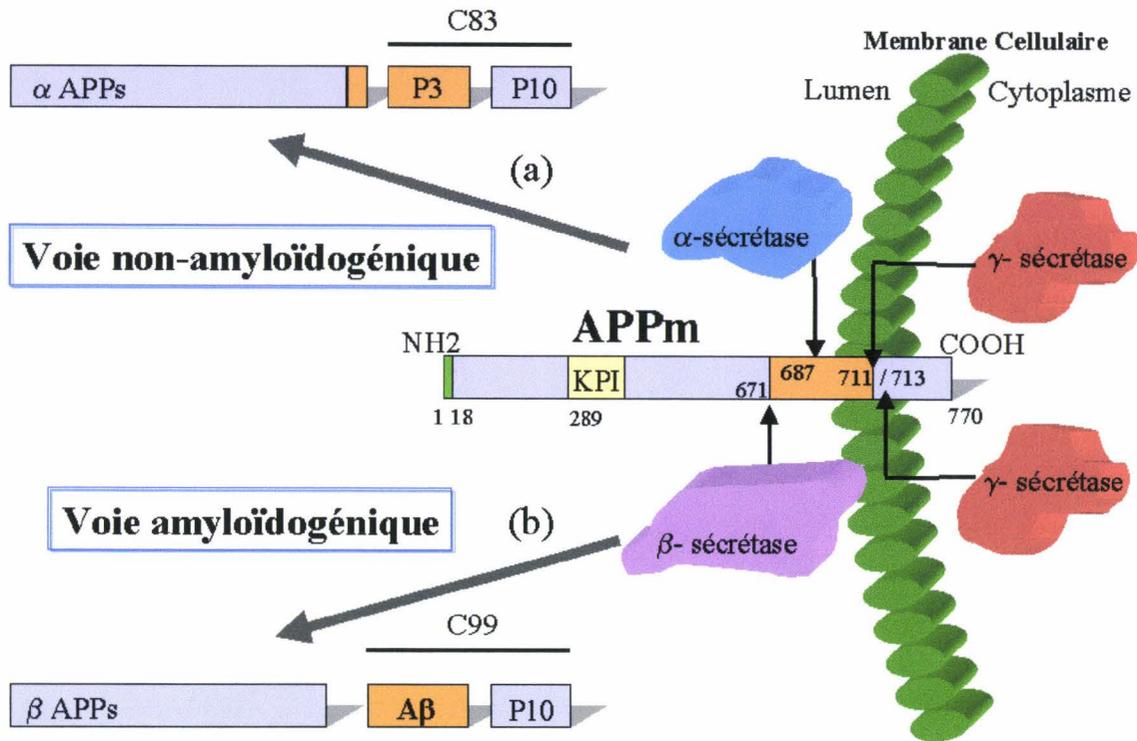


Figure 7 : Les différentes voies métaboliques de l'APP.

(a) : Voie non-amyloïdogénique produisant le fragment C83 après digestion de l'APP membranaire par l' α -sécrétase. Le fragment C83, après coupure par la γ -sécrétase, libère les produits P3 et P10; (b) : Voie amyloïdogénique produisant le fragment C99 après digestion de l'APP membranaire par la β -sécrétase. Le fragment C99, après coupure par la γ -sécrétase, libère les produits A β et P10; **APPm** : APP membranaire; **KPI** : domaine inhibiteur de protéases de type Kunitz; **NH2** : partie amino-terminale du peptide; **COOH** : partie carboxy-terminale du peptide; **C83** : fragment C-terminal de 83KDa; **C99** : fragment C-terminal de 99KDa; **P3** et **P10** : fragments de 3 et 10KDa; **A β** : peptide amyloïde (4KDa). Les chiffres au niveau de l'APPm correspondent aux numéros des acides aminés de la protéine.

1.3.2.4 Métabolisme du peptide A β

Comme le peptide A β est codé à partir des exons 16 et 17 du gène *APP*, il ne peut être un produit de l'épissage alternatif. De plus, l' α APPs ne contient plus la région intégrale de l'A β . En fait, ce dernier provient de la protéolyse de l'APP membranaire (Kang *et al*, 1987; Lemaire *et al*, 1989; Yoshikai *et al*, 1990). Le mécanisme impliqué, différent de celui de l' α APPs, est appelé : la voie amyloïdogénique (voir figure 7b). Les activités protéasiques

intervenant ne sont pas connues. Il est cependant suggéré que ces enzymes soient différentes de l' α -sécrétase. Alors que l' α -sécrétase couperait l'APP membranaire à la surface des cellules (Parvathy *et al*, 1999), le site d'action de la β -sécrétase se trouverait plutôt au niveau de la voie de sécrétion, c'est-à-dire, au niveau de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique (Busciglio *et al*, 1993; Hartmann *et al*, 1997b). Il doit donc exister un mécanisme de contrôle afin d'assurer le clivage non amyloïdogénique de l'APP par l' α -sécrétase.

La β -sécrétase coupe l'APP membranaire en amont de la région contenant le peptide A β . Le fragment β APPs ainsi produit est libéré dans le milieu cellulaire, alors que le fragment C99 (contenant le peptide A β) subit l'activité de la γ -sécrétase, qui agit en aval de la région contenant le peptide A β . Elle libère ainsi le peptide A β de la membrane cellulaire, tandis que le fragment restant, P10, est internalisé. Cette enzyme semblerait, elle aussi, agir au niveau de la voie de sécrétion puisque le trafic d'endocytose de l'APP est essentiel à la production de peptides A β . En effet, toute altération du mécanisme d'internalisation de l'APP membranaire aboutit à une augmentation de la sécrétion de α APPs, avec une diminution de la production du peptide A β (Pérez *et al*, 1999).

Le peptide A β pouvant être de taille variable, il a été suggéré que différentes enzymes γ -sécrétases existent (Citron *et al*, 1996; Klafki *et al*, 1996). Cependant, des études plus récentes montrent que ce serait plutôt la localisation du site d'action de la γ -sécrétase sur l'APP par rapport à la membrane cellulaire, qui déterminerait principalement la taille du peptide formé (Murphy *et al*, 1999). La γ -sécrétase interagirait ainsi au niveau C-terminal de l'APP en se fixant à un des côtés de l'hélice en α du domaine transmembranaire (Lichtenthaler *et al*, 1999).

Le peptide A β ainsi formé est ensuite libéré dans le milieu extracellulaire. Dans les conditions normales, cette forme soluble s'associe aux lipoprotéines du plasma. Cependant, la concentration de peptide A β augmentant dans la MA, cette élimination plasmatique est ralentie, contribuant certainement ainsi à l'influx de peptide A β dans le cerveau (**Matsubara et al, 1999**).

De nos jours, les enzymes agissant au niveau des voies amyloïdogénique et non amyloïdogénique ne sont pas clairement identifiées; cependant, l'implication de PS-I, en tant que γ -sécrétase est fortement suggérée. Cet aspect sera étudié ultérieurement.

Les raisons pour lesquelles la concentration du peptide A β est augmentée lors du développement de la MA, ne sont pas complètement élucidées; cependant, l'héparine pourrait être un facteur contributeur en raison de son affinité pour l'APP. Les protéoglycannes de type héparane sulfate se fixent très intimement à l'APP (**Narindrasorasak et al, 1995**), ils seraient donc susceptibles d'intervenir dans la régulation de la production de peptide A β (**Leveugle et al, 1997**). Il est également possible qu'ils soient impliqués dans l'agrégation du peptide amyloïde puisqu'ils ont une grande affinité pour ce dernier (**Buée et al, 1993a; Buée et al, 1993b**).

Finalement, il faut noter qu'il existe un site de coupure pour les enzymes de type caspase, au niveau de la région C-terminale de l'APP et différent de celui des sécrétases. La mort cellulaire programmée pourrait donc être une source secondaire de formation du

peptide A β en augmentant la production d'un nouveau précurseur contenant le peptide A β (Capp) (LeBlanc *et al*, 1999; Pellegrini *et al*, 1999; Weidemann *et al*, 1999).

I.3.2.5 Formation des dépôts de peptides amyloïdes

Le peptide A β ne semble pas être pathologique par lui-même puisqu'il est capable d'intervenir dans la croissance et la survie des neurones lorsqu'il est fraîchement synthétisé, c'est-à-dire à l'état monomérique (Yankner *et al*, 1990). Cependant, après quelques jours, il s'agrège avec d'autres peptides A β et devient alors toxique (Pike *et al*, 1991). Cette agrégation est plus rapide pour la forme A β 42 que celle A β 40 (Jarrett *et al*, 1993) et dépend de la concentration en peptide A β (Luine, 1985). C'est donc l'agrégation du peptide A β , devenant alors insoluble, qui serait toxique pour les cellules (Pike *et al*, 1993; Lorenzo & Yankner, 1994), surtout la région 25-35 (Pike *et al*, 1993).

La formation de fibrilles amyloïdes suit un phénomène dit de nucléation (Jarrett *et al*, 1993) (voir figure 8). En effet, dans les conditions normales, l'aspect du peptide A β est en équilibre entre la forme monomérique et la forme dimérique (Garzon-Rodriguez *et al*, 1997). Cependant, lorsque cet équilibre est rompu, par augmentation de la concentration de peptide A β par exemple, cette balance dévie vers la formation de protofibrilles, précurseurs des fibrilles amyloïdogéniques toxiques, par association des formes dimériques du peptide A β (Walsh *et al*, 1997; Blackley *et al*, 1999). Ces protofibrilles forment ainsi la base de la formation des dépôts de peptide A β sur laquelle viennent se fixer d'autres molécules A β ou d'autres protofibrilles (Walsh *et al*, 1999). Cette agrégation de peptide A β est donc ainsi

amplifiée, la formation des dépôts de peptide A β suivant ainsi le même procédé que la cristallisation.

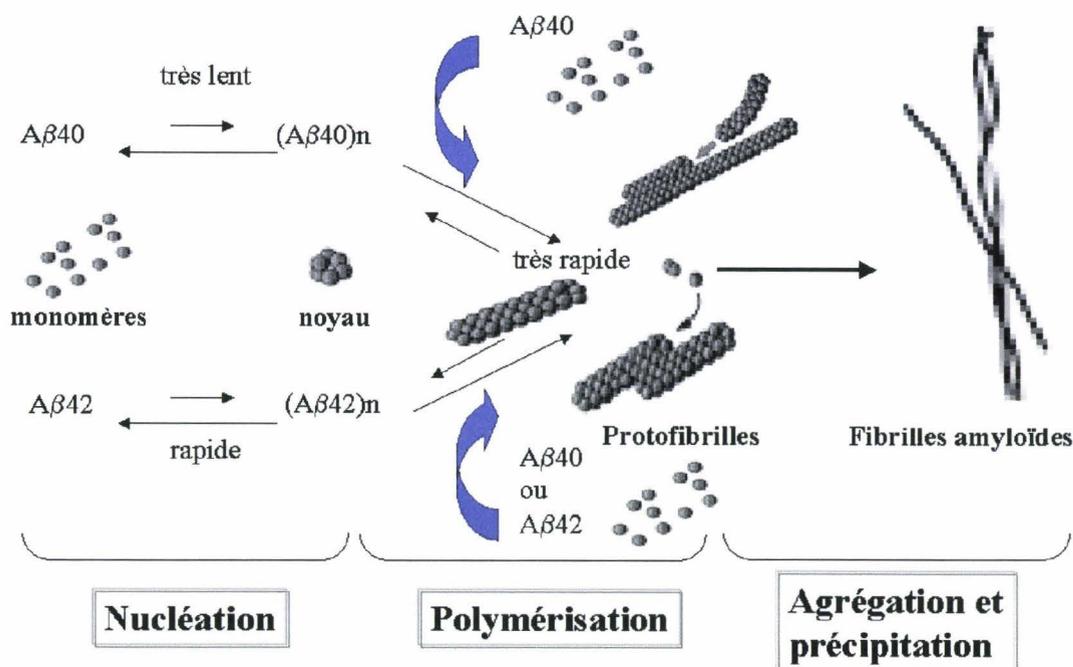


Figure 8: Représentation schématique du mécanisme de formation des fibrilles amyloïdes.

Le peptide A β sous la forme monomérique est en équilibre avec la forme dimérique. Lorsque cet équilibre est rompu, le peptide A β forme un noyau et le processus de polymérisation est ainsi engagé.

Il faut noter que la taille du peptide A β est un point critique dans la formation des fibrilles amyloïdes. En effet, A β 42(43), très rapide à se polymériser, intervient ainsi dans la nucléation et sert d'ancrage au peptide A β 40 qui vient se fixer de façon très stable (Jarrett *et al*, 1993; Jarrett & Lansbury, 1993).

Une autre hypothèse expliquant la formation des dépôts de peptides amyloïdes vient de l'observation de la capacité de certaines métalloprotéases à dégrader le peptide A β lorsqu'elles sont activées (Roher *et al*, 1994; Mentlein *et al*, 1998). Or, il semblerait que la forme

latente d'enzyme telle que la MMP-9 (Matrix Metalloproteinase-9) est augmentée chez les patients atteints de la MA (Backstrom *et al*, 1996). De plus, la région C-terminale de l'APP (439-671) présente un domaine inhibiteur de métalloprotéase (Miyazaki *et al*, 1993). Il est donc possible que l'absence d'activation de ces enzymes contribue à l'accumulation de peptides A β au niveau des plaques séniles.

I.3.2.6 Toxicité du peptide A β

Puisque la forme amyloïde soluble n'est pas toxique en elle-même, le dépôt de substance amyloïde serait responsable de la mort neuronale. Cependant, son mécanisme d'action dans la pathogenèse de la MA n'est pas encore déterminé. Plusieurs études ont montré différents mécanismes par lesquels la production de peptide A β conduirait à la neurotoxicité. Ces différentes hypothèses suggèrent souvent un rôle indirect du peptide A β . Celui-ci activerait le métabolisme oxydatif, le mécanisme de réponse inflammatoire ou encore le système lysosomal, chacun entraînant une détérioration du neurone. En effet, le peptide A β déstabilise l'homéostasie du calcium, ce qui rend le neurone vulnérable à toute attaque environnementale (Mattson *et al*, 1992). De plus, cette rupture de l'équilibre calcique peut aussi conduire à une augmentation localisée de l'activité de l'AChE, impliquée dans la perte des fonctions cognitives (Sberna *et al*, 1997). Une augmentation des produits glycatés étant observée au niveau des dépôts de substance amyloïde (Vitek *et al*, 1994), la glycation du peptide amyloïde pourrait être mise en cause dans la mort neuronale. En effet, le peptide A β glycaté augmente le recrutement des cellules microgliales, impliquées dans la réponse

inflammatoire (Dickson *et al*, 1996). De même, il active la réponse astrocytaire (Pike *et al*, 1994).

D'autres expériences montrent un effet plus direct du peptide A β qui induirait l'apoptose ou la nécrose du neurone, par altération de l'équilibre homéostasique du calcium ou par augmentation de la production de radicaux libres (Sabbagh *et al*, 1997).

Toutes ces hypothèses sont possibles et ne sont pas exclusives, car pour aucune d'elle, jusqu'à présent, la preuve d'un mécanisme unique d'action neurotoxique du peptide A β dans la MA n'a été apportée. Il est aussi possible que la mort neuronale soit la résultante du cumul de ces différents processus.

Il faut noter que la neurotoxicité du peptide A β semblerait plutôt être une réponse pathologique du vieillissement cérébral puisqu'il a été montré que, sous sa forme fibrillaire, il est toxique dans le cerveau des singes de type Rhésus uniquement lorsque ces derniers présentent déjà un certain âge (Geula *et al*, 1998).

I.3.3 Les protéines Tau

I.3.3.1 Les protéines Tau normales

I.3.3.1.a Les différentes isoformes

Le gène de la protéine Tau se trouve sur le chromosome 17 (Neve *et al*, 1986) et contient 15 exons dont 11 interviennent dans la production de la protéine (Andreadis *et al*, 1992) dans le cerveau humain adulte. Sa transcription aboutit à la formation de 6 isoformes (Goedert & Jakes, 1990) qui diffèrent dans la partie amino-terminale et aussi dans la partie de la molécule se fixant à la tubuline (voir figure 9A). Cette variation est due à l'insertion de 29 (exon 2) ou 58 (exons 2+3) acides aminés en position N-terminale (Goedert *et al*, 1989a) et aussi à la présence ou l'absence de l'exon 10 de l'ARN messager de Tau (Goedert *et al*, 1989b), qui se traduit par une modification du nombre de séquences répétitives en position C-terminale.

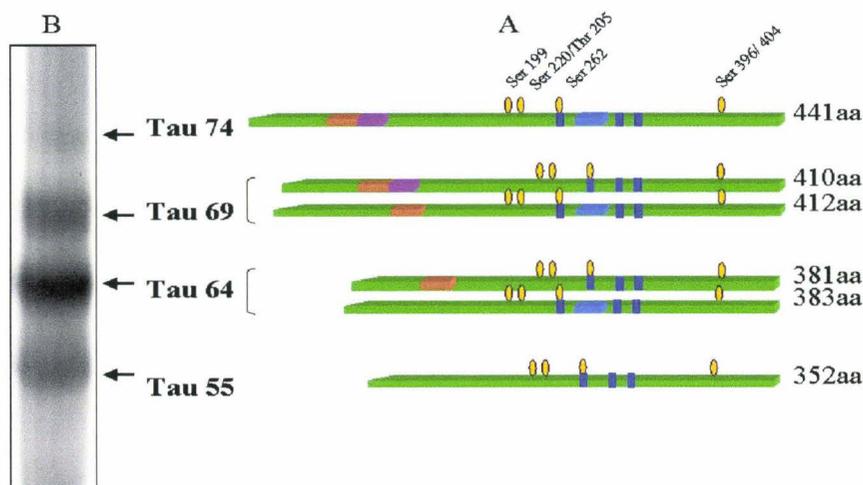


Figure 9: Les différentes isoformes des protéines Tau.

A: Représentation schématique des isoformes de la protéine Tau présentes au niveau du système nerveux central. Le nombre d'acides aminés est précisé pour chacune d'elles; B: Profil électrophorétique des protéines Tau-PHF séparées sur un gel de polyacrylamide de 10% en présence de SDS. Le poids moléculaire des bandes correspondantes aux protéines Tau-PHF est indiqué en kDa; ■ Domaine de liaison aux microtubules; ■ Exon 2; ■ Exon 3; ■ Exon 10; ○ Site d'hyperphosphorylation.

La distinction de ces 6 isoformes de la protéine Tau est ainsi possible en fonction de leur masse moléculaire apparente (Goedert & Jakes, 1990). La complexité de ces différentes isoformes est ensuite accentuée par l'étape de maturation qui consiste, entre autre, à la phosphorylation de sites spécifiques de la protéine (Cleveland *et al*, 1977a). L'état de phosphorylation des protéines Tau est en effet critique, car il est impliqué dans la régulation de leur fonction biologique (Lindwall & Cole, 1984a). Il intervient, par exemple, dans la modulation de l'aptitude des protéines à se lier aux microtubules (Lindwall & Cole, 1984b ; Brugg & Matus, 1991; Garver *et al*, 1996), à s'auto-assembler (Guttmann *et al*, 1995) ou à réguler le transport axonal des organelles (Sato-Harada *et al*, 1996).

1.3.3.1.b Fonctions biologiques des protéines Tau

Les protéines Tau contribuent, de façon indirecte au transport axonal en permettant l'acheminement des vésicules et organelles, du noyau vers la synapse. En effet, elles participent à la formation et à la stabilisation des microtubules, structures cellulaires qui interviennent dans le transport des nutriments du corps cellulaire tout au long des axones, ainsi qu'à la division des cellules (Weingarten *et al*, 1975; Cleveland *et al*, 1977a; Cleveland *et al*, 1977b). En se fixant aux molécules de tubuline, les protéines Tau favorisent ainsi leur polymérisation qui conduit à la formation des microtubules.

Une action plus directe, par régulation des protéines qui servent de moteurs dans le transport des organelles le long des microtubules, est aussi suggérée (Johnson & Hartigan, 1998). Des études plus récentes indiquent que les protéines Tau joueraient également un rôle dans d'autres mécanismes, tels que la croissance et la polarisation des neurites, la

transduction des signaux neuronaux et peut-être même l'interaction membranaire des microtubules avec le plasma (Johnson & Jenkins, 1996; Johnson & Hartigan, 1998).

I.3.3.2 Les protéines Tau dans la maladie d'Alzheimer

Un triplet caractéristique de protéines Tau pathologiques (Tau-PHF), accompagné d'une bande additionnelle plus faible, peut être purifié à partir des PHF extraites du cerveau de patients atteints de la MA (Mulot *et al*, 1994; Delacourte *et al*, 1998). Ces protéines se distinguent par leur masse moléculaire qui varie de 55 à 74KDa et correspondent aux 6 protéines Tau normales ayant subi des modifications post-traductionnelles (Flament & Delacourte, 1989; Flament *et al*, 1989; Goedert *et al*, 1989b; Lee *et al*, 1991) (voir figure 9B). Ces protéines Tau-PHF sont en effet hyperphosphorylées (Flament *et al*, 1990; Goedert *et al*, 1992; Ksiazak-Reding *et al*, 1992; Trojanowski *et al*, 1996) au niveau des sites intervenant dans la liaison à la tubuline (Biernat *et al*, 1993; Bramblett *et al*, 1993). D'autres modifications, observées de façon spécifique au niveau des protéines Tau-PHF sont la glycation (Ledesma *et al*, 1994) et la **glycosylation** (Wang *et al*, 1996; Takahashi *et al*, 1999), ici aussi, au niveau des sites de fixation avec la tubuline. Ces protéines Tau-PHF sont de ce fait, incapables de se lier aux microtubules, occasionnant ainsi la perte neuronale.

L'hyperphosphorylation des protéines Tau est corrélée avec leur présence dans les PHF (Grundke-Iqbal *et al*, 1986; Flament *et al*, 1990; Lee *et al*, 1991), sans en être la cause principale. En effet, cette phosphorylation anormale des tau-PHF n'augmente pas leur capacité à s'agréger (Schneider *et al*, 1999), mais elle diminue leur compétence à se lier aux microtubules (Lu & Wood, 1993; Garver *et al*, 1996; Tseng *et al*, 1999). De plus, elle leur donne

l'aptitude de séquestrer les protéines Tau normales en filaments et aussi de désassembler les microtubules (Alonso *et al*, 1996). Ce sont ces formations filamenteuses qui sont sensibles à la glycation (Ledesma *et al*, 1994) et la glycosylation (Takahashi *et al*, 1999). Ces modifications biochimiques favoriseraient leur évolution en structure PHF (Ledesma *et al*, 1995), puis/ou leur agrégation et maintiendraient la stabilité des formations PHF (Wang *et al*, 1996; Ledesma *et al*, 1998).

Tout récemment, une étude sur l'enzyme Pin1 (Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomérase) présentait une autre possibilité de contribution des Tau-PHF dans la perte neuronale (Lu *et al*, 1999). En effet, ce régulateur mitotique semble se lier et réguler la fonction des protéines Tau cérébrales phosphorylées. Cependant, la concentration de la forme soluble de cette enzyme est largement diminuée dans le cerveau des patients atteints de la MA, car elle est séquestrée dans les lésions de type dégénérescence neurofibrillaire de par son affinité pour les protéines Tau-PHF. Selon les auteurs, cette diminution de Pin1 chez les patients atteints de la MA pourrait contribuer à la perte neuronale puisque sa déplétion entraîne la mort cellulaire par apoptose (Lu *et al*, 1996).

I.3.3.3 Phosphorylation pathologique

I.3.3.3.a Implication des phosphatases

La raison pour laquelle les protéines Tau sont anormalement phosphorylées chez les malades atteints de la MA n'est pas encore établie avec certitude, mais elle peut provenir d'un problème de balance entre les niveaux des phosphatases et/ou des kinases. En effet, les niveaux de phosphatases, telles que PP2A (Type 2A Phosphoprotein Phosphatase), sont largement diminués dans le tissu cérébral de sujets atteints de la MA (Gong *et al*, 1993), or elles font parties des enzymes capables de déphosphoryler les protéines Tau-PHF (Gong *et al*, 1995; Garver *et al*, 1996). De plus, des études réalisées chez le rat montrent que l'inhibition de l'activité de l'enzyme PP2A conduirait à l'apparition de structures de type PHF et de dépôts de substance amyloïde (Arendt *et al*, 1995).

I.3.3.3.b Implication des kinases

De même, une augmentation des niveaux de GSK-3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β) cérébrale est détectée chez des patients atteints de la MA (Pei *et al*, 1997). Cependant, d'autres études décrivent une diminution corrélée avec le nombre de lésions de type dégénérescence neurofibrillaire (Baum *et al*, 1996). Cette enzyme est particulièrement intéressante car, tout comme les MAPK (Microtubule Associated Protein Kinase) et MARK (MAP Affinity-Regulating Kinase), elle phosphoryle les protéines Tau aux sites critiques intervenant dans la liaison aux microtubules (Mandelkow *et al*, 1995; Song & Yang,

1995; Tseng *et al*, 1999) et est retrouvée au niveau des lésions de type dégénérescence neurofibrillaire (Yamaguchi *et al*, 1996). Cependant, son action ne montre pas d'augmentation du nombre des formations PHF (Liu & Yen, 1996). Au contraire, elle empêcherait l'agrégation de ces protéines ainsi phosphorylées (Schneider *et al*, 1999).

I.3.3.3.c Implication du peptide A β

La déstabilisation de la concentration calcique due au peptide A β est aussi mise en cause puisque la phosphorylation des protéines Tau peut être contrôlée par le calcium intracellulaire. La perturbation de l'homéostasie du calcium causerait une augmentation inappropriée de l'activité de certaines protéines kinases, telles que la GSK-3 β , qui contribuent à l'hyperphosphorylation des protéines Tau (Busciglio *et al*, 1995; Hartigan & Johnson, 1999). En effet, le traitement de cellules neuronales de rat avec le peptide A β produit une activation de la GSK-3 β et ainsi une augmentation de la phosphorylation des protéines Tau (Takashima *et al*, 1998a; Zheng-Fischhofer *et al*, 1998). Ceci conforte l'hypothèse selon laquelle la formation des lésions de type dégénérescence neurofibrillaire pourrait être une conséquence de la formation des dépôts de substance amyloïde dans la MA.

I.3.3.3.d Implication des protéoglycannes

Un autre type de molécules mises en cause dans le développement de la dégénérescence neurofibrillaire sont les protéoglycannes. Leur présence est en effet observée au sein même de ces lésions (Perry *et al*, 1991). De plus, une augmentation cytoplasmique de

glycosaminoglycannes sulfate telles que l'héparane sulfate, peut déclencher l'hyperphosphorylation des protéines Tau non-phosphorylées, voire leur évolution en structure PHF (Yang *et al*, 1994; Goedert *et al*, 1996; Hasegawa *et al*, 1997).

I.3.4 L'apolipoprotéine E

I.3.4.1 Les différentes isoformes

Le gène de l'*ApoE*, localisé sur le chromosome 19, est constitué de quatre exons et produit trois formes protéiques majeures: E2, E3 et E4. Ces isoformes diffèrent uniquement au niveau des acides aminés en position 112 et 158 par des substitutions de résidus Arginine ou Cystéine (Weisgraber *et al*, 1981). Ces modifications de séquence déterminent des affinités différentes de l'ApoE pour les lipides et les récepteurs membranaires. En effet, les lipoprotéines associées à l'isoforme E4 sont dégradées plus rapidement par rapport à celles contenant l'isoforme E2 ou E3 (Davignon *et al*, 1988; Pablos-Mendez *et al*, 1997) et l'isoforme E2 a moins d'affinité pour le récepteur LDL que l'isoforme E3 ou E4 (Guillaume *et al*, 1996). Par contre, bien que la différence d'acides aminés entre les différentes isoformes ApoE se situe au niveau du site de liaison avec le LRP (Mahley, 1988), leur capacité à se fixer à ce récepteur ne varie pas considérablement (Weisgraber *et al*, 1982).

La fréquence de ces différentes isoformes varie selon les populations, néanmoins l'isoforme E3 reste la plus fréquente (Hallman *et al*, 1991).

I.3.4.2 Fonctions de l'apolipoprotéine E

La protéine ApoE est impliquée dans le métabolisme des lipoprotéines et le transport du cholestérol dans le sang. Pour cela, elle se fixe à différents récepteurs dont majoritairement le LRP, mais aussi le LDL-r et le VLDL-r (Mahley, 1988). Le mécanisme d'internalisation du complexe formé implique cependant une fixation des protéoglycannes de type héparane sulfate (Ji *et al*, 1993; Ji *et al*, 1994). La protéine ApoE joue ainsi un rôle de distribution et d'élimination des produits cellulaires, dont l'APP (Kounnas *et al*, 1995; Winkler *et al*, 1999).

Dans le système nerveux, l'ApoE est essentiellement synthétisée par les astrocytes (Boyles *et al*, 1985; Pitas *et al*, 1987), ainsi que les macrophages, en fonction de leur état d'activation (Werb & Chin, 1983a; Werb & Chin, 1983b). Durant le développement, le vieillissement ou après une lésion du système nerveux central, l'expression d'ApoE augmente considérablement; ce qui lui attribue aussi une fonction dans la croissance et la réparation des neurones (Poirier *et al*, 1991; Mouchel *et al*, 1995). La synthèse locale de l'ApoE dans le cerveau permet ainsi la récupération et la redistribution immédiate des lipides et du cholestérol.

I.3.4.3 Implication dans la maladie d'Alzheimer

Dans la MA, l'ApoE a été très rapidement considérée comme contribuant au développement de la maladie, car elle est retrouvée dans les plaques séniles, ainsi que dans les lésions de type dégénérescence neurofibrillaire (Namba *et al*, 1991; Wisniewski & Frangione,

1992). De plus, son implication génétique dans l'apparition de la MA est maintenant bien établie (voir paragraphe *I.4.2.2.a*).

I.3.4.3.a Niveaux d'expression

La production de protéines ApoE est largement augmentée par les cellules gliales (Uchihara *et al*, 1995; Roses, 1996) et les astrocytes activés (Diedrich *et al*, 1991; Rebeck *et al*, 1993) chez les personnes affectées par la maladie. En effet, les taux d'ARNm de l'*ApoE* sont plus élevés dans le cerveau des malades par rapport aux témoins (Diedrich *et al*, 1991; Yamada *et al*, 1995). Toutefois, les résultats sur les taux d'ApoE dans le liquide céphalorachidien sont controversés: certains groupes montrent une augmentation des niveaux (Merched *et al*, 1997), d'autres présentent une diminution (Landen *et al*, 1996; Skoog *et al*, 1997) et d'autres encore n'observent aucun changement (Lefranc *et al*, 1996; Pirttila *et al*, 1996). Les concentrations d'ApoE sembleraient, cependant, être diminuées inversement à la sévérité de la démence (Skoog *et al*, 1997), alors qu'une augmentation est observée dans le liquide céphalorachidien lors du vieillissement normal (Blain *et al*, 1997). Ceci appuie l'hypothèse que l'ApoE agirait à l'encontre du développement de la maladie (Yamada *et al*, 1995).

I.3.4.3.b Interaction avec le peptide A β

De par son interaction avec le peptide A β , plusieurs hypothèses sur le rôle de l'ApoE dans la formation des plaques amyloïdes ont été proposées.

L'ApoE pourrait intervenir dans l'élimination du peptide A β , grâce à sa capacité à le fixer, pour l'amener à être dégradé par la cellule, via le récepteur LRP (Rebeck *et al*, 1993; Kounnas *et al*, 1995). Cependant, l'affinité du variant E4 pour le peptide A β est plus faible que celle des isoformes E2 et E3 (LaDu *et al*, 1994; Zhou *et al*, 1996; Aleshkov *et al*, 1997; Yang *et al*, 1997) et le complexe formé est très insoluble (Strittmatter *et al*, 1993; Sanan *et al*, 1994; Wisniewski *et al*, 1994). Ainsi, ce variant ApoE pourrait donc accélérer la formation des dépôts de substance amyloïde en favorisant la formation de fibrilles amyloïdes et leur précipitation (Ma *et al*, 1994; Castano *et al*, 1995). En effet, les patients atteints de la MA et porteurs de l'isoforme ApoE4 présentent un nombre plus important de dépôts de substance amyloïde dans le cerveau par rapport à ceux possédant un autre variant ApoE (Schmechel *et al*, 1993; Nicoll *et al*, 1995; Oyama *et al*, 1995; Pirttila *et al*, 1997).

Alternativement, la présence des plaques amyloïdes pourrait être due à une diminution de la capacité de l'ApoE4 à éliminer le peptide A β lors de l'internalisation du complexe amyloïde-ApoE4 (Rebeck *et al*, 1993; Beffert *et al*, 1999). Effectivement, la capacité de l'ApoE4 à éliminer le peptide A β en culture neuronale est moins efficace que celle du variant E3 (Beffert *et al*, 1999). Par contre, lorsque qu'une copie d'*ApoE* humaine (E3 ou E4) est exprimée par des souris transgéniques susceptibles de développer des caractéristiques de la MA, le cerveau des souris montre une diminution du nombre de plaques amyloïdes par rapport aux souris n'exprimant pas d'ApoE (Holtzman *et al*, 1999). Lorsque les souris possèdent leur propre copie d'*ApoE*, la précipitation du peptide A β est aussi dramatiquement réduite (Bales *et al*, 1997). Ces divergences inter-espèces proviennent peut-être d'une différence d'interaction de l'ApoE avec le peptide A β . A moins qu'il n'existe

une différence d'interaction du complexe ApoE-amyloïde avec les protéoglycannes de type héparane sulfate ou une différence d'affinité pour les récepteurs de l'ApoE.

I.3.4.3.c Interaction avec la protéine Tau

Une autre propriété de l'ApoE est sa capacité à se lier aux protéines Tau (Strittmatter *et al*, 1994b), avec cependant une affinité différente en fonction des isoformes ApoE; celle de l'ApoE3 étant la plus forte (Strittmatter *et al*, 1994a ; Fleming *et al*, 1996; Roses, 1996). L'ApoE se fixe spécifiquement dans la région impliquée dans la formation des PHF, région sensible à l'hyperphosphorylation (Strittmatter *et al*, 1994b; Fleming *et al*, 1996). Il est donc suggéré que l'ApoE protégerait les protéines Tau contre toute transformation pathologique (Genis *et al*, 1995; Huang *et al*, 1995) et empêcherait ainsi la formation des PHF (Huang *et al*, 1995). Cependant, il est à noter que les protéines Tau sont trouvées dans le cytoplasme, alors que l'ApoE se localise au niveau des vésicules d'endocytose dans les neurones. Des études *in vitro* montrent, en effet, l'aspect toxique de cette molécule au niveau du cytosol (DeMattos *et al*, 1999). L'interaction Tau-ApoE est donc très improbable; à moins que l'intégrité cellulaire soit compromise et alors l'ApoE peut être colocalisée avec les protéines Tau (Alberts *et al*, 1995).

Une autre possibilité d'action de l'ApoE sur les protéines Tau serait au niveau de la surface cellulaire. En effet, l'ApoE affecterait des voies de signalisation, associées à la concentration en calcium, qui pourraient augmenter l'activité des phosphatases de type 2A et 2B (Wang *et al*, 1998a). En perturbant ces voies de transduction, l'ApoE pourrait donc conduire à la déphosphorylation des protéines Tau.

I.3.4.3.d Réparation neuronale

Différentes études ont montré que l'allèle $\epsilon 4$ est souvent associé à une mauvaise récupération neuronale après une lésion (Alberts *et al*, 1995; Nicoll *et al*, 1995; Jordan *et al*, 1997), ainsi qu'à une diminution du métabolisme cérébral du glucose aussi bien chez les personnes atteintes de la MA (Kennedy *et al*, 1995; Reiman *et al*, 1996), que chez leurs apparentés (Small *et al*, 1995). Toutefois ces données sont controversées (Corder *et al*, 1997). Il est cependant possible que l'isoforme ApoE4 soit moins efficace dans son rôle de réparation neuronale (Nathan *et al*, 1994) et qu'elle joue ainsi un rôle dans la perte neuronale observée chez les patients atteints de la MA. En effet, l'expression d'une copie de l'ApoE $\epsilon 4$ humaine chez la souris manquant sa propre copie du gène, est plus susceptible à la neurodégénérescence que celle porteuse d'une copie de l'ApoE $\epsilon 3$ (Buttini *et al*, 1999).

I.3.5 Autres composants des lésions de type Alzheimer

De nombreuses autres molécules sont retrouvées au niveau des lésions caractéristiques de la MA et sont ainsi des facteurs potentiels impliqués dans le développement de cette pathologie. Des hypothèses de mécanismes fonctionnels sont suggérées pour quelques-unes de ces protéines.

I.3.5.1 Les présénilines

Les gènes des présénilines sur le chromosome 14 (Sherrington *et al*, 1995) et le chromosome 1 (Levy-Lahad *et al*, 1995) codent respectivement les protéines préséniline I (PS-I) et préséniline II (PS-II). Ces molécules renferment 7 à 10 domaines transmembranaires et possèdent plus de 67% d'homologie entre elles (Nakai *et al*, 1999). Dans le cerveau, PS-I et PS-II sont exprimées au niveau des neurones de façon prédominante (Cook *et al*, 1996; Kovacs *et al*, 1996; Lee *et al*, 1996), pour être rapidement clivées par les présénilinasés au niveau de la grande boucle cytoplasmique (Thinakaran *et al*, 1996; Ward *et al*, 1996; Kim *et al*, 1997a). Ces fragments ainsi formés restent liés de façon non-covalente afin de pouvoir activer leurs fonctions biologiques (voir figure 10). Ces protéines joueraient un rôle dans la voie du signal Wnt intervenant dans le développement et les fonctions neuronales et impliquant la β -caténine (Hartmann *et al*, 1997a; Hong *et al*, 1999), ainsi que dans la mort cellulaire programmée impliquant la protéine Notch (Vito *et al*, 1996). Leur mode d'action dans ces mécanismes n'est pas encore bien déterminé, néanmoins des hypothèses sont suggérées. En effet, PS-I se fixe à la β -caténine (Zhang *et al*, 1998) qui, ainsi activée, régulerait la transduction des signaux au niveau de la voie Wnt. De même, PS-I serait indispensable au clivage du récepteur Notch (Struhl & Greenwald, 1999; Ye *et al*, 1999), qui libère alors les signaux nucléaires intervenant dans la régulation de la transcription. Tout dérèglement des fonctions de Notch ou de la β -caténine conduit à l'augmentation de la vulnérabilité neuronale à l'apoptose.

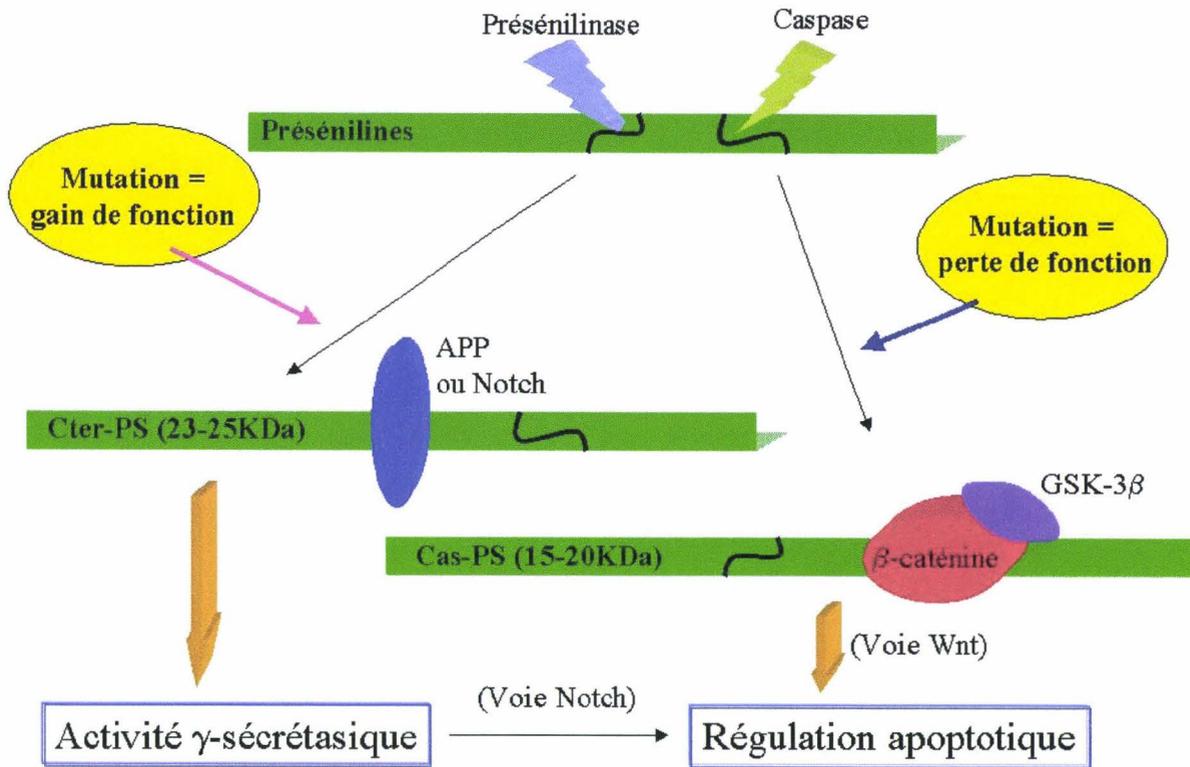


Figure 10: Les différentes voies d'action des présénilines et conséquences de leurs mutations.

Cter-PS: fragment C-terminal obtenu après clivage de la préséniline par la présénilinase; **Cas-PS:** fragment C-terminal obtenu après clivage de la préséniline par la caspase. Les poids moléculaires de ces fragments sont respectivement indiqués entre parenthèses pour PS-I et PS-II.

Une observation intéressante est celle de l'inhibition de la protéolyse de Notch par des répresseurs de γ -sécrétases (De Strooper *et al*, 1999), suggérant ainsi l'implication de PS-I au niveau de cette activité enzymatique, à moins que PS-I soit elle-même une γ -sécrétase. Cette hypothèse est soutenue par la démonstration de l'interaction des présénilines avec l'APP au niveau du réticulum endoplasmique (Weidemann *et al*, 1997; Xia *et al*, 1997) et de leur présence indispensable pour le clivage de cette dernière par la γ -sécrétase (De Strooper *et al*, 1998). L'inhibition de la formation de peptide A β lorsque PS-I est muté au niveau de sites potentiellement critiques pour sa fonction, appuierait l'idée de considérer les présénilines comme ayant des activités γ -sécrétasiques (Wolfe *et al*, 1999).

PS-II interviendrait essentiellement au niveau de la régulation de l'apoptose. En effet, après clivage par la présénilase, le fragment C-terminal (Cter-PS) formé possède une activité anti-apoptotique (Kim *et al*, 1997b; Vito *et al*, 1997; Walter *et al*, 1999); alors que le fragment C-terminal obtenu après clivage par une caspase (Cas-PS) aurait un effet plutôt activateur de l'apoptose (Kim *et al*, 1997b). Cette enzyme intervient dans l'élimination des présénilines n'ayant pas subi le clivage par les présénilases (Kim *et al*, 1997b). Tout dérèglement de cet équilibre aura donc des conséquences sur le métabolisme et le cycle de vie cellulaire.

Une autre propriété de PS-I serait sa capacité à réguler l'activité de la GSK-3 β qui contrôle la phosphorylation de la β -caténine ainsi que celle des protéines Tau. En effet, les molécules de β -caténine et de GSK-3 β se fixent sur PS-I lors du mécanisme de l'apoptose (Takashima *et al*, 1998b). Le changement d'un seul acide aminé de PS-I suffirait alors à dérégler l'activité de cette kinase, qui augmenterait de ce fait la phosphorylation des protéines Tau en défaveur de celle de la β -caténine (Takashima *et al*, 1998b; Lucas, 1999; Weihl *et al*, 1999). Ceci représente une nouvelle voie susceptible de conduire à l'hyperphosphorylation observée dans les protéines Tau pathologiques, ainsi que l'augmentation de la vulnérabilité neuronale à l'apoptose due à la perte d'activité de la β -caténine.

L'implication des présénilines pathologiques dans le développement de la MA est, par conséquent indiscutable (Cruts & Van Broeckhoven, 1998; Nishimura *et al*, 1999), que ce soit au

niveau de l'augmentation de la production de peptide A β ou de celle de l'apoptose. Cependant, leur mode d'action est encore sous investigation. Il faut aussi noter que l'expression de PS-I et PS-II au niveau du cerveau ne varie pas chez les patients atteints de la MA par rapport aux témoins (Kovacs *et al*, 1996; Benkovic *et al*, 1997; Hendriks *et al*, 1997)

I.3.5.2 Les protéoglycannes

Les protéoglycannes sont des macromolécules constituées d'un axe protéique sur lequel des chaînes polysaccharides (glycosaminoglycannes ou GAG) sont liées de façon covalente. Elles sont impliquées dans un ensemble de processus physiologiques fondamentaux tels que la régulation de la croissance neuritique (Lander *et al*, 1982), la formation de la matrice extracellulaire (Dow *et al*, 1991) et l'activité de facteurs de croissance (Ruoslahti & Yamaguchi, 1991). Elles sont également associées aux dépôts de substance amyloïde et à la dégénérescence neurofibrillaire observés dans la MA (Snow *et al*, 1988; Snow *et al*, 1990; Perry *et al*, 1991; Su *et al*, 1992).

Le Perlécane et les protéoglycannes de type héparane sulfate sont les formes majeures de protéoglycannes identifiées dans les plaques amyloïdes dès l'apparition des formes diffuses (Snow *et al*, 1990). Ces dernières se fixent très intimement à l'APP (Narindrasorasak *et al*, 1995) et pourraient donc ainsi intervenir dans la pathogenèse de la MA. Leur mode d'action n'est pas bien déterminé, cependant, différentes études suggèrent qu'elles puissent agir en augmentant le clivage de l'APP par la voie amyloïdogénique (Baskin *et al*, 1992;

Leveugle et al, 1997). En effet, les protéoglycannes de type héparane sulfate se fixeraient sur l'APP de telle façon qu'elle serait protégée contre le clivage par l' α -sécrétase.

Un autre mécanisme d'action des protéoglycannes dans le développement de la MA pourrait être aussi au niveau de l'agrégation du peptide A β . En effet, les protéoglycannes de type héparane sulfate sont capables de se fixer au peptide A β (**Buée et al, 1993a; Buée et al, 1993b**) et le Perlécane accélérerait et maintiendrait la formation des fibrilles de peptides A β (**Snow et al, 1994; Castillo et al, 1997**). Ces protéines seraient donc susceptibles d'intervenir dans la formation des dépôts de peptide A β (**Leveugle et al, 1997**).

De même, les protéoglycannes de type héparane sulfate participeraient à la formation des lésions de type dégénérescence neurofibrillaire en déstabilisant la liaison des protéines Tau aux microtubules et en favorisant leur phosphorylation (**Goedert et al, 1996**).

I.3.5.3 Les facteurs inflammatoires

Dans le cerveau des malades atteints de la MA, un grand nombre de médiateurs inflammatoires et de composés de la cascade du complément sont retrouvés colocalisés au niveau des lésions neuronales. Cette réponse inflammatoire serait induite par la formation des fibrilles amyloïdes et semblerait être impliquée dans la mort neuronale. En effet, le peptide A β stimulerait l'activation des cellules microgliales (**Chao et al, 1998**) et des astrocytes (**Pike et al, 1994**), qui eux même stimuleraient la production du peptide A β

(Donnelly *et al*, 1990; Rogers *et al*, 1999) et des protéines associées au niveau des plaques séniles (Das & Potter, 1995; Sheng *et al*, 1996; Nilsson *et al*, 1998).

Des études montrent que le peptide A β active les cellules microgliales (Meda *et al*, 1995; Chong, 1997; Scali *et al*, 1999) et aussi la cascade du complément (Rogers *et al*, 1992; Meda *et al*, 1995). Or, le composé C1q du complément favorise l'agrégation du peptide A β (Jiang *et al*, 1994; Webster *et al*, 1995; Webster & Rogers, 1996), favorisant ainsi sa nucléation. De plus, la cascade du complément aboutissant à la formation du Complexe d'Attaque Membranaire (CAM), l'activation des cellules microgliales résulterait aussi à une perte neuronale, par la formation de pores membranaires par le composé CAM (Yasojima *et al*, 1999).

Les cellules microgliales activées sécrètent aussi d'autres facteurs afin de recruter d'autres cellules pour intervenir dans la dégradation du peptide A β , amplifiant ainsi la réponse inflammatoire, mais accentuant certainement de la sorte la formation des dépôts de substance amyloïde. Cette hypothèse est appuyée par la démonstration de l'effet neurodégénératif de l'IL-6 en production continue chez la souris (Campbell *et al*, 1993), mais aussi par l'association de la forme C de l'IL-6, dont l'activité est réduite, avec une diminution du risque de développer la MA (Papassotiropoulos *et al*, 1999).

En stimulant de façon continue microglies et astrocytes, le peptide A β maintiendrait donc ainsi une stimulation chronique de la réponse inflammatoire, conduisant à la formation des plaques neuritiques, mais aussi à la perte neuronale.

Les cellules microgliales sont aussi retrouvées activées au niveau de la dégénérescence neurofibrillaire (Ikeda *et al*, 1992; Perlmutter *et al*, 1992; DiPatre & Gelman, 1997; Kobayashi *et al*, 1998), mais il n'est pas encore déterminé si elles jouent un rôle dans la formation de ces lésions (DiPatre & Gelman, 1997).

I.3.5.4 Les facteurs de la phase aiguë

L'augmentation de l'IL-6, sécrétée par les astrocytes, eux-mêmes activés par l'IL-1 provenant des cellules microgliales (Griffin *et al*, 1989), conduit à une production astrocytaire et neuronale de protéines de la phase aiguë (Northemann *et al*, 1983; Ganter *et al*, 1991; Cotman *et al*, 1996) telles que l'A2M et l'ACT. La concentration de ces deux molécules est ainsi augmentée dans le cerveau des personnes atteintes de la MA (Wood *et al*, 1993; Ma *et al*, 1996) et elles sont retrouvées essentiellement au niveau des plaques neuritiques (Abraham *et al*, 1988; Strauss *et al*, 1992; De Strooper & Van Leuven, 1993; Van Gool *et al*, 1993). Elles ne semblent donc pas intervenir dans la formation des dépôts de substance amyloïde. Cette suggestion est appuyée par des études présentant la capacité de l'A2M à prévenir la formation fibrillaire du peptide A β (Hughes *et al*, 1998), ainsi que l'aptitude de l'ACT à dissoudre les fibrilles préformées et stables, mais aussi à inhiber la formation de fibrilles à partir du peptide A β 40 (Fraser *et al*, 1993; Eriksson *et al*, 1995). Ces facteurs de la phase aiguë pourraient donc intervenir afin d'éliminer les formations de substance amyloïde; une des fonctions normales de l'A2M étant certainement de participer à la dégradation et l'élimination de l'A β par endocytose à l'aide du récepteur LRP (Qiu *et al*, 1996; Du *et al*, 1997; Narita *et al*, 1997). Cependant, la forme amyloïde majeure présente au niveau des plaques séniles est de 42 acides aminés et d'autres études montrent un effet activateur de l'ACT sur la formation de fibrilles neurotoxiques à partir de cette forme longue du peptide A β (Ma *et al*, 1994; Ma *et al*, 1996). De plus, il faut noter que les expériences réalisées avec un peptide A β 40 "âgé" aboutissent aussi à une formation fibrillaire qui, après désagrégation chimique, produit des filaments amyloïdes dont la conformation est atypique, voire dégradée. Ces formations

pourraient donc peut-être être impliquées dans l'initiation des plaques neuritiques (Giulian, 1999).

Finalement, il faut noter que dans le système nerveux central l'A2M et l'ACT agissent essentiellement en tant qu'inhibiteurs de protéases. Ces facteurs de la phase aiguë pourraient donc être impliqués dans le métabolisme de l'APP qui est elle-même contrôlée par différentes sécrétases (Ganter *et al*, 1991). La présence de l'ACT et de l'A2M au niveau des plaques neuritiques peut donc être due à leur implication dans différents mécanismes (métabolisme de l'APP, élimination du peptide A β , formations des plaques séniles). Cependant, l'hypothèse la plus probable est certainement qu'elles sont simplement une marque de l'inflammation intense qui existe au niveau du cerveau des patients atteints de la MA: l'augmentation de leur concentration dans le cerveau conduit alors à leur implication dans la formation des plaques neuritiques.

I.3.5.5 Les récepteurs de l'ApoE

Parmi les récepteurs majeurs de l'ApoE retrouvés au niveau des plaques séniles se trouvent le LRP (LDL-receptor related protein) et le récepteur pour VLDL (lipoprotéines de très basses densités) (Rebeck *et al*, 1993; Tooyama *et al*, 1993; Ikeda *et al*, 1996). Au niveau du cerveau, ces molécules interviennent dans le transport des lipoprotéines pour la croissance et la maintenance des neurones (Holtzman *et al*, 1995; Ishiguro *et al*, 1995; Fagan *et al*, 1996). Ils ont une grande affinité pour l'ApoE liée aux lipoprotéines (Kowal *et al*, 1989), mais leur

internalisation nécessite d'abord une interaction de ce complexe avec les protéoglycannes de type héparane sulfate (Mahley, 1996; Al-Haideri *et al*, 1997).

Ces récepteurs sont retrouvés abondamment dans le cerveau des patients atteints de la MA et colocalisent avec l'ApoE (Rebeck *et al*, 1993; Lopes *et al*, 1994; Christie *et al*, 1996; Ikeda *et al*, 1996). De plus, ils sont capables d'internaliser les formes solubles et transmembranaires de l'APP (Kounnas *et al*, 1995; Knauer *et al*, 1996). Ceci suggère donc qu'ils interviennent afin d'éliminer le peptide A β par l'intermédiaire de l'ApoE et, par un mécanisme inconnu, ils se retrouveraient piégés dans les plaques séniles (voir figure 11a).

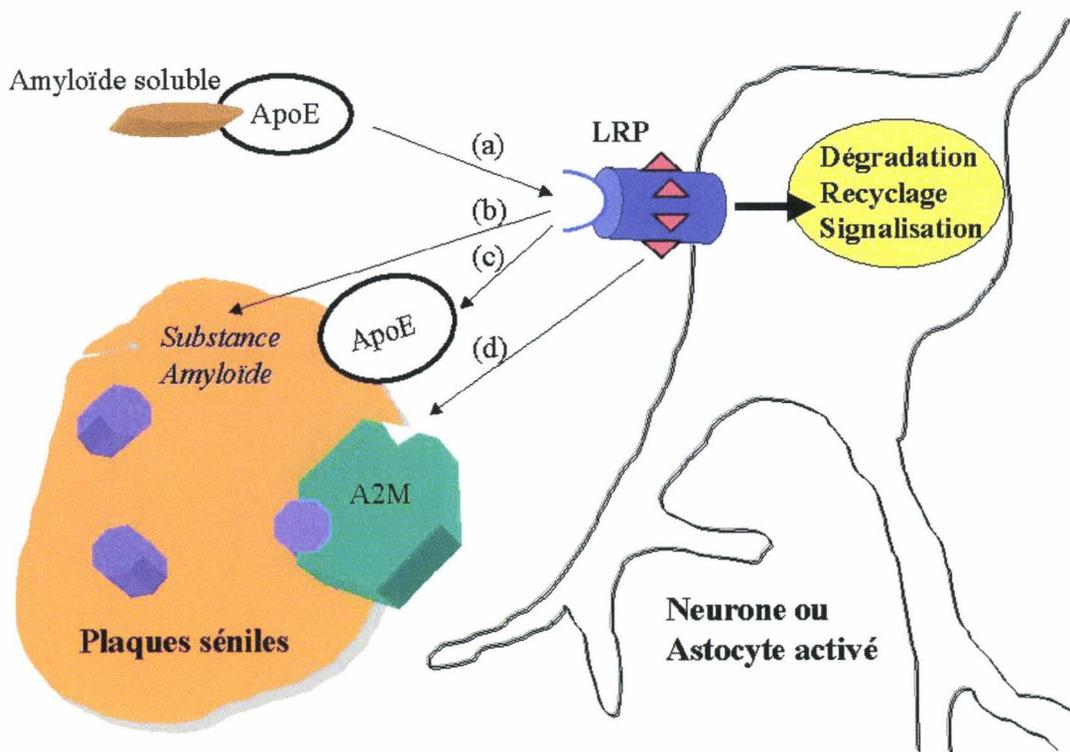


Figure 11: Hypothèses (a, b, c et d) d'intervention du LRP au niveau des plaques séniles.

◆ Protéinases; ▲ Site de fixation de l' $\alpha 2$ -macrogl obuline; ⤿ Site de de fixation de l'ApoE

Une autre hypothèse serait qu'ils se lient directement à l'ApoE agrégée avec le peptide A β (figure 11c) ou à tout autre ligand déjà piégé dans les plaques séniles (figure 11b). A moins qu'ils ne se lient à l'ApoE fixée au peptide A β soluble et qu'une accumulation de ce complexe, due à une déficience dans le mécanisme d'élimination, conduit à leur précipitation (figure 11a). Le fait que le LRP soit un récepteur multiligand rend aussi possible l'existence d'une compétition entre les complexes ApoE-amyloïde et α 2M-protéase pour leur liaison sur le LRP et leur élimination consécutive (Kounnas *et al*, 1995; Winkler *et al*, 1999). Il est cependant certain que l'intervention du LRP dans la pathogenèse de la MA n'est pas due à une défaillance dans sa capacité à fixer les différents ligands, car cette dernière n'est pas altérée (Rebeck *et al*, 1995).

Une autre possibilité d'intervention du LRP dans la MA pourrait venir de son affinité pour le ligand A2M activé qui est capable de fixer le peptide A β complexé à des protéinases (figure 11d) (Ashcom *et al*, 1990; Kounnas *et al*, 1995; Knauer *et al*, 1996). L'internalisation par le LRP des formes solubles ou transmembranaires de l'APP les rendraient ainsi vulnérables aux enzymes lysosomales et donc conduirait à une augmentation de la production du peptide amyloïdogénique. Ce qui est en accord avec l'idée que la concentration importante du peptide A β dans la MA n'est pas due à une augmentation de sa biosynthèse chez les cas sporadiques, mais provient d'un excès de production du peptide A β au niveau de la voie de dégradation de l'APP (Haass *et al*, 1992a; Haass *et al*, 1992b; Koo & Squazzo, 1994) ou d'une défaillance de son élimination.

Un nouveau récepteur de l'ApoE a récemment été identifié au niveau du cerveau: Le récepteur 2 de l'apolipoprotéine E (ApoE R2) (Kim *et al*, 1996). Celui-ci est aussi retrouvé en

concentration plus importante dans les neurones des malades atteints de la MA (Motoi *et al*, 1999). Cependant, ces données sont encore préliminaires et des études supplémentaires sont nécessaires avant de pouvoir déterminer si ce récepteur est mis en cause dans la MA. Toutefois, il est très probable que son mode d'intervention dans la pathologie, s'il existe, soit semblable à celui des autres récepteurs de l'ApoE.

1.3.6 Hypothèse de la cascade amyloïde

Vu les différents points étudiés précédemment, un mécanisme de formation des lésions peut être suggéré: l'hypothèse de la cascade amyloïde. Cette théorie propose un rôle pour le peptide A β comme élément principal et initiateur de la pathogenèse de la MA.

Dans cette hypothèse, la formation des plaques séniles résulterait d'une dérégulation du métabolisme de l'APP. Que ce soit le résultat d'un défaut génétique, un effet du vieillissement ou encore une réponse à une lésion neuronale, la production excessive du peptide A β ₄₂₍₄₃₎ semble être la partie déterminante dans la formation de ces lésions cérébrales. Dans chacun des cas, le système inflammatoire intervient très certainement, soit en favorisant l'agrégation des fibrilles amyloïdes ou en augmentant la formation du peptide A β , voire en stimulant la synthèse de l'APP, soit en attaquant les cellules saines avoisinantes. La stimulation continue de la réponse inflammatoire deviendrait nuisible au cerveau, favorisant la propagation de la pathologie.

De même, les molécules intervenant dans la dégradation du peptide A β joueraient, elles aussi, un rôle dans la propagation des lésions de type Alzheimer. Aussi bien les

protéoglycannes de type héparane sulfate, l'ApoE ou les récepteurs de l'ApoE qui sont nécessaires à l'internalisation du peptide A β , que les facteurs de la phase aiguë ou du complément qui interviennent pour essayer de l'éliminer. Tous semblent montrer une carence dans leur capacité à éliminer le peptide A β et stimuleraient sa formation par la voie amyloïdogénique.

En conclusion, cette cascade d'évènements aurait pour point de départ la nucléation primaire de fibrilles amyloïdes (plaque diffuse), qui stimulerait l'activation d'autres produits, instituant ainsi un cercle vicieux et conduisant à la formation des lésions caractéristiques de la MA: la formation de dépôts de substance amyloïde entraînant la dégénérescence neurofibrillaire puis la mort neuronale. Les différents éléments retrouvés dans les lésions seraient donc des facteurs amorçant et maintenant la propagation des lésions de type Alzheimer. Il faut noter toutefois que le peptide A β contient une région cytotoxique en elle-même (25-35) et qu'il est donc nuisible aux neurones à lui seul.

Une dernière remarque est qu'il existerait une différenciation entre les cas dits purement génétiques (familiaux à début précoce) chez lesquels le point initiateur de la pathologie serait l'augmentation de la production du peptide A β liée au métabolisme de l'APP et les cas dits pathologiques (ou tardifs) qui seraient plutôt le résultat d'une défaillance de l'élimination de l'APP dont la concentration augmente lors du vieillissement normal ou suite à une blessure du cerveau.

I.4 Facteurs modulant le développement de la MA

Plusieurs facteurs de susceptibilité liés au développement de la MA ont été identifiés tels que l'âge, le sexe, l'existence d'antécédents familiaux de démence ou encore des **mutations** génétiques. Néanmoins, la MA est très complexe et l'étiologie de la pathologie n'est pas encore complètement élucidée. De nombreuses études épidémiologiques sont donc réalisées sur différentes populations dans le but de mettre en évidence l'existence d'une association entre des facteurs de susceptibilité potentiels et la MA. Deux types d'études sont principalement utilisées dans ce but, les études d'association et les études de **liaison génétiques**. Ces deux méthodes, discutées plus loin dans le Chapitre II, consistent à comparer la distribution d'un facteur (**marqueur génétique**, marqueur biochimique ou élément environnemental) entre les personnes affectées par la maladie et des personnes non-affectées qui servent de témoins. Des calculs statistiques permettent de déterminer la probabilité que la présence de ce facteur soit associée à la pathologie.

I.4.1 Facteurs environnementaux

I.4.1.1 Facteurs de risque

L'augmentation de l'âge et l'existence d'antécédents familiaux sont des facteurs de risque importants clairement établis de la MA. En effet, après l'âge de 60 ans, la prévalence et l'incidence de la maladie doublent approximativement tous les 5 ans (**Jorm *et al*, 1987; Evans *et al*, 1989; Breteler *et al*, 1992b; Paykel *et al*, 1994**). De même, les descendants de familles contenant des membres affectés par la maladie possèdent un risque plus important de développer la maladie par rapport aux familles témoins (**Rao *et al*, 1996**).

Le genre semble aussi être un facteur de risque puisque la prévalence de la MA est plus élevée chez les femmes. Ces dernières auraient donc un risque plus important de développer la maladie, qui n'est pas dû à leur espérance de vie plus longue (**Rocca *et al*, 1991; Payami *et al*, 1996**).

L'existence d'un précédent de traumatisme crânien serait un autre facteur de risque pour la MA (**van Duijn *et al*, 1991; Mayeux *et al*, 1993; Roberts *et al*, 1994**). En effet, plusieurs études montrent la présence de dépôts diffus de peptide A β dans la zone corticale du cerveau après contusion (**Mayeux *et al*, 1995; Jordan *et al*, 1997**). Ces formations augmenteraient le risque de développer la maladie ultérieurement. Cette hypothèse est appuyée par l'observation de lésions de type Alzheimer au niveau des cerveaux de sportifs ayant subi de nombreuses contusions, tels que les boxeurs (**Geddes *et al*, 1999**). En effet, ces

individus développent très souvent une démence pugilistique qui partage des caractéristiques pathologiques avec la MA (Rudelli *et al*, 1982).

Finalement, des données plus récentes sur la circonférence du crâne suggèrent que la taille du cerveau joue aussi un rôle, plus ou moins indirect, dans le développement de la MA. Les cerveaux plus petits auraient moins de cellules nerveuses avec moins de connections synaptiques que les autres et la dégradation causée par les lésions neuronales apparaîtrait ainsi de façon plus précoce (Graves *et al*, 1996; Schofield *et al*, 1997).

I.4.1.2 Facteurs protecteurs

I.4.1.2.a Les œstrogènes

Chez les femmes ménopausées, les thérapies de remplacement des œstrogènes semblent diminuer le risque de développer la MA (Henderson *et al*, 1994; Paganini-Hill & Henderson, 1994; Ohkura *et al*, 1995; Paganini-Hill & Henderson, 1996). En effet, les œstrogènes ont des fonctions neurotrophiques qui seraient utiles pour lutter contre la maladie (Birge, 1996). De plus, elles augmentent l'activité de CAT dans la région frontale (Luine, 1985). Leur diminution chez les femmes ménopausées les prédisposerait donc à développer la MA. Le fait que les hommes aient une ressource moins limitée d'œstrogènes, grâce à la conversion de testostérone, les protégerait contre cette déficience d'œstrogènes.

Ces données pourraient rendre compte de la prévalence plus importante de la MA chez les femmes par rapport aux hommes.

I.4.1.2.b Tabagisme

La consommation de tabac serait aussi un facteur de protection contre la MA. En facilitant la fonction des récepteurs nicotiques, le tabac retarderait ainsi la déclaration des symptômes cliniques (Graves *et al*, 1991; van Duijn & Hofman, 1991; van Duijn *et al*, 1991). Cependant, des études plus récentes présentent des résultats opposés (Ott *et al*, 1998; Launer *et al*, 1999), avec toutefois un risque diminué chez les personnes ayant stoppé leur consommation par rapport aux actuels fumeurs (Merchant *et al*, 1999). Ces anciens fumeurs auraient ainsi peut-être acquis une protection supplémentaire, réduisant leur susceptibilité à développer la MA.

I.4.1.2.c Facultés intellectuelles

Un dernier facteur qui semblerait protéger de la maladie serait le niveau d'éducation, ou plus généralement, les occupations intellectuelles exercées par le patient durant sa vie adulte. Le cerveau ainsi stimulé aurait une densité synaptique plus importante dans les aires néocorticales associatives, ce qui augmenterait donc la quantité de neurones de réserve et retarderait ainsi l'apparition des symptômes de 4 à 5 ans (van Duijn *et al*, 1991; Katzman, 1993; Stern *et al*, 1994).

I.4.2 Facteurs génétiques

D'un point de vue génétique, la MA semble très complexe car le mode de développement de la pathologie est assez hétérogène, révélant ainsi un aspect multigénétique. En effet, alors que la MA se transmet de façon autosomique dans les formes familiales, elle résulte probablement de l'action synergique de facteurs génétiques et environnementaux dans les formes sporadiques. Aucune caractéristique clinique ou pathologique ne distingue ces deux formes, mis à part le fait que la forme familiale apparaisse très souvent à un âge précoce et présente généralement un développement plus prononcé de la maladie. Cette absence de caractéristique de distribution suggère que des facteurs distincts initient des mécanismes similaires conduisant à l'apparition de la même pathologie. La détermination du mode d'action des gènes mutés transmis dans les formes familiales pourrait donc apporter des hypothèses sur les mécanismes physiologiques qui sont altérés lors de la pathogenèse de la MA.

I.4.2.1 Les gènes mutés

Jusqu'à présent, des mutations pathogènes dans trois gènes différents sont impliquées dans l'apparition des formes autosomiques dominantes de la MA. Ces gènes sont l'*APP* et les *présénilines I* et *II* et sont responsables de la majorité des cas familiaux avec un âge précoce d'apparition de la maladie.

I.4.2.1.a Le chromosome 21

La recherche de gènes impliqués dans la MA s'est tout d'abord basée sur les données obtenues dans d'autres maladies neurodégénératives telles que la trisomie 21 et l'hémorragie cérébrale héréditaire avec amyloïdose. En effet, les personnes atteintes de trisomie 21 présentent des lésions neuropathologiques similaires à la MA (Oliver & Holland, 1986). De même, l'hémorragie cérébrale héréditaire avec amyloïdose se caractérise par une angiopathie congophile retrouvée chez les patients atteints de la MA (Ellis *et al*, 1996). Ces trois maladies possèdent donc comme point commun la présence cérébrale de dépôts du peptide A β (Glennner & Wong, 1984b; Masters *et al*, 1985). Ce dernier est codé par un locus du chromosome 21 (Goldgaber *et al*, 1987; Robakis *et al*, 1987). Or, le gène *APP* possède une mutation au niveau du codon 693, partie codante du peptide A β , chez des personnes atteintes d'hémorragie cérébrale héréditaire avec amyloïdose (Levy *et al*, 1990; Bakker *et al*, 1991). Une telle mutation provoquerait une accélération de l'agrégation du peptide A β en culture cellulaire (Wisniewski *et al*, 1991). De même, une mutation au niveau du codon 692, associée à l'angiopathie amyloïde cérébrale (Hendriks *et al*, 1992), augmenterait la sécrétion du peptide A β avec une diminution parallèle du fragment non amyloïdogénique P3 de l'*APP* (Haass *et al*, 1994). Le gène *APP*, situé sur le chromosome 21, a donc été le premier facteur génétique étudié dans la MA. Cette idée est appuyée par l'observation, dans la trisomie 21, de l'apparition des symptômes de type Alzheimer dès l'âge de 40 ans; la copie surnuméraire du chromosome 21 pourrait être responsable du développement précoce de la pathologie. L'expression du gène *APP* est en effet augmentée chez ces individus (Rumble *et al*, 1989; Suzuki *et al*, 1994a).

Des études de liaison génétique ont ainsi été menées et ont montré une liaison entre différents marqueurs du chromosome 21 et la MA (Tanzi *et al*, 1988b; Goate *et al*, 1991). Le séquençage du gène *APP* a permis ensuite d'identifier un total de 8 mutations dans différentes familles atteintes de la MA à un âge précoce (Tableau 2).

Tableau 2: Les différentes mutations de l'*APP* et leur implication sur son métabolisme.

Référence	Mutation	Changement amino acide	Effet Biochimique	Effet Moléculaire
(Mullan <i>et al</i> , 1992a)	APP 670/671 (Suèd.)	Lys/Asn et Met/Leu	Activation de la coupure par la β -sécrétase	Augmentation d'A β total
(Hendriks <i>et al</i> , 1992)	APP 692 (Holl.)	Ala/Gly	Inhibition de la coupure par l' α -sécrétase	Augmentation d'A β 42
(Levy <i>et al</i> , 1990)	APP 693 (Holl.)	Glu/Gln	Altération du site de coupure pour la γ -sécrétase	Diminution d'A β 40
(Ancolio <i>et al</i> , 1999)	APP 715 (Franç.)	Val/Met		
(Eckman <i>et al</i> , 1997)	APP 716 (Amer-FL)	Ile/Val	Altération du site de coupure pour la γ -sécrétase	Augmentation d'A β 42
(Chartier-Harlin <i>et al</i> , 1991)	APP 717 (Angl.)	Val/Gly	Altération du site de coupure pour la γ -sécrétase	Augmentation d'A β 42
(Goate <i>et al</i> , 1991)	APP 717 (Angl,	Val/Ile	Altération du site de coupure pour la γ -sécrétase	Augmentation d'A β 42
(Naruse <i>et al</i> , 1991)	Jap.)			
(Murrell <i>et al</i> , 1991)	APP 717 (Amer-IN)	Val/Phe		

(L'origine des familles dans lesquelles les mutations ont été décrites, est indiquée entre parenthèses: Suèd., Suède; Holl., Hollande; Franç., France; FL et IN, états de Floride et d'Indiana des Etats-Unis d'Amérique; Angl, Angleterre; Jap, Japon).

Ces mutations, localisées au niveau des exons 16 et 17, se produisent aux sites de clivage de l'*APP* par les sécrétases. Certaines mutations altèreraient le site de coupure par l' α -sécrétase, modifiant ainsi la balance de la production amyloïde totale (Citron *et al*, 1992; Cai *et al*, 1993; Felsenstein *et al*, 1994). D'autres auraient plutôt lieu au niveau des sites de coupure de la β -sécrétase ou de la γ -sécrétase, favorisant ainsi la production du peptide A β 42 au dépens du peptide A β 40 (Iwatsubo *et al*, 1994; Suzuki *et al*, 1994b; Tamaoka *et al*, 1994).

Ces mutations affectent donc le métabolisme de l'*APP* et ont pour résultat final la surproduction du peptide amyloïdogénique A β 42 (Hardy, 1997) (voir figure 12). En effet, l'expression de ces gènes mutés chez la souris est corrélée avec une augmentation du

peptide A β 42 (Hsiao *et al*, 1996; Schenk *et al*, 1997; Moechars *et al*, 1999). La surexpression de ce peptide est donc bien une cause d'un développement de la formation des dépôts de peptide

A β .

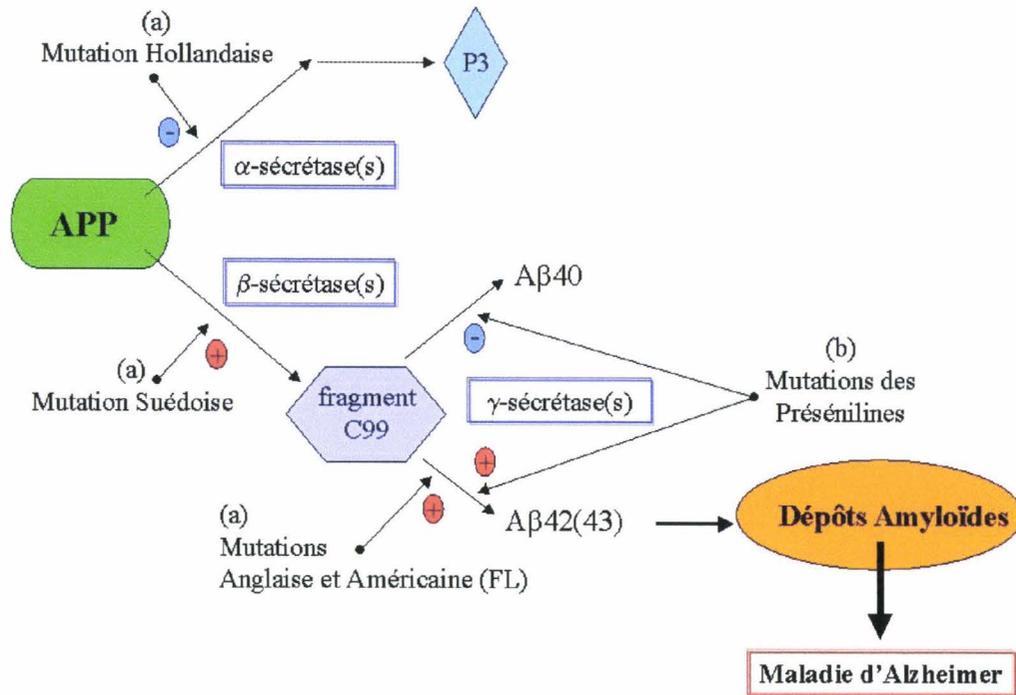


Figure 12: Implication des mutations de l'APP (a) et de PS-I (b) dans le métabolisme de l'APP.

P3: fragment de 3KDa libéré après action de la γ-sécrétase sur le fragment C83 obtenu par la voie non-amyloïdogénique;
C99: fragment de 99KDa obtenu par la voie amyloïdogénique. ⊕ Activation; ⊖ Inhibition

1.4.2.1.b Les chromosomes 1 et 14

Les mutations situées sur le gène *APP* ne concernent qu'un nombre restreint de familles. De nouvelles études de liaison génétique ont donc été conduites et ont permis ainsi de mettre en évidence une liaison entre une région du chromosome 14 et d'autres formes familiales à début précoce (Schellenberg *et al*, 1992). Le gène *PS-I* a ensuite été rapidement identifié, ainsi que son homologue, *PS-II*.

De nos jours, plus de 50 mutations liées aux formes familiales de la MA ont été identifiées dans les parties codantes de *PS-I* et 3 chez *PS-II*, qui sont constituées de 10

exons pour chacun de ces gènes (Cruts & Van Broeckhoven, 1998; Price & Sisodia, 1998). Dans la majorité des cas, ces mutations conduisent à une augmentation de la production du peptide A β (voir figure 12) (Borchelt *et al*, 1996; Duff *et al*, 1996; Xia *et al*, 1998). En effet, lorsque les mutations se trouvent au niveau du site de clivage par les présénilases, les présénilines seraient capables d'interagir plus facilement avec le peptide APP (Tomita *et al*, 1998) et le mécanisme semble alors avoir perdu de sa saturabilité. De plus, ce type de mutation, ainsi que celles affectant l'activité "γ-sécrétasique" (Wolfe *et al*, 1999), augmentent la vulnérabilité des cellules à la mort cellulaire car elle fournit plus de matériel aux caspases qui produisent alors plus de fragments C-terminaux apoptotiques (Capp) (Wolozin *et al*, 1996; Guo *et al*, 1997; Chui *et al*, 1999). Par contre, les mutations au niveau du site de clivage par les caspases déviaient cet équilibre vers la formation des fragments C-terminaux amyloïdogéniques par les présénilases (Vito *et al*, 1997), conduisant principalement à une augmentation de la production du peptide A β .

Il faut noter que plus de 58% des mutations chez les présénilines liées à la MA sont localisées au niveau de la grande boucle cytoplasmique qui contient les sites d'activité des présénilases, des caspases et des γ-sécrétases.

Les mutations décrites chez *PS-I* sont les plus fréquentes puisqu'elles représentent 20-50% des cas familiaux précoces (Campion *et al*, 1995; Cruts *et al*, 1996; Hutton *et al*, 1996; Cruts & Van Broeckhoven, 1998), alors que celles de l'*APP* n'en expliquent que 5% (Van Broeckhoven, 1995a; Van Broeckhoven, 1995b) et celles de *PS-II* moins de 1% (Sherrington *et al*, 1996; Cruts *et al*, 1998). Ensemble, ces trois gènes représentent moins de la moitié des cas

familiaux précoces qui ne représentent que 10% de la population totale de patients atteints de la MA. D'autres gènes doivent donc exister pour expliquer l'autre moitié des cas familiaux, ainsi que l'existence des cas sporadiques qui représentent la forme la plus courante de la maladie et dont l'étiologie est très complexe.

I.4.2.2 Les gènes de susceptibilité

De plus en plus d'études épidémiologiques sont réalisées afin d'établir si certains gènes sont effectivement des facteurs de risque pouvant favoriser l'apparition de la MA. Les gènes considérés comme candidats pour la maladie sont souvent choisis parmi ceux présents dans les lésions pathologiques du cerveau, ou ceux pouvant agir dans la physiopathologie en interagissant, par exemple avec les gènes déjà impliqués.

Plusieurs gènes ont ainsi été décrits comme pouvant contribuer à la vulnérabilité de la MA sans pour autant avoir une association obligatoire avec la maladie. C'est-à-dire qu'un génotype déterminé augmente le risque de développer la maladie chez les individus porteurs de ce variant du gène, mais celui-ci n'est ni suffisant ni nécessaire pour l'apparition de la pathologie. Il est à noter que la plupart de ces gènes ont été associés avec la forme tardive de la MA, qui est considérée comme sporadique dans la majorité des cas. Cependant, mis à part le gène de l'*ApoE*, les études réalisées sur les autres gènes candidats sont contradictoires et, jusqu'à présent, pour aucun d'eux la preuve indiscutable de leur implication dans le développement de la maladie n'a été apportée.

I.4.2.2.a Le gène de l'apolipoprotéine E

Dans la population générale, les fréquences alléliques de l'*ApoE* sont de 78% pour ϵ_3 , 15% pour ϵ_4 et 7% pour ϵ_2 (Roses, 1996). Cependant, l'allèle ϵ_4 est plus fréquemment présent dans la MA (Rebeck *et al*, 1993; Saunders *et al*, 1993), aussi bien dans les formes familiales à début tardif que dans les formes sporadiques à début tardif ou précoce (Brousseau *et al*, 1994; Chartier-Harlin *et al*, 1994; van Duijn *et al*, 1994; Pérez-Tur *et al*, 1995). En effet, on retrouve jusqu'à 64% de porteurs de cet allèle à l'autopsie de patients sporadiques déclarés déments, voire 80% dans les cas familiaux, contre 32% chez les témoins (Rebeck *et al*, 1993). L'allèle ϵ_4 du gène *ApoE* est donc considéré comme facteur de risque, les personnes porteuses de cet allèle ayant plus de risque de développer la maladie par rapport à celles ayant un génotype qui en est dépourvu. De plus, il semble exister une relation de dose à effet, les personnes homozygotes (génotype ϵ_4/ϵ_4) étant d'autant plus susceptibles de développer la maladie par rapport aux personnes ne portant qu'un seul allèle ϵ_4 (Corder *et al*, 1993; Lucotte *et al*, 1995). Cette augmentation de la vulnérabilité à la MA pourrait être liée à une variation d'expression des allèles de l'*ApoE*. En effet, la production relative d'ARNm pour l'allèle ϵ_4 est plus importante chez les malades par rapport aux témoins (Lambert *et al*, 1997); or l'isoforme ApoE4 serait fonctionnellement déficiente.

Une autre observation de l'implication de l'allèle ϵ_4 dans la MA est son influence sur l'âge d'apparition des premiers symptômes. En effet, différentes études ont montré que celui-ci diminue avec l'augmentation du nombre d'allèle ϵ_4 (Corder *et al*, 1993; Lucotte *et al*, 1995; Oyama *et al*, 1995). Ceci appuie l'idée que l'implication de l'allèle ϵ_4 dans l'apparition des plaques amyloïdes serait liée à une déficience de l'élimination du peptide A β par ce

variant ApoE, ainsi qu'à une diminution de la solubilité du complexe amyloïde-ApoE. La formation des dépôts de peptide A β serait ainsi plus rapide chez les personnes porteuses de l'allèle ϵ 4 et les symptômes apparaîtraient plus tôt. Des études histopathologiques montrant une différence du nombre de lésions cérébrales en fonction du génotype *ApoE* chez les patients atteints de la MA soutiennent cette théorie (Schmechel *et al*, 1993; Norrman *et al*, 1995; Ohm *et al*, 1995; Ohm *et al*, 1999).

Des informations supplémentaires ont été apportées lors de l'utilisation du polymorphisme de l'*ApoE* conjointement à des marqueurs encadrant ce gène (Chartier-Harlin *et al*, 1994). En effet, la combinaison de ces polymorphismes génétiques augmente d'avantage la probabilité déjà associée à l'allèle ϵ 4 de développer la MA. Ces données suggèrent donc l'existence d'autres facteurs de susceptibilité, liés au gène de l'*ApoE*, qui modifieraient le risque associé à l'allèle ϵ 4. Des polymorphismes au niveau des régions régulatrices de l'*ApoE* sembleraient effectivement être associés à la MA (Lambert *et al*, 1998a; Bullido *et al*, 1998; Ahmed *et al*, 1999), ainsi qu'à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de l'*ApoE* (Artiga *et al*, 1997; Lambert *et al*, 1997; Artiga *et al*, 1998; Lambert *et al*, 1998b). En effet une augmentation du taux plasmatique de l'ApoE est observée chez les personnes porteuses du génotype "-491AA", aussi bien chez les témoins que chez les sujets affectés, avec toutefois un niveau plus élevé chez ces derniers (Town *et al*, 1998; Laws *et al*, 1999). Le polymorphisme -491 du promoteur *ApoE* pourrait donc jouer un rôle dans la synthèse protéique, indépendamment du statut ϵ 4. Cependant, ce résultat n'a pu être reproduit par d'autres groupes (Roks *et al*, 1998; Song *et al*, 1998; Toji *et al*, 1999).

De même, les polymorphismes de l'intron 1 (Mui *et al*, 1996) et Th1/E47cs situé en position -219 du promoteur de l'*ApoE* (Lambert *et al*, 1998b) sont associés à une

augmentation du risque de développer la MA. En particulier, l'allèle T du polymorphisme Th1/E47cs, qui possède un effet délétère indépendamment de l'allèle $\epsilon 4$, pourrait contribuer à la régulation de l'expression des différents allèles de l'*ApoE* (Lambert *et al*, 1998a; Lambert *et al*, 1998b). Une diminution des taux plasmatiques en ApoE est en effet observée chez les patients porteurs de l'allèle T (Lambert et collaborateurs, Article soumis).

Finalement, le polymorphisme au niveau de l'exon 3 (codon 28 de l'*ApoE*) agirait en synergie avec le polymorphisme *ApoE*, augmentant ainsi le risque déjà attribué à $\epsilon 4$ par 5 (Kamboh *et al*, 1999).

Ces découvertes sont très récentes, aussi d'autres études sont nécessaires avant de pouvoir suggérer une hypothèse sur l'implication de ces polymorphismes génétiques dans la MA.

1.4.2.2.b Les gènes des récepteurs de l'*ApoE*

Les autres composés des plaques séniles qui ont été étudiés en tant que gènes candidats sont des récepteurs de l'*ApoE* au niveau du cerveau, le LRP et le VLDL-r. Ces deux molécules interviennent dans l'élimination du peptide A β lorsqu'il est lié à l'*ApoE*. Il est donc possible que des variations génétiques au niveau de ces récepteurs puissent affecter l'élimination de l'*ApoE* fixée au peptide amyloïde et donc agir en tant que facteurs de risque. Au niveau de la région 5' du gène *VLDL-r*, 19pb avant le codon d'initiation, un triplet CGG, répété de 4 à 10 fois, est présent (Jokinen *et al*, 1994). Des études de populations montrent une association entre la MA et l'allèle possédant 5 répétitions de ce triplet (Okuizumi *et al*, 1995; Helbecque *et al*, 1998b; Yamanaka *et al*, 1998); alors que d'autres études

montrent une augmentation de l'allèle contenant 9 répétitions chez les patients (McIlroy *et al*, 1999). De plus, d'autres groupes essayant de reproduire ces résultats n'ont pu confirmer cette association (Chung *et al*, 1996; Okuizumi *et al*, 1996; Pritchard *et al*, 1996; Brookes *et al*, 1997; Fallin *et al*, 1997b; Lendon *et al*, 1997; Chen *et al*, 1998). L'association du gène *VLDL-r* avec la MA est donc encore sujette à caution.

De telles études ont également été réalisées sur le gène du *LRP*, dont les résultats sont contradictoires. En effet, un polymorphisme similaire, présentant un nombre variable de répétitions du tétranucléotide TTTC existe en amont du gène *LRP* (Zuliani & Hobbs, 1994; Harris *et al*, 1996), ainsi qu'une mutation silencieuse dans l'exon 3 du gène qui change le nucléotide C, en position 766 pour un T (Kang *et al*, 1997). Certaines études montrent une association entre la MA et un allèle particulier, pour chacun de ces polymorphismes génétiques (Kang *et al*, 1997; Lendon *et al*, 1997; Baum *et al*, 1998; Hollenbach *et al*, 1998; Kamboh *et al*, 1998), alors que d'autres n'observent aucune variation entre les fréquences alléliques des personnes affectées par la maladie et les témoins (Clatworthy *et al*, 1997; Fallin *et al*, 1997c; Kamboh *et al*, 1998; Scott *et al*, 1998; Woodward *et al*, 1998). Cependant, des études de recherche génomique montrent l'implication d'un locus sur le chromosome 12, proche de la région contenant le *LRP*, dans la MA (Pericak-Vance *et al*, 1997; Rogaeva *et al*, 1998). Il est donc possible que l'association observée entre les polymorphismes du *LRP* et la MA révèle la présence d'un autre gène, proche de celui du *LRP* et impliqué dans la pathogenèse de la maladie.

L'implication des récepteurs *VLDL-r* et *LRP* dans le développement de la MA en tant que facteurs de risque reste donc équivoque.

I.4.2.2.c Les gènes de la phase aiguë

L' α 1-Antichymotrypsine (ACT) et l' α 2-Macroglobuline (A2M) sont deux inhibiteurs de protéases qui sont aussi retrouvés au niveau des formations amyloïdes dans le cerveau des personnes atteintes de la MA. Le gène de l'ACT est localisé sur le chromosome 14 (Rabin *et al*, 1986), celui de l'A2M sur le chromosome 12 (Bell *et al*, 1985; Fukushima *et al*, 1988) et les protéines correspondantes pourraient être des molécules chaperonnes favorisant la formation des dépôts de substance amyloïde. L'ACT possède un polymorphisme, au niveau de la région codante pour le peptide signal, qui conduit à l'existence possible de 2 allèles différant par un seul nucléotide (A ou T). Le génotype AA a ainsi été retrouvé plus fréquemment chez les personnes affectées par la maladie par rapport aux témoins (Kamboh *et al*, 1995; Kamboh *et al*, 1997; Wang *et al*, 1998b). L'allèle A de l'ACT est donc suggéré comme facteur de risque pour la MA dans ces populations, alors qu'une étude plus récente met plutôt en cause l'allèle T (Licastro *et al*, 1999). De plus, d'autres groupes essayant de reproduire cette association dans d'autres populations n'ont pu confirmer une susceptibilité génétique de l'ACT dans la MA (Haines *et al*, 1996; Talbot *et al*, 1996; Fallin *et al*, 1997a; Tysoe *et al*, 1997b; Yamanaka *et al*, 1998; Sodeyama *et al*, 1999).

De même, l'A2M contient deux polymorphismes qui semblent être associés à la MA (Blacker *et al*, 1998; Liao *et al*, 1998). Ces deux polymorphismes se présentent l'un par une mutation au niveau de l'exon 24, qui résulte en un changement d'acide aminé de Valine (GTC) par une Isoleucine (ATC) (Poller *et al*, 1992) et l'autre par une délétion de 5 nucléotides au niveau du site accepteur d'épissage de l'exon 18 (Matthijs & Marynen, 1991; Poller *et al*, 1991).

De plus, des études de liaison génétique montrent la présence de locus associés à la MA sur le chromosome 14, à proximité de la région contenant le gène de l'*ACT* (Mullan *et al*, 1992b) et un autre sur le chromosome 12 assez proche de la région contenant le gène de l'*A2M* (Rogaeva *et al*, 1998). Il est donc possible que ces polymorphismes génétiques soient impliqués dans le développement de la MA.

Pour le moment, au vu des données sur les gènes de l'*ACT* et de l'*A2M*, ils ne peuvent pas être encore considérés comme des facteurs de risque de la MA, mais ils ne peuvent en être exclus, non plus.

I.4.2.2.d Le gène de la préséniline I

De nombreuses mutations au niveau de *PS-I* ont été mises en cause dans les formes familiales précoces de la MA; or elles ne sont pas retrouvées au niveau des formes tardives. Des études d'association ont donc été entreprises afin de déterminer si le polymorphisme au niveau de l'intron 9 de ce gène contribue au développement de la pathologie dans les formes sporadiques. En effet, le génotype 1/1 est retrouvé plus fréquemment chez les personnes affectées par la maladie que chez les témoins (Isoe *et al*, 1996; Kehoe *et al*, 1996; Wragg *et al*, 1996; Ezquerro *et al*, 1997; Nishiwaki *et al*, 1997). D'autres groupes ne reproduisent cependant pas cette association positive (Pérez-Tur *et al*, 1996; Cai *et al*, 1997; Matsushita *et al*, 1997; Scott *et al*, 1997; Singleton *et al*, 1997; Sorbi *et al*, 1997; Tysoe *et al*, 1997a; Hu *et al*, 1998a; Kowalska *et al*, 1998; Taddei *et al*, 1998; Liao *et al*, 1999; Wu *et al*, 1999). L'implication de *PS-I* dans la MA, dans le cas des formes tardives, reste donc sous investigation pour l'instant.

1.4.2.2.e Les autres gènes potentiels

Ci-dessous se trouve une liste non-exhaustive de gènes dont l'implication dans la MA est mise en cause et est encore sous investigation.

- HLA (Human Leukocyte Antigen):

Le gène *HLA*, sur le chromosome 6, code une protéine faisant partie du complexe majeur d'histocompatibilité et qui intervient donc dans la régulation de la réponse immunitaire. L'allèle A2 de ce gène semblerait être associé à une précocité de l'âge d'apparition de la MA dans certaines populations (Payami *et al*, 1991; Small *et al*, 1991; Combarros *et al*, 1998; Ballerini *et al*, 1999). Ces résultats soutiennent l'hypothèse de l'implication des mécanismes inflammatoires et/ou immunitaires dans le développement de la pathologie.

- BCHE (Butyrylcholinesterase):

Des études d'association ont récemment montré une augmentation du variant K du gène *BCHE*, localisé sur le chromosome 3, chez les personnes atteintes de la MA et porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ du gène ApoE (Lehmann *et al*, 1997; Panegyres *et al*, 1999; Wiebusch *et al*, 1999). Cette enzyme est capable d'hydrolyser des molécules telles que l'Acétylcholine, mais sa fonction exacte dans l'organisme humain n'est pas encore déterminée. Au vu de ces données, il est suggéré qu'elle agisse en synergie avec l'ApoE dans le développement de la MA. L'activité de la Butyrylcholinestérase est en effet augmentée au niveau des lésions cérébrales caractéristiques de la pathologie (Wright *et al*, 1993; Mesulam & Geula, 1994).

Cependant, d'autres groupes d'études ne peuvent reproduire cette association avec le variant *BCHE-K* (Brindle *et al*, 1998; Crawford *et al*, 1998; Helbecque *et al*, 1998a; Kehoe *et al*, 1998; Singleton *et al*, 1998; Grubber *et al*, 1999; Ki *et al*, 1999; Yamamoto *et al*, 1999). Il existe donc peut-être d'autres gènes, non identifiés, sur le chromosome 3 et à proximité du gène *BCHE*, capables d'interagir avec l'*ApoE* $\epsilon 4$ et susceptibles d'intervenir dans le développement de la MA.

- *Fe65*:

La protéine *Fe65* est produite de façon abondante surtout dans les régions du cerveau atteintes de la MA et a été impliquée dans les mécanismes de régulation et de communication cellulaire. Les recherches sur les gènes de susceptibilité dans la MA se sont tournées sur cette protéine cytoplasmique lorsqu'il a été découvert qu'elle se fixe à l'*APP* et ceci spécifiquement au niveau de la région membranaire qui est nécessaire à l'internalisation de ce précurseur protéique (Fiore *et al*, 1995; Borg *et al*, 1996; Guenette *et al*, 1996) et qui est essentielle à la régulation de la production du peptide $A\beta$ (Pérez *et al*, 1999). De plus, on observe une altération de cette interaction en culture cellulaire lorsque le gène *APP* possède une des mutations retrouvées dans certaines formes familiales de la MA (Zambrano *et al*, 1997). Le gène *Fe65*, situé sur le chromosome 11 (Bressler *et al*, 1996), pourrait donc être un facteur de risque pour la MA. En effet, une étude de population présente une association entre la maladie et un des polymorphismes de ce gène (Hu *et al*, 1998b). D'autres investigations sont donc nécessaires afin de pouvoir déterminer la susceptibilité de *Fe65* dans la MA.

- ACE (Angiotensin-Converting Enzyme):

Le gène *ACE* faisant partie des facteurs de risque impliqués dans les maladies vasculaires et ces derniers ayant de grandes probabilités d'avoir un impact sur les risques de démence, les polymorphismes de ce gène ont donc été étudiés dans le cadre de la MA. Jusqu'à présent, aucune association n'a été démontrée avec la maladie (Tysoe *et al*, 1997b; Chapman *et al*, 1998). Cependant, la disparité de l'allèle I semble être liée à une longévité plus importante. En effet, la fréquence de ce variant est beaucoup plus faible chez les centenaires (Schachter *et al*, 1994; Galinsky *et al*, 1997). Ce résultat est à prendre en considération car cet allèle I serait associé à une augmentation du risque de maladie cardiovasculaire (Hibberd *et al*, 1997; Luft, 1999). Il existerait peut-être un lien avec une certaine vulnérabilité à la MA.

I.4.2.3 Les facteurs de protection

- L'allèle $\epsilon 2$ de l'ApoE

A l'inverse de l'allèle $\epsilon 4$, l'allèle $\epsilon 2$ de l'ApoE semble associé à une diminution du risque de développer la MA (Chartier-Harlin *et al*, 1994; Corder *et al*, 1994; West *et al*, 1994), un retardement de la déclaration des symptômes (Oyama *et al*, 1995), ainsi qu'à une longévité plus importante (Schachter *et al*, 1994). Les personnes atteintes de Trisomie 21 ont en effet un risque plus faible de développer une démence lorsqu'elles possèdent l'allèle $\epsilon 2$ dans leur génotype ApoE (Lambert *et al*, 1996; Tyrrell *et al*, 1998).

Le mécanisme protecteur n'est pas connu, mais les différentes suggestions proposées sont plausibles. L'une d'elles serait en rapport avec le métabolisme du peptide A β . En effet, la grande avidité de l'ApoE2 native pour le peptide A β rend le complexe formé très stable, ce qui facilite son élimination et donc limite la formation des dépôts de substance amyloïde (Aleshkov *et al*, 1997; Yang *et al*, 1997). De plus, il semblerait que la production relative d'ARN messenger de l'allèle ϵ 2, par rapport à l'allèle ϵ 3, est moins importante chez les malades, par rapport aux témoins (Lambert *et al*, 1997). La prise en charge du peptide A β par l'ApoE pourrait donc être d'autant plus importante chez ces individus. Un autre point est que l'isoforme ApoE2 possède une capacité plus faible de se lier aux récepteurs neuronaux par rapport aux autres isoformes ApoE; ApoE2 exercerait donc un effet protecteur par une insuffisance à délivrer le peptide A β aux cellules (Guillaume *et al*, 1996).

Un autre effet de l'ApoE2 serait de protéger les cellules neuronales contre le stress oxydant. En effet, par un mécanisme indéterminé, l'ApoE2 serait plus efficace pour bloquer l'effet cytotoxique du peptide A β par rapport aux autres isoformes (Miyata & Smith, 1996). Cette hypothèse de l'effet protecteur de l'isoforme ApoE2 est appuyée par des études sur des souris ne produisant pas d'ApoE qui montrent une augmentation du stress oxydant, facteur de la mort neuronale (Palinski *et al*, 1994; Matthews & Beal, 1996).

OBJECTIFS DE TRAVAIL

Dans le cadre de notre thèse, nous nous sommes intéressés à l'étiologie génétique de la MA à début tardif; notre but étant d'identifier les gènes impliqués dans le développement de cette maladie. Ceci s'est réalisé principalement en deux étapes conduites en parallèle: l'une étant l'étude de l'implication de gènes déterminés dans la maladie et l'autre, de plus grande ampleur, consistant à l'identification de nouveaux locus associés à la maladie.

Pour aboutir à nos ambitions, la collaboration avec d'autres laboratoires a été nécessaire, ce qui s'est avéré fructueux. Les différents types d'études ont donc été réalisés, pour une partie dans le laboratoire français du Professeur Philippe Amouyel en ce qui concerne les études de populations et l'autre dans le laboratoire américain du Professeur John Hardy afin de pouvoir réaliser les études de liaison génétique.

Dans le chapitre suivant, nous présenterons donc nos travaux ainsi que les motivations et les méthodes utilisées pour leurs réalisations.

CHAPITRE II:

APPROCHES GENETIQUES

II.1 Généralités

La MA, comme la plupart des maladies chroniques, présente une grande hétérogénéité physiopathologique. Il est maintenant bien établi, surtout grâce aux études de jumeaux, que l'étiologie génétique de cette maladie est très complexe et que la susceptibilité à la maladie n'est pas attribuable à un seul facteur. Les différentes mutations mises en évidence dans les gènes *APP*, *PS-I* et *PS-II* ne sont responsables que d'environ 5% des patients atteints de la MA. De plus, elles n'expliquent pas la variabilité phénotypique trouvée entre les familles portant la même mutation, voire même entre les membres d'une même famille. Dans ce contexte, la susceptibilité à la maladie serait attribuable au produit de l'effet combiné de nombreux facteurs, chacun représentant une contribution partielle au risque globale. Ces altérations génétiques ou environnementales contribuent donc à moduler le **phénotype** de la maladie, aussi bien dans les populations qu'au sein des familles.

Afin de déterminer les causes génétiques de la maladie, différentes études sont réalisables. Il existe essentiellement deux types de stratégie permettant la recherche des gènes impliqués dans le déterminisme génétique des maladies multifactorielles:

- Les études d'association génétique qui examinent la ségrégation avec la maladie de variabilités génétiques présentes dans des gènes candidats, déterminés à partir d'hypothèses physiopathologiques, dont certains variants pourraient être impliqués dans le développement de la maladie. Par exemple, un gène dont la protéine est détectée au niveau des lésions cérébrales, qui interagit avec les facteurs génétiques déjà identifiés et

dont les niveaux sont en déficit ou en excès chez les malades par rapport aux témoins, peut être considéré comme un gène candidat.

- Les études de liaison génétique qui sont réalisées lors d'une recherche génomique et qui consistent alors à effectuer un criblage systématique en s'appuyant sur des marqueurs génétiques polymorphes (voir paragraphe **II.2**) de localisation connue et régulièrement espacés le long du génome, permettant ainsi d'identifier les régions chromosomiques qui coségrégent avec le phénotype de la maladie.

II.2 Les marqueurs génétiques

II.2.1 Les polymorphismes de restriction

Les polymorphismes de restriction ou RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) correspondent à des variations ponctuelles de l'ADN causant la disparition ou l'apparition d'un site de reconnaissance pour une enzyme spécifique au sein d'une séquence déterminée. Ces marqueurs génétiques ne semblent pas être très informatifs car ils ne présentent que deux allèles (coupé ou non-coupé); toutefois, leur distribution peut varier notablement entre les populations de malades et celles de témoins. De plus, ils sont très faciles à utiliser et donnent des informations rapidement. Après avoir augmenté le nombre de copies du segment d'ADN contenant le polymorphisme (amplicon) par une méthode dite d'amplification (PCR ou réaction en chaîne de polymérisation), le produit est digéré par une enzyme spécifique qui, en

fonction de la séquence contenue, coupe ou non les amplicons. Les fragments d'ADN obtenus peuvent être ensuite séparés en fonction de leur taille par électrophorèse, ce qui permet d'identifier les deux allèles de chaque sujet et de déterminer un génotype.

II.2.2 Les polymorphismes de répétition

Une grande partie du génome est constituée de séquences d'ADN contenant des éléments identiques qui se suivent les uns les autres. Le plus souvent, il s'agit de di-, tri- voire tétra- nucléotides qui sont répétés en tandem, un grand nombre de fois. Ils sont appelés: microsatellites, pour les différencier des minisatellites ou VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) qui correspondent à des séquences répétées de plus de 10 nucléotides. Le nombre de répétitions permet de distinguer les différents allèles qui sont présents dans la population générale. Ces polymorphismes génétiques sont très nombreux et très informatifs car multialléliques.

Dans ce cas aussi, les segments d'ADN contenant le polymorphisme seront amplifiés par PCR, mais les amplicons obtenus n'auront pas à subir d'étape de digestion car chaque allèle se différencie déjà d'un autre allèle par son nombre de répétitions. Ils peuvent être donc séparés en fonction de leur taille par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide.

II.3 Etudes d'association génétique

II.3.1 Principes

Dans le cas d'une étude cas-témoins, la distribution génotypique et allélique d'un gène ou d'un marqueur déterminé est comparée entre une population de témoins représentatifs de la population saine et une population constituée de cas affectés par la maladie. Ces deux populations doivent partager un maximum de variables environnementales, telles que l'origine ethnique, l'âge ou la proportion d'individus du même sexe (Feingold, 1972). Ce type d'étude est réalisé sur des individus non apparentés et les RFLP (polymorphisme biallélique) sont le plus souvent utilisés pour leur intérêt physiologique. Des différences significatives entre le groupe de témoins et le groupe de malades indiqueraient, soit que le gène candidat (ou le polymorphisme génétique) étudié influence la maladie, soit qu'il est en déséquilibre de liaison avec un autre polymorphisme génétique ayant un effet direct sur la maladie.

Pour cela, les données sont exploitées à l'aide de calculs statistiques tel que le test d'indépendance de Pearson. Ce test, connu sous le nom du Chi-carré (χ^2), permet de comparer les distributions génotypiques et alléliques entre les malades et les témoins et donc d'établir s'il existe une association entre le gène étudié et la maladie. Les données peuvent aussi être analysées individuellement, dans les cas appropriés, par utilisation du modèle de régression logistique multivariée. Il est ainsi possible d'éliminer l'effet des autres facteurs confondants, tels que le génotype *ApoE*, l'âge, le sexe ou d'autres facteurs de risque suspectés qui pourraient interagir avec le facteur étudié et donc

influencer les résultats. L'odds ratio (OR) qui, en étude cas-témoins correspond à une estimation du risque relatif des malades par rapport aux témoins, est ensuite calculé. L'intervalle de confiance à 95% (IC à 95%) estime la validité de cet OR calculé. Ces calculs statistiques établissent ainsi une estimation du risque qu'un individu développe la maladie s'il possède le génotype en question.

Dans le cas de la MA, de nombreuses études de populations ont été réalisées sur les différents gènes candidats possibles. Cependant, aucune certitude ne peut être apportée quant à leur implication réelle dans la maladie car les résultats ne sont pas concordants. Pour un grand nombre des polymorphismes étudiés sur ces gènes, il existe autant de rapports décrivant une association d'un certain allèle avec la maladie, que de rapports ne confirmant pas ces résultats. Jusqu'à aujourd'hui, seul l'allèle $\epsilon 4$ du gène de l'*ApoE* est considéré comme un facteur de susceptibilité du développement de la maladie, ce n'est cependant pas un polymorphisme causal mais un facteur de risque.

II.3.2 Le gène de susceptibilité *LRP*

II.3.2.1 Présentation du *LRP*

Le gène *LRP* se trouve dans la région q13-14 du chromosome 12 et couvre 92Kb de l'ADN génomique (Myklebost *et al*, 1989). Ses 89 exons, dont leur taille varie de 65 nucléotides (exon 86) à 925 nucléotides (exon 89), codent un ARN messager unique de 15Kb (Van Leuven *et al*, 1994). Les régions introniques, quant à elles, ont une taille très variable de 82 bases (intron 53) jusqu'à 8Kb (intron 6). La région du promoteur contient plusieurs sites de fixation à l'ADN pour les protéines de régulation et un site de fixation Sp1 d'orientation inversée (Kutt *et al*, 1989).

La transcription de l'ARN messager conduit à la production d'une chaîne polypeptidique de 4544 acides aminés qui subit ensuite la maturation. Ce précurseur de 600KDa est clivé dans le Golgi par la furine pour produire deux sous-unités de 515KDa et 85KDa (Herz *et al*, 1990). La grosse sous-unité est constituée de 3924 acides aminés et contient les régions de fixation des ligands du LRP, alors que la petite sous-unité est composée de 601 acides aminés contenant le domaine transmembranaire. Ces deux chaînes s'associent de façon non-covalente afin de former le récepteur de surface cellulaire mature qui est constitué de 4 hétérodimères.

Le domaine cytoplasmique contient une centaine de résidus acides avec deux copies du motif NPXY qui permet l'internalisation du LRP (Hussain *et al*, 1999; Willnow, 1999).

Des polymorphismes sont observés au niveau des régions codantes et non-codantes de ce gène. En effet, la région 5'UTR (Untranslated Region) présente un polymorphisme de répétition en position 3' d'une séquence Alu et est constituée de la répétition en tandem du tétranucléotide TTTC (Zuliani & Hobbs, 1994). Il ne semble pas exister de différence dans la fonction biologique de ces différents allèles. De même, le polymorphisme présent au niveau de l'exon 3, changeant la Cytosine en position 766 pour une Thymine, n'apporte pas de modification biologique puisqu'elle ne change pas la séquence des acides aminés (Kang *et al*, 1997).

II.3.2.2 Le gène *LRP* et la maladie d'Alzheimer

Le gène du *LRP* est un candidat intéressant dans l'étude de la MA pour plusieurs raisons, la principale étant due à sa fonction de récepteur de l'ApoE et de l'APP (voir paragraphe I.3.5.5). De plus, il est retrouvé au niveau des lésions cérébrales caractéristiques de la MA. Il est donc probable que le *LRP* est impliqué dans le développement de la pathologie. Pour cette raison, nous avons choisi d'étudier le comportement des polymorphismes présents au niveau de ce gène dans la forme tardive de la MA et cités au paragraphe *I.4.2.2.b*. Nous avons donc décidé **d'étudier la distribution des deux polymorphismes présents au niveau du gène *LRP* dans une population française constituée de patients affectés de façon sporadique par la forme tardive de la MA et une population de témoins.**

Le premier polymorphisme examiné est celui présent dans la région 5'UTR du gène *LRP* et constitué d'un nombre variable de répétitions du tétranucléotide TTTC (Zuliani & Hobbs, 1994; Harris *et al*, 1996). Les données sont présentées dans l'article suivant: "Association entre le *LRP* et la Maladie d'Alzheimer" publié en 1997 dans "*Neuroscience Letters*".

“Association between the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP)

and Alzheimer’s Disease”

(1997), *Neuroscience Letters*.

Association between the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) and Alzheimer's disease

Fabienne Wavrant-DeVrièze^{a,b,*}, Jordi Pérez-Tur^a, Jean-Charles Lambert^b, Bernard Frigard^c,
Florence Pasquier^d, André Delacourte^e, Philippe Amouyel^b,
John Hardy^a, Marie-Christine Chartier-Harlin^b

^aMayo Clinic Jacksonville, 4500 San Pablo Road, Jacksonville, FL 32224, USA

^bService de Santé Publique et d'Epidémiologie, CJF INSERM 95-05, Institut Pasteur de Lille, 1 rue Prof. Calmette, 59019 Lille cedex, France

^cCentre de gériatrie de Wasquehal Molinel, rue Salvador Allende, B.P. 165, 59444 Wasquehal, France

^dCHR et U de Lille, Clinique Neurologique, Centre de la mémoire, Hôpital Salengro, 59037 Lille cedex, France

^eUnité Inserm 422, 1 Place de Verdun, 59045 Lille cedex, France

Received 2 April 1997; revised version received 18 April 1997; accepted 18 April 1997

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder affecting elderly people. It usually occurs after 65 years old (late-onset AD). The $\epsilon 4$ allele of apolipoprotein E (APOE) gene is a risk factor which contributes about 50% of the genetic risk for this form of the disease. The low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a major receptor for APOE which is found in the senile plaques of AD brains. This makes it a good candidate gene for the disease. There is a polymorphism in the region upstream of the LRP gene that has been associated with AD in an American population. We examined this polymorphism by restriction fragment length polymorphism analysis in a French population with sporadic late-onset AD. In the previous report, a significant increase of the 87 bp allele was found in the AD cases; however, in our population, we observed a significant decrease with this same allele of the LRP gene. The possible reasons for this discrepancy, linkage disequilibrium or statistical anomaly, are discussed. © 1997 Elsevier Science Ireland Ltd.

Keywords: Late-onset Alzheimer's disease; Low density lipoprotein receptor-related protein; Apolipoprotein E receptor; Association studies; Risk factor

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder affecting elderly people. Several genes have been reported to influence the occurrence of the disease [4], but the only established risk factor for the typical late-onset form of the disease is genetic variability at the apolipoprotein E (APOE) gene. Genetic variability at this locus has been shown to have a strong association with the disease [14]. The APOE gene is located on the chromosome 19q and codes for a protein which plays a central role in lipid metabolism. This protein is found in senile plaques and neurofibrillary tangles in AD brains [10]. The APOE gene has been implicated not only in 40–50% of the patients with

late-onset disease [14], but also in some early-onset AD populations [2,16].

Several other genes have been studied as possible risk factors for typical late-onset disease including α -1-antichymotrypsin, the very low density lipoprotein receptor, and presenilin-1. However, in all these cases, there have been both positive and negative reports, and no consensus has developed about their involvement in disease etiology [3,7,11,12,15,18].

Most recently, a genetic association between late-onset AD and a polymorphism close to the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) gene has been reported [9]. The LRP gene is an attractive candidate for involvement in late-onset disease because it is directly involved with APOE metabolism [1] and it is also involved in the neuronal metabolism of the amyloid- β precursor protein [8]. Furthermore,

* Corresponding author. Tel.: +1 904 9530152; fax: +1 904 9537370; e-mail: fabie@mayo.edu

LRP immunostaining has been demonstrated in the neuritic plaques of AD brains [13]. No mutations have yet been reported in this large and complex gene, although a polymorphism has been reported upstream of the gene. This polymorphism involves a tetranucleotide repeat (TTTC)_n which can generate four different alleles [5,19]; the 91 and 87 bp alleles which are found most frequently, and the rarer 95 and 83 bp alleles. Lendon et al. [9] have reported a significant increase in the frequency of the 87 bp allele in late-onset AD studying an American population.

We have sought to confirm this potential association in a French population with late-onset disease compared to relevant controls.

The study was performed in a population consisting of 144 sporadic AD patients (100 women, 44 men) and 153 controls (106 women, 47 men) with a similar mean age (AD cases, 77.3 ± 8.9 years; controls, 79.3 ± 9.3 years). None of the subjects had a family history of AD consistent with Mendelian inheritance. All cases fulfilled NINCDS/ADRDA criteria for probable AD. The mean age of onset for the AD patients was 73.4 ± 8.7 years. Genomic DNA was extracted from white blood cells, and the relevant part of the LRP gene, containing the TTTC repeat, was amplified by polymerase chain reaction (PCR) in order to genotype the subjects. PCR amplifications were carried out using primers previously described [19]. The amplified product was analyzed by electrophoresis on 20% acrylamide-bisacrylamide (19:1) gels stained with ethidium bromide. The APOE genotype was performed as described by Hixson and Verner [6].

The genotype distributions were in Hardy–Weinberg equilibrium as assessed by a Chi-square test, and were similar in men and women. The Pearson Chi-square (χ^2) test of association was used to compare allele and genotype distributions. Where appropriate, the SPSS statistical package (version 7.5) was used to analyze the data with a multivariate logistic regression model giving odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI).

As expected the allelic frequencies of the APOE gene showed a strong association between AD cases and the $\epsilon 4$

Table 1
Distribution of APOE genotypes and alleles

	APOE	AD cases		Controls	
		AD cases	Controls	AD cases	Controls
Number of subjects		144	153		
Genotype (%)*	E2/E3	4.2	10.5		
	E2/E4	4.2	3.3		
	E3/E3	41.0	66.0		
	E3/E4	39.6	19.6		
	E4/E4	11.0	0.6		
Allele frequencies (%)*	E2	4.2	6.9		
	E3	62.8	81.0		
	E4	33.0	12.1		

* $P < 0.0001$.

Table 2
Distribution of LRP genotypes and alleles

		LRP	
		AD cases	Controls
Number of subjects		144	153
Genotype (%)*	83/87	0.7	2.0
	83/91	5.5	0.7
	87/87	13.9	17.6
	87/91	39.6	47.7
	91/91	40.3	32.0
Allele frequencies (%)**	83	3.1	1.3
	87	34.0	42.5
	91	62.9	56.2

* $P = 0.041$; ** $P = 0.046$.

allele ($P < 0.0001$) (Table 1). The odds ratio to develop the disease in the presence of at least one $\epsilon 4$ allele was 3.950 (95% CI = [2.402–6.495]). We did not see a statistically significant protective effect of the $\epsilon 2$ allele in this population (OR = 0.571; 95% CI = [0.270–1.209]; $P = 0.139$). The genotype distributions of the LRP polymorphism and the allele frequencies are shown in Table 2. The 83 bp allele was rarely observed (0.013), and the 95 bp allele was absent in this population. In the control group, the LRP allele frequencies were similar to those previously described [5,19]. The genotype distributions showed a significant difference between AD cases and controls ($P = 0.041$). This difference in genotype distributions was reflected in the allele frequencies. Comparison of the distribution of the LRP alleles indicated a depletion of the 87 bp allele and an enrichment of the 91 bp allele in AD cases compared to controls ($P = 0.046$). This effect is exactly the opposite of the results reported by Lendon et al. [9]. The genotypes containing the 83 bp allele, which is rare, were combined either with the genotypes containing the 91 bp allele, or the 87 bp allele. The results showed a non-significant increase in the genotypes with the 91 bp allele in the AD cases; but a significant decrease of the genotypes with at least one 87 bp allele in AD cases (OR = 0.574; 95% CI = [0.358–0.919]; $P = 0.020$). This association persisted when the analysis was performed with a multivariate logistic regression on the whole population adjusted on gender and age (OR = 0.567; 95% CI = [0.350–0.919]; $P = 0.021$), or when adjusted on gender, age and APOE (OR = 0.537; 95% CI = [0.321–0.897]; $P = 0.018$).

The decrease in the 87 bp allele in the AD group results in a concomitant increase in the frequencies of both the 83 and the 91 bp alleles. Our results, however, are in conflict with those of Lendon et al. We show an association between the LRP gene and disease; however, this association is opposite to that reported previously. In this report, the association is with a decrease in the frequency of the 87 bp allele; in the previous report it was an increase of this allele. There are two possibilities to explain these observations. The first is that both reports are type I statistical errors (false positives),

as the weak significance of the associations would suggest (Lendon's $P = 0.041$; this study $P = 0.046$); the second is that alleles at this locus are in linkage disequilibrium with biologically relevant variability elsewhere in the gene, and that different alleles are in disequilibrium in different populations. This latter suggestion could be due to the different genetic backgrounds between the populations used for these studies (American in Lendon et al.; French in this report). This possibility is further supported by the fact that both reports have borderline P values for the analysis of the LRP genotypes. However, they did not find any effect of the 87 bp allele after correction by logistic regression ($P = 0.27$) whereas we still had a significant result after this correction ($P = 0.021$). Sequence analysis of the LRP gene is a formidable undertaking as it has 89 coding exons [17], but will probably be needed to resolve this issue. A possible clue as to which part of the gene may be involved could be given by exploring the interaction between the LRP and APOE genes. We have found that the frequency of the 87 bp allele of the LRP gene is decreased in AD cases who are $\epsilon 4$ carriers; however, the lack of significance may be due to the small size of the population and the low frequency of the $\epsilon 4$ allele in the control group. This hypothesis needs to be investigated in a larger population before targeting the APOE binding domains for sequence analysis. Finally, it is of interest that there have been two positive linkage reports suggesting a locus on chromosome 12 may be involved in late-onset disease (Tanzi, personal communication; Pericak-Vance, personal communication). It remains possible that these positive linkage reports relate to the LRP locus.

This work was supported by an NIH project grant: LRP and Alzheimer's disease (J.H.), the Mayo Foundation, and also supported by INSERM and the Conseil Régional du Nord-Pas de Calais 'axe régional de recherche sur les maladies neurodégénératives et le vieillissement cérébral' (P.A., M.C.C.H., F.P.).

- [1] Beisiegel, U., Weber, W., Ihrke, G., Herz, J. and Stanley, K.K., The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein, *Nature*, 341 (1989) 162–164.
- [2] Chartier-Harlin, M.-C., Parfitt, M., Legrain, S., Pérez-Tur, J., Brousseau, T., Evans, E., Berr, C., Vidal, O., Roques, P., Gourlet, V., Fruchart, J.-C., Delacourte, A., Rossor, M. and Amouyel, P., Apolipoprotein E, $\epsilon 4$ allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset forms of Alzheimer's disease: analysis of the 19q13.2 chromosomal region, *Hum. Mol. Genet.*, 3 (1994) 569–574.
- [3] Chung, H., Roberts, C.T., Greenberg, S., Rebeck, G.W., Christie, R., Wallace, R., Jacob, H.J. and Hyman, B.T., Lack of association of trinucleotide repeat polymorphisms in the very-low-density lipoprotein receptor gene with Alzheimer's disease, *Ann. Neurol.*, 6 (1996) 800–803.
- [4] Hardy, J., Molecular genetics of Alzheimer's disease (review), *Acta Neurol. Scand. (Suppl.)*, 165 (1996) 13–17.
- [5] Harris, M., Sanghera, D.K. and Kamboh, M.I., Two new alleles in the tetranucleotide repeat polymorphism in the LDL-receptor-related protein (LRP) gene, *Clin. Genet.*, 50 (1996) 54–55.
- [6] Hixson, J.E. and Vernier, D.T., Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI, *J. Lipid Res.*, 31 (1990) 545–548.
- [7] Kamboh, M.I., Sanghera, D.K., Ferrell, R.E. and DeKosky, S.T., APOE*4-associated Alzheimer's disease risk is modified by $\alpha 1$ -antichymotrypsin polymorphism, *Nature Genet.*, 10 (1995) 486–488.
- [8] Kounnas, M., Moir, R., Rebeck, W., Bush, A., Argraves, S., Tanzi, R., Hyman, B. and Strickland, D., LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted β -amyloid precursor protein and mediates its degradation, *Cell*, 82 (1995) 331–340.
- [9] Lendon, C., Talbot, C., Craddock, N., Woo Han, S., Wragg, M., Morris, J. and Goate, A., Genetic association studies between dementia of the Alzheimer's type and three receptors for apolipoprotein E in a Caucasian population, *Neurosci. Lett.*, 222 (1997) 187–190.
- [10] Namba, Y., Tomonaga, M., Kawasaki, H., Otomo, E. and Ikeda, K., Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease, *Brain Res.*, 541 (1991) 163–166.
- [11] Okuizumi, K., Onodera, O., Namba, Y., Ikeda, K., Yamamoto, T., Seki, K., Ueki, A., Nanko, S., Tanaka, H., Takahashi, H., Oyanagi, K., Mizusawa, H., Kanazawa, I. and Tsuji, S., Genetic association of the very low density lipoprotein (VLDL) receptor gene with sporadic Alzheimer's disease, *Nature Genet.*, 11 (1995) 207–209.
- [12] Pérez-Tur, J., Wavrant-De Vrièze, F. and Lambert, J.-C., Chartier-Harlin, M.-C. and the Alzheimer's Study Group, Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease, *Lancet*, 347 (1996) 1560–1561.
- [13] Rebeck, G.W., Harr, S.D., Strickland, D.K. and Hyman, B.T., Multiple, diverse senile plaque-associated proteins are ligands of an apolipoprotein receptor, the alpha 2-macroglobulin receptor/low density-lipoprotein receptor-related protein, *Ann. Neurol.*, 37 (1995) 211–217.
- [14] Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S. and Roses, A.D., Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 (1993) 1977–1981.
- [15] Talbot, C., Houlden, H., Craddock, N., Crook, R., Hutton, M., Lendon, C., Prihar, G., Morris, J.C., Hardy, J. and Goate, A., Polymorphism in AACT gene may lower age of onset of Alzheimer's disease, *NeuroReport*, 7 (1996) 534–536.
- [16] van Duijn, C.M., de Knijff, P., Cruts, M., Wehnert, A., Havekes, L.M., Hofman, A. and Van Broeckhoven, C., Apolipoprotein E4 allele in a population-based study of early-onset Alzheimer's disease, *Nature Genet.*, 7 (1994) 74–78.
- [17] Van Leuven, F., Stas, L., Hilliker, C., Lorent, K., Umans, L., Serneels, L., Overbergh, L., Torrekens, S., Moechars, D., De Strooper, B. and Van den Berghe, H., Structure of the gene (LRP1) coding for the human $\alpha 2$ -macroglobulin receptor lipoprotein receptor-related protein, *Genomics*, 24 (1994) 78–89.
- [18] Wragg, M. and Hutton, M., Talbot, C. and the Alzheimer's Disease Collaborative Group, Genetic association between intronic polymorphism in presenilin-1 gene and late-onset Alzheimer's disease, *Lancet*, 347 (1996) 509–512.
- [19] Zuliani, G. and Hobbs, H.H., Tetranucleotide length polymorphism 5' of the $\alpha 2$ -macroglobulin receptor (A2MR)/LDL receptor-related protein (LRP) gene, *Hum. Mol. Genet.*, 3 (1994) 215.

Présentation du travail

Cette étude a été réalisée sur une population constituée de 144 patients de diagnostic probable de la MA (69,4% étant du sexe féminin) et de 153 témoins (dont 69,3% de femmes). La moyenne d'âge chez les témoins était de $79,3 \pm 9,3$ ans et de $77,3 \pm 8,9$ ans pour les malades, avec une moyenne d'âge d'apparition de premiers symptômes de $73,4 \pm 8,7$ ans pour ces derniers. Aucun des sujets ne présentait d'antécédent familial de démence et les malades remplissaient les critères établis par le National Institut of Neurological Disorders and Stroke (NINCDS) et l'Alzheimer's Disease Association (ADDA).

Chacun des sujets a été génotypé selon la méthode standard utilisée pour les polymorphismes de répétition (voir paragraphe [II.2.2](#)) avec les conditions décrites dans notre article.

Présentation des résultats

L'étude des fréquences alléliques du gène *ApoE* a tout d'abord confirmé l'implication de l'allèle $\epsilon 4$ dans la MA dans cette population d'étude ($p < 0,0001$). Le risque de développer la maladie est multiplié par 3,95 chez les personnes possédant au moins un allèle $\epsilon 4$ (IC à 95%=[2,4-6,5]).

Tableau 3: Distributions génotypiques et alléliques du polymorphisme présent dans la région 5'UTR du gène *LRP*.

		<i>Groupe des malades (n=144)</i>	<i>Groupe des témoins (n=153)</i>
Distribution des génotypes (%) :	83/87	0,7	2,0
	83/91	5,5	0,7
	87/87	13,9	17,6
	87/91	39,6	47,7
	91/91	40,3	32,0
Fréquences alléliques (%) :	83	3,1	1,3
	87	34,0	42,5
	91	62,9	56,2

Les distributions génotypiques et alléliques du gène *LRP* montrent une différence significative entre le groupe des malades et celui des témoins (respectivement $p=0,04$ et $p=0,05$) (voir tableau 3). En effet, il existe une déplétion de l'allèle 87 en faveur d'un enrichissement de l'allèle 91 dans le groupe des malades par rapport à celui des témoins. Cette association persiste lorsqu'une régression logistique multivariée ajustée sur le sexe, l'âge et le génotype *ApoE* est réalisée sur cette population étudiée (OR=0,5; IC à 95%=[0,3-0,9]; $p=0,02$).

Discussion des résultats

Nos résultats montrent une association entre le gène *LRP* et la MA. Nous observons en effet une diminution de l'allèle 87 résultant d'une augmentation à la fois de l'allèle 91 et de l'allèle 83 chez les malades. **L'allèle 87 aurait donc un effet protecteur, ou alors l'allèle 91 augmenterait le risque de développer la forme tardive de la MA.** Ces résultats sont cependant en contradiction avec les données de Lendon et collaborateurs qui observent une augmentation de l'allèle 87 chez les malades (Lendon *et al*, 1997).

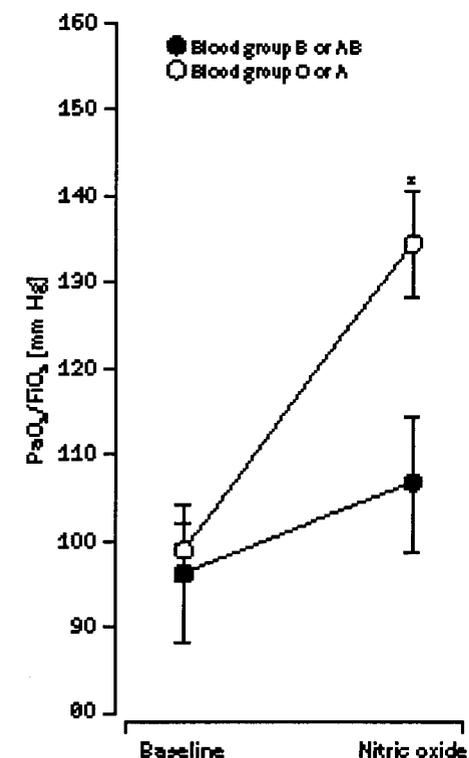
Une explication possible pour ces données contradictoires serait que les résultats sont dus à une erreur statistique de type I (faux positif), comme le suggère la faiblesse de ces associations ($p=0,04$ pour Lendon et $p=0,05$ dans notre étude). Toutefois, il est aussi possible que les allèles de ce locus soient en déséquilibre de liaison avec un autre polymorphisme génétique avoisinant qui, lui, pourrait avoir une variabilité biologique pertinente. Cette dernière hypothèse est soutenue par l'observation de l'augmentation d'allèles différents dans les populations étudiées. Cette étude a donc été approfondie dans notre laboratoire en multipliant le nombre de sujets dans la population étudiée par six et le résultat reste en accord avec nos premières données ($p<0,01$) (Lambert *et al*, 1999). Le risque de développer la maladie augmente dans ce cas jusqu'à 1,6 pour les sujets porteurs d'au moins un allèle 91.

D'autres groupes n'ont pu confirmer ces résultats (Clatworthy *et al*, 1997; Fallin *et al*, 1997c; Kamboh *et al*, 1998; Scott *et al*, 1998). Ils n'observent aucune association entre le gène *LRP* et la MA.

Ces résultats suggéraient l'existence d'un déséquilibre de liaison entre le polymorphisme de la région 5'UTR et un autre polymorphisme dans le gène *LRP*. Nous avons donc décidé d'examiner, dans une population française plus importante, le polymorphisme présent au niveau de l'exon 3 et précédemment décrit comme associé à la MA (Kang *et al*, 1997; Hollenbach *et al*, 1998). Les résultats sont regroupés dans l'article suivant: "Association du locus du gène *LRP* avec la forme sporadique de la Maladie d'Alzheimer à début tardif" publié en 1998 dans "*The Lancet*".

“Association at LRP gene locus with sporadic late-onset Alzheimer’s disease”

(1998), *The Lancet*.



$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio during nitric-oxide inhalation

Data are mean (SE). * $p=0.03$.

nitric oxide was measured as the percentage increase in $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ($\Delta\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$). If more than one nitric-oxide dose was inhaled, the largest $\Delta\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ was recorded. Patients with a $\Delta\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ of less than 20% were classified as non-responders.^{2,3}

The oxygenation response to inhaled nitric oxide was significantly decreased in patients with genotype B who express blood group B or AB ($\Delta\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, 13 [4]%, $n=27$) compared with patients without genotype B who express blood group O or A ($\Delta\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, 36 [4]%, $n=111$, $p=0.03$, ANOVA and post-hoc Scheffé's test; figure). 67% of patients with blood group B or AB were non-responders to inhaled nitric oxide compared with 27% of patients with blood group O or A ($p<0.001$, two-tailed Fisher's exact test). The oxygenation response to inhaled nitric oxide did not differ between men (32 [5]%, $n=91$) and women (32 [6]%, $n=47$), or between rhesus-positive (35 [4]%, $n=109$) and rhesus-negative patients (21 [5]%, $n=29$).

These results suggest a relation between the oxygenation response to inhaled nitric oxide and the ABO blood-group system. Possible explanations include a genetic linkage between the ABO gene locus (9q34) and another, as yet unknown, gene locus that is involved in the pulmonary vascular response to inhaled nitric oxide. Alternatively, ABO blood group may modify the severity or course of ARDS and alter responsiveness to nitric oxide. For example, patients with ARDS associated with sepsis more frequently fail to respond to inhaled nitric oxide than patients with ARDS associated with other processes.² Antibodies to blood group B are reported to possess antibacterial properties.⁵ Since these antibodies are naturally present in individuals with blood groups O or A, who responded better to inhaled nitric oxide, it is possible that ABO blood group may modify the underlying process contributing to ARDS and, thereby, modulate responsiveness to inhaled nitric oxide.

This study was supported by USPHS grants HL 42397 (W M Z and K D B) and HL 55377 (K D B), and by the Deutsche Forschungsgemeinschaft WE 2114/1-1 (J W). K D B is an established investigator of the American

Heart Association. We thank Yu Chiao Chang for statistical advice.

- Rossaint R, Falke KJ, Lopez F, Slama K, Pison U, Zapol WM. Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1993; **328**: 399-405.
- Manktelow C, Bigatello LM, Hess D, Hurford WE. Physiologic determinants of the response to inhaled nitric oxide in patients with acute respiratory distress syndrome. *Anesthesiology* 1997; **87**: 297-307.
- Dellinger RP, Zimmerman JL, Taylor RW, et al. Effects of inhaled nitric oxide in patients with acute respiratory distress syndrome: results of a randomized phase II trial. Inhaled Nitric Oxide in ARDS Study Group. *Crit Care Med* 1998; **26**: 15-23.
- Murray JF, Matthay MA, Luce JM, Flick MR. An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1988; **138**: 720-23.
- Springer GF. Importance of blood-group substances in interactions between man and microbes. *Ann N Y Acad Sci* 1970; **169**: 134-52.

Department of Anesthesia and Critical Care (J Weimann) and the Cardiovascular Research Center and Cardiology Division of the Department of Medicine, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02114, USA; and Klinik für Anaesthesiologie, Ruprecht-Karls Universität Heidelberg, Heidelberg, Germany

Association at LRP gene locus with sporadic late-onset Alzheimer's disease

Jean-Charles Lambert, Fabienne Wavrant-De Vrièze, Philippe Amouyel, Marie-Christine Chartier-Harlin

The $\epsilon 4$ allele of the apolipoprotein E gene (*APOE*) is the only recognised genetic susceptibility factor for late-onset Alzheimer's disease (AD). However, the mechanism by which the *APOE* alleles affect disease development is not fully understood. The LDL receptor-related protein (LRP), located on chromosome 12, is the main apoE receptor in the brain. LRP mediates neurite outgrowth in an apoE-isoform-dependent manner. LRP is also responsible for the endocytosis of secreted APP, another molecule central to the pathogenesis of AD. These observations suggest a potential for this apoE receptor to have a role in the pathogenesis of AD. Four studies have investigated the association of a TTTC repeat polymorphism in the 5' end of the *LRP* gene with AD, two of them with negative results.^{1,3} These discrepancies may be due to sample limitations ($n<180$ AD cases for all studies), different genetic background (not all whites, a mixture of familial or sporadic AD cases in some studies), or linkage disequilibrium with another gene. A report describing a silent CT polymorphism in exon 3 favours the hypothesis that variability in the *LRP* locus is associated with familial late-onset AD.⁴ We tested this polymorphism in a large white sample composed of 558 sporadic probable AD—ie, cases without any formal pattern of family inheritance—(mean age 71.8 [SD 8.1] years; mean age at onset 68.6 [8.2] years; 38.2% men) and 596 controls (mean age 72.7 [8.3] years; 37.2% men). Patients characterised according to NINCDS-ADRDA criteria, were recruited in hospital. Controls were defined as those without DSM-III-R dementia criteria and with intact cognitive functions. Informed consent was obtained. Statistical analyses were done with SAS software (SAS institute, Cary, NC). Categorical data were tested with the Pearson χ^2 test. Multivariate logistic regression analyses were used to test for interactions between *LRP* genotypes and

	n	Genotype distribution*			Allele distribution†	
		CC	CT	TT	C	T
Control	596	407 (0.68)	168 (0.28)	21 (0.04)	982 (0.82)	210 (0.18)
AD	558	428 (0.77)	119 (0.21)	11 (0.02)	975 (0.87)	141 (0.13)

* $p=0.004$, † $p<0.001$.

Genotype and allele distributions of the LRP exon 3 CT polymorphism

age of onset or *APOE* status, and to estimate odds ratios adjusted for age and sex.

The genotype and allele distributions were similar to that described by Kang and colleagues⁴ (table). The *LRP* CC genotype was over-represented in AD (odds ratio 1.5, [95% CI 1.2–2.0], $p=0.002$) compared with controls. Although no statistical interaction could be detected between *LRP* polymorphism and age at onset, the association of the *LRP* CC genotype was more pronounced in late-onset AD cases (1.7 [1.2–2.3], $p=0.001$, age at onset >65 years) than in cases with earlier ages at onset (1.2 [0.7–1.9], $p=0.520$, age at onset ≤ 65 years). Similarly, the level of association between the *LRP* CC genotype and AD tended to be stronger in those carrying at least one $\epsilon 4$ allele (2.2 [1.3–3.7], $p=0.006$), than in people without an $\epsilon 4$ allele (1.5 [1.0–2.3], $p=0.080$), despite the lack of significance of the statistical interaction.

Kang and colleagues⁴ reported that the *LRP* CC genotype was a risk factor for familial late-onset AD and described a similar trend in sporadic late-onset AD cases, lack of significance in this latter group probably being due to the small sample size. Our results extend the possible effect of the *LRP* CC genotype to sporadic late-onset AD cases. However, we cannot reject the hypothesis that linkage disequilibrium exists between this *LRP* polymorphism and another polymorphism within *LRP* or neighbouring genes. In the light of linkage data implicating a new locus on chromosome 12 for late-onset AD,⁵ the genetic association of *LRP* variability with both familial and sporadic late-onset AD may confirm involvement of the *LRP* locus in the disease.

We thank Jordi Pérez-Tur for his helpful discussion. J-CL is a recipient of the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. This work was supported by the Institut National pour la Santé et la Recherche Médicale, the Institut Pasteur de Lille, the Conseil Régional du Nord-Pas de Calais 'axe régional de recherche sur les maladies neurodégénératives et le vieillissement cérébral' and the Fondation pour la Recherche Médicale.

- 1 Lendon CL, Talbot CJ, Craddock NJ, et al. Genetic association studies between dementia of Alzheimer's type and the three receptors for apolipoprotein E in Caucasian population. *Neurosci Lett* 1997; 222: 187–90.
- 2 Wavrant-De Vrièze F, Pérez-Tur J, Lambert J-C, et al. Association between the low-density lipoprotein receptor-related protein (*LRP*) gene and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1997; 227: 68–70.
- 3 Clatworthy AE, Gomez-Isla T, Rebeck GW, Wallace RB, Hyman BT. Lack of association of a polymorphism in the low-density lipoprotein receptor-related protein gene with Alzheimer disease. *Arch Neurol* 1997; 54: 1289–92.
- 4 Kang DE, Saitoh T, Chen X, et al. Genetic association of the low-density lipoprotein receptor-related protein gene (*LRP*), an apolipoprotein E receptor with late-onset Alzheimer's disease. *Neurology* 1997; 49: 56–61.
- 5 Pericak-Vance MA, Bass MP, Yamaoka LH, et al. Complete genomic screen in late-onset familial Alzheimer disease. *JAMA* 1997; 278: 1237–41.

INSERM C/JF 95-05, Institut Pasteur de Lille, BP 245, 59019 Lille, France (M-C Chartier-Harlin)

Could lightning injury be magnetically induced?

Michael Cherington, Howard Wachtel, Philip R Yarnell

Lightning injuries are usually thought to be caused by direct strike, side flash, or ground current;^{1,2} none of which explain lightning-related deaths where current does not apparently enter or leave the patient's body.

In June, 1996, a 32-year-old man and three other golfers stood under a tree during a lightning storm. When lightning struck the tree, the patient suffered a cardiac arrest. Cardiopulmonary resuscitation was given by a physician who was nearby. The patient was taken to hospital but remained comatose and died on the 18th day. Three other golfers under the same tree survived. One had surface burns on his head,

neck, and abdomen at places where he wore metal objects: necklace, belt buckle, and metal button on a cap. The other two golfers had only brief loss of consciousness. This case and at least four other cases in the medical literature³ are unusual in that patients succumbed to lightning but there was no evidence of external damage from lightning currents. Lightning-related hypoxic encephalopathy secondary to cardiac arrest is often fatal.³ Most lightning casualties have external signs of damage from contact with electrical current, such as skin burns and Lichtenberg figures or "ferning".^{4,5} However, some patients have a cardiac arrest as the result of a lightning strike without external signs of electrical burns.

Lightning "bolts" have very high peak currents ($\geq 100\,000$ amps) which rise in μ s and decay more slowly. They may produce intense nearby magnetic fields (several millitesla at a distance of about 1 m), which may induce large but short-lived (<1 ms) currents in a human body. The induced current wave-form is proportional to the change per time of the magnetic field. The lightning may induce a loop current within the human torso without evidence of current entering the body. If these currents occur during a vulnerable part of the cardiac cycle, they could cause asystole or ventricular fibrillation.*

This hypothesis may be tested on mice or rats exposed to rapidly rising magnetic field pulses that approximate the dynamics of lightning currents within cylindrical chambers enclosed by solenoid windings. This method would necessitate the use of fields on the order or ten times as great as the natural lightning fields. Our proposed mechanism may explain some unwitnessed and unexplained "heart attacks" among hikers found dead in the mountains.

Presented in part at the American Association of Physics Teachers Meeting in Denver, Colorado, August 14, 1997.

We thank Vincent W Vanek.

*Lightning stroke with peak current 100 000 amp gives peak magnetic field (B_p):

$$B_p = \frac{\mu_0 I_p}{2\pi R}$$

Where μ_0 =magnetic permeability of air $4\pi(10^{-7})$ Webers/A·m I_p =peak current (amps). R =distance from the lightning stroke (m).

For a distance of 1.0 m, $B_p=2(10^{-7})$ Tesla. Lightning current rises to its peak in about 10^{-6} s, so the rate of rise of dB/dt is $2(10^6)$ Tesla/s. Electrical field induced in a cylindrical object (human torso)

$$E = \left(\frac{a}{2}\right) \frac{dB}{dt}$$

Where E =electrical field (v/m) a =radius of the induced current path (m). Highest fields would be at the perimeter of the torso and the lowest ones produced in the centre. With an estimate of $a=0.1$ m yields E of about 1000 V/m for $dB/dt=2(10^6)$ Tesla, and current density of about 1000 A/m² through the ventricles (tissue resistivity 1 ohm/m). Long current pulses (of ms) or for 60 Hz, such a current density would lead to arrhythmias. For current pulses lasting a few μ s, electrical impedance of cardiac-cell membranes is due almost entirely to the membrane capacitance (C_m) which is on the order of 0.01 F/m², the change in membrane potential (ΔV_m) is

$$\Delta V_m = \frac{J(\Delta t)}{C_m}$$

For $J=1000$ A/m², and the duration of the current pulse, $\Delta t=10^{-6}$ s, predicts a ΔV_m of 100 mV. If the cardiac cell is in a refractory state this current is not likely to re-trigger a discharge in the active phase corresponding to the ECG T wave. Ventricular fibrillation or asystole may result.

- 1 Kleinschmidt-DeMasters BK. Neuropathology of lightning-strike injuries. *Semin Neurol* 1995; 15: 323–28.
- 2 Cooper MA. Emergent care of lightning and electrical injuries. *Semin Neurol* 1995; 15: 268–78.
- 3 Wetli CV. Keraunopathology: an analysis of 45 fatalities. *Am J Forensic Med Path* 1996; 17: 89–98.
- 4 Cherington M, Yarnell PR, London SF. Neurological complications of lightning injuries. *West J Med* 1995; 162: 413–17.
- 5 ten Duis HJ, Klasen HJ, Nijsten MWN, Pietronero L. Superficial lightning injuries: their "fractal" shape and origin. *Burns* 1987; 13: 141–46.

Lightning Data Center, St Anthony Hospital, Denver, CO 80204, USA (M Cherington); Department of Neurology, University of Colorado School of Medicine, Denver, and Electrical and Computer Engineering Department, Boulder, CO

Présentation du travail

La population étudiée contient ici 558 patients (61,8% de femmes) de diagnostic probable de la MA selon les critères de NINCDS/ADRDA et 596 témoins (dont 62,8% sont des femmes) ne possédant aucun signe de démence selon les critères publiés dans le DSM-III-R. L'âge moyen de ces derniers est de $72,7 \pm 8,3$ ans et de $71,8 \pm 8,1$ ans pour les malades, avec un âge moyen d'apparition des premiers symptômes de $68,6 \pm 8,2$ ans.

Chacun des sujets a été génotypé pour le polymorphisme présent au niveau de l'exon 3 comme décrit dans l'article de Kang et collaborateurs (Kang *et al*, 1997).

Présentation des résultats

Tableau 4: Distributions génotypiques et alléliques du polymorphisme présent dans l'exon 3 du gène *LRP*.

	Distribution des génotypes (%)			Fréquences alléliques (%)	
	CC	CT	TT	C	T
Groupe des malades (n=558)	76,7	21,3	2,0	87,4	12,6
Groupe des témoins (n=596)	68,3	28,2	3,5	82,4	17,6

Après ajustement sur les facteurs confondants que sont l'âge et le sexe, nos résultats montrent une fréquence plus importante du génotype CC chez les sujets affectés par la forme tardive de la MA par rapport aux témoins (OR=1,7; IC à 95%=[1,2-2,3]; $p=0,002$) (voir tableau 4). De plus, lorsque cette population est divisée en sous-groupes en fonction du génotype *ApoE*, nous observons une augmentation de cette tendance

chez les personnes possédant au moins un allèle $\epsilon 4$ (OR=2,2; IC à 95%=[1,3-3,7]; $p=0,006$) par rapport au sous-groupe composé de sujets ne possédant pas l'allèle $\epsilon 4$ de l'*ApoE*. Ce dernier résultat n'est cependant pas significatif.

Discussion des résultats

Nous montrons une fois encore une association entre le gène *LRP* et la forme tardive de la MA. En effet, les personnes affectées par la maladie présentent plus souvent le génotype CC que les témoins. **Le génotype CC pour le polymorphisme de l'exon 3 augmenterait donc le risque de développer la forme tardive de la MA.** Nous confirmons ainsi les résultats obtenus par Kang et collaborateurs, ainsi que ceux de Hollenbach et collaborateurs qui décrivent le gène du *LRP* comme facteur de risque pour cette maladie (Kang *et al*, 1997; Hollenbach *et al*, 1998).

D'autres groupes, tentant de reproduire ces résultats, observent un effet similaire avec une diminution de l'allèle T chez les patients atteints de la MA, qui aurait donc un effet protecteur surtout chez les sujets possédant un allèle $\epsilon 4$ de l'*ApoE* (Baum *et al*, 1998; Kamboh *et al*, 1998).

Les données sur le polymorphisme de l'exon 3 sont beaucoup plus homogènes que celles obtenues en testant le polymorphisme présent dans la région 5'UTR. En effet, en dehors de l'étude de Woodward et collaborateurs (Woodward *et al*, 1998), toutes les autres tendent à confirmer l'impact du gène *LRP* dans le développement de la MA. Toutefois, le polymorphisme de l'exon 3 est une mutation silencieuse qui n'aurait, à priori, aucune conséquence biologique.

L'hypothèse de l'implication du *LRP* dans la MA n'étant pas exclue par ces données, nous avons décidé d'entreprendre le séquençage de ce gène. Notre but étant d'essayer de détecter d'autres variations génétiques entraînant des effets fonctionnels qui pourraient être associées de façon plus forte avec la MA, de tester leur distribution dans notre population et peut-être d'expliquer ainsi nos résultats antérieurs. Les résultats de cette étude ont été publiés en 1999 dans le journal *Human Genetics* dans l'article suivant: "Association entre une variabilité codante dans le gène du *LRP* et le risque de la Maladie d'Alzheimer à début tardif".

“Association between coding variability in the LRP gene and the risk of

Late-Onset Alzheimer’s Disease”

(1999), *Human Genetics*.

SHORT REPORT

Fabienne Wavrant-DeVrièze · Jean-Charles Lambert
 Lou Stas · Richard Crook · Dominique Cotel
 Florence Pasquier · Bernard Frigard
 Martine Lambrechts · Els Thiry · Philippe Amouyel
 Jordi Pérez Tur · Marie Christine Chartier-Harlin
 John Hardy · Fred Van Leuven

Association between coding variability in the LRP gene and the risk of late-onset Alzheimer's disease

Received: 28 December 1998 / Accepted: 1 March 1999

Abstract We have sequenced the entire (89 exons) open reading frame of the LRP gene in 12 cases of Alzheimer's disease (AD) from Northern France. We have found no novel changes but confirm the occurrence of a polymorphism in exon 6 of the gene (A216V). This polymorphism is rare (2.8% of controls) and is in linkage equilibrium with previously reported polymorphisms. The V216 allele is negatively associated with the disease in a large case-controlled series. These data suggest that the LRP receptor may be involved in the pathobiology of AD, but the association that we report here cannot explain the previously reported genetic data implicating the LRP gene in AD. If the LRP gene is a major site of genetic variability leading to AD, there must be other biologically relevant variability in promoter or other regulatory elements of this large gene.

Introduction

Several lines of evidence suggest that LRP (low-density lipoprotein receptor-related protein) is an attractive candi-

date locus for late-onset Alzheimer's disease (AD). First, it is a receptor for three ligands that are themselves established or reported as genetic risk factors for the disease: apolipoprotein E, the amyloid- β precursor protein (APP), and α 2 macroglobulin (α 2M; Van Leuven et al. 1980; Rebeck et al. 1995; Corder et al. 1993; Goate et al. 1991; Blacker et al. 1998). Second, several association studies have been reported between non-coding polymorphisms in the LRP gene and AD, the majority of which have been positive (Lendon et al. 1997; Wavrant-DeVrièze et al. 1997; Kang et al. 1997; Hollenbach et al. 1998; Kamboh et al. 1998; Baum et al. 1998; Lambert et al. 1998; but see Clatworthy et al. 1997; Fallin et al. 1997). Finally, genetic linkage studies have shown evidence for a locus on chromosome 12p, which is where LRP maps: the precise position of this locus is difficult to define because of poor resolution of the genetic analyses for late-onset disease but may include the LRP gene (Pericak-Vance et al. 1997; Wu et al. 1998; Rogaeva et al. 1998). The large size of the LRP gene (> 80 kb; Van Leuven et al. 1994) made sequencing this gene a formidable task: however, we have worked out an efficient strategy for doing this (Van Leuven et al. 1998). Our aim has therefore been as follows: first, to sequence the entire LRP gene in cases of AD that we have previously genetically defined so as to increase the likelihood of detecting variability (Wavrant-DeVrièze et al. 1997; Van Leuven et al. 1998) and second, to test any polymorphism that we found for association with the disease in the samples series in which we had previously observed an association between a promoter polymorphism and AD (Van Leuven et al. 1998).

F. Wavrant-DeVrièze · R. Crook · J. Pérez-Tur · J. Hardy
 Mayo Clinic Jacksonville, 4500 San Pablo Rd., Jacksonville,
 FL 32224, USA
 e-mail: hardy@mayo.edu, Fax: +1904-953-7370

F. Wavrant-DeVrièze · J.-C. Lambert · D. Cotel · P. Amouyel
 M.-C. Chartier-Harlin
 CJF 95-05 INSERM 508, Institut Pasteur de Lille,
 1 Rue du Pr Calmette BP 245, F-59019 Lille Cedex, France

L. Stas · M. Lambrechts · E. Thiry · F. Van Leuven
 Experimental Genetics Group, Center for Human Genetics,
 Flanders Institute for Biotechnology,
 K.U.Leuven – Campus Gasthuisberg ON 06,
 B-3000 Leuven, Belgium

F. Pasquier
 CHRU de Lille, Clinique Neurologique, Centre de la Mémoire,
 Hôpital Roger Salengro, F-59037 Lille Cédex, France

B. Frigard
 Centre de Gériatrie de Wasquehal Molinel,
 Rue Salvador Allende, BP165, F-59444 Wesquehal, France

Materials and methods

Samples used for sequencing

The cases that we sequenced were taken from our previous genetic association study between the LRP gene and AD (see Table 1). We chose samples segregated by the tetranucleotide repeat polymorphism genotype at the 5' end of the gene, a polymorphism that we had previously found to be associated with the disease (Wavrant-DeVrièze et al. 1997).

Table 1 Samples used for sequencing the LRP gene (M male, F female)

Sample	LRP tetranucleotide		
	Genotype	Age at onset	Gender
BFAD 00	87/87	76	M
BFAD 16	87/87	77	F
BFAD 18	87/87	87	F
BFAD 01	87/87	76	F
BFAD 19	91/91	77	M
BFAD 20	91/91	85	F
BFAD 27	91/91	72	M
BFAD 29	91/91	82	F
56	91/91	62	M
72	91/91	69	M
168	91/91	62	M
BFAD 26	91/91	84	F

Table 2 Primer sequences (used in addition to those described in Van Leuven et al. 1998)

Primers for LRP sequencing		
Exon 1R	GAATCTCACTCACCGTCG	18 mers
Exon 20R	TCATTGTCCCCATCGCAGGT	20 mers
Exon 21S	ACAGGGATGAGGAGGGCT	18 mers
Exon 22R	AGACTCCTACCCAGCCA	17 mers
Exon 29S	CGGATTGGTGGGAAGCA	17 mers
Exon 36R	GTTAGGTGAGGACAGGTGGA	20 mers
Exon 38R	TCCCCTAACTCACTCCTGC	19 mers
Exon 39-40S	AGGAGGCAGGAGTGAGTTAGG	21 mers
Exon 41R	ATGAACTGCGGGGGTGC	18 mers
Exon 43S	TTCCTGGGCATTGGGGCACT	20 mers
Exon 48R	ACCATCTGCTCACTGCCCCCT	21 mers
Exon 49-50S	CACCAGAAGGGCACCAGTT	18 mers
Exon 51S	TCTCTCTGTCTTCCCA	18 mers
Exon 52-53S	ACTCCACCCACACACAGA	19 mers
Exon 52R	ACACAGCCCTTCAGCCCT	18 mers
Exon 53-54S	TCCTCATCCAGTGCCTTGC	19 mers
Exon 55R	CAGATAGAGGCAGACCCCAA	20 mers
Exon 56-57S	CGGGTAGAGGGAATTGGAGT	20 mers
Exon 58R	GGGAGACATTGAGGCTTGGA	21 mers
Exon 60R	CAGTGTATGGCTCCCCTC	18 mers
Exon 66S	GGGAGATGACACGGAAGCAG	20 mers
Exon 61R	GTCTGAACCCTGCCTCTTTTAG	22 mers
Exon 68R	ATGGAGTGGGATGGGTGA	18 mers
Exon 69S	TGACCTCCCCAAACCCT	19 mers
Exon 74-75S	AGGGCATCCACTCTCTGT	18 mers
Exon 84R	AGGGCTCTCCATAGGTTG	18 mers
Exon 86-88S	GCTTCACCCAGGCATAG	17 mers
Exon 88R	TCCCCTATCTCGTCTCAG	19 mers

Technique used for sequencing

Essentially, we used the protocol as previously described (Van Leuven et al. 1998). However, we wished to make completely sure that any sequencing changes that changed an amino acid or had the potential to alter a splice site were confirmed through sequencing in both directions. For this reason, we designed extra primers to facilitate this effort (Table 2). The ABI Prism DNA sequencer 377 was used to run the sequencing reactions and to analyze the sequences.

Samples used for association study

The AD and control samples were European Caucasians from Northern France. Cases were without any formal pattern of family inheritance. Probable AD patients were characterized according to the NINCDS-ADRDA criteria and had been recruited in hospital. Controls were defined as being without DSM-III-R dementia criteria and with intact cognitive function. The tested population was composed of 665 AD cases (age 73.0 ± 8.7 ; age of onset 69.2 ± 8.6 ; 36.4% male) and 671 controls (age 73.1 ± 8.5 ; 36.5% male).

Polymerase chain reaction amplification of the LRP coding polymorphism

The coding polymorphism located in exon 6 of the LRP gene was amplified under the following conditions. Briefly, the polymerase chain reaction (PCR) step was performed over 35 cycles (1 min at 94°C , 1 min at 54°C , 1 min at 72°C) with the forward primer 5'-CTG TGC TGT TGA TAG CCA AC-3' and the reverse primer 5'-GCA GAC TGA GGG AGA TGT TG-3'. This produced a PCR product of 244 bp that was cleaved by *ApaI* to produce fragments of 193 and 51 bp. The fragments were separated on a 3% agarose gel.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the SAS software (SAS institute, Cary, N.C.). Categorical data were tested with the Pearson χ^2 test. Multivariate logistic regression analyses were used to estimate Odds Ratios (OR) adjusted for age and gender. The standard disequilibrium and the percent of maximum value of disequilibrium were computed as outlined by Thompson and colleagues (1988).

Results

We found no novel coding polymorphisms in the 89 exons of the LRP gene in the 12 cases that we sequenced. Four polymorphisms were located in splice junction at position +9 in intron 50, -5 in intron 54, -7 in intron 55, +11 intron 58. In a single sample (BFAD18), we found the heterozygote C→T change in exon 6 that we had previously reported in codon 216 (Van Leuven et al. 1998). This change deleted an *ApaI* site. The distribution of this polymorphism in the case controlled population is presented in Table 3. The alleles are in Hardy-Weinberg equilibrium. The T allele (V216) was rare with an allelic frequency of 2.8% in the control group. This frequency was significantly decreased to 1.5% in the AD group (OR = 0.54, CI 95% [0.30–0.96], $P = 0.025$). The OR for developing AD in subjects bearing at least one T allele was 0.55 (CI 95% [0.31–0.97], $P = 0.038$ adjusted by age and gender). These data suggested that the rarer allele (V216) presents a weakly protective effect. This change does not show significant disequilibrium with either the repeat polymor-

Table 3 Association study between the A216V polymorphism and AD

	Genotypes			Alleles	
	CC	CT	TT	C	T
Controls	635	33	2	1303	37
Cases	629	19	0	1277	19

phism at the 5' end of the gene or with the polymorphism in exon 3, both of which have previously been reported to show association with disease in this population (Wavrant-DeVrière et al. 1997; Lambert et al. 1998).

Discussion

First, these results clearly show that coding variability in the LRP gene is a rare event and that it is not a major site of genetic risk for AD. However, from a mechanistic perspective, these results are ambivalent. The finding that the polymorphism that we have discovered shows a negative association with the disease suggests that the LRP gene has a role in the pathogenesis of AD. However, the findings that this polymorphism is not in linkage disequilibrium with the other polymorphisms to which risk has been attributed (Lendon et al. 1997; Wavrant-DeVrière et al. 1997; Kang et al. 1987; Lambert et al. 1998) and is quite rare means that A216V is not the major, biologically relevant site of variability. If the previous reports of an association between the tetranucleotide repeat and exon 3 polymorphisms and AD are not type 1 errors (false positives), then the previously reported variability must be in linkage disequilibrium with another polymorphism in the untranslated regions or to another gene close to this one. Mutation in sequences controlling expression or splicing, such as the four polymorphisms close to splice donor and acceptor sites described in this paper, may be biologically relevant. We suggest that independent confirmation or refutation of the modest negative association that we report here would be a useful first step in determining whether the Herculean task of sequencing the entire locus in several cases and controls should be undertaken.

Acknowledgements This work was supported by the National Institute of Health, the Alzheimer's Disease Association, the Nettie and Rebecca Brown Foundation, the FWO-Vlaanderen, the Interuniversity Network for Fundamental Research (IUAP), the Action Program for Biotechnology of the Flemish government (VLAB/IWT, Cot-008), the Roomsfund, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), and the Institut Pasteur.

References

- Baum L, Chen L, Ng HK, Chan YS, Mak YT, Woo J, Chiu HF, Pang CD (1998) Low density lipoprotein receptor related protein gene exon 3 polymorphism association with Alzheimer's disease in Chinese. *Neurosci Lett* 247: 33–36
- Blacker D, Wilcox MA, Laird NM, Rodes L, Horvath SM, Go RC, Perry R, Watson B Jr, Bassett SS, McInnis MG, Albert MS, Hyman BT, Tanzi RE (1998) Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* 19: 357–360
- Clatworthy AE, Gomez-Isla T, Rebeck GW, Wallace RB, Hyman BT (1997) Lack of association of a polymorphism in the low density lipoprotein receptor related protein gene with Alzheimer disease. *Arch Neurol* 54: 1289–1292
- 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
- Fallin D, Hundtz A, Town T, Gaustlett AC, Duara R, Barker W, Crawford F, Mullan N (1997) No association between the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) gene and late-onset Alzheimer's disease in a community-based sample. *Neurosci Lett* 233: 145–147
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349: 704–706
- Hollenbach E, Ackermann S, Hyman BT, Rebeck GW (1998). Confirmation of an association between a polymorphism in exon 3 of the low-density lipoprotein receptor-related protein gene and Alzheimer's disease. *Neurology* 50: 1905–1907
- Kang DE, Saitoh T, Chen X, Xia Y (1997) Genetic association of the low-density lipoprotein receptor-related protein gene (LRP), an apolipoprotein E receptor, with late-onset Alzheimer's disease. *Neurology* 49: 56–61
- Kamboh MI, Ferrell RE, DeKosky ST (1997) Genetic association studies between Alzheimer's disease and two polymorphisms in the low density lipoprotein receptor-related protein gene. *Neurosci Lett* 244: 65–68
- Lambert JC, Wavrant-DeVrière F, Amouyel P, Chartier-Harlin MC (1998) Association at LRP gene locus with sporadic late-onset Alzheimer's disease. *Lancet* 351: 1787–1788
- Lendon CL, Talbot CJ, Craddock NJ, Han SW, Wragg M, Morris JC, Goate AM (1997) Genetic association studies between dementia of the Alzheimer's type and three receptors for apolipoprotein E in a Caucasian population. *Neurosci Lett* 222: 187–190
- 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: 1237–1241
- Rebeck GW, Harr SD, Strickland DK, Hyman BT (1995) Multiple, diverse senile plaque associated proteins are ligands of an apolipoprotein E receptor, the alpha 2-macroglobulin receptor/low-density-lipoprotein receptor-related protein. *Ann Neurol* 37: 211–217
- Rogaeva E, Premkumar S, Song Y, Sorbi S, Brindle N, Paterson A, Duara R, Levesque G, Yu G, Nishimura M, Ikeda M, O'Toole C, Kawarai T, Jorge R, Vilarino D, Bruni AC, Farrer LA, St George-Hyslop PH (1998) Evidence for an Alzheimer disease susceptibility locus on chromosome 12 and for further locus heterogeneity. *JAMA* 280: 614–618
- Thompson EA, Deeb S, Walker D, Motulsky AG (1988) The detection of linkage disequilibrium between closely linked markers: RFLPs at the AI-CIII apolipoprotein genes. *Am J Hum Genet* 42: 113–124
- Van Leuven F, Cassiman JJ, Van Den Berghe H (1980) Primary amines inhibit recycling of alpha 2M receptors in fibroblasts. *Cell* 20: 37–43
- Van Leuven F, Stas L, Hilliker C, Lorent K, Umans L, Serneels L, Overbergh L, Torrekens S, Moechars D, De Strooper B, et al. (1994) Structure of the gene (LRP1) coding for the human alpha 2-macroglobulin receptor lipoprotein receptor-related protein. *Genomics* 24: 78–89
- Van Leuven F, Stas L, Thiry E, Nelissen B, Miyake Y (1998) Strategy to sequence the 89 exons of the human LRP1 gene coding for the lipoprotein receptor related protein: identification of one expressed mutation among 48 polymorphisms. *Genomics* 52: 138–144
- Wavrant-DeVrière F, Pérez-Tur J, Lambert JC, Frigard B, Pasquier F, Delacourte A, Amouyel P, Hardy J, Chartier-Harlin MC (1997) Association between the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 227: 68–70
- Wu WS, Holmans P, Wavrant-DeVrière F, Shears S, Kehoe P, Crook R, Booth J, Williams N, Pérez-Tur J, Roehl K, Fenton I, Chartier-Harlin MC, Lovestone S, Williams J, Hutton M, Hardy J, Owen MJ, Goate A (1998) Genetic studies on chromosome 12 in late-onset Alzheimer disease. *JAMA* 280: 619–622

Présentation du travail

Le séquençage des 89 exons du gène *LRP* étant une tâche laborieuse, nous avons décidé de sélectionner douze échantillons d'ADN en fonction de leur génotype pour le polymorphisme de la région 5'UTR du gène. Nous avons donc choisi quatre échantillons d'ADN provenant de malades porteurs du génotype 91/91 (l'allèle 91 ayant été associé avec la MA), ainsi que quatre témoins de même génotype pour permettre la comparaison. Le gène *LRP* de quatre autres malades possédant le génotype 87/87 a aussi été séquencé afin de déterminer si l'association entre ce gène et la maladie est due à la présence de l'allèle 91, ou à l'absence de l'allèle 87.

Les nouveaux polymorphismes génétiques observés ont ensuite été testés sur une population française similaire à celle utilisée dans l'étude précédente.

Présentation des résultats

Aucun nouveau polymorphisme codant n'a été observé lors du séquençage des 89 exons du gène *LRP* chez les 12 sujets sélectionnés. Au niveau des jonctions d'épissage, quatre polymorphismes introniques ont été localisés en position +9 de l'intron 50, -5 de l'intron 54, -7 de l'intron 55 et +11 de l'intron 58. Aucun de ces polymorphismes génétiques ne montre d'association avec la MA dans la population d'étude (données non présentées).

Finalement, une substitution hétérozygote changeant un C pour un T, reportée à la même époque dans le codon 216 (exon 6) par nos collaborateurs (**Van Leuven *et al*, 1998**),

est observée chez l'un des malades possédant le génotype 87/87 pour le polymorphisme de la région 5'UTR. La distribution de ce polymorphisme génétique a donc été testée dans la population cas-témoins. Les résultats sont présentés dans le tableau 5 suivant.

Tableau 5: Distributions génotypiques et alléliques du polymorphisme présent dans l'exon 6 du gène *LRP*.

	Distribution des génotypes (%)			Fréquences alléliques (%)	
	CC	CT	TT	C	T
Groupe des malades (n=670)	97,1	2,9	0,0	98,5	1,5
Groupe des témoins (n=648)	94,8	4,9	0,3	97,2	2,8

L'allèle T semble être un évènement rare puisque sa fréquence dans le groupe des témoins n'est que de 2,8%. Dans le groupe des malades, la fréquence de cet allèle est cependant encore plus faible; elle diminue jusqu'à 1,5%. Ces données sont toujours significatives après ajustement sur l'âge et le sexe et montrent un risque de développer la MA de 0,55 pour les porteurs de l'allèle T (IC à 95%=[0,3-1.0]; p=0,04).

Discussion des résultats

Aucune mutation fonctionnelle nouvelle n'a été observée lors du séquençage des 89 exons dans le gène du *LRP* chez les 12 sujets sélectionnés. Toutefois un nouveau polymorphisme, identifié dans l'exon 6 du gène, montre aussi une association du *LRP* avec la forme tardive de la MA. En effet, cette mutation substitue une Cytosine en Thymine, ce qui se traduit par un changement de l'Alanine en Valine au niveau du codon 216. L'allèle T est rarement présent chez les malades atteints de la MA. Il est

donc possible que **l'allèle T du polymorphisme de l'exon 6 présente un effet protecteur** qui est faible. En effet ce nouveau polymorphisme génétique ne présente pas de déséquilibre de liaison avec les polymorphismes localisés au niveau de la région 5'UTR et de l'exon 3. Si les résultats précédents, montrant une association entre la MA et ces deux polymorphismes génétiques, ne sont pas des erreurs de type I, il est possible que le polymorphisme dans l'exon 6 soit en déséquilibre de liaison avec un autre polymorphisme présent dans la région non codante du gène *LRP* ou dans un autre gène environnant. La reproduction de cette étude par d'autres groupes est nécessaire afin de pouvoir formuler une idée plus claire sur le polymorphisme de l'exon 6.

II.3.2.3 Conclusion sur le gène *LRP*

Dans le cadre de notre thèse, nous avons donc étudié la distribution de trois polymorphismes présents au niveau du gène *LRP* dans la forme tardive de la MA. Que ce soit une association positive (allèle 91 du polymorphisme 5'UTR, allèle C du polymorphisme de l'exon 3), ou négative (allèle T du polymorphisme de l'exon 6), ces résultats montrent une **association entre les polymorphismes du gène *LRP* et la forme tardive de la MA**. Ceci suggère donc l'implication du *LRP* dans le développement de la MA. En effet, les études de liaison réalisées sur le chromosome 12 montrent l'existence d'une association entre des marqueurs de la région du *LRP* et la MA. Pourtant, après séquençage des 89 exons qui représentent le gène, nous n'avons trouvé aucune mutation pertinente pouvant rendre compte d'un changement dans la fonction biologique du *LRP*. Il doit donc exister une autre explication pour rendre

compte des associations trouvées entre les polymorphismes du gène *LRP* et la MA. Il est en effet possible que ces polymorphismes génétiques soient en déséquilibre de liaison avec un autre polymorphisme présent au niveau de son promoteur ou avec un autre gène environnant. Cette hypothèse est confortée par une étude d'association montrant l'existence d'une différence raciale dans la distribution du polymorphisme en position 5'UTR (Harris *et al*, 1998). Cependant, des études fonctionnelles seront nécessaires afin de déterminer l'effet physiologique de ces polymorphismes.

Un autre gène localisé sur le chromosome 12 et susceptible d'intervenir dans la MA est celui de l'*A2M* (voir paragraphe I.3.5.4). Au vu des résultats sur les polymorphismes du *LRP* et des études de liaison montrant une association du chromosome 12 avec la MA, nous avons donc décidé d'étudier la susceptibilité de ce gène dans la forme tardive de la MA.

II.3.3 Le gène de susceptibilité *A2M*

II.3.3.1 Présentation de l'*A2M*

Le gène *A2M* est localisé sur le chromosome 12 (Bell *et al*, 1985; Kan *et al*, 1985) et s'étend sur 48Kb dans la région p12.2-13 (Fukushima *et al*, 1988; Marynen *et al*, 1989). Ce gène est composé de 36 exons qui contiennent de 21 jusqu'à 229 nucléotides, la taille des introns allant de 145pb à 7,5Kb. Il possède 3 sites d'initiation de transcription pour différents types cellulaires (Matthijs *et al*, 1992).

Cette glycoprotéine plasmatique de 725KDa est formée par 4 sous-unités (185KDa), de 1451 acides aminés chacune, arrangées en 2 paires de dimères (Sottrup-Jensen *et al*, 1984). Elle contient deux régions essentielles qui sont le domaine d'amorçage, contenant une série de sites cibles pour les liaisons peptidiques et un domaine thiolester qui possède des propriétés antiprotéasiques.

L'*A2M* est un inhibiteur non spécifique de protéases qui inhibe les membres de chacune des 4 classes catalytiques des protéases (sérine, cystéine, acide aspartique et métalloprotéase) (Travis & Salvesen, 1983). Le clivage de la région d'amorçage par les protéinases conduit à un changement de conformation de l'*A2M* qui active la région thiolester. Il s'ensuit l'hydrolyse du pont thiolester, qui se fixe ensuite aux protéinases et expose alors les régions de reconnaissance pour son récepteur. Le récepteur de l'*A2M* peut ainsi fixer ce complexe et l'éliminer de la circulation par endocytose.

Plusieurs polymorphismes de type RFLP ont été décrits (Marynen *et al*, 1985; Scambler *et al*, 1985; David *et al*, 1987), mais les plus détaillés sont ceux retrouvés au niveau la région

5' de l'épissage de l'exon 18 (Matthijs & Marynen, 1991) et celui localisé dans l'exon 24 (Poller *et al*, 1992). Ils correspondent respectivement à une délétion de 5 nucléotides dans l'intron 17 et à une substitution de G pour A dans le codon 1000. Cette dernière conduit à un changement de l'acide aminé 25 du domaine thiolester d'une Valine pour une Isoleucine, alors que la conséquence de la délétion pentanucléotidique, au niveau de l'exon II du domaine d'amorce, n'est pas connue.

II.3.3.2 Le gène *A2M* et la maladie d'Alzheimer

Le gène *A2M* semble être un bon candidat d'étude pour aider à éclaircir l'étiologie de la MA, car il interviendrait dans plusieurs mécanismes impliqués dans le développement de la pathologie (voir paragraphe I.3.5.4) tels que la réponse inflammatoire ou le métabolisme de l'APP et il possède même un site de fixation au LRP. De plus, comme décrit dans le paragraphe *I.4.2.2.c*, des polymorphismes au niveau du gène *A2M* ont été associés avec la MA (Blacker *et al*, 1998; Liao *et al*, 1998).

Une autre partie de notre thèse a donc été de **tester les polymorphismes du gène *A2M* sur une population de patients atteints de la forme tardive de la MA.**

Les résultats ont été publiés en 1999 dans les deux articles suivants: "Aucune association entre le polymorphisme I1000V de l'alpha-2-macroglobuline et la Maladie d'Alzheimer" publié dans *Neuroscience Letters* et "Le gène de l'alpha-2-macroglobuline et la Maladie d'Alzheimer" publié dans *Nature Genetics*.

Nous présenterons les résultats sur le polymorphisme présent au niveau de l'exon 24
du gène *A2M* en premier lieu.

“No association between the alpha-2 macroglobulin I1000V polymorphism and

Alzheimer’s Disease”

(1999), *Neuroscience Letters*.

No association between the alpha-2 macroglobulin I1000V polymorphism and Alzheimer's disease

Fabienne Wavrant-DeVrière^{a,1}, Varuni Rudrasingham^{b,1}, Jean-Charles Lambert^{c,1}, Sumi Chakraverty^{1,d}, Patrick Kehoe^b, Richard Crook^a, Philippe Amouyel^c, William Wu^d, Peter Holmans^{b,d}, Francis Rice^d, Jordi Pérez-Tur^a, Bernard Frigard^c, John C. Morris^d, Stephanie Carty^b, Dominique Cottel^c, Nigel Tunstall^e, Simon Lovestone^e, Ronald C. Petersen^f, Marie-Christine Chartier-Harlin^c, Alison Goate^d, Michael J. Owen^b, Julie Williams^b, John Hardy^{a,*}

^aBirdsall Building, Mayo Clinic Jacksonville, 4500 San Pablo Road, Jacksonville, FL32084 USA

^bNeuropsychiatric Genetics Unit, Tenovus Building, University of Wales College of Medicine, Heath Park, Cardiff, CF4 4XN, UK

^cCJF 95-05 INSERM, Institut Pasteur de Lille, 1, Rue du Pr Calmette, 59019 Lille Cedex, France

^dDepartments of Neurology, Psychiatry and Genetics, Washington University School of Medicine, 4940 Children's Place, St. Louis, MO 63110, USA

^eSection of Old Age Psychiatry, Institute of Psychiatry, De Crespigny Park, London, SE5 8AF, UK

^fDepartment of Neurology, Mayo Clinic Rochester, Rochester, MN55905, USA

Received 7 October 1998; received in revised form 31 December 1998; accepted 4 January 1999

Abstract

Recent reports have suggested that variability in the $\alpha 2$ -macroglobulin gene is a genetic risk factor for Alzheimer's disease. Here we have both tested a common polymorphism in the gene (I1000V) for association with the disease in a four-site case control study design, and tested the locus for linkage in a large series of sibpairs afflicted with late onset disease. Our results fail to show an association between this polymorphism and disease. © 1999 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Alzheimer's disease; Genetics; $\alpha 2$ -macroglobulin; Apolipoprotein E

Apolipoprotein E (ApoE) is a major genetic risk factor locus for late-onset Alzheimer's disease [4]. However, it does not explain all the risk for the development of this form of the disease. As part of a strategy to find other genetic risk factors, several groups have reported the use of non-parametric linkage searches in families with late onset AD. Each of these studies has reported some evidence for a locus on the short arm of chromosome 12 [9,12,15]. However, the precise position of the linkage peak in each case has been different, probably because of the inherently poor resolution of the genetic analysis.

There are two attractive candidate genes for Alzheimer

loci on this chromosome: the LRP receptor gene and the $\alpha 2$ macroglobulin ($\alpha 2M$) gene. LRP is the predominant receptor for ApoE in the brain [14] and $\alpha 2M$ is another ligand for this receptor as well as being a serum pan-protease inhibitor [3,13]. Recently, an association between an intronic deletion polymorphism in the $\alpha 2M$ gene [10,11] and AD has been reported [2]. We have been unable to confirm this association between this intronic polymorphism in a large case control series (unpublished data). However, there is a coding variant of the $\alpha 2M$ gene: an I1000V variant, which has an allele distribution of ~70%/30% in Caucasian populations [10,11]. Therefore we determined to examine whether this polymorphism showed an association with disease in the same case control series. In particular, we considered it possible that this I1000V mutation was the biologically relevant polymorphism and that the intronic

* Corresponding author.

¹ These authors contributed equally to this work.

polymorphism was in linkage disequilibrium with this in some, but not all populations. The case control series we used for our analysis comprised four independent samples of AD patients with onset over 50 years and relevant controls (these controls were a mixture of population controls and the spouses of affected individuals) (see Table 1). AD patients were diagnosed according to NINCDS-ADRDA [8] criteria with either probable or definite AD. We also examined whether this polymorphism showed genetic linkage to late-onset AD in a large series of sibpairs. These sibpairs comprised a series of 266 sibpairs whose collection was funded by the National Institute of Mental Health [1] and a similar series of sibpairs collected through the auspices of the National Institute on Aging at the Indiana Alzheimer cell repository (131 sibpairs). The former series overlaps with that reported by Blacker et al. [1]. In addition, within the sibpairs, we tested whether the allele frequencies were similar in the affected probands and their unaffected sibs.

The I1000V polymorphism was detected following standard PCR and RFLP methods (see Table 1). The genotype distributions of the polymorphism in relation to APOE status are shown in Table 1. Pearson's chi-square was used to test for association. The frequencies were not different between the AD cases and the controls in the sporadic samples, or in the familial samples (sibpair series). We failed to observe an association between AD and possession of at least one copy of the polymorphism (all $P > 0.1$). As Blacker et al. [1] observed a stronger effect in individuals

without an ApoE4 allele, we stratified our sample according to ApoE4 status. We found no evidence of either a genotypic or allelic association in those with no ApoE4 alleles (all $P > 0.2$).

We then did a linkage study on the whole set of sibpairs using the program SPLINK to compute single-point maximum lod scores under 'possible triangle' restrictions [5,6]. This linkage data is shown in Table 2. The lod scores were marginally, though not significantly, positive and consistent with the data we have previously published for this chromosomal region [15].

These data, taken together with our data concerning the intronic deletion polymorphism suggest that $\alpha 2M$ locus is not a risk factor locus for AD. The two simplest explanations are that the original report of an involvement of $\alpha 2M$ constituted a type 1 statistical error (false positive) or that our failure to find an association in this series constitutes a type 2 error (false negative). However, both studies are statistically powerful and so other possibilities should also be considered. Chief among these is the fact that the ascertainment in the linkage studies is different from ascertainment in case control studies. In the linkage studies reported by Blacker et al., the genetic linkage strategy used looks for genetic differences in multiply affected families between affected and unaffected sibs. While this study was under revision, in a follow-up paper, Liao et al. [7] reported an association between the V1000 polymorphism and disease in a case control study of similar size to that we report here.

Table 1

Genotype distributions of the $\alpha 2$ macroglobulin gene. Genotype distributions of the I1000V polymorphism in the four-case control series and in the sibpairs used in the linkage series of experiments. The latter were not pooled with the former. The cases were diagnosed using NINCDS/ADRDA criteria. In the case/control series, the controls were either spouse controls or elderly unaffected persons from the same population. The linkage series consisted of data derived from a proband (AD case) and a random unaffected sib ('Control'). The primers used to generate the data had the sequences 5'GAGACATATTAGGCTCTGCC and 5'CAGTGTTGAGATAGCCAATG. Use of these primers generates a fragment of 180 bp. Digestion with *Sau3A1* or *DpnII* cuts allele 1 (I1000) to yield 140 bp/40 bp fragments: allele 2 (V1000) is not cut. The genotype frequencies (whole dataset) were: controls, 1/1, 42%; 1/2, 46%; 2/2, 12%; AD cases, 1/1, 44%; 1/2, 46%; 2/2, 10%. Allele frequencies are controls: 1, 65%; 2, 35% and AD cases: 1, 67%; 2, 33%.

APOE	Total			E4 +			E4 -		
	1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/2
Cardiff									
AD	39	64	16	25	37	9	14	27	7
Controls	41	56	17	13	12	5	28	44	12
Jacksonville									
AD	143	141	45	80	81	24	62	60	21
Controls	200	226	61	52	43	16	148	183	45
St. Louis									
AD	56	66	14	21	39	6	35	27	8
Controls	59	72	14	12	23	5	47	49	9
Lille									
AD	290	275	51	171	154	31	119	121	20
Controls	289	283	76	65	55	12	224	228	64
Total									
AD	528	546	126	297	311	70	230	235	56
Controls	589	637	168	142	133	38	447	504	130
Sibpairs									
AD	72	50	15	57	38	13	15	12	2
Controls	60	60	17	31	35	4	29	26	13

Table 2

Linkage data in sibpair series between I1000V polymorphism and Alzheimer's disease in 397 sibpairs. Linkage data in 397 sibpairs computed using the SPLINK program [5,6].

	Whole	E4+	E4-
Log-likelihood Ratio- chi-squared	1.67 (<i>P</i> = 0.1)	1.78 (<i>P</i> = 0.12)	0.01 (<i>P</i> = 0.5)
Equivalent to a lod score	0.4	0.4	0

They report a modest, but statistically significant increase in cases homozygote for the V1000 allele and a modest, but not statistically significant increase in the frequency of this allele in AD cases. In contrast, we find a modest, but not statistically significant decrease in both the proportion of V1000 homozygotes and in the frequency of the V1000 allele in cases. We regard our failure to find an association between the V1000 polymorphism and AD as evidence that $\alpha 2M$ is not a locus of major effect in AD, though it remains possible that there are protective alleles of $\alpha 2M$ which are found in the unaffected sibs of families multiply affected by AD. Exhaustive sequencing of the locus will be required to determine whether this is the case.

This work was supported by the Medical Research Council (UK), the Institut National pour la Santé Et la Recherche Médicale (INSERM), the Institut Pasteur de Lille, the Conseil Régional du Nord-Pas de Calais axe régional de recherche sur les maladies neurodégénératives et le vieillissement cérébral, and the Fondation pour la Recherche Médicale, The Mayo Foundation, National Institute of Health, the Alzheimer's Disease Association and the Nettie and Rebecca Brown Foundation. We also wish to thank the clinicians and staff of the Mayo Institute and Washington University, School of Medicine.

- [1] Blacker, D., Haines, J.L., Rodes, L., Terwedow, H., Go, R.C., Harrell, L.E., Perry, R.T., Bassett, S.S., Chase, G., Meyers, D., Albert, M.S. and Tanzi, R., ApoE-4 and age at onset of Alzheimer's disease: the NIMH genetics initiative, *Neurology*, 48 (1997) 139–147.
- [2] Blacker, D., Wilcox, M.A., Laird, N.M., Rodes, L., Horvath, S.M., Go, R.C., Perry, R., Watson, B. Jr., Bassett, S.S., McInnis, M.G., Albert, M.S., Hyman, B.T. and Tanzi, R.E., Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease, *Nat. Genet.*, 19 (1998) 357–360.
- [3] Borth, W., Alpha 2-macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics, *FASEB J.*, 6 (1992) 3345–3353.
- [4] Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel,

- D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L. and Pericak-Vance, M.A., Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families, *Science*, 261 (1993) 921–923.
- [5] Holmans, P. and Clayton, D., Efficiency of typing unaffected relatives in an affected sib-pair linkage study with single-locus and multiple tightly linked markers, *Am. J. Hum. Genet.*, 57 (1995) 1221–1232.
- [6] Holmans, P., Asymptotic properties of affected sib-pair linkage analysis, *Am. J. Hum. Genet.*, 52 (1993) 362–374.
- [7] Liao, A., Nitsch, R.M., Greenberg, S.M., Finckh, U., Blacker, D., Albert, M., Rebeck, G.W., Gomez-Isla, T., Clatworthy, A., Binetti, G., Hock, C., Mueller-Thompson, T., Mann, U., Zuchowski, K., Beisegele, U., Staehlin, H., Growdon, J.H., Tanzi, R.E. and Hyman, B.T., Genetic association of an $\alpha 2$ -macroglobulin (Val100Ile) polymorphism and Alzheimer's disease, *Hum. Mol. Genet.*, 7 (1998) 1953–1956.
- [8] McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D. and Stadlan, E.M., Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease, *Neurology*, 34 (1984) 939–944.
- [9] Pericak-Vance, M.A., Bass, M.P., Yamaoka, L.H., Gaskell, P.C., Scott, W.K., Terwedow, H.A., Menold, M.M., Conneally, P.M., Small, G.W., Vance, J.M., Saunders, A.M., Roses, A.D. and Haines, J.L., Complete genomic screen in late-onset familial Alzheimer disease. Evidence for a new locus on chromosome 12, *J. Am. Med. Assoc.*, 278 (1997) 1237–1241.
- [10] Poller, W., Faber, J.-P., Klöbeck, G. and Olek, K., Cloning of the alpha 2-macroglobulin gene and detection of mutations in two functional domains: the bait region and the thiolester site, *Human Genet.*, 88 (1992) 313–319.
- [11] Poller, W., Faber, J.-P. and Olek, K., Sequence polymorphism in the human alpha 2-macroglobulin (A2M) gene, *Nucl. Acid Res.*, 19 (1991) 198.
- [12] Rogaeva, E., Premkumar, S., Song, Y., Sorbi, S., Brindle, N., Paterson, A., Duara, R., Levesque, G., Yu, G., Nishimura, M., Ikeda, M., O'Toole, C., Kawarai, T., Jorge, R., Vilarino, D., Bruni, A.C., Farrer, L.A. and St. George-Hyslop, P.H., Evidence for an Alzheimer's disease susceptibility locus on chromosome 12 and for further locus heterogeneity, *J. Am. Med. Assoc.*, 280 (1998) 614–618.
- [13] Strickland, D.K., Ashcom, J.D., Williams, S., Burgess, W.H., Migliorini, M. and Argraves, W.S., Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor, *J. Biol. Chem.*, 15 (265) (1990) 17401–17404.
- [14] Van Leuven, F., Stas, L., Hilliker, C., Lorent, K., Umans, L., Semeels, L., Overbergh, L., Torrekens, S., Moechars, D., De Stommer, B. and Van Den Berghe, H., Structure of the gene (LRP1) coding for the human alpha 2-macroglobulin receptor lipoprotein receptor-related protein, *Genomics*, 24 (1994) 78–89.
- [15] Wu, W.S., Holmans, P., Wavrant-DeVrièze, F., Shears, S., Kehoe, P., Crook, R., Booth, J., Williams, N., Perez-Tur, J., Roehl, K., Fenton, I., Chartier-Harlin, M.C., Lovestone, S., Williams, J., Hutton, M., Hardy, J., Owen, M.J. and Goate, A., Genetic studies on chromosome 12 in late-onset Alzheimer disease, *J. Am. Med. Assoc.*, 280 (1998) 619–622.

Présentation du travail

La population étudiée est constituée de quatre groupes de sujets atteints de la MA et provenant d'Europe et des Etats-Unis. Au total, elle comprend 1200 sujets dont l'âge d'apparition des premiers symptômes est supérieur à 50 ans et 1394 témoins comprenant principalement le conjoint des individus affectés. Cette population est composée en moyenne de 60% de femmes.

Une autre population constituée de 397 paires de germains atteints de la forme tardive de la MA a été testée afin d'examiner l'existence d'une liaison génétique entre ce polymorphisme et les formes familiales de la maladie. Cette population est également utilisée pour observer la distribution des allèles dans un groupe comprenant une personne affectée de chacune des familles (cas index) et un groupe témoin constitué d'un apparenté sain de chacune des familles. Cette sous-population comprend 137 individus affectés et autant de témoins.

Le polymorphisme, situé au niveau de l'exon 24, est détecté selon les conditions standard de détection des polymorphismes de type RFLP.

Présentation des résultats

Tableau 6: Distributions génotypiques et alléliques du polymorphisme présent dans l'exon 24 du gène *A2M* dans une population cas-témoins.

	Distribution des génotypes (%)			Fréquences alléliques (%)	
	A/A	A/G	G/G	A	G
<i>Population de malades (n=1200)</i>	44,0	45,5	10,5	66,7	33,3
<i>Population de témoins (n=1394)</i>	42,3	45,7	12,1	65,1	34,9

Aucune variation significative entre les fréquences alléliques et les distributions génotypiques n'est observée, aussi bien dans la population constituée de cas sporadiques (Tableau 6) que dans la sous-population composée de cas familiaux (Tableau 7). Même après stratification de ces populations en fonction du génotype de l'*ApoE* (voir l'article).

Tableau 7: Distributions génotypiques et alléliques du polymorphisme présent dans l'exon 24 du gène *A2M* dans la population cas index-germaines témoins.

	Distribution des génotypes (%)			Fréquences alléliques (%)	
	A/A	A/G	G/G	A	G
Population de malades (n=137)	52,6	36,5	10,9	70,8	29,2
Population de témoins (n=137)	43,8	43,8	12,4	65,7	34,3

De même, l'étude génétique sur la population de paires de germains ne montre pas de liaison entre le gène *A2M* et la MA. Toutefois, le résultat est proche du seuil de significativité dans le groupe des paires de germains ne contenant aucun allèle $\epsilon 4$, lorsque ceux-ci sont séparés en fonction du génotype *ApoE*.

Discussion des résultats

Aucune association n'est présente entre la MA et le polymorphisme situé au niveau de l'exon 24 du gène *A2M* dans nos populations, aussi bien dans les cas sporadiques que dans les cas familiaux. Nous ne pouvons donc reproduire les résultats de Liao et collaborateurs (Liao *et al*, 1998) qui présentent une association entre la MA et l'allèle G du polymorphisme de l'exon 24.

De plus, nous n'obtenons pas de résultat positif montrant l'existence d'une liaison génétique entre ce polymorphisme et les formes familiales de la maladie. Bien que, dans le groupe des paires de germains ne possédant pas d'allèle $\epsilon 4$, il semble exister une liaison génétique faible avec ce polymorphisme mais qui n'est cependant pas significative. D'autres groupes ont récemment publié des résultats semblables (Crawford *et al*, 1999; Singleton *et al*, 1999). Il est donc possible que les résultats présentés par Liao et collaborateurs soient une erreur statistique de type I (faux positif).

Toutefois, une étude réalisée sur une population finlandaise constituée de sujets de diagnostic certain de la MA, montre une association de l'allèle A avec la maladie (Myllykangas *et al*, 1999). Cette association est plus importante pour les individus qui ne possèdent aucun allèle $\epsilon 4$ de l'*ApoE*.

Une autre explication pour ces résultats contradictoires pourrait être que ce polymorphisme dans l'exon 24 du gène *A2M* est en déséquilibre de liaison avec une mutation dans le gène ou un polymorphisme présent dans un gène avoisinant. Dans ce dernier cas, le comportement du polymorphisme présent au niveau de l'exon 24 de l'*A2M* varierait selon les populations étudiées.

En parallèle à cette étude, le polymorphisme présent au niveau de l'intron 17 de l'*A2M* a lui aussi été investigué. Les résultats sont présentés dans l'article qui suit.

“Alpha-2 macroglobulin gene and Alzheimer’s disease”

(1999), *Nature Genetics*.

Our third sample was composed of individuals from an epidemiologically based cohort from Cambridge aged 84 and older in which cognitive function was assessed using the MMSE 3. Of 229 individuals analysed, 47 had MMSE scores less than 22 and 159 had MMSE scores greater than 23 (used as controls in sample 1, above). The odds ratio reported previously for *A2M* (3.56; ref. 2) is detectable with 37 cases and 74 controls (80% power, 5% significance; ref. 5), thus our combined sample of 230 cases and 218 controls should detect this effect. Our autopsy-confirmed sample alone should detect an odds ratio of 2 (80% power, 5% significance).

We designed new primers to facilitate *A2M* genotyping (AmaF, 5'-TTCTC-CATAAGCTTTATCTGTATG-3'; AmaR, 5'-AAGTACTTTTCGTACGGTCTCCG-3'). These gave products of 138 bp (wild-type) and 133 bp (deletion), which corresponded with alleles determined using the previous method².

We compared frequencies of carriers for at least one **2* allele with wild-type homozygotes² and allele frequencies in cases and controls from our three groups and in the pooled cases with controls (Table 1). We saw no significant influence of *A2M*2* on AD or dementia risk in any of these comparisons ($P > 0.05$, χ^2 tests) or on MMSE score (Cambridge cohort; $P > 0.05$), even after using a multiple regression approach to account for the effect of age on MMSE score.

*A2M*2* is not strongly associated with AD risk in our UK samples. Our 95% confidence intervals for the odds ratio of AD associated with carriers of *A2M*2* did not overlap with that in the Blacker study²

(1.80–7.03) when we compared autopsy-confirmed cases with all non-demented controls, Cambridge cases with Cambridge controls and all cases with all controls (Table 1). The proportion of *A2M*2* carriers was 32.6% in our elderly, non-demented controls versus 29.5% in the Blacker *et al.* cases, and the *A2M*2* allele frequencies were 17.9% and 16.4% in our controls and the Blacker *et al.*² cases, respectively. Our data are unlikely to be confounded by population stratification, because they include two epidemiologically based cohort studies from confined regions including almost exclusively English individuals of European descent.

The discrepancies between our data and those reported previously² may be due to regional population differences in AD susceptibility associated with this polymorphism, or the gene may be associated with AD confined to particular ages and the UK and USA samples may have different age distributions. There may be another functional variant closely linked to *A2M*2* conferring AD risk, which is in linkage disequilibrium with the deletion allele in the USA sample but not in the UK samples. Family based association studies² may give different odds ratios from population-based case-control studies, either because these are families with a high density of disease, or because affected and unaffected individuals in family based studies are more likely to share other familial factors than population-based cases and controls. We have looked at autopsy-confirmed cases, however, avoiding the diagnostic uncertainties associated with clinical assessments and at epidemiologically based samples, which reflect the impact of

this gene in the general population, as opposed to highly selected families.

Acknowledgements

We thank E. Buckridge and R.A. Furlong for technical and statistical assistance, the Anglia and Oxford Regional Health Authority, The Medical Research Council and The Department of Health for funding. D.C.R. is a Glaxo Wellcome Research Fellow.

David J. Dow¹, Nicola Lindsey¹, Nigel J. Cairns², Carol Brayne³, Damian Robinson³, Felicia A. Huppert⁴, Eugene S. Paykel⁴, John Xuereb⁵, Gordon Wilcock⁶, Joanne L. Whittaker¹ & David C. Rubinsztein^{1,7}

¹Department of Medical Genetics, Addenbrooke's Hospital, Hills Road, Cambridge, CB2 2QQ, UK. ²Medical Research Council Brain Bank, Department of Neuropathology, Institute of Psychiatry, London, De Crespigny Park, London, SE5 8AF, UK. ³Institute of Public Health, University Forvie Site, Robinson Way, Cambridge, CB2 2SR, UK. ⁴Departments of ⁴Psychiatry and ⁵Pathology, Cambridge University, Addenbrooke's Hospital, Hills Road, Cambridge, CB2 2QQ, UK. ⁶Day Hospital Laboratory, Department of Care of the Elderly, University of Bristol, Frenchay Hospital, Bristol, BS16, 1LE, UK. ⁷Department of Medical Genetics, Cambridge Institute for Medical Research, Wellcome/MRC Building, Addenbrooke's Hospital, Hills Road, Cambridge, CB2 2XY, UK. Correspondence should be addressed to D.C.R. (e-mail: dcr1000@cus.cam.ac.uk).

- Heston, L.L. in *The Genetic Basis of Common Diseases* (eds King, R.A. *et al.*) 792–800 (Oxford University Press, New York, 1992).
- Blacker, D. *et al.* *Nature Genet.* **19**, 357–360 (1998).
- Tysoe, C. *et al.* *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **9**, 191–198 (1998).
- The Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study *Psychol. Med.* **28**, 319–335 (1998).
- Breslow, N.E. & Day, N.E. *Statistical methods in Core Research: The Design and Analysis of Case-Control Studies* (Iarc Scientific Publications, Lyon, 1980).

α -2 macroglobulin gene and Alzheimer disease

Blacker *et al.*¹ reported an association between a deletion in exon 18 of the α -2 macroglobulin (*A2M*) gene and Alzheimer disease (AD) in a sample of affected and unaffected siblings from families segregating AD. They observed that the degree of conferred risk for AD in *A2M* allele 2 (*A2M*2*) carriers was similar in magnitude to that for carriers of the apolipoprotein (*APOE*) ϵ 4 allele (*APOE*E4*). We set out to test for a similar association in a powerful, case-control sample composed of 2,616 individuals taken from populations from Europe and the United States. In addition, we

extended our analysis of the National Institute of Mental Health (NIMH) family samples studied by Blacker *et al.*¹ using linkage and association approaches. We pooled this NIMH series (270 sibpairs) with a similar series of 125 sibpairs collected through the auspices of the National Institution of Aging (NIA) at the Indiana Alzheimer cell repository to increase the power of our analysis.

We studied four independent association samples of unrelated AD patients with onset over 50 years and relevant controls (Table 1) and diagnosed AD patients according to NINCDS-ADRDA

(ref. 2) criteria with either probable or definite AD. We calculated that this sample had over 99% power to detect an effect of equivalent size to that reported by Blacker *et al.*¹ in their familial sample (odds ratio (OR)=3.56), assuming a stringent α level of 0.001. Furthermore, we calculated that our sample was sufficiently powerful (80%) to detect an extremely small effect (OR \geq 1.2) assuming an α level of 0.05.

We detected the exon 18 mutation using standard PCR and RFLP methods (available on request). We used the Woolf method³ to test for association in the combined data set and MAPMAKER/SIBS (ref. 4) to compute single-point maximum lod scores.

The genotype distributions of *A2M*2* in relation to *APOE* status are shown

Table 1 • Association between *A2M* and AD

Research centre	Sample descriptions	Summary statistics			
		Whole samples *2/*2 and *1/*2 versus *1/*1	<i>APOE</i> *E4- *2/*2 and *1/*2 versus *1/*1	Whole sample allele *2/*1	<i>APOE</i> *E4- allele *2/*1
UK:Cardiff	152 AD patients: 63% F, AO 71.9±8.13	1.5 (0.8–2.8)	1.3 (0.6–2.8)	1.4 (0.8–2.4)	1.2 (0.6–2.5)
	99 controls: 54% F, age 72.6±6.55				
France:Lille	616 AD patients: 63% F, AO 69.4±8.6	1.1 (0.9–1.5)	1.1 (0.8–1.6)	1.1 (0.9–1.4)	1.1 (0.8–1.4)
	648 controls: 63% F, age 73.1±8.5				
US:Wash U	143 AD patients: 62.4% F, AO 73.7±9.51	1 (0.6–1.6)	1.7 (0.9–3.3)	1 (0.6–1.5)	1.6 (0.9–2.7)
	144 controls: 65.2% F, age 77±9.2				
US:Mayo	327 AD patients: 65.5% F, AO 75.5±9.7	0.8 (0.6–1.1)	0.8 (0.5–1.2)	0.8 (0.6–1.1)	0.9 (0.6–1.2)
	487 controls: 67.1% F, age 82.7±7.5				
Combined Sample	1,238 AD patients	1 (0.9–1.2)	1.1 (0.9–1.4)	1 (0.9–1.2)	1.1 (0.9–1.3)
	1,378 controls				

AO, age at onset.

(Table 2), as well as the summary statistics (Table 1). We did not observe an association between AD and possession of at least one copy of the deletion ($P=0.7$) in the sample overall. We also failed to detect an allelic association ($P=0.4$), although the combined sample showed the expected association between AD and *APOE**E4 ($P<10^{-10}$, OR=4.6, 95% confidence interval (CI)=3.9–5.5).

As Blacker *et al.*¹ observed a stronger effect in individuals without an *APOE**E4 allele, we stratified our sample according to *APOE**E4 status. We found no evidence of either a genotypic (*A2M**2/*2 and *A2M**2/*1 versus *A2M**1/*1) or allelic association in individuals with no *APOE**E4 alleles ($P=0.5$ and $P=0.4$). All samples of cases and controls were in Hardy-Weinberg equilibrium.

We speculated that the difference between affected and unaffected siblings observed by Blacker *et al.*¹ may reflect the action of a confound, such as age-related

differences in exon 18 frequencies between groups. We tested this in the NIMH sample used by Blacker and colleagues¹ and found some evidence of age differences in affected (mean age=75.7±10.9) versus unaffected siblings (mean age=82.5±7.2). We then tested for age differences (50–79 versus 80+ years) in proportions of individuals with the exon 18 deletion in our control samples. We found no association between the *A2M**1/*1 genotype and age ($P=0.2$). Indeed, we found that the trend was slightly in the opposite direction (data not shown), suggesting that age did not act as a confound.

Our collaborative group recently obtained evidence⁵ consistent with linkage (MLS=1.91) to polymorphic markers on chromosome 12 in a region encompassing the *A2M* locus in the same NIMH sample studied by Blacker *et al.*¹. This did not meet Lander and Kruglyak's criterion⁴ for suggestive linkage but was the second highest score obtained in our genome scan

and was observed in 68 *APOE**E4-negative families⁶. We therefore tested for linkage between AD and the exon 18 polymorphism analysed in the NIMH/NIA sample using the exon 18 polymorphism and obtained a lod score of 0.7 in *APOE**E4-negative affected sibling pairs and a lod score of 0.17 for the sample overall. We thus observed a similar trend towards excess allele sharing in *APOE**E4-negative siblings, but with a reduced level of significance that might reflect a lack of informativity of the polymorphism.

Finally, we were concerned that the tests used by Blacker *et al.*, which included all members of sibships, may have overestimated the size of the association in their sample. We tested for association using one pair of affected/unaffected siblings chosen at random from each family. We found significant but weaker genotypic (*A2M**2/*2 and *1/*2 versus *1/*1; $P=0.04$) and allelic (*A2M**2; $P=0.01$) associations in the NIMH sample than those observed by Blacker

Table 2 • Genotype distributions of *A2M* as a function of *APOEE4 status**

	Whole sample			<i>E4+</i>			<i>E4-</i>		
	*1/*1	*1/*2	*2/*2	*1/*1	*1/*2	*2/*2	*1/*1	*1/*2	*2/*2
UK: Cardiff									
AD	112	37	3	68	23	2	44	14	1
Control	80	17	2	21	2	1	59	15	1
France: Lille									
AD	434	165	17	245	99	12	189	66	5
Control	474	158	16	88	42	2	386	116	14
US: Wash U									
AD	102	37	4	57	14	0	45	23	4
Control	102	37	5	25	14	1	77	23	4
US: Mayo									
AD	242	78	7	137	45	3	105	33	4
Control	340	132	15	80	25	6	260	107	9
Total									
AD	890	317	31	507	181	17	383	136	14
%	(72%)	(25.5%)	(2.5%)	(72%)	(25.6%)	(2.4%)	(72%)	(25.5%)	(2.5%)
Control	996	344	38	214	83	10	782	261	28
%	(72%)	(25%)	(3%)	(69%)	(27%)	(3%)	(73%)	(24.4%)	(2.6%)

*et al.*¹, showing ORs of 2.13 and 2.17, respectively. Similar though non-significant trends were also observed in the NIA sample ($P = 0.1$; $P = 0.1$). Combined analyses of the NIMH and NIA samples showed significant genotypic ($P = 0.007$, OR=2.13, CI=1.22–3.7) and allelic ($P=0.003$, OR=2.02, CI=1.3–3.2) associations with AD.

We did not find associations between AD and $A2M^*2$, or genotypes containing $A2M^*2$, in a powerful, case-control sample. We did, however, detect significant but weaker associations in the NIMH sample than those quoted by Blacker *et al.*¹ using the same sample, together with similar but non-significant trends in an independent family sample (NIA). We believe the ORs we observed provide more accurate estimates of the effect sizes than those quoted originally¹. We conclude that if these data are not due to chance, $A2M$, or a gene in linkage disequilibrium with it, may be weakly associated with AD in some samples and may reflect either an interaction with other susceptibility gene/s segregating in these families or a stronger genetic effect

in some of these families. Either case would limit the power of conventional case-control samples to detect association.

Acknowledgements

We thank the clinicians and staff of the Mayo Institute and Washington University School of Medicine, NIMH and NIA. This work was supported by the Medical Research Council (UK), the Institut National pour la Santé Et la Recherche Médicale (INSERM), the Institut Pasteur de Lille, the Conseil Régional du Nord-Pas de Calais axe régional de recherche sur les maladies neurodégénératives et le vieillissement cérébral and the Fondation pour la Recherche Médicale, The Mayo Foundation, National Institute of Health, the Alzheimer's Disease Association and the Nettie and Rebecca Brown Foundation.

Varuni Rudrasingham^{1*},
Fabienne Wavrant-De Vrièze^{2*},
Jean-Charles Lambert^{3*},
Sumi Chakraverty^{4*}, Patrick Kehoe¹,
Richard Crook², Philippe Amouyel³,
William Wu⁴, Frances Rice¹,
Jordi Pérez-Tur², Bernard Frigard³,
John C. Morris⁴, Stephanie Carty¹,

Ronald Petersen⁵, Dominique Cotte^{1,3},
Nigel Tunstall⁶, Peter Holmans^{1,4},
Simon Lovestone⁶,
Marie-Christine Chartier-Harlin³,
Alison Goate⁴, John Hardy²,
Michael J. Owen¹ & Julie Williams¹

*These authors contributed equally to this work.

¹Department of Psychological Medicine, University of Wales College of Medicine, Heath Park, Cardiff, CF14 4XN. ²Birdsall Building, Mayo Clinic Jacksonville, 4500 San Pablo Road, Jacksonville, Florida 32084, USA. ³CJF 95-05 INSERM, Institut Pasteur de Lille, 1 Rue du Pr Calmette, 59019 Lille Cedex, France.

⁴Departments of Neurology, Psychiatry and Genetics, Washington University School of Medicine, 4940 Children's Place, St. Louis, Missouri 63110, USA. ⁵Department of Neurology, Mayo Clinic Rochester, Rochester, Minnesota 55905, USA. ⁶Section of Old Age Psychiatry, Institute of Psychiatry, De Crespigny Park, London SE5 8AF UK. Correspondence should be addressed to J.W. (e-mail: WilliamsJ@cardiff.ac.uk).

1. Blacker, D. *et al.* *Nature Genet.* **19**, 357–360 (1998).
2. McKhann, G. *et al.* *Neurology* **34**, 939–944 (1984).
3. Woolf, B. *Ann. Hum. Genet.* **19**, 251–253 (1955).
4. Kruglyak, L. & Lander, E.S. *Am. J. Hum. Genet.* **57**, 439–454 (1995).
5. Wu, W.S. *et al.* *JAMA* **280**, 619–622 (1998).
6. Kehoe, P. *et al.* *Hum. Mol. Genet.* **8**, 237–245 (1999).

An α -2-macroglobulin insertion-deletion polymorphism in Alzheimer disease

Blacker *et al.*¹ reported an association between Alzheimer disease (AD) and the deletion allele ($A2M^*2$) of an intronic polymorphism in the α -2-macroglobulin gene ($A2M$; ref. 2), which confers a risk for AD (OR=3.55, 95% CI=1.90–7.03) comparable with that of $APOE^*E4$ (OR=3.54, 95% CI=1.76–7.12). We analysed two independent sets of AD families^{3,4} using the same family-based association (sibship disequilibrium test¹ (SDT) and sib transmission-disequilibrium test⁵ (S-TDT)) methods. Following the scheme of Blacker *et al.*¹, we limited these analyses to nuclear families of European descent in which all affected individuals had AD onset over 50 years, marker information was available for at least one unaffected sib and, in the case of the S-TDT, two or more distinct genotypes were present in the sibship. We averaged P values for the S-TDT over 100 iterations (10,000 replicates per iteration) using a Monte-Carlo method⁶. Both data sets demonstrated the association of AD and $APOE^*E4$ (SDT, Duke, $P=0.000007$; Toronto, $P=0.0009$), indicating sufficient power to detect associations of the magnitude reported for $A2M^*2$ (ref. 1). Although prior evidence shows that these pedigrees are enriched for an

AD locus on chromosome 12 near $A2M$ (refs 3,4,7), we were unable to detect an association with the $A2M^*2$ polymorphism using either the SDT or S-TDT, even when the “stringent unaffecteds” method¹ was applied (SDT, Duke, $n = 60$, $P = 0.80$, Toronto, $n = 45$, $P = 0.82$; S-TDT, Duke, $n = 17$, $P = 0.64$, Toronto, $n = 21$, $P = 0.75$). Furthermore, we did not detect an association in two independent series of sporadic AD cases of European descent after adjustment for $APOE^*E4$ status (Table 1), despite the fact that each data set had more than 80% power to detect an odds ratio as low as 1.87 (an effect much smaller than reported for $A2M^*2$; ref. 1).

Blacker *et al.* analysed 104 sibships from the NIMH data set¹, but we investigated an overlapping set of 143 NIMH sibships that met the same selection criteria¹. Analysis of this larger data set generated marginal or non-significant results (SDT, $n=143$, $P=0.08$; S-TDT, $n=59$, $P=0.05$). Furthermore, these results derive almost entirely from the subset of sibships collected at a single institution, NIMH site 3 (SDT, $n=56$, $P=0.03$; S-TDT, $n=20$, $P=0.04$). The lack of a trend towards an association in sibships from NIMH sites 1 (SDT, $n=46$, $P=1.0$; S-TDT, $n=19$, $P=0.85$) and 2 (SDT, $n=41$,

$P=0.65$; S-TDT, $n=20$, $P=0.53$), together with the robust association with $APOE^*E4$ ($P<0.0009$) in all three NIMH sub-data sets, indicates that the results for sites 1 and 2 are not due to reduced statistical power.

The $A2M$ polymorphism involves nt –7 to –2 upstream of the AG splice sequence of exon 18. The 5-bp insertion/deletion does not affect either the upstream 15-nt imperfect (or the internal 11-nt perfect) polypyrimidine tract or putative hnRNA stem-loop structures (G=–7.1 kCal/mol for the insertion, –8.8 kCal/mol for the deletion) thought to be important for splicing⁸. In agreement with this, RT-PCR studies, including studies using primers specific for a fusion of exons 17 and 19, did not detect aberrant $A2M$ splice products in brain (12 deletion carriers versus 6 insertion homozygotes) or liver (3 deletion carriers versus 7 insertion homozygotes; Fig. 1a).

Western-blot analysis of $A2M$ in biological samples is difficult because denaturation of $A2M$ tetramers often generates artefactual fragments (for example, heat-induced cleavage at the thiolester site/proteolytic cleavage of the bait region^{9,10}). Claims that such fragments are anything other than artefacts will require both precise correlation with $A2M^*2$ genotype and direct carboxy-terminal protein sequencing. We tested several different antibodies, including monoclonal antibodies raised to epitopes encoded by regions upstream of exon 18, and found no correlation between

Présentation du travail

La population est la même que celle utilisée dans l'étude précédente. Au total, elle comporte 1238 sujets atteints de la forme tardive de la maladie à un âge moyen de 73 ans (moyenne de 63% de femmes) et 1378 témoins de 76 ans pour moyenne d'âge (moyenne de 62% de femmes).

De même, la population constituée de paires de germains atteints de la MA est, elle aussi, étudiée, tout d'abord pour réaliser une étude de liaison génétique, mais également pour reproduire le même type de population que celle utilisée par Blacker et collaborateurs (Blacker *et al*, 1998) lors de la première observation d'une association entre ce polymorphisme génétique et la MA. Cette population est composée de 395 paires de germains et, comme dans notre article précédent, elle est utilisée pour former une sous-population constituée d'un cas affecté de chacune des familles avec un apparenté sain.

Le polymorphisme étudié est celui localisé au niveau du site d'épissage en 5' de l'exon 18. Chacun des sujets a été génotypé selon les conditions standard de détection de polymorphisme de type RFLP.

Présentation des résultats

Comme l'indique les résultats du tableau 8, aucune différence n'existe entre la distribution des génotypes des malades et celle des témoins dans la population constituée de cas sporadiques. Les fréquences alléliques ne diffèrent pas non plus dans

cette population. Ces résultats ne varient pas après division de la population en fonction de l'allèle $\epsilon 4$ de l'*ApoE*.

Tableau 8: Distributions génotypiques et alléliques du polymorphisme présent dans l'exon 18 du gène *A2M* dans la population cas-témoins.

	Distribution des génotypes (%)			Fréquences alléliques (%)	
	N/N	N/D	D/D	N	D
Population de malades (n=1238)	71,9	25,6	2,5	84,7	15,3
Population de témoins (n=1378)	72,3	25,0	2,7	84,8	15,2

(N = normal correspond à l'allèle 1 dans l'article de Blacker et D = délétion à l'allèle 2)

Cependant, lorsque la sous-population constituée d'une partie des paires de germains est testée, on observe alors une augmentation de l'allèle D dans le groupe des malades, ainsi que des génotypes contenant au moins un allèle D (voir tableau 9).

Tableau 9: Distributions génotypiques et alléliques du polymorphisme présent dans l'exon 18 du gène *A2M* dans la population cas index-germains témoins.

	Distribution des génotypes (%)			Fréquences alléliques (%)	
	N/N	N/D	D/D	N	D
Population de malades (n=137)	66,4	28,5	5,1	80,7	19,3
Population de témoins (n=137)	80,3	16,1	3,6	88,3	11,7

Cette association entre la forme familiale de la MA et l'allèle D est significative (OR=2,02; IC à 95%=[1,3-3,2]; p=0,003) ainsi que celle avec le génotype contenant l'allèle D (OR=2,13; IC à 95%=[1,2-3,7]; p=0,007).

De plus, l'étude de liaison génétique réalisée sur la population entière de paires de germains montre un résultat positif chez les malades (voir les résultats dans l'article). En effet, une liaison faible est observée entre ce polymorphisme de l'*A2M* et les sujets atteints de forme familiale de la MA. Cette liaison semble un peu plus importante dans le groupe des germains ne possédant pas d'allèle $\epsilon 4$ pour l'*ApoE*.

Discussion des résultats

Nous ne trouvons donc **pas d'association entre la forme sporadique de la MA et le polymorphisme présent au niveau de l'intron 17 du gène de l'*A2M***. Il est donc peu probable que ce polymorphisme génétique soit lié au développement de la MA. D'ailleurs ce résultat a été confirmé par d'autres groupes (**Dow *et al*, 1999; Hu *et al*, 1999; Kovacs *et al*, 1999; Singleton *et al*, 1999 Rogaeva, 1999 #2656**).

Cependant, lorsque cette étude est réalisée au niveau de formes familiales de la MA, une association faible est alors observée avec l'allèle D. L'étude de liaison génétique conforte ces données en montrant l'existence d'une liaison de cet allèle D avec les paires de germains affectés par la maladie. Il existerait donc une **association entre le polymorphisme présent au niveau de l'intron 17 du gène de l'*A2M* et la forme familiale à début tardif de la MA**.

Il est possible que ce polymorphisme génétique soit en déséquilibre de liaison avec une mutation dans le gène *A2M* ou avec un gène environnant. Cependant, cette hypothèse s'appliquerait seulement pour les cas familiaux de la MA.

II.3.3.3 Conclusion sur le gène *A2M*

Dans le cadre de notre thèse, nous avons étudié la distribution des polymorphismes présents au niveau du gène *A2M* dans la forme tardive de la MA. **Aucune association n'est observée entre la MA et le polymorphisme situé au niveau de l'exon 24 du gène *A2M***, qui correspond à l'exon II du domaine d'amorçage. Toutefois, une liaison génétique non significative semble exister avec la forme familiale à début tardif chez les sujets ne portant aucun allèle $\epsilon 4$ pour l'*ApoE*. Ce résultat doit faire l'objet d'une investigation plus poussée.

Par contre, il existe une **association entre la forme familiale à début tardif de la MA et le polymorphisme présent au niveau de la région 5' de l'épissage de l'exon 18 du gène de l'*A2M***, association qui n'est pas retrouvée dans la forme sporadique. Cette association est confortée par l'étude des paires de germains qui montre une faible liaison génétique entre ce polymorphisme et les sujets ne portant aucun allèle $\epsilon 4$ pour l'*ApoE*.

Ceci suggère donc l'implication de l'*A2M* dans le développement de la forme familiale à début tardif de la MA. Il est aussi possible que ces polymorphismes génétiques soient en déséquilibre de liaison avec un polymorphisme présent dans sa région de régulation ou avec un autre gène environnant.

Il faut noter que ces deux polymorphismes étudiés se situent au niveau de régions de l'ADN codant pour des domaines différents de la protéine; l'un correspondant aux sites de reconnaissance des protéases, l'autre au site de l'activité antiprotéasique et de

fixation du récepteur. Il est donc possible que les résultats divergents observés au niveau des études de population reflètent des actions différentes de ces polymorphismes génétiques sur la fonction protéique.

Les études d'association génétique ayant besoin d'une certaine connaissance des mécanismes pathologiques afin de pouvoir sélectionner des gènes candidats appropriés, une méthode alternative pour l'identification des locus impliqués dans la maladie sont donc les études de liaison génétique qui ne demandent aucune hypothèse à priori sur la nature du gène.

II.4 Etudes de liaison génétique

II.4.1 Principes

Les études de liaison génétique consistent à analyser la coségrégation d'une région chromosomique déterminée, identifiée par un marqueur génétique ou un groupe de marqueurs génétiques, par rapport au phénotype d'une maladie au sein d'une ou plusieurs familles affectées. Lorsqu'un haplotype déterminé, transmis à travers les

générations, est associé avec l'apparition de la maladie, cette région chromosomique est alors considérée comme liée à la maladie.

Les analyses de liaison génétique sont très puissantes si le mode de transmission de la maladie est connu et si le nombre d'individus affectés dans les familles est important. En absence d'information sur le nombre de gènes impliqués dans une maladie, sur leur mode d'action ou sur le mode de transmission de la maladie, l'analyse des paires de germains (frères ou sœurs) permet alors de découvrir de nouveaux effets. Elle consiste à déterminer la distribution du nombre d'allèles de marqueurs polymorphes partagés à un locus dans des fratries affectées par la maladie. De plus, l'information génétique des parents n'est pas indispensable pour avoir des résultats fiables, ce type d'étude présente un grand avantage même s'il perd ainsi de sa puissance. Toutefois, le nombre de paires de germains nécessaires est important.

Cette étude repose sur l'observation que, si un site polymorphe influence la maladie, les membres d'une fratrie affectés par cette maladie ont tendance à partager les mêmes allèles à ce site ou, si un tel site est proche du marqueur utilisé, cette tendance se répercutera également sur les allèles de ce marqueur. En déterminant l'haplotype des sujets en génotypant les marqueurs avoisinants, on observera une distorsion de la distribution allélique vers une plus grande proportion d'allèles partagés chez les personnes affectées par la maladie. La sensibilité de la méthode est d'autant meilleure que la taille de la population est importante et que l'informativité des marqueurs est élevée. De telles analyses ont déjà porté leurs fruits dans l'étude de maladies polygéniques comme le diabète, l'hypertension artérielle ou la sclérose en plaque.

Dans le cadre de notre thèse, deux types d'étude de liaison ont été réalisés sur la population de paires de germains dont nous disposons. La première consiste à étudier l'effet des gènes associés à la MA sur cette population à l'aide de marqueurs polymorphes localisés à proximité de ces gènes candidats. L'autre correspond à une recherche génomique qui permet la recherche de nouveaux locus liés à la MA, à l'aide de marqueurs polymorphes espacés de façon régulière et couvrant le génome entier.

II.4.2 Les gènes de susceptibilité

Les résultats obtenus avec les études de populations sur les gènes *LRP* et *A2M* montrent une association faible des polymorphismes génétiques étudiés avec la MA à début tardif. De même, une liaison génétique est observée avec les formes familiales lorsque ces polymorphismes sont testés sur des populations constituées de paires de germains. Cependant, ces associations sont faibles, ne sont pas significatives pour chacun des polymorphismes génétiques étudiés et ne sont présentes que dans certaines populations. De plus, aucune mutation fonctionnelle ne semble être présente dans la région codante de ces gènes. Il est donc possible que les gènes *LRP* et *A2M* soient en déséquilibre de liaison avec un autre polymorphisme au niveau de leur région régulatrice ou d'un autre locus du chromosome 12.

II.4.2.1 Le chromosome 12

Plus de 500 gènes sont estimés être localisés sur le chromosome 12 et à peine 52 ont été identifiés jusqu'à présent. Parmi ceux-ci se trouvent des gènes qui sont suggérés comme étant susceptibles d'intervenir dans le développement de la MA, tels que l'*A2M* (p12.2-13.1) et le *LRP* (q13.1-13.3) (voir figure 13). Ces gènes ont fait l'objet de nombreuses études, toutefois leur implication en tant que facteurs de risque de la MA reste sous investigation.

De même, d'autres gènes tels que l'apolipoprotéine F ou les facteurs C1r et C1s du complément, qui se trouvent également sur le chromosome 12, pourraient eux aussi jouer un rôle dans la MA, soit par effet direct dans le développement de la pathologie, soit par effet indirect en intervenant dans la régulation d'autres protéines.

Le chromosome 12 a donc une grande probabilité de contenir un ou plusieurs gènes associés à la MA. En 1997, un locus lié à la maladie a, en effet, été identifié en position q12-13.2 (Pericak-Vance *et al*, 1997).

Pour la suite de notre thèse, nous avons donc décidé d'entreprendre **une étude de liaison génétique sur le chromosome 12 et une population composée de paires de germains atteints de la MA à début tardif**, afin de localiser plus précisément les régions chromosomiques qui sont liées à l'apparition de la maladie.

Les résultats ont été publiés en 1998 dans l'article "Etudes génétiques du chromosome 12 dans la Maladie d'Alzheimer à début tardif" paru dans *JAMA*.

“Genetics Studies on chromosome 12 in late onset Alzheimer’s disease”

(1998), *JAMA*.

Genetic Studies on Chromosome 12 in Late-Onset Alzheimer Disease

Wu, William S., MS; Holmans, Peter, PhD; Wavrant-DeVrieze, Fabienne; Shears, Shantia; Kehoe, Patrick; Crook, Richard; Booth, Jeremy; Williams, Nigel; Perez-Tur, Jordi, PhD; Roehl, Kimberly; Fenton, Iain; Chartier-Harlin, Marie-Christine, PhD; Lovestone, Simon, MD; Williams, Julie, PhD; Hutton, Mike, PhD; Hardy, John, PhD; Owen, Michael J., MD; Goate, Alison, PhD

Context.- The only genetic locus universally accepted to be important as a risk factor for late-onset Alzheimer disease (AD) is the apolipoprotein E (APOE) locus on chromosome 19. However, this locus does not account for all the risk in late-onset disease, and a recent report has suggested a second locus on chromosome 12p11-12.

Objective.- To look for evidence of linkage on chromosome 12 and to test for the presence of the new locus in an independent sample of familial late-onset AD cases.

Design.- Retrospective cohort study. As part of a 20-centimorgan genome screen (approximately equal to 200 markers), we tested a series of 18 genetic markers on chromosome 12 and carried out multipoint, nonparametric lod score and exclusion analyses.

Setting.- Clinic populations in the continental United States selected from the National Institute of Mental Health AD Genetics Consortium.

Patients.- We selected samples for DNA analysis from affected sibling pairs, 497 subjects from 230 families with 2 or more affected individuals with probable or definite AD with onset ages older than 60 years (mean +/- SD, 75 +/- 6 years). Within the families, we used the 2 probable or definitely affected individuals. In families with more than 2 such cases available, we used all of them; in families with only 2 such cases in which unaffected individuals were available, we also sampled the oldest unaffected individual and used genotype data from this unaffected individual to check for nonpaternity and genotyping errors.

Main Outcome Measure.- Presence of linkage or locus on chromosome 12.

Results.- Although linkage analyses confirmed the presence of a genetic susceptibility factor at the APOE locus in these families with late-onset AD, we were unable to confirm the presence of a locus close to the marker D12S1042. A moderate lod score (1.91) was found near D12S98 close to the α 2-macroglobulin locus in the affected pairs in which both members did not possess an ϵ 4 allele.

Conclusions.- APOE remains the only locus established to be a risk factor for late-onset AD. We were unable to confirm that a locus on chromosome 12p11-12 has a major effect on risk for late-onset AD, although an effect smaller than that for APOE cannot be excluded.

JAMA. 1998;280:619-622

allele is negatively associated with disease.³⁻⁶ However, the APOE locus accounts for, at most, about half of the genetic risk of developing the disease.^{3,7} Thus, other genes or risk factors must account for the remaining genetic risk for developing disease.

See also pp 614 and 652

Several strategies can be used to define these other genetic risk factors: (1) the analysis of large pedigrees with late-onset disease; however, few suitable pedigrees have been ascertained⁸; (2) the genetic analysis of population isolates with disease; again, few such isolates have been reported⁹; (3) the use of association studies between alleles of candidate genes and disease; and (4) the application of genome search strategies using large numbers of sibling pairs.

Association studies have the advantage of simplicity and speed since all that is required is the availability of a case-control series of DNA samples that can be tested for the presence of particular alleles. Furthermore, association studies can detect relatively small increases in risk associated with particular alleles. However, since the identification of the APOE locus, a large number of positive-association studies have been reported for AD, but none of these have been consistently confirmed. These failures to confirm associations may reflect different etiologies in different populations, type I statistical errors (a particular problem because multiple testing is always involved), or linkage disequilibrium between the tested polymorphism and the functional polymorphism (with this disequilibrium not present in all populations). In addition, association studies are sensitive

LATE-ONSET Alzheimer disease (AD) shows familial clustering¹ but does not show a clear mode of inheritance. The only genetic locus universally accepted as an important risk factor for late-onset AD is the apolipoprotein E (APOE) locus on chromosome 19.² A proportion of this familial clustering is accounted for by genetic variability at the APOE locus. The APOE ϵ 4 allele is positively associated with disease and the APOE2

From the Departments of Psychiatry and Genetics, Washington University School of Medicine, St Louis, Mo (Messrs Wu and Booth, Mss Shears and Roehl, and Dr Goate); Neuropsychiatric Genetics Unit, University of Wales College of Medicine, Cardiff (Drs Holmans, Owen, and Williams and Messrs Kehoe, Williams, and Fenton); Mayo Clinic Jacksonville, Jacksonville, Fla (Ms Wavrant-DeVrieze, Mr Crook, and Drs Perez-Tur, Hutton, and Hardy); INSERM, Institut Pasteur de Lille, Lille, France (Ms Wavrant-DeVrieze and Dr Chartier-Harlin); and Section of Old Age Psychiatry, Institute of Psychiatry, London, England (Dr Lovestone).
Reprints: John Hardy, PhD, Neurogenetics Laboratory, Mayo Clinic Jacksonville, 4500 San Pablo Rd, Bldg 32224, Jacksonville, FL 32224 (e-mail: hardy.john@mayo.edu).

to population substructure and unnoticed ethnic differences between cases and controls. Furthermore, association studies currently cannot detect new genes implicated in disease etiology; they can only be used to test existing "candidate" genes.

Genome search strategies have the disadvantage that they are considerably less sensitive than association studies and require large amounts of work in terms of sample collection, data generation, and data analysis. However, these studies have the potential to identify previously unsuspected loci. Given the uncertainty of the published disease associations, we initiated a genome search for other loci. During this process, Pericak-Vance and colleagues¹⁰ published a report of a locus on chromosome 12, and we tried to replicate this finding. A second reason for us to start the genome search on chromosome 12 is the fact that we and others have found associations between AD and the LRP gene (located on chromosome 12),¹¹⁻¹³ which encodes a brain-expressed APOE receptor. In addition, the ligand for this receptor, α 2-macroglobulin, is also encoded on this chromosome.

METHODS

Family Data

We selected families from those collected by the the National Institute of Mental Health AD Genetics Consortium.⁷ From within this family series, we selected 230 families based on the following criteria: at least 2 affected siblings with probable or definite AD with onset ages of more than 60 years, sampled and available for genotyping. Within the families, we genotyped the probable or definitely affected siblings. For families with more than 2 affected siblings (definite or probable) available, we used all of them; in families with only 2 affected siblings but in which unaffected individuals were available, we also sampled the oldest unaffected individual, so that the genotype data from this unaffected individual could be used to check for genotyping errors (eg, data suggesting more than 4 parental chromosomes). Comparison of the structure of our family series with that

used by Pericak-Vance et al¹⁰ is shown in Table 1, although we restricted our analysis to sibling pairs.

Table 1.-Family Structure Comparison.

Characteristic	This Series	Duke Series [†]
No. of Families	230	54
Affected	643 (510)	173 (141)
Patients per family	2.8 (2.3)	4.0 (2.6)
Large family subset††	3.6 (3.1)	
Pairs		
Sib	545 (292)	234 (114)
Parent-child	97 (0)	62 (4)
Avuncular	43 (4)	31 (10)
Cousin	12 (7)	22 (13)
Age at onset, mean \pm SD, y	75 \pm 6	73 \pm 7

*Numbers in parentheses are those actually sampled. The sib pairs were comprised as follows: 199 sib pairs, 27 sib trios, and 2 sib quartets.

†There were a total of 43 families.

Generation of Marker Data

The microsatellite polymorphisms were detected by polymerase chain reaction. The forward primers were labeled at the 5' end with a 6-carboxyfluorescein known as 6-FAM, a tetrachlorinated analogue, or a hexachlorinated analogue (Perkin Elmer Systems, San Francisco, Calif). The total 5-microliters reaction contained a 50-micrograms DNA genomic template, 3.5-mol/L end-labeled forward primer and unlabeled reverse primer, 0.2 mol/L each of dextroadenosine triphosphate, dextroguanosine 5'-triphosphate, dextrocytidine 5'-triphosphate, dextroribothymidine 5'-triphosphate, 1 unit of Taq DNA polymerase (Promega), and 1-microliters 5x buffer (7.5-mmol/L magnesium chloride, 250-mmol/L potassium chloride, 50-mmol/L Tris hydrochloride [pH 8.3]). All reaction cocktails were distributed evenly to a 96-well Falcon assay plate using a Beckman-1000 workstation (Beckman Instruments, San Francisco, Calif). Polymerase chain reactions were carried out on Hybaid OmniGene thermal cyclers (Hybaid, London, England) using the following cycling conditions: initial denaturation at 96 degrees C for 4 minutes, followed by optimized (22-30) cycles of 94 degrees C for 1 minute, optimized annealing temperature (54 degrees C-60 degrees C) for 1 minute, and 72 degrees C for 45 seconds, and a final extension of 5 minutes at 72 degrees C. The polymerase chain

reaction products were then diluted at least 8-fold using a Beckman-1000 workstation. A measurement of 0.8 microliters of diluted polymerase chain reaction product was mixed with 2.5 microliters of deionized formamide, 0.4 microliters of internal lane standard TAMRA-350 (Perkin Elmer Systems), and 0.5 microliters of blue dye, denatured at 97 degrees C for 5 minutes, rapidly cooled on ice, and was then electrophoresed on a 6% denaturing polyacrylamide gel and the alleles were detected on a 373-automated DNA sequencer (Perkin Elmer Systems, San Francisco, Calif) using GeneScan 2.1 (Perkin Elmer Systems). Two Centre Erute Polymorphisme Humaine individuals (133 101,133 102) and 1 local DNA were loaded on every gel as controls. All alleles were initially assigned and genotyped semiautomatically using Genotyper 2.0 (Perkin Elmer Systems) without any information of phenotype. Laboratory personnel were masked to the phenotypic status of individual samples.

Statistical Analysis

Two-point and multipoint-affected sibling pair analysis was performed on the entire set of genotyped sibships (292 affected pairs) using MAPMAKER/SIBS.¹⁴ This program does not permit analysis of other affected pairings. In addition, the data set was divided into 2 subsamples, each of which was analyzed separately using MAPMAKER/SIBS.¹⁴ The first group consisted of sibling pairs who both possessed at least 1 APOE ϵ 4 allele (162 affected pairs), and the second group consisted of sibling pairs in which neither member possessed an APOE ϵ 4 allele (63 affected pairs). For example, a quartet of affected siblings whose APOE genotypes are APOE3/APOE3, APOE3/APOE3, APOE3/APOE4, and APOE3/APOE4 would contribute 1 pair to each group.

A multipoint exclusion map also was obtained for the entire sample using MAPMAKER/SIBS. For the purposes of this analysis, the disease-susceptibility model was parameterized in terms of λ s, the relative risk to siblings of a case.¹⁵ A number of values of λ s ranging from 1.2 to 2.0 were tested

Table 2.-Marker Information and 2-Point Lod Scores.

Locus	Map Position	Heterozygosity	No. of Families	No. of Sib Pairs	Identity by Descent Proportion	Lod Score (Data Set)	Lod Score (Large Families)	APOE ε4 Positive	APOE ε4 Negative
S372	0	0.73	178	238	0.48	0	0.09	0	0.25
S397	17	0.87	222	266	0.54	0.59	0.84	0.19	0.69
S98	24	0.65	221	283	0.56	0.92	1.17	0.10	1.12
S358	26	0.77	218	278	0.59	1.67	1.26	0.63	1.04
S301	30	0.87	223	287	0.53	0.27	0.03	0	0.50
S310	36	0.55	221	278	0.48	0	0	0	0.81
S363	37	0.62	223	287	0.50	0	0	0	0.32
S373	40	0.69	221	285	0.48	0	0	0	0.01
S1027	45	0.70	222	281	0.51	0.01	0	0	0.58
S1057	52	0.81	223	285	0.51	0.04	0.65	0.71	0
S1042	56	0.78	221	285	0.52	0.13	0.73	0.98	0
S1292	59	0.73	225	289	0.43	0	0	0	0
S398	86	0.64	223	287	0.48	0	0.03	0.3	0
S375	96	0.74	209	273	0.51	0.01	0.23	0.24	0
S379	116	0.72	197	257	0.47	0	0	0	0
S393	131	0.66	189	251	0.54	0.28	0	0.24	0.09
S395	155	0.76	211	273	0.52	0.05	0.58	0	0.28
S1045	183	0.84	204	266	0.51	0.01	0.07	0.06	0

*Map positions obtained from the genome database. Marker heterozygosity estimated from our sample. Lod scores calculated as described in the text. Numbers of affected sib pairs are less than 292 because of data loss. Identity by descent proportion is calculated for the entire sample. Allele sharing of 0.5 would be expected by chance. Positive deviations from the chance give rise to positive lod scores. Markers S373, S1027, S1057, S1042, and S1292 are those to which Pericak-Vance and colleagues¹⁰ reported genetic linkage. The LRP gene is located close to D12S398.

RESULTS

Two-point lod scores between markers and disease are shown in Table 2. Multipoint affected sibling pair analysis on the entire data set (292 sibling pairs), with lod scores, is shown in Figure 1. The maximum lod score obtained was 0.89 at D12S98, corresponding to a chromosome-wide P value of .21. If the multiple testing arising from the APOE ε4 positive and negative analyses is included, the P value increases to .48. These P values were simulated from our actual sample, using the observed marker allele frequencies and the marker map used in the analyses and thus should not be conservative. (A lod score of zero, suggesting no excess of allele sharing between affected family members, was obtained in the region in which Pericak-Vance and colleagues¹⁰ found their highest lod scores.)

We attempted to detect possible epistatic effects between APOE and a susceptibility locus on chromosome 12 by splitting the data set into 2 subsets. The first portion contained sibling pairs who both possessed at least 1 APOE ε4 allele (162 pairs) and is denoted in Figure 1 by "APOE ε4 both positive." The other subset contained sibling pairs with both members APOE ε4 negative (63 pairs), and is denoted in Figure 1 by "APOE ε4

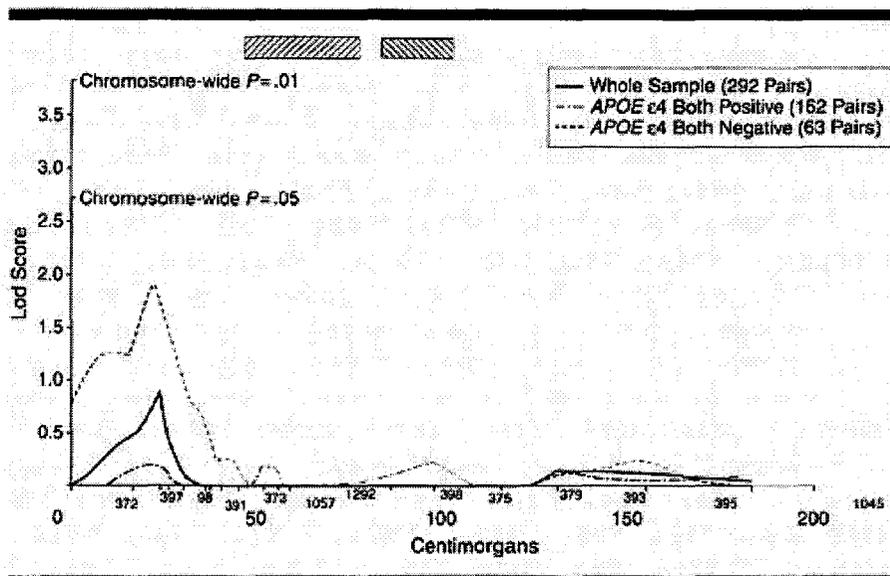


Figure 1.-Multipoint lod scores along chromosome 12 calculated using MAPMAKER/SIBS,¹⁴ together with criteria corresponding to chromosome-wide .05 and .01 significance (based on our sample and marker map, allowing for the multiple analyses performed). The left-hand bar shows the chromosomal region where Pericak-Vance and colleagues¹⁰ reported a lod

both negative." As shown in Figure 1, neither group had a significant lod score close to D12S1042. However, the subset of affected pairs who were both APOE ε4 negative had a multipoint lod of 1.91 at D12S98, corresponding to a chromosome-wide P value of approximately .09 (allowing for multiple testing). The α2 - macroglobulin gene is between D12S98 and D12S397 at this peak, and Blacker

and colleagues⁷ have recently reported an association between this gene and AD.¹⁶ These data, thus, would support the notion that α2-macroglobulin is an AD locus.

The results of the multipoint exclusion analysis performed on the entire data set are shown in Figure 2. For this analysis, the disease-susceptibility model was parameterized in terms of the relative risk

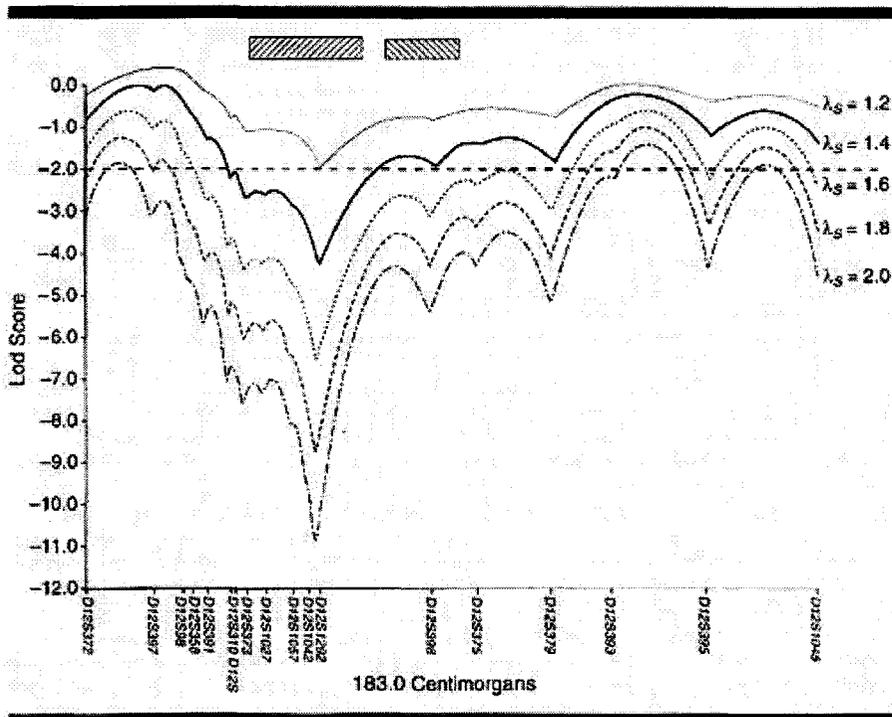


Figure 2.—Exclusion map along chromosome 12 generated using MAPMAKER/SIBS¹⁴ at different values of λ_s .¹⁵ The left-hand bar shows the chromosomal region where Pericak-Vance and colleagues¹⁰ reported a lod score of more than 2 in their data set. This bar is open at the right-hand end because the region is not delimited in their publication. The right-hand bar shows the approximate chromosomal region where the LRP gene has been localized. The α_2 -macroglobulin gene maps between D12S397 and D12S398.

to siblings of a case, λ_s .¹⁵ Assuming the frequency of APOE ϵ_4 in the general population is 0.15, the relative risk to ϵ_4 heterozygotes is 4, and the relative risk to ϵ_4 homozygotes is 10^3 , then λ_s for the APOE locus is approximately 1.4. As shown in Figure 2, when λ_s is 1.4, a region extending from D12S310 to 12 centimorgans distal of D12S1292 is excluded (lod score < 2.0). (This region includes D12S1042, the locus to which Pericak-Vance and colleagues¹⁰ found their strongest evidence of linkage.)

To replicate the analysis of Pericak-Vance and colleagues,¹⁰ we selected from our sample those families with at least 3 sampled affected individuals (see Table 1) for the structure of these "large pedigrees") and analyzed these separately. The lod scores given by each locus analyzed separately are shown in Table 2. The highest multipoint lod scores were 0.47 at D12S98 and 0.44 at D12S395. This is consistent with the results obtained from the entire sample, although the lod score is reduced, as would be expected from the reduction in

sample size. In this analysis, multiply affected families are not greatly different from the others in terms of their evidence for linkage. However, our series of large families (at least 3 sampled individuals) contained half the number of sampled cousin and avuncular pairs than the data sets in the previous report. Thus, it remains possible that some difference in ascertainment between the 2 series could account for the discrepancies in the results.

COMMENT

Our findings should not be interpreted as indicating that there is no AD-risk gene close to D12S1042, since, as with the failures to repeat the observations of genetic associations, it remains possible that there is such a locus that is important in a few families including a proportion of those ascertained by Pericak-Vance and colleagues.¹⁰ However, it is unlikely that such a locus accounts for a large proportion of cases of AD, since we were not able to detect evidence of linkage in our entire data set. However, we were able to detect evidence of linkage to a

marker near the APOE locus using a dinucleotide repeat marker (D19S412). This marker gave a lod score of 1.1 on its own and 2.1 when used in a multipoint with APOE. These data, not surprisingly, resemble those reported by Blacker et al,⁷ since they consist of a largely overlapping series of samples. Furthermore, the sample we have used here was sufficiently powerful to exclude (lod < 2) a locus of similar effect size to that of APOE from the region in which Pericak-Vance and colleagues¹⁰ found their most significant results. It is therefore unlikely that the difference between our results and those of Pericak-Vance and colleagues¹⁰ is due to lack of power in our sample. We did obtain a moderate lod score ($P = .09$) in the subset of affected pairs where both members were APOE ϵ_4 negative, suggesting the possible involvement of a locus acting heterogeneously with APOE ϵ_4 . This locus is exactly at the α_2 -macroglobulin locus, which Blacker and colleagues⁷ have recently suggested is associated with AD.¹⁶ This locus is more than 20 centimorgans from the region implicated by Pericak-Vance and colleagues.¹⁰

The LRP gene is close to D12S398, but we are not able to confirm or refute the inference from association studies,¹¹⁻¹⁵ which implicate this gene in the etiology of the disease. Our data suggest that LRP is not a gene of large effect. However, given the poor genetic resolution of these types of linkage studies, it remains possible that the LRP gene is within the "linked" region in the data set. If the α_2 -macroglobulin is a predisposing locus for AD,¹⁶ it will be important to examine the genetics of both LRP and its other ligands.

A serious problem in genome scans of complex disorders is the assessment of the true level of significance associated with a screen in which multiple tests are performed on a single data set. The problem is that such studies attempt to resolve 2 complex issues with a single analysis: (1) determination of the inheritance characteristics of the locus (ie, mode of inheritance, age-dependent penetrance, "phenocopy" or misdiagnosis rate, disease allele frequency, interaction with other [APOE] loci, etc) and (2) identification of the location of this

putative gene. This is quite unlike maximum likelihood methods of analysis in simple Mendelian disorders in which the inheritance characteristics can be estimated to a high enough degree of certainty so as not to interfere with the localization. Modification of the analysis parameters or choosing a variety of linkage analyses and approaches amounts

to multiple testing from a statistical perspective. Although multiple testing is a legitimate part of trying to determine the inheritance characteristics of the phenotype, it means that lod scores derived from such analyses cannot be thought of as equivalent to the lod scores in simple disorders.

This work was supported by the British Medical Research Council, National Institutes of Health grant AG14616, the Alzheimer's Association, and the Mayo Foundation. Alison Goate, PhD, is the recipient of National Institutes of Health career development award AG00634. The National Institutes of Mental Health provided the DNA samples used in this work.

REFERENCES

1. Pericak-Vance MA, Haines JL. Genetic susceptibility to Alzheimer's disease. *Trends Genet.* 1995;11:504-508.
2. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D. Apolipoprotein E: high affinity binding to [small beta]-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;90:1971-1981.
3. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 1993;261:921-923.
4. Corder EH, Saunders AM, Risch N. Protective effect of apolipoprotein E type 2 alleles decreases the risk of late onset Alzheimer disease. *Nat Genet.* 1994;7:180-184.
5. Chartier-Harlin M-C, Parfitt M, Legrain S. Apolipoprotein E, [small epsilon]4 allele as a major risk factor for sporadic early- and late-onset forms of Alzheimer's disease: analysis of the 19q13.2 chromosomal region. *Hum Mol Genet.* 1994;3:569-574.

6. Talbot C, Lendon CL, Craddock N, Shears S, Morris JC, Goate AM. Protection against Alzheimer's disease with ApoE [small epsilon]2. *Lancet.* 1994;343:1432-1433.
7. Blacker D, Haines JL, Rodes L. ApoE-4 and age at onset of Alzheimer's disease: the NIMH Genetics Initiative. *Neurology.* 1997;48:139-147.
8. Martin ES, Martin SE, Edelson L, Borgaonkar DS. Studies in a large family with late onset Alzheimer's disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 1997;11:163-170.
9. Pericak-Vance MA, Haines J, Johnson CC. Alzheimer's disease and apolipoprotein E in an Amish population. *Ann Neurol.* 1997;39:700-704.
10. Pericak-Vance MA, Bass MP, Yamaoka LH. Complete genomic screen in late-onset familial Alzheimer's disease: evidence for a new locus on chromosome 12. *JAMA.* 1997;278:1237-1241.
11. Lendon CL, Talbot CJ, Craddock NJ. Genetic association studies between dementia of the Alzheimer type and three receptors for apolipoprotein E in a Caucasian population. *Neurosci Lett.* 1997;222:187-190.

12. Wavrant-DeVrieze F, Perez-Tur J, Lambert J-C. Association between the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 1997;227:68-70.
13. Kang DE, Saitoh T, Chen X. Genetic association of the low density lipoprotein receptor-related protein gene (LRP), an apolipoprotein receptor, with late onset Alzheimer's disease. *Neurology.* 1997;49:56-61.
14. Kruglyak L, Lander E. Complete multipoint analysis of qualitative and quantitative traits. *Am J Hum Genet.* 1995;57:439-454.
15. Risch N. Linkage strategies for genetically complex traits, I. *Am J Hum Genet.* 1990;46:222-228.
16. Kruglyak L. Thresholds and sample sizes. *Nat Genet.* 1996;14:132-133.

Présentation du travail

Par une étude de liaison génétique, nous avons observé la ségrégation de 18 marqueurs polymorphes, espacés d'environ 20cM, au niveau d'une population constituée de paires de germains atteints de la MA et d'apparentés témoins (292 fratries affectées avec un total de 850 échantillons). Les patients, atteints de la forme tardive de la MA, ont développé leurs premiers symptômes à un âge moyen de 75 ± 6 ans.

Chacun des sujets a été génotypé pour chacun des marqueurs sélectionnés sur le chromosome 12, ainsi que pour le polymorphisme *ApoE*. Deux sous-groupes sont donc formés en fonction de l'allèle à risque $\epsilon 4$: l'un est constitué de paires de germains affectés ne possédant pas cet allèle (63 fratries) et l'autre de paires de germains affectés possédant au moins un allèle $\epsilon 4$ (162 fratries).

Les résultats ont ensuite été exploités selon la méthode d'analyse statistique mentionnée dans l'article et de façon à reproduire la technique utilisée par les rapports antérieurs publiés sur le même sujet.

Présentation des résultats (voir article pour les graphes et tableaux)

La valeur maximale observée pour le **Multipoint Lods Score** (MLS=0,9) se trouve au niveau du marqueur D12S98. Celui-ci augmente jusqu'à 1,91 lorsqu'il est observé dans le sous-groupe de fratries ne contenant pas l'allèle $\epsilon 4$ pour l'*ApoE*.

Quant à la valeur MLS pour le marqueur D12S1042, région positive dans l'étude de Pericak-Vance et collaborateurs (MLS=3,5), celle-ci est nulle dans notre population,

suggérant qu'il n'existe pas de différence dans la distribution des différents allèles entre les membres affectés d'une même famille, par rapport aux témoins.

Lorsqu'un effet modéré est suggéré pour les gènes potentiels du chromosome 12 ($\lambda_s=1,4$), les analyses d'exclusion éliminent une région étalée sur 12cM et située entre les marqueurs D12S310 et D12S1292 (lods score < -2). Cette région chromosomique comprend le marqueur D12S1042.

Le chromosome 12 est éliminé dans sa totalité lorsqu'un effet majeur est suggéré pour ces locus ($\lambda_s=2,0$).

Discussion des résultats

Dans notre population de cas familiaux à début tardif, le **locus D12S1042 n'est pas lié à l'apparition de la MA**, comme il l'est observé dans la population étudiée par Pericak-Vance et collaborateurs. En effet, la région chromosomique de D12S310 à D12S1292 (p11.2-q12), dans lequel il se localise, est exclue de notre étude.

Par contre, nous obtenons un résultat positif pour la région chromosomique comprise entre les marqueurs D12S372 et D12S98 (pter-12.3). **Cette région pourrait donc contenir des gènes susceptibles d'intervenir dans le développement de la MA.** Cependant, leur effet génétique sur la maladie ne peut être que modéré.

Il est intéressant de noter que le gène *A2M* se trouve à proximité des marqueurs D12S98 et D12S397 situés dans la région p12.3 et que l'étude de suivi de Pericak-

Vance et collaborateurs confirme nos résultats en montrant une liaison importante entre le locus D12S358 et la MA (Scott *et al*, 1999).

La susceptibilité du gène *LRP* est aussi une possibilité puisqu'il se situe entre la région positive q12-13.2 décrite par Pericak-Vance et collaborateurs (Pericak-Vance *et al*, 1997) et celle identifiée par Rogaeva et collaborateurs par utilisation du marqueur D12S96 (q13.1) (Rogaeva *et al*, 1998). Ce locus a encore été récemment lié à l'apparition de la maladie dans l'étude de Scott et collaborateurs par l'utilisation du marqueur D12S390 (q13.1) (Scott *et al*, 1999).

De même, ces derniers observent une liaison de la MA avec le marqueur D12S88 qui se situe entre D12S96 et le marqueur D12S1045 (q24.3), locus d'intérêt décrit dans une autre étude de liaison génétique (Zubenko *et al*, 1999).

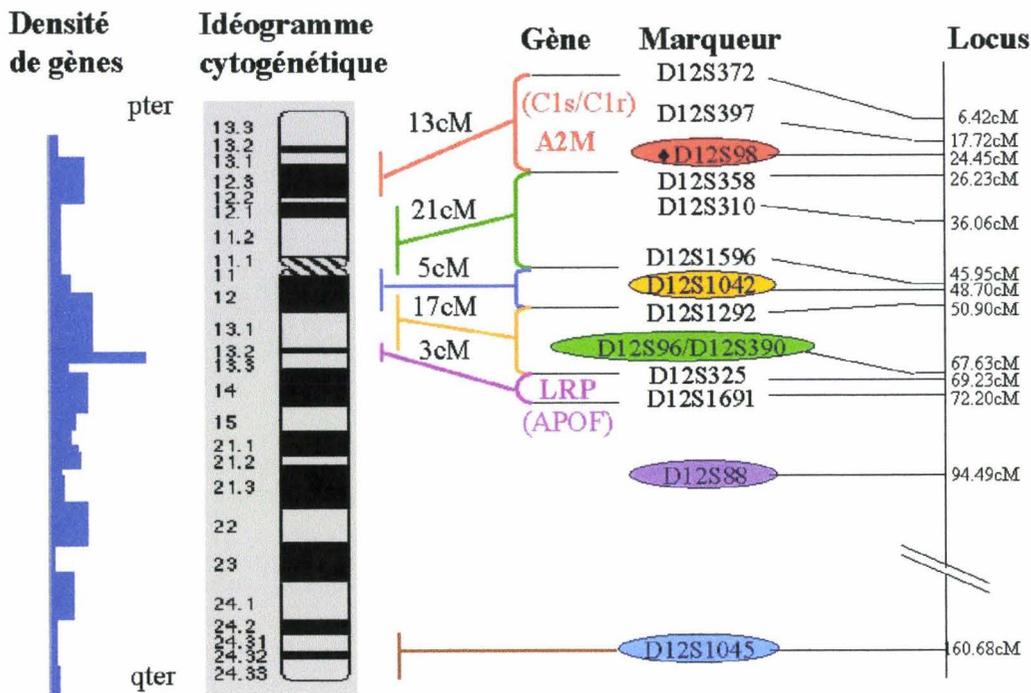


Figure 13: Le chromosome 12 et les régions candidates.

Les gènes indiqués correspondent aux gènes candidats ou potentiels (ceux entre parenthèses) pouvant intervenir dans le développement de la MA. La distance entre les marqueurs délimitant des intervalles chromosomiques est indiquée pour chacune des régions. Les marqueurs présentant le Lods score le plus important, pour chacune des études de liaison génétique mentionnées, sont mis en évidence comme suit: ● Notre étude ● (Pericak-Vance *et al*, 1997) ● (Rogaeva *et al*, 1998-Scott *et al*, 1999) ● (Scott *et al*, 1999) ● (Zubenko *et al*, 1999)

Il semblerait donc que le chromosome 12 posséderait différents locus d'intérêt, au moins 3, susceptibles d'intervenir dans le développement de la MA. Cependant, il faut rappeler que les valeurs de Lods score obtenues dans ces études ne sont pas suffisamment importantes pour pouvoir affirmer l'existence de liaison génétique avec la maladie; au mieux elles peuvent suggérer l'existence d'un locus.

II.4.2.2 Les gènes de susceptibilité de la MA

Afin de vérifier la validité de notre technique, nous avons testé en même temps des polymorphismes présents au niveau des gènes reconnus comme étant impliqués dans le développement de la MA. Nous nous sommes donc assurés que nous pouvions, en effet, détecter une liaison génétique entre notre population constituée de paires de germains et ces marqueurs regroupés dans ce que nous avons dénommé: le "panel des gènes Alzheimer". Les résultats ont été présentés dans l'article "Une variabilité génétique au locus du précurseur de la protéine amyloïde pourrait contribuer au risque de la maladie d'Alzheimer à début tardif" publié en 1999 dans *Neuroscience Letters*.

“Genetic variability at the amyloid- β precursor protein locus may contribute
to the risk of Late-Onset Alzheimer’s disease”

(1999), *Neuroscience Letters*.

Genetic variability at the amyloid- β precursor protein locus may contribute to the risk of late-onset Alzheimer's disease

Fabienne Wavrant-De Vrièze^{a, f}, Richard Crook^a, Peter Holmans^{b, c}, Patrick Kehoe^b, Michael J. Owen^b, Julie Williams^b, Kim Roehl^{c, d}, Debomoy K. Laliiri^e, Shantia Shears^{c, d}, Jeremy Booth^{c, d}, William Wu^{c, d}, Alison Goate^{c, d}, Marie Christine Chartier-Harlin^f, John Hardy^{a, *}, Jordi Pérez-Tur^a

^aMayo Clinic Jacksonville, 4500 San Pablo Road, Jacksonville, FL 32224, USA

^bNeuropsychiatric Genetics Unit, Tenovus Building, University of Wales College of Medicine, Heath Park, Cardiff, CF4 4XN, UK

^cDepartment of Psychiatry, Washington University School of Medicine, 4559 Scott Avenue, St. Louis, MO 63110, USA

^dDepartment of Genetics, Washington University School of Medicine, 4559 Scott Avenue, St. Louis, MO 63110, USA

^eInstitute of Psychiatric Research, Indiana University School of Medicine, 791 Union Drive, Indianapolis, IN 46202, USA

^fCJF 95–05 INSERM, Institute Pasteur de Lille, 1, Rue du Pr Calmette, 59019 Lille Cedex, France

Received 20 April 1999; received in revised form 5 May 1999; accepted 5 May 1999

Abstract

In a series of sibpairs with late onset Alzheimer's disease, we have examined the segregation of the loci involved in the early onset, autosomal dominant form of the disorder by using flanking microsatellite repeat markers: thus we have used APP-PCR3 and D21S210 to examine the segregation of the amyloid- β precursor protein (APP) gene, the markers D1 4S77 and D14S284 to examine the segregation of the presenilin 1 (PS1) gene and the markers D1S227, D1S249 and D1S419 to examine the segregation of presenilin 2 (PS2). We carried out our analyses on the whole dataset of 291 affected sibpairs, and on subsets comprising those sibpairs in which neither had an apolipoprotein E4 allele (65 affected sibpairs) and those in which both had an apolipoprotein E4 allele (165 affected sibpairs). We used the programs SPLINK to generate allele frequencies and MAPMAKER/SIBS to analyze our results. We examined the segregation of the markers D19S908 and D19S918 that are close to the apolipoprotein E (ApoE) gene as a positive control to assess whether the methods we are employing have the capability to identify known loci. The sibpair approach to the identification of genetic risk loci is relatively insensitive as indicated by the failure of the ApoE locus to reach statistical significance ($P = 0.06$). Nevertheless, these data suggest that neither the PS1 nor the PS2 gene is a major locus for late-onset AD, but that the APP gene cannot be ruled out as a risk locus in those sibships without an E4 allele ($P = 0.014$). The possibility that APP is indeed a locus for late onset disease will need confirmation in other series of familial cases. © 1999 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Alzheimer's disease; Genetics; Amyloid precursor protein; Apolipoprotein E; Presenilin 1; Presenilin 2; Sibpairs

Mutations in the amyloid- β precursor protein (APP), the presenilin 1 (PS1) and the presenilin 2 (PS2) genes lead to early onset autosomal dominant Alzheimer's disease (AD) [7,14,23] almost certainly through pathways which depend upon production of increased amounts of the amyloidogenic peptide A β 42 [22]. In addition, it is likely that individuals with Down syndrome develop AD because they too, produce more A β 42 as the APP gene is encoded on chromosome 21 [17,21]. Mutations in these genes have never been found in significant numbers of elderly individuals and

the consensus has been that mutations in these genes do not contribute (with very rare exceptions) to late onset disease.

The only locus that is known to contribute to the risk of late onset AD is the apolipoprotein E (ApoE) gene. Relative to the common E3 allele of ApoE, the E4 allele is associated with increased risk of disease and the E2 allele with decreased risk of disease [3,4]. However, the possibility that the loci associated with early onset disease could contribute to late onset disease has, surprisingly, never been addressed in a systematic genetic fashion. Previous experiments have merely sought mutations in the open reading frame of these genes or in promoter or intronic elements

* Corresponding author. Fax: +1-904-953-737.

E-mail address: hardy@mayo.edu (J. Hardy)

Table 1
Primer sequence for loci at ApoE, APP, PS1 and PS2^a

Marker	Dye	Size	Forward	Reverse
D19S908	TET	221-253	TGTAGTAAGCCAAGATCACTCC	AATTGTACNCACTGTGTGCCAG
D19S918	FAM	268-306	AAAGGCTTGATTACCCCOA	ATTACAGACGTGGGAGACCA
APP.PCR3	FAM	124-162	GCCATCAAGATGCTACTGA	ACATTCTCTCTGCCTCTAC
D21S210	HEX	148-190	AGATATTGGATGCTCAACTC	CTGGAGAGAACTCTGATATG
D14S77	FAM	214-260	TTATAAGCGTGAGTCACTGTGCCA	GGCTNCAGACAGAAATTAACCAGAO
D14S284	FAM	184-208	TACAGGTATOAGCCACCACT	GCCTACTTATCNTCCAAAGACAG
D1S227	TET	111-125	AGTGTGTCTGGGTCTTGAAGAA	GAGCGATTTCAGAATGTTGC
D1S249	FAM	316-346	TGAGGCTGAGGCAGGAGAAT	TGTTGTAGATG;AGACTGGC
D1S419	TET	325-357	CAGGACTGTACATTGGGTACCA	AGCTCAGAAAGAATGAGCACGC

^a Primer sequences and dye labeling used for assessing the genetic contributions of the known AD loci. These sequences can be paneled together for efficiency and run together on an ABI machine.

close to the open reading frame [20,27] and then tested these specific changes for association with disease with mixed and inconclusive results [15,27].

A priori however, one might expect that genetic variability controlling the expression of the genes encoded at these loci might contribute significantly to disease risk. Overexpression of the APP gene clearly leads to AD in Down syndrome [17], and recent experiments in which the mouse PS1 gene was knocked out suggested that expression levels of this gene might also play a part in regulating A β production [5]. Moreover, recent characterization of the APP promoter reveals several functional domains that can regulate the expression of the APP gene [6,18]. For these reasons, we decided to test the hypotheses that sibpairs who

were both affected by late onset AD would share alleles at the APP, PS1 and PS2 loci more frequently than the 50% one would expect by chance.

For each of these genetic loci and for ApoE we chose two informative genetic markers (Table 1) (three markers for PS2) which framed the gene and examined the segregation of the markers within 291 sibpairs from the NIMH series of late-onset AD families [2]. We developed primer sets (Table 1) which allowed these markers to be paneled together and run simultaneously on ABI DNA sequencers. The program SPLINK was used to generate marker allele frequencies from our dataset [9] and both SPLINK and MAPMAKER SIBS [11] were used to analyze our results. We carried out three, two point analyses: in sibpairs in which both had an

Table 2
Single locus lodscores for markers at the ApoE, APP, PS1 and PS2 loci analyzed using MAPMAKER/SIBS2^a

Gene	ApoE		APP		PS1		PS2		
Marker	D19S908	D19S918	APPPCR3	D21S210	D14S77	D14S284	D1S227	D1S249	D1S419
All pairs	0.49	0.71	0	0.1	0.06	0	0.04	0.06	0.01
Exclusion									
λ 1.2	0.49	0.71	-1.25	0	-1.10	4.44	-0.41	0.16	0.46
λ 1.4	0.24	0.36	Excluded	0.54	Excluded	Excluded	-1.35	0.93	-1.58
λ 1.6	0.31	0.41	Excluded	-1.28	Excluded	Excluded	Excluded	-1.91	Excluded
λ 1.8	-0.98	-1.38	Excluded						
λ 2.0	-1.69	Excluded							
E4-pairs	NA	NA	0.3	1.12	0	0	0	0	0
Exclusion									
λ 1.2	NA	NA	0.23	0.58	-0.60	-0.66	-0.20	0.20	0.24
λ 1.4	NA	NA	0.29	0.8	-1.31	-1.37	0.52	-0.54	-0.45
λ 1.6	NA	NA	0.22	0.98	-1.82	-1.97	-0.78	-0.78	-0.93
λ 1.8	NA	NA	0.14	1.01	Excluded	Excluded	-1.07	-1.07	-1.28
λ 2.0	NA	NA	0.04	1.01	Excluded	Excluded	4.35	-1.35	-1.62
E4 + pairs	NA	NA	0	0	0.18	0	0.15	0.03	0.15
Exclusion									
λ 1.2	NA	NA	-1.18	-0.37	-0.66	-0.89	0.13	-0.12	0.2
λ 1.4	NA	NA	Excluded	-0.91	-1.7	-1.93	-0.10	-0.61	-0.18
λ 1.6	NA	NA	Excluded	-1.49	Excluded	Excluded	-0.46	-1.24	-0.64
λ 1.8	NA	NA	Excluded	Excluded	Excluded	Excluded	-0.87	4.89	-1.15
λ 2.0	NA	NA	Excluded	Excluded	Excluded	Excluded	-1.28	Excluded	-1.68

^a Two-point analysis of segregation analyzed by MAPMAKER/SIBS. NA, not analyzed. Exclusion analysis was taken down to λ at which it was < -2.0 , the conventional criteria for exclusion of linkage. Thus, these data show (for example), that the PS 1 locus does not have λ in all affected sibpairs of >1.4 , in E4- pairs of >1.8 and in E4+ >pairs of >1.6 .

E4 allele (165 sibpairs), in sibpairs in which neither had an E4 allele (65 sibpairs) and in the total dataset (291 sibpairs). We carried out exclusion analysis at different values of λ_s where λ_s is defined as the ratio of the risk to siblings of a case relative to the risk of the trait in the general population attributable to the locus under study [19].

Our results are illustrated in Table 2. First of all these experiments illustrate both the strengths and weaknesses of the sibpair approach to the finding of pathogenic loci. Thus, this analysis (which used ~850 samples) barely has the power to identify the ApoE locus ($P = 0.06$ at D195918: SPLINK analysis). In contrast, simple association studies would need only 50 samples to show the association with this locus: however, in the approach we use here, loci can be identified solely by their chromosomal position. Secondly, and given the caveat that this is an insensitive method for identifying loci involved in disease, they suggest that in sibships without an E4 allele, the APP locus is more likely to be shared by affected sibs than by chance ($P = 0.014$ at D21S210: SPLINK analysis: analysis uncorrected for multiple comparisons). These analyses provided neither significant evidence for or against the notion that the presenilin genes may contribute to the risk of getting late onset AD. However, they do suggest that these loci are not the site of major risk for developing disease and therefore they are not concordant with the suggestion, based on association studies, that the PS1 gene is a major risk locus for late-onset disease [27]. Thus, our analyses show no positive lod scores with either PS1 or PS2 genetic markers in any group and exclude these loci from having a risk comparable in effect size with the ApoE locus.

The observation that APP may be a risk factor locus is not surprising. Studies of plasma A β have suggested that a subgroup of late onset disease cases have an increase in the concentration of this biomarker [22]. This 'high expression' subgroup may overlap with the group of individuals whose genetic susceptibility is, in part, encoded at the APP gene. The fact that the APP gene appears to be a risk locus only in individuals without an E4 allele is interesting and consistent with the view that ApoE is involved in the process of deposition of A β rather than in its production [1].

A parsimonious explanation of these results is that genetic variability in regulatory regions of the APP gene contributes to disease risk through the production of A β . We have previously failed to find any genetic variability in the APP promoter in AD [20]. However, our study dealt only with the promoter region of 334 bp, from -558 and -225 bp relative to the transcription start site of the gene. The APP locus is complex and there are many other regulatory regions that need to be examined for genetic variability. Within the mRNA there are elements in the three untranslated region that may contribute to message processing [28]. Within and upstream of the promoter, there are many regulatory elements at which genetic variability may occur. For example, one block extending from about -600 to -460 bp acts as a positive regulator and a

second block of sequences extending from -450 to -150 bp acts as a negative regulator [13]. Two additional upstream regulatory elements that control the activity of the human APP promoter, are from -2257 to -2234 bp and from -489 to -452 bp [12]. Other novel APP transcriptional regulatory elements within the first 100 bp from the start site are the GC-elements [16], the zinc finger protein motif CTCF [26] and an upstream regulatory factor (USF) [10]. Detailed characterization of the relevant nuclear factors in different cell types has not been reported. Recently, a 17 kb DNA fragment containing the 5'-upstream regulatory region of the rhesus APP gene has been characterized [24]. The rhesus APP promoter gene is similar in sequence to the human promoter and it contains many inducible characteristics responsible for its regulated transcription. A functional study with a series of 5'-deletion APP gene regions extending as far upstream as -7900 bp relative to the start site indicates that a -75 to +104 bp region is an essential promoter element, that multiple positive and negative elements regulate the expression of the promoter and that the interaction of the USF and pyrimidine-rich initiator element at the proximal region is crucial for transcription [25]. The study with the rhesus promoter reveals an important upstream regulatory element at -76 to -48 bp that controls the activity of the rhesus promoter in a cell type-specific manner. These functional studies clearly show that there are many elements around the APP gene where genetic variability has not been sought and which could influence APP expression [8].

This work was supported by the Medical Research Council (UK), the Mayo Foundation, the National Institute of Health, the Alzheimer's Disease Association and the Nettie and Rebecca Brown Foundation. The samples were collected as part of the NIMH Alzheimer's genetic initiative (Ref. [2]).

- [1] Bales, K.R., Verina, T., Dodel, R.C., Du, Y., Mtstiel, L., Bender, M., Hyslop, P., Jolinstone, E.M., Little, S.P., Cummins, D.J., Piccardo, P., Ghetti, B. and Paul, S.M., Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nat Genet.*, 17 (1997) 263–264.
- [2] Blacker, D., Haines, J.L., Rodes, L., Terwedow, H., Go, R.C., Harrell, L.E., Perry, R.T., Bassett, S.S., Chase, G., Meyers, D., Albert, M.S. and Tanzi, R., ApoE-4 and age at onset of Alzheimer's disease: the NIMH genetics initiative. *Neurology*, 48 (1997) 139–147.
- [3] Chartier-Harlin, M.C., Parfiff, M., Legrain, S., Pérez-Tur, J., Brousseau, T., Evans, A., Berr, C., Vidal, O., Roques, P. and Gourlet, V., et al., Apolipoprotein E, epsilon 4 allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset forms of Alzheimer's disease: analysis of the 19q13.2 chromosomal region. *Hum. Mol. Genet.*, 3 (1994) 569–574.
- [4] Corder, E.H., Saunders, A.M., Stritmatter, W.J., Schinechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L. and Pericak-Vance, M.A., Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 261 (1993) 921–923.
- [5] De Strooper, B., Saflig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele,

- H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K. and Van Leuven, F., Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*, 391 (1998) 387–390.
- [6] Fox, N.W., Johnstone, E.M., Ward, K.E., Schrementi, J. and Little, S.P., APP gene promoter constructs are preferentially expressed in the CNS and testis of transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 240 (1997) 759–762.
- [7] Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N. and James, L., et al., Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 349 (1991) 704–706.
- [8] Hattori, M., Tsukahara, F., Furuhashi, Y., Tanahashi, H., Hirose, M., Saito, M., Tsukuni, S. and Sakaki, Y., A novel method for making nested deletions and its application for sequencing of a 300 kb region of human APP locus. *Nucl. Acids Res.*, 25 (1997) 1802–1808.
- [9] Holmans, P. and Clayton, D., Efficiency of typing unaffected relatives in an affected-sib-pair linkage study with single-locus and multiple tightly linked markers. *Am. J. Hum. Genet.*, 57 (1995) 1221–1232.
- [10] Kovacs, D.M., Wasco, W., Witherby, J., Felsenstein, K.M., Brunel, F., Roeder, R.G. and Tanzi, R.E., The upstream stimulatory factor functionally interacts with the Alzheimer amyloid β -protein precursor gene. *Hum. Mol. Genet.*, 4 (1995) 1527–1533.
- [11] Kruglyak, L. and Lander, E.S., Complete multipoint sib-pair analysis of qualitative and quantitative traits. *Am. J. Hum. Genet.*, 57 (1995) 1237–1241.
- [12] Lahiri, D.K., An upstream region of the gene promoter for the beta-amyloid precursor protein interacts with proteins from nuclear extracts of the human brain and PC12 cells. *Mol. Brain Res.*, 58 (1998) 112–122.
- [13] Lahiri, D.K. and Robakis, N.K., The promoter activity of the gene encoding Alzheimer beta-amyloid precursor protein (APP) is regulated by two blocks of upstream sequences. *Mol. Brain Res.*, 9 (1991) 253–257.
- [14] Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D.M., Oshima, J., Pettingell, W.H., Yu, C.E., Jondro, P.D., Schmidt, S.D. and Wang, K., et al., Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer' disease locus. *Science*, 269 (1995) 973–977.
- [15] Pérez-Tur, J., Wavrant-De Vrièze, F., Lambert, J.C. and Chartier-Harlin, M.C., Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet*, 347 (1996) 1560–1561.
- [16] Pollwein, P., Masters, C.L. and Beyreuther, K., The expression of the amyloid precursor protein (APP) is regulated by two GC-elements in the promoter. *Nucl. Acids Res.*, 20 (1992) 63–68.
- [17] Prasher, V.P., Farrer, M.J., Kessling, A.M., Fisher, E.M., West, R.J., Barber, P.C. and Butler, A.C., Molecular mapping of Alzheimer-type dementia in Down's syndrome. *Ann. Neurol.*, 43 (1998) 380–383.
- [18] Quitschke, W.W. and Goldgaber, D., The amyloid beta-protein precursor promoter. A region essential for transcriptional activity contains a nuclear factor binding domain. *J. Biol. Chem.*, 267 (1992) 17362–17368.
- [19] Risch, N., Linkage strategies for genetically complex traits. I. Multilocus models. *Am. J. Hum. Genet.*, 46 (1990) 222–228.
- [20] Rooke, K., Goate, A., Fidani, L., Mullan, M., Roques, P., Rossor, M., Hardy, J. and Chartier-Harlin, M.C., Screening of the promoter and the β -amyloid sequence of the APP gene for polymorphism in families with late onset Alzheimer's disease. *Neurodegeneration*, 1 (1993) 237–240.
- [21] Rumble, B., Retallack, R., Hilbich, C., Simms, G., Muihthaupt, G., Martins, R., Hockey, A., Montgomery, P., Beyreuther, K. and Masters, C.L., Amyloid A4 protein and its precursor in Down's syndrome and Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.*, 320 (1989) 1446–1452.
- [22] Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T.D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Vutanan, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D. and Younkin, S., Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med.*, 2 (1996) 864–870.
- [23] Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G. and Holman, K., et al., Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, 375 (1995) 754–760.
- [24] Song, W. and Lahiri, D.K., Molecular cloning of the gene encoding the Rhesus monkey β -amyloid precursor protein: structural characterization of the promoter and comparative study with other species. *Gene*, 217 (1998) 151–164.
- [25] Song, W. and Lahiri, D.K., Functional identification of the promoter of the gene encoding the Rhesus monkey β -amyloid precursor protein. *Gene*, 217 (1998) 165–176.
- [26] Vostrov, A.A. and Quitschke, W.W., The zinc finger protein CTCF binds to the APB beta domain of the amyloid beta-protein precursor promoter. Evidence for a role in transcriptional activation. *J. Biol. Chem.*, 272 (1997) 33353–33359.
- [27] Wragg, M., Hutton, M. and Talbot, C., Alzheimer's Disease Collaborative Group. Genetic association between intronic polymorphism in presenilin-1 gene and late-onset Alzheimer's disease. *Lancet*, 347 (1996) 509–512.
- [28] Zaidi, S.H. and Malter, J.S., Nucleolin and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C proteins specifically interact with the 5'-untranslated region of amyloid protein precursor mRNA. *J. Biol. Chem.*, 270 (1995) 17292–17298.

Présentation du travail

L'*ApoE* est le seul gène reconnu comme contribuant à la forme tardive de la MA. Les autres gènes (*PS-I*, *PS-II* et *APP*), qui présentent des mutations au niveau de leur région codante, sont impliqués dans l'apparition des formes familiales à début précoce. Cependant, les régions introniques et celles régulatrices de leur promoteur n'ont pas été vraiment étudiées. Il ne peut donc être exclu qu'elles aient aussi un certain degré de responsabilité dans le développement de la forme tardive de la MA. Par une étude de liaison génétique, nous avons donc observé la ségrégation de ces locus au niveau de la population décrite dans l'article précédent. En effet, s'il existe des variabilités génétiques contrôlant l'expression de ces gènes qui contribuent au risque de la maladie, ces germains affectés ont de fortes chances de partager le même allèle à ces locus.

Au moins deux marqueurs ont été sélectionnés pour chacun de ces locus et ont ainsi servi à génotyper chacun des sujets.

Les lods scores ont été calculés à différents λ s (ampleur estimée de l'effet génétique pour chacun des locus) afin de "couvrir" les différentes forces d'action possibles pour les locus candidats.

Présentation des résultats (voir tableau 2 de l'article)

Comme attendu, les marqueurs au niveau de l'*ApoE* sont liés à l'apparition de la maladie. Cependant, les valeurs MLS sont très faibles, donnant un résultat proche du seuil de la significativité ($p=0,006$).

Les marqueurs représentant le gène *APP* ne semblent pas être liés à la maladie lorsque les analyses statistiques sont réalisées sur la population entière. Cependant, les résultats sont positifs dans le sous-groupe composé de fratries ne possédant pas l'allèle $\epsilon 4$ pour le génotype *ApoE* (lods score > 1 pour D21S210; $p=0,01$). De plus, ces locus ne sont pas exclus de l'étude quel que soit l'effet génétique estimé λ_s qui leur est attribué.

Pour ce qui est des marqueurs localisés dans la région des gènes *PS-I* et *PS-II*, les valeurs MLS sont proches de la valeur zéro et les analyses d'exclusion éliminent leurs régions dès $\lambda_s=1,4$ (effet modéré).

Discussion des résultats

Une liaison génétique est observée entre les marqueurs génétiques de l'*APP* et les formes familiales de la MA à début tardif. **Une variabilité au locus de l'*APP* pourrait donc influencer l'apparition de la maladie** dans notre population, toutefois cet effet est restreint au sous-groupe ne possédant pas d'allèle $\epsilon 4$ pour le génotype *ApoE*. Ce résultat soutient l'hypothèse que l'ApoE influence la formation des dépôts de peptides $A\beta$ et non pas la production de ce produit amyloïdogénique.

Par contre, ***PS-I* et *PS-II* ne semblent pas avoir de rôle majeur dans la pathogenèse de la forme tardive de la MA familiale**. Ceci n'exclut pas l'idée qu'ils pourraient intervenir de façon mineure; cependant ce type d'étude ne permet pas de détecter un locus avec un effet génétique faible.

II.4.2.3 Conclusion

Ces travaux montrent tout d'abord que cette technique d'étude de liaison génétique entre des locus potentiels et la maladie, à partir de paires de germains affectés, d'apparentés sains en tant que témoins et en absence des données parentales, permet de détecter, même faiblement, des locus avec un effet génétique modéré. L'informativité des marqueurs et le nombre de fratries sont, cependant, des variables importantes qui influencent beaucoup la puissance des résultats.

Deux locus susceptibles d'intervenir dans l'apparition de la forme familiale de la MA à début tardif ont été identifiés dans des régions distinctes du chromosome 12. Des gènes situés dans les environs, tels que le *LRP* et l'*A2M*, auraient un effet modéré dans la pathogenèse de la MA.

Les gènes mutés impliqués dans l'apparition des formes précoces de la MA de type familial (*PS-I*, *PS-II* et *APP*) ne semblent pas avoir un tel effet au niveau des formes tardives. Cependant, un rôle secondaire mineur n'est pas impossible.

Par contre, un effet modéré de l'*APP* est observé chez les individus possédant une isoforme ApoE différente de celle obtenue par l'allèle $\epsilon 4$. L'implication de l'ApoE dans le développement de la MA serait donc au niveau de la formation des plaques amyloïdes, par une défaillance à éliminer le peptide A β ou en favorisant sa précipitation, plutôt que dans le métabolisme de l'APP.

II.4.3 Recherche génomique

L'effort à fournir lors d'une recherche génomique étant considérable en raison du nombre de sujets à génotyper et du nombre de marqueurs utilisés pour chaque chromosome, il s'avère plus efficace de séparer ce travail en plusieurs étapes:

- La première étape correspond à un "balayage" préliminaire du génome, c'est-à-dire qu'une population de taille raisonnable est génotypée pour chacun des marqueurs sélectionnés. Ces derniers sont séparés de chacun par environ 20cM, ce qui est la distance minimale pour ne pas laisser échapper les régions chromosomiques potentielles. Cette étape consiste donc à détecter les régions de chaque chromosome qui pourraient être d'un certain intérêt. De plus, elle permet de réduire la taille du génome étudié puisqu'elle aboutit à l'exclusion des régions chromosomiques non-impliquées dans la maladie étudiée.
- La seconde étape pourrait être appelée celle de "nettoyage" car elle permet d'éliminer les régions chromosomiques sélectionnées par la première étape correspondant à de faux positifs. Cette partie est réalisée grâce à l'utilisation d'une seconde population, dans laquelle les marqueurs sélectionnés en fonction des résultats de la première étape sont génotypés.
- L'étape finale de la recherche génomique à proprement parler est une étape "d'affinage". Cette étape consiste à réduire les régions chromosomiques positives, afin d'obtenir une localisation plus précise des locus impliqués dans la maladie étudiée. Elle est réalisée sur l'ensemble des sujets des deux premières populations à l'aide de nouveaux marqueurs séparés de 5cM.

Dans le cadre de notre thèse, la première étape d'une recherche génomique sur la forme tardive de la MA a été complétée. Les résultats présentés ci-après sont ainsi parus dans l'article "Recherche génomique complète sur la Maladie d'Alzheimer à début tardif" publié en 1999 dans le journal *Human Molecular Genetics*.

“A full genome scan for late-onset Alzheimer's Disease”

(1999), *Human Molecular Genetics*

A full genome scan for late onset Alzheimer's disease

Patrick Kehoe⁺, Fabienne Wavrant-De Vrieze^{1,+}, Richard Crook^{1,+}, William S. Wu^{2,+}, Peter Holmans⁺, Iain Fenton, Gillian Spurlock, Nadine Norton, Hywel Williams, Nigel Williams, Simon Lovestone³, Jordi Perez-Tur¹, Mike Hutton¹, Marie-Christine Chartier-Harlin⁴, Shantia Shears², Kimberly Roehl², Jeremy Booth², Wendy Van Voorst², Dzanan Ramic², Julie Williams, Alison Goate², John Hardy¹ and Michael J. Owen^{*}

Neuropsychiatric Genetics Unit, Tenovus Building, University of Wales College of Medicine, Heath Park, Cardiff CF4 4XN, UK, ¹Birdsall Building, Mayo Clinic, 4500 San Pablo Road, Jacksonville, FL 32084, USA, ²Departments of Psychiatry and Genetics, Washington University School of Medicine, 4940 Children's Place, St Louis, MO 63110, USA, ³Institute of Psychiatry, De Crespigny Park, Denmark Hill, London SE5 8AF, UK and ⁴CJF 95-05 INSERM, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr Calmette, 59019 Lille Cedex, France

Received July 17, 1998; Revised and Accepted November 20, 1998

We have genotyped 292 affected sibling pairs (ASPs) with Alzheimer's disease (AD) according to NINCDS-ADRDA diagnostic criteria and with onset ages of ≥ 65 years using 237 microsatellite markers separated by an average distance of 16.3 cM. Data were analysed by SPLINK and MAPMAKER/SIBS on the whole sample of 292 ASPs and subsets of 162 ASPs where both members possessed an apolipoprotein E (APOE) $\epsilon 4$ allele and 63 pairs where neither possessed an $\epsilon 4$ allele. Sixteen peaks with a multipoint lod score (MLS) >1 either in the whole sample, the $\epsilon 4$ -positive or -negative subgroups were observed on chromosomes 1 (two peaks), 2, 5, 6, 9 (two peaks), 10 (two peaks), 12, 13, 14, 19, 21 and X (two peaks). Simulation studies revealed that these findings exceeded those expected by chance, although many are likely to be false positives. The highest lod scores on chromosomes 1 (MLS 2.67), 9 (MLS 2.38), 10 (MLS 2.27) and 19 (MLS 1.79) fulfil Lander and Kruglyak's definition of 'suggestive' in that they would be expected to occur by chance once or less per genome scan. Several other peaks were only marginally less significant than this, in particular those on chromosomes 14 (MLS 2.16), 5 (MLS 2.00), 12, close to $\alpha 2$ -macroglobulin (MLS 1.91), and 21, close to amyloid precursor protein (MLS 1.77). This is the largest genome scan to date in AD and shows for the first time that this is a genetically complex disorder involving several, perhaps many, genes in addition to APOE. Moreover, our data will be of interest to those hoping

to identify positional candidate genes using information emerging from neurobiological studies of AD.

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder that occurs predominantly in later life. It is the commonest cause of dementia and represents the fourth largest cause of death in the developed world (1).

To date, four genes have been implicated in the aetiology of AD. Mutations in three of these, coding for the amyloid precursor protein (APP) (2), presenilin 1 (PS-1) (3,4) and presenilin 2 (5) account for most cases of autosomal dominant familial AD (FAD) (6). However, FAD accounts for $<1\%$ of all cases of AD. The inheritance of common forms of the disorder appears considerably more complex and probably reflects the co-action or interaction of several or many genes together with environmental factors. One gene that is clearly implicated in this form of the disorder is that encoding apolipoprotein E (APOE). The $\epsilon 4$ allele of APOE, although neither necessary nor sufficient to cause AD, is associated with increased risk of both early and late onset disease (7). The effect of $\epsilon 4$ appears additive such that heterozygotes and homozygotes are, respectively, approximately three and eight times more likely to be affected than controls (7). However, variation at the APOE locus accounts for at most $\sim 50\%$ of the genetic variation in liability (8) to develop the disorder and there must be other genetic variants that account for the remaining risk.

A number of strategies are available for mapping genetically complex traits (9). Traditional lod score analysis in multiplex pedigrees is best suited to forms of a disorder showing obvious Mendelian inheritance. This approach is clearly applicable to FAD, where successes have already been evident. However, the

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +44 1222 743058; Fax: +44 1222 746554; Email: owenmj@cardiff.ac.uk

⁺These authors contributed equally to this work

lod score method is at its weakest when the mode of transmission is complex and the genetic parameters cannot be accurately specified. It is generally agreed that the best way to proceed under such circumstances is by a combination of allele sharing linkage methods in pairs of affected siblings or other relative pairs and association studies (9,10). A number of candidate gene association studies have been performed in AD since the identification of the APOE locus. Some positive findings have been claimed (11–30) but unfortunately none of these has been consistently confirmed. These inconsistencies are likely to be due to a number of factors that bedevil genetic association studies, including heterogeneity, issues of statistical power, multiple testing and population stratification (31). Moreover, at the present time, association studies can only be based on testing of genes whose candidature is suggested by an existing understanding of the pathophysiology. In contrast, a systematic genome screen using allele sharing linkage methods offers the potential to identify novel pathogenic pathways and mechanisms. Consequently we have carried out a two-stage genome scan in 600 affected sibling pairs (ASPs) with AD. In the first phase we have genotyped 292 ASPs with a 20 cM grid of markers and report the results here.

RESULTS

A multipoint ASP analysis was performed on the entire dataset of 292 ASPs using MAPMAKER/SIBS (32). The sample was also stratified for analysis on the basis of whether both (162 ASPs) or neither (63 ASPs) members of an ASP possessed at least one APOE $\epsilon 4$ allele in order to maximize power to detect loci acting epistatically or heterogeneously with respect to APOE. APOE genotypes were not included in lod score calculations. This is a computationally simple, model-free approach to two-locus analysis which does not require the specification of unknown parameters such as gene frequencies, penetrances and interactions and which allows the multilocus approach implemented in MAPMAKER/SIBS to be used. The resulting multipoint lod scores (MLS) are shown in Figure 1, together with the regions where exclusion analysis based on a λ_s of 1.4 gave lod scores of -2 or less. A genetic effect of size $\lambda_s = 1.4$ was chosen since this is approximately equal to that given by APOE (see below). This could be excluded from $\sim 28\%$ of the genome, whereas a λ_s of 2 could be excluded from $\sim 80\%$ of the genome (data not shown).

The multipoint results are also summarized in Table 1, which shows data from the 16 peaks with an $MLS \geq 1$ in either the whole sample, the $\epsilon 4$ -positive ($\epsilon 4^{+ve}$) or $\epsilon 4$ -negative ($\epsilon 4^{-ve}$) subgroups. These regions were observed on chromosomes 1 (two peaks), 2, 5, 6, 9 (two peaks), 10 (two peaks), 12, 13, 14, 19, 21 and X (two peaks). Only peaks on chromosomes 1, 5, 9, 10 and 19 gave a $MLS > 1$ in the whole sample. The remaining peaks were observed in either the $\epsilon 4^{-ve}$ (chromosomes 1, 10, 12, 21 and X) or the $\epsilon 4^{+ve}$ (chromosomes 2, 6, 13 and 14) sib pairs only. Pointwise and genome-wide significance levels calculated by simulation for all three samples analysed are shown in Table 2. It can be seen that the number of observed regions (i.e. MLSs) exceeding a given lod score is greater than would be expected by chance. Furthermore, the highest lod scores on chromosomes 1 (MLS 2.67), 9 (MLS 2.38), 10 (MLS 2.27) and 19 (MLS 1.79) fulfil Lander and Kruglyak's definition of 'suggestive' in that they would be expected to occur by chance once or less per genome scan (32). Several other peaks were only marginally less significant than this, in particular those on chromosomes 14

(MLS 2.16), 5 (MLS 2.00), 12 (MLS 1.91) and 21 (MLS 1.77). We did not observe any 'significant' linkages (i.e. genome-wide occurrence probability < 0.05) since our simulation results indicate that a lod score of ~ 3.6 would be required for this (Table 2).

Table 1. Maximum multipoint lod scores and peak identity by descent (IBD) sharing probabilities

Chromosome	Whole sample	IBD	Both $\epsilon 4^{+ve}$	IBD	Both $\epsilon 4^{-ve}$	IBD
1A	0.02		0.00		1.35	0.67
1B	1.33	0.56	2.67	0.61	0.00	
2	0.49		1.01	0.57	0.36	
5	1.07	0.55	2.00	0.61	0.00	
6	0.48		1.40	0.60	0.85	
9A	0.00		0.00		1.12	0.64
9B	1.15	0.56	2.38	0.62	0.00	
10A	2.27	0.60	2.25	0.61	0.92	
10B	0.2		0.00		1.17	0.63
12	0.89		0.20		1.91	0.63
13	0.20		1.20	0.58	0.00	
14	0.30		2.16	0.60	0.00	
19	1.79	0.57	n/a		n/a	
21	0.25		0.50		1.77	0.65
XA	0.10		0.05		1.45	0.72
XB	0.05		0.20		1.93	0.65

Data from the 16 peaks with an $MLS \geq 1$ in either the whole sample, the $\epsilon 4^{+ve}$ or $\epsilon 4^{-ve}$ subgroups are shown.

Table 2. Single point P -values and genome-wide multipoint significance levels

Lod	Single point P -value	Expected no. per genome scan	Observed
All chromosomes except 19 (three analyses)			
3.6	0.00008	0.05	0
2.6	0.0005	0.5	1
2.3	0.001	0.9	2
2.0	0.002	1.7	5
1.7	0.005	3.1	8
1.3	0.015	6.9	9
1.0	0.025	12.5	16
Chromosome 19 (whole sample analysis only)			
1.79		0.7	

The genome-wide significance levels for chromosomes apart from 19 were based on simulated genome scans in the whole sample, $\epsilon 4^{+ve}$ and $\epsilon 4^{-ve}$ subgroups.

DISCUSSION

In a genome screen of 292 sib pairs with late onset AD, we observed 16 loci (i.e. MLSs) with lod scores ≥ 1 , which exceeded the number expected by chance. The regions of interest occur on chromosomes 1 (two peaks), 2, 5, 6, 9 (two peaks), 10 (two

peaks), 12, 13, 14, 19, 21 and X (two peaks). The chromosome 19 result appears attributable to the APOE locus, with marker D19S571 (15 cM distal of APOE) showing a lod score of 1.79. This complies with Lander and Kruglyak's (32) definition of 'suggestive' linkage and indicates that our study would have detected a susceptibility gene for AD in this region had association with APOE $\epsilon 4$ not already been reported. In addition we obtained a single point lod score of 2.02 (IBD 0.64) with marker D19S412 (2 cM distal of the APOE locus).

Recently Pericak-Vance *et al.* (33,34) reported the results of a two-stage genome screen in late onset FAD in 54 families with multiple affected members. This first stage was carried out in 16 of the largest families, in which DNA was available from 52 affected individuals. Fifteen regions of interest were followed up in a further 38 families, in which DNA was available from 89 affected individuals. Interestingly, no evidence for linkage around the APOE locus was obtained despite the enrichment of markers in this region. On follow-up, four regions were identified showing possible or suggestive linkage on chromosomes 4, 6, 12 and 20, with the strongest evidence being found in the pericentromeric region of chromosome 12 (peak MLS 3.5). We found little evidence to support these findings on chromosome 12 in our dataset (35), although we did find some evidence for linkage on 12p (see below). Unfortunately, Pericak-Vance *et al.* provide no information on the specific locations of the other areas of interest on chromosomes 4, 6 and 20 (33,34). We did not observe evidence of linkage on chromosomes 4 or 20 but did find a lod score of 1.4 in $\epsilon 4$ -ve ASPs on chromosome 6. However, while we cannot assess whether our chromosome 6 region of interest corresponds to that of Pericak-Vance *et al.* (34), it is of interest that it contains much of the HLA region and that associations between AD and HLA-A2 have been reported (20). From initial findings of a separate genome survey for AD susceptibility genes, Zubenko *et al.* (36) also reported a region of interest on the X chromosome, near DXS1047. No support for linkage to this region was obtained in our study. Indeed, we could exclude a locus of $\lambda_s \geq 1.4$ from this region.

Figure 1 also shows the positions of a number of 'candidate genes' for which evidence exists implicating their involvement in AD. Only three of these are located within the peaks identified in this study: APOE, APP and $\alpha 2$ -macroglobulin (A2M). APOE is the only unequivocally established genetic risk factor for late onset AD and it is therefore reassuring that we were able to obtain evidence for linkage at this locus without enriching for markers in the region. It is well known that mutations in APP can cause autosomal dominant early onset familial AD (2). Direct analyses of the coding sequence (37) and the promoter (37,38) have not detected APP polymorphisms that predispose to late onset AD. However, the Duke group, also using non-parametric linkage methods, have provided evidence that a locus predisposing to late onset AD might reside in this region of chromosome 21 (39). Our findings suggest that further attention should now be paid to the possibility of a susceptibility locus either within the regulatory regions of APP or, less parsimoniously, in a gene close by. It is therefore of interest that high levels of βA are sometimes found in typical late onset AD and this might indicate genetic variability in APP expression (40). In addition, recent genetic analysis of a case of Down syndrome (DS) due to non-disjunction has firmly implicated triplication of APP in the pathogenesis of AD in DS (41). Together with our data, these findings suggest that a full genetic analysis of the APP gene should now be a priority. A2M

is a serum pan-protease inhibitor which has been implicated in AD because of its ability to mediate the clearance and degradation of βA (42,43) and because, like ApoE, it is a ligand of low density lipoprotein receptor-related peptide (44). Blacker *et al.* (29) have recently demonstrated an association between a pentanucleotide deletion in the 5' splice site of exon 18 of A2M and AD using a subset of the NIMH sample typed in the present study. This association appeared independent of APOE genotype and this would appear to correlate well with our observation that linkage to the A2M region was seen only in $\epsilon 4$ -ve families. Our data on chromosome 12 have been reported separately (35), but we are now able to place them in the context of a full genome scan. The maximum MLS of 1.91 in this region is less than the threshold calculated by simulation of 2.25 for suggestive linkage according to Lander and Kruglyak (32), but was the second highest score obtained in the $\epsilon 4$ -ve families. None of the other candidate genes shown in Figure 1 are located within the lod score peaks in our study. However, the power of linkage methods to detect genes of small effect is limited (45). Indeed only PS-1 and $\alpha 1$ -antichymotrypsin fall within the areas of exclusion for a gene of an effect size equivalent to or greater than APOE ($\lambda_s = 1.4$).

This study is the first stage of a two-stage genome scan for late onset AD in 600 sibling pairs. The 16 areas identified will form the basis of analysis in stage 2. This will comprise further analysis of these areas using the original and new markers spaced at ~ 5 cM intervals within each region in a total of 600 sibling pairs with late onset Alzheimer's disease. We have calculated that this two-stage study will have a power of >0.80 to detect a locus of effect size $\lambda_s \geq 1.5$. Regions showing evidence of linkage at stage 2 will be tested further using positional cloning and candidate gene approaches.

This is the largest genome scan to date in Alzheimer's disease and shows for the first time that this is a genetically complex disorder involving several, perhaps many, genes in addition to APOE. We have provided evidence consistent with a role of A2M as a susceptibility locus and preliminary data suggesting that variation in the regulatory regions of APP may also influence predisposition to AD. The other areas identified in our study, in particular those on chromosomes 1, 9 and 10, will be of considerable interest to those trying to identify positional candidate genes using information emerging from neurobiological studies of AD.

MATERIALS AND METHODS

Families

The families used were selected from those collected by the NIMH-AD Genetic Consortium (46). From within this family series 230 families were selected based on the following criteria: at least two affected siblings with probable or definite AD according to the NINCDS-ADRDA diagnostic criteria (47) with onset ages of ≥ 65 years sampled and available for genotyping (diagnosis of definite AD requires neuropathological data which are usually obtained post-mortem). Within these families the probable ($n = 417$) or definitely affected ($n = 79$) siblings were genotyped. In families where there were more than two affected siblings (definite or probable) available, all of them were used. In families where there were just two affected siblings but unaffected individuals were available, the oldest of the unaffected individuals was also sampled so that the genotype data from this unaffected

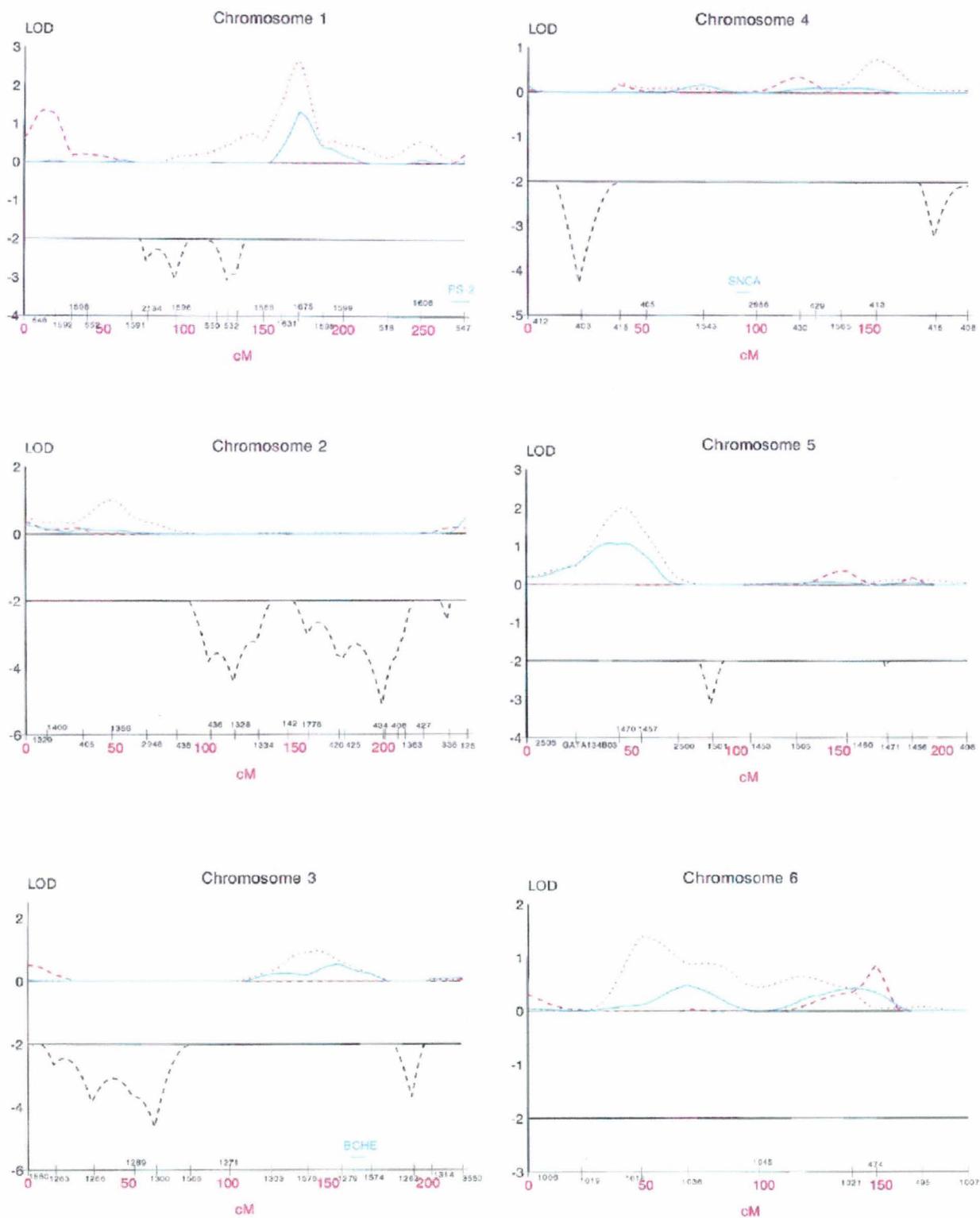


Figure 1. Multipoint lod scores.

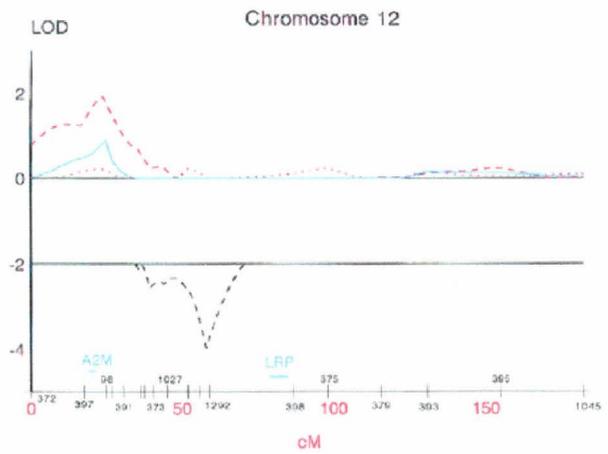
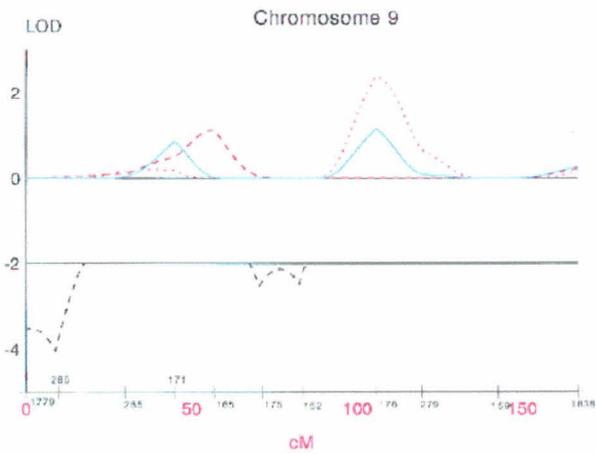
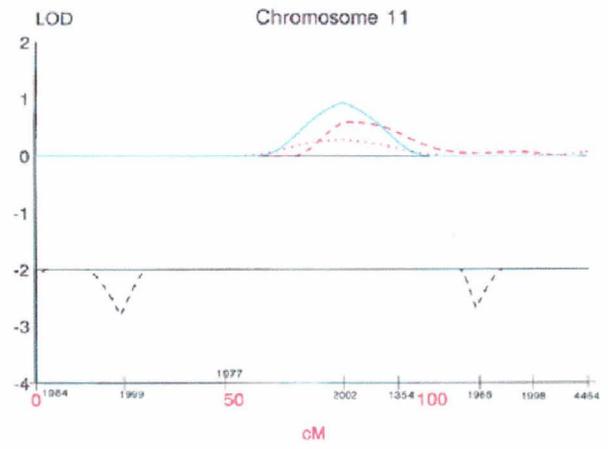
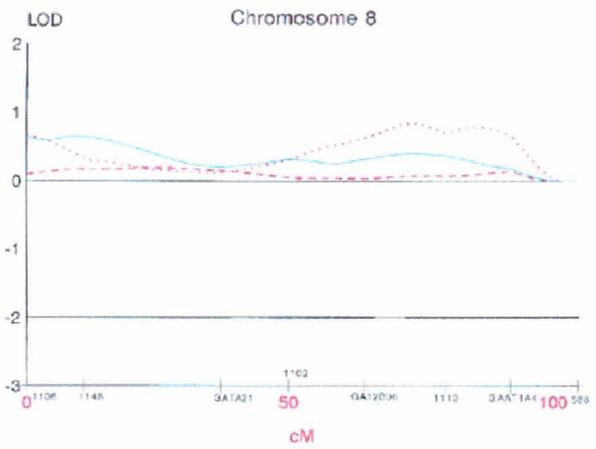
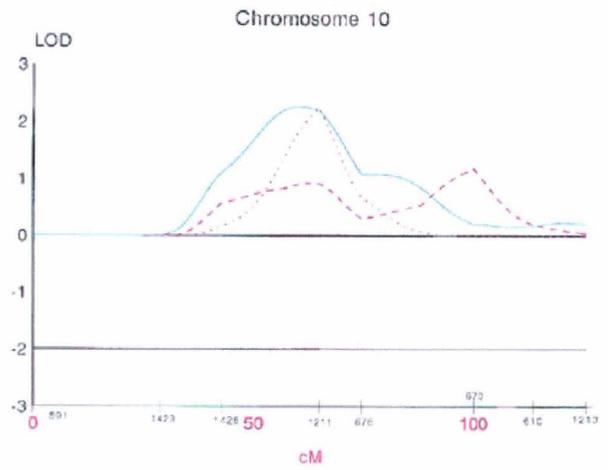
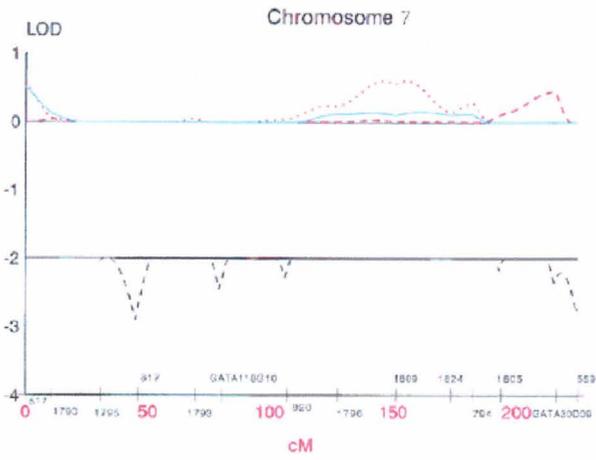


Figure 1. Continued

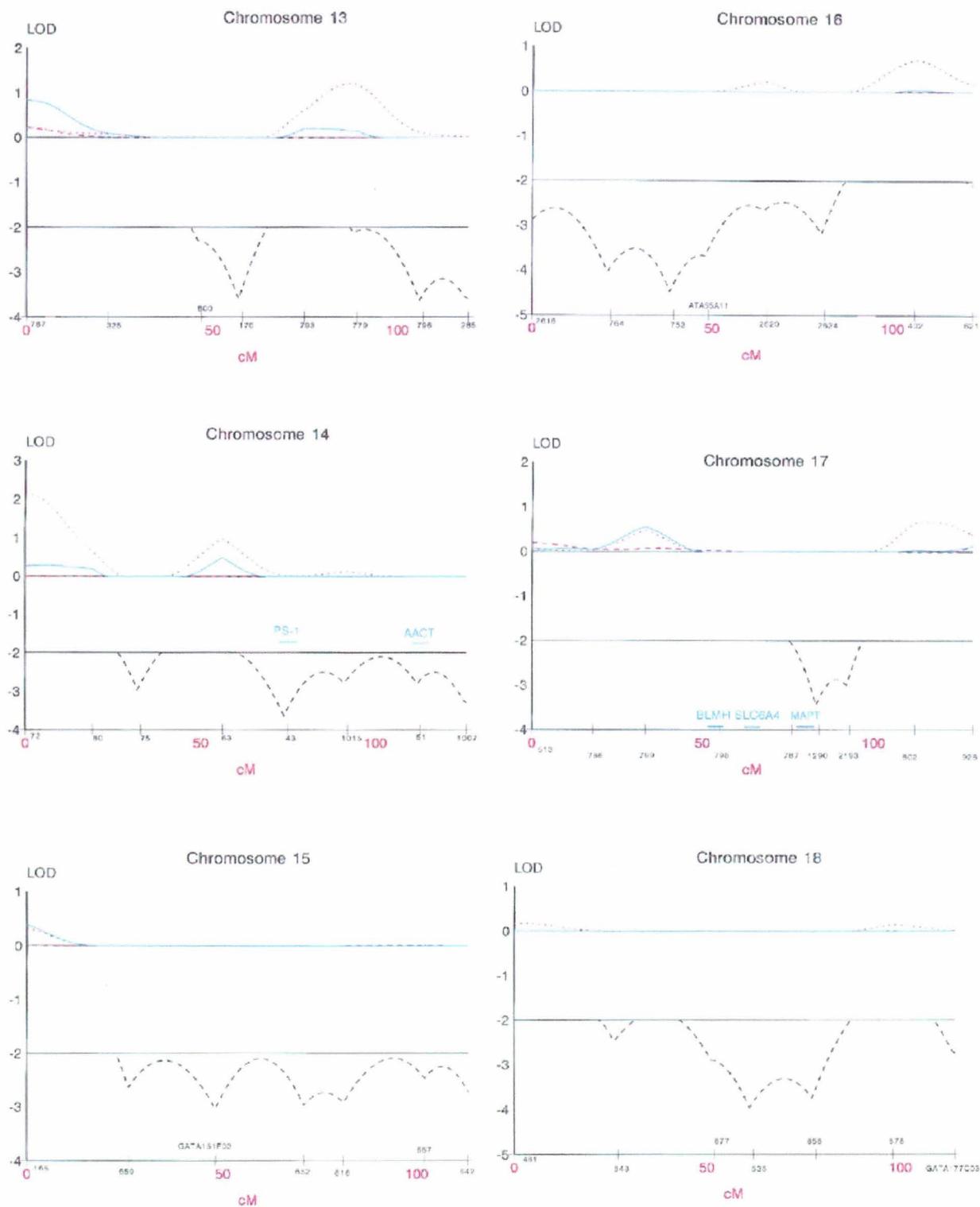


Figure 1. Continued

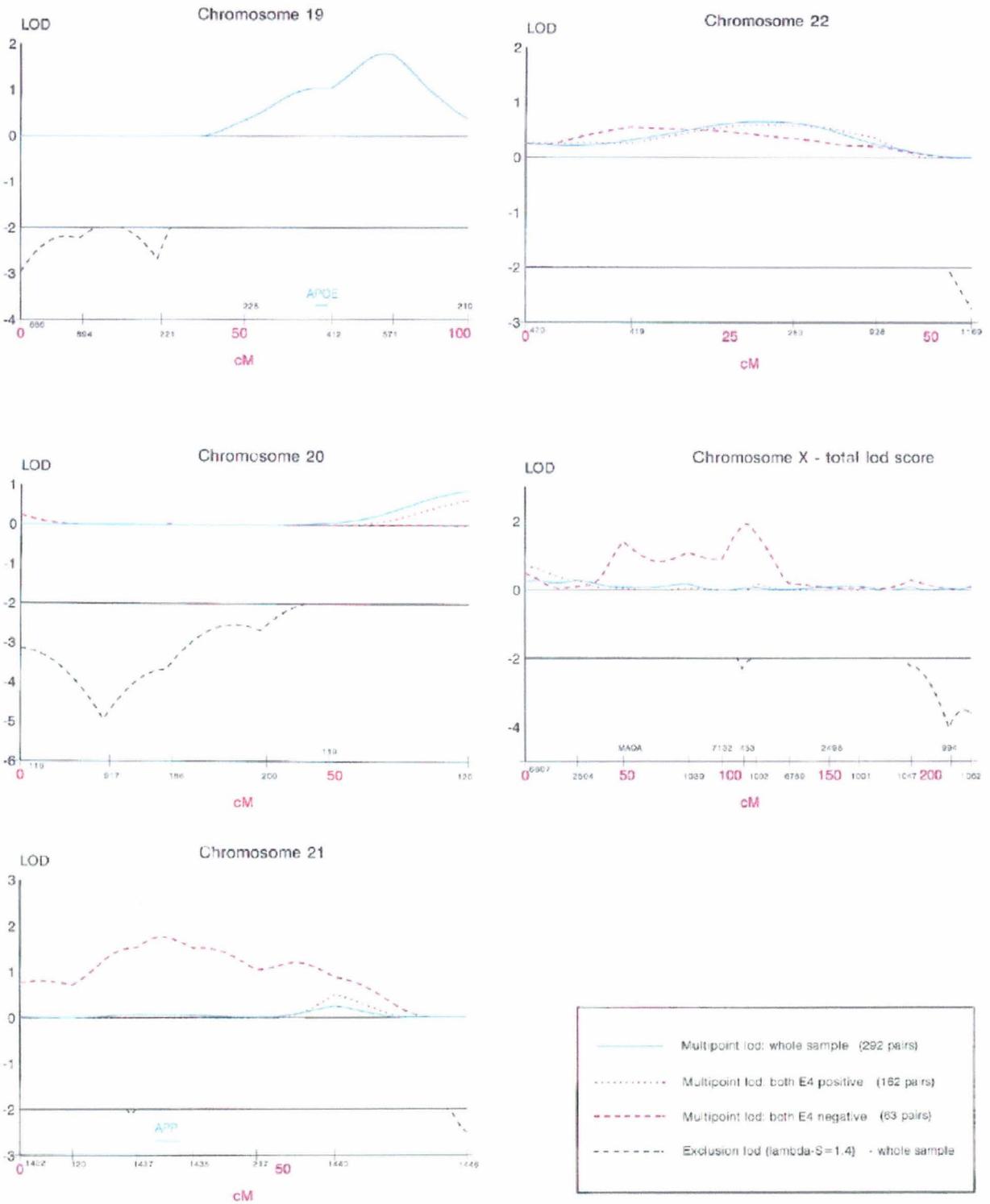


Figure 1. Continued

individual could be used to check for genotyping errors. These 230 families yielded a total of 292 ASPs, in only 17 of which were both definitely affected.

Genotyping

Lymphoblastoid cell lines were generated from peripheral blood leukocytes and DNA extracted using routine methods. Semi-automated fluorescent genotyping was undertaken using the ABI Genescan/Genotyper system by comparison of the fragment sizes with an internal standard. All genotypes were scored blind as to phenotype. Genotype data from all three participating centres was sent to a centralized database in Cardiff (48). The database (MEGABASE) was used to check the binning of alleles, convert allele sizes to whole numbers and to check for non-Mendelian inheritance where possible. MEGABASE stored all relevant genotypic/phenotypic data and produced all necessary files for statistical analysis.

Markers

A total of 237 microsatellite markers, obtained from Genethon, CHLC and GDB (106 di-, 21 tri- and 110 tetranucleotides) were typed in an average of 253.8 (159–288) sib pairs. The average distance between adjacent markers was 16.3 cM (1–40 cM) and the average heterozygosity was 0.75 (0.39–0.89).

Statistical analysis

The program SPLINK (49) was used to compute single point MLSs under the 'possible triangle' restrictions (50) and to calculate allele frequency estimates for each marker. These were used in the multipoint analyses, which were carried out using MAPMAKER/SIBS (32) on the whole sample of 292 sib pairs, the subset of 162 sib pairs where both members possessed an $\epsilon 4$ allele and the subset of 63 pairs where neither possessed an $\epsilon 4$ allele. A multipoint exclusion map was also obtained for the whole sample using MAPMAKER/SIBS. For the purposes of this analysis, the disease susceptibility model was parameterized in terms of λ_s , the relative risk to siblings of a case (51). A λ_s of 1.4 was used, since this is approximately equal to that given by APOE, assuming a population gene frequency of 0.15, a relative risk of 4 for $\epsilon 4$ heterozygotes and a relative risk of 10 for $\epsilon 4$ homozygotes, similar to observations in a number of Caucasian populations (7). Higher values of λ_s were also tested, although the results are not shown here. Genome-wide significance levels were obtained by simulation in the following way: 500 replicate samples of each chromosome were simulated under the null hypothesis of no linkage, using the observed allele frequencies and ensuring that the individuals typed at each locus were the same as in the original dataset. Stratification into $\epsilon 4^{+ve}$ and $\epsilon 4^{-ve}$ subsamples was carried out according to the observed APOE genotypes in the original dataset. Maximum MLS analyses were carried out using MAPMAKER/SIBS for each replicate sample of each chromosome. All three samples (whole, $\epsilon 4^{+ve}$ and $\epsilon 4^{-ve}$) were analysed, except for chromosome 19, which was analysed in the whole sample only. The method for estimating the genome-wide significance of a given lod score was to simulate a genome scan by choosing one replicate of each chromosome at random. The number of peaks exceeding the required level in any of the three analyses (results for chromosome 19 excepted) was

counted and the process repeated 10 000 times. The average number of such peaks per genome scan was used to estimate the true genome-wide occurrence rate and, hence, the significance of the lod score.

ACKNOWLEDGEMENTS

The samples used in this study were selected from those collected by the NIMH Alzheimer's Genetics Initiative and were banked at the Coriell Cell Repository. Full sample IDs are available from the authors. Genotyping and data analysis were supported by a grant from the MRC (UK), the Alzheimer's Association, the Metropolitan Life Foundation, the Mayo Foundation and the Mayo/USF Program Project Grant. A.G. is the recipient of an NIH career development award (AG00634).

ABBREVIATIONS

A2M, $\alpha 2$ -macroglobulin; AD, Alzheimer's disease; ASPs, affected sibling pairs; APP, amyloid precursor protein; APOE, apolipoprotein E; DS, Down syndrome; $\epsilon 4^{+ve}$, $\epsilon 4$ -positive; $\epsilon 4^{-ve}$, $\epsilon 4$ -negative; FAD, familial autosomal dominant AD; IBD, identity by descent; PS-1, presenilin 1.

REFERENCES

- Clark, R. and Goate, A. (1993) Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.*, **50**, 1164–1172.
- Goate, A.M., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M.C., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., Mant, R., Newton, P., Rooke, K., Roques, P., Talbot, C., Pericak-Vance, M.A., Roses, A.D., Williamson, R., Rossor, M.N., Owen M.J. and Hardy, J. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, **349**, 704–706.
- Schellenberg, G.D., Bird, T.D., Wijsman, E.M., Orr, H.T., Anderson, L., Nemens, E., White, J.A., Bonnycastle, L., Weber, J.L., Alonso, M.E., Potter, H., Heston, L.L. and Martin, G.M. (1992) Genetic-linkage evidence for a familial Alzheimers-disease locus on chromosome-14. *Science*, **258**, 668–671.
- Sherrington, R., Rogeev, E.L., Liang, Y., Rogeeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Foncin, J.F., Bruni, A.C., Montesi, M.P., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Nee, L., Chumakov, I., Pollen, D., Brookes, A., Sanseau, P., Polinsky, R.J., Wasco, W. *et al.* (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's-disease. *Nature*, **375**, 754–760.
- Levy-Lehad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D.M., Oshima, J., Pettingell, W.H., Yu, C.E., Jondro, P.D., Schmidt, S.D., Wang, K., Crowley, A.C., Fu, Y.H., Guenette, S.Y., Galas, D., Nemens, E., Wijsman, E.M., Bird, T.D., Schellenberg, G.D. and Tanzi, R.E. (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*, **269**, 973–977.
- Hutton, M. and Hardy, J. (1997) The presenilins and Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.*, **6**, 1639–1646.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L. and Pericak-Vance, M.A. (1993) Gene dose of apolipoprotein-e type-4 allele and the risk of Alzheimers-disease in late-onset families. *Science*, **261**, 921–923.
- Pericak-Vance, M.A. and Haines, J.L. (1995) Genetic susceptibility to Alzheimer-disease. *Trends Genet.*, **11**, 504–508.
- Lander, E.S. and Schork, N.J. (1994) Genetic dissection of complex traits. *Science*, **266**, 2037–2048.
- Owen, M.J. and McGuffin, P. (1993) Association and linkage—complementary strategies for complex disorders. *J. Med. Genet.*, **30**, 638–639.
- Wragg, M., Hutton, M., Talbot, C., Busfield, F., Han, S.W., Lendon, C., Clark, R.F., Morris, J.C., Edwards, D., Goate, A., Pfeiffer, E., Crook, R., Prihar, G., Phillips, H., Baker, M., Hardy, J., Rossor, M., Houlden, H., Karran, E., Roberts, G. and Craddock, N. (1995) Genetic association between intronic polymorphism in Presenilin-1 gene and late-onset Alzheimers-disease. *Lancet*, **347**, 509–512.

12. Kehoe, P., Williams, J., Lovestone, S., Wilcock, G., Owen, M.J. and the UK Alzheimer's Disease Collaborative Group (1996) Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet*, **347**, 1185.
13. Kehoe, P., Williams, J., Holmans, P., Liddell, M., Lovestone, S., Holmes, C., Powell, J., Neal, J., Wilcock, G. and Owen, M.J. (1996) Association between a PS-1 intronic polymorphism and late onset Alzheimer's disease. *Neuroreport*, **7**, 2155-2158.
14. Higuchi, S., Muramatsu, T., Matsushita, S., Arai, H. and Sasaki, H. (1996) Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet*, **347**, 1186.
15. Isoe, K., Ukrami, K., Ji, Y., Adachi, Y. and Nakashima, K. (1996) Presenilin-1 polymorphism in patients with Alzheimer's disease, vascular dementia and alcohol-associated dementia in Japanese population. *Acta Neurol. Scand.*, **94**, 326-328.
16. Matsushita, S., Arai, H., Muramatsu, T., Makimoto, K., Nakagawa, T., Sasaki, H. and Higuchi, S. (1997) Presenilin-1 polymorphism in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Exp. Neurol.*, **146**, 567-569.
17. Brookes, A.J., Howell, W.M., Woodburn, K., Johnstone, E.C. and Carothers, A. (1997) Presenilin-1, presenilin-2 and VLDL-R associations in early onset Alzheimer's disease. *Lancet*, **350**, 336-337.
18. Okuzumi, K., Onodera, O., Namba, Y., Ikeda, K., Yamamoto, T., Seki, K., Ueki, A., Nanko, S., Tanaka, H., Takahashi, H., Oyanagi, K., Mizusana, H., Kanazawa, I. and Tsuji, S. (1995) Genetic association of the very low density lipoprotein (VLDL) receptor gene with sporadic Alzheimer's disease. *Nature Genet.*, **11**, 207-209.
19. Lehman, D.J., Johnston, C. and Smith, A.D. (1997) Synergy between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset confirmed Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.*, **6**, 1933-1936.
20. Payami, H., Schellenberg, G.D., Zarepari, S., Kaye, J., Sexton, G.J., Head, M.A., Matsuyama, S.S., Jarvik, L.F., Miller, B., McManus, D.Q., Bird, T.D., Katzman, R., Heston, L., Norman, D. and Small, G.W. (1997) Evidence for association of HLA-A2 allele with onset age of Alzheimer's disease. *Neurology*, **49**, 512-518.
21. Kambh, M.I., Sanghera, D.K., Ferrel, F.E. and DeKosky, S.T. (1995) APOE4-associated Alzheimer's disease risk is modified by alpha-1 antichymotrypsin polymorphism. *Nature Genet.*, **10**, 486-488.
22. Lendon, C., Talbot, C.J., Craddock, N.J., Han, S.W., Wragg, M., Morris, J.C. and Goate, A.M. (1997) Genetic association studies between dementia of the Alzheimer's type and three receptors for apolipoprotein E in a caucasian population. *Neurosci. Lett.*, **222**, 187-190.
23. Wavrant-De Vrieze, F., Perez-Tur, J., Lambert, J.C., Frigard, B., Pasquier, F., Delacourte, A., Amouyel, P., Hardy, J. and Chartier-Harlin, M.C. (1997) Association between the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) and Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.*, **227**, 68-70.
24. Kang, D.E., Saitoh, T., Chen, X., Xia, Y., Maslah, E., Hansen, L.A., Thomas, R.G., Thal, L.J. and Katzman, R. (1997) Genetic association of the low-density lipoprotein receptor-related protein gene (LRP), an apolipoprotein E receptor, with late-onset Alzheimer's disease. *Neurology*, **49**, 56-61.
25. Kambh, M.I., Ferrell, R.E. and DeKosky, S.T. (1998) Genetic association studies between Alzheimer's disease and two polymorphisms in the low density lipoprotein receptor-related protein gene. *Neurosci. Lett.*, **244**, 65-68.
26. Baum, L., Chen, L., Ng, H.K., Chan, Y.S., Mak, Y.T., Woo, J., Chiu, H.F.K. and Pang, C.P. (1998) Low density lipoprotein receptor related protein gene exon 3 polymorphism association with Alzheimer's disease in Chinese. *Neurosci. Lett.*, **247**, 33-36.
27. Hollenbach, E., Ackermann, S., Hyman, B.T. and Rebeck, G.W. (1998) Confirmation of an association between a polymorphism in exon 3 of the low density-lipoprotein-related protein gene and Alzheimer's disease. *Neurology*, **50**, 1905-1907.
28. Montoya, S.E., Aston, C.E., DeKosky, S.T., Kambh, M.I., Lazo, J.S. and Ferrell, R.E. (1998) Bleomycin hydroxylase is associated with risk of sporadic Alzheimer's disease. *Nature Genet.*, **18**, 211-212.
29. Blacker, D., Wilcox, M.A., Laird, N.M., Rodes, L., Horvath, S.M., Go, R.C.P., Perry, R., Watson, B. Jr, Bassett, S.S., McInnis, M.G., Albert, M.S., Hyman, B.T. and Tanzi, R.E. (1998) Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer's disease. *Nature Genet.*, **19**, 357-360.
30. Li, T., Holmes, C., Sham, P.C., Vallada, H., Birkett, J., Kirov, G., Lesch, K.P., Powell, J., Lovestone, S. and Collier, D. (1997) Allelic functional variation of serotonin transporter expression is a susceptibility factor for late onset Alzheimer's disease. *Neuroreport*, **8**, 683-686.
31. Owen, M.J., Holmans, P. and McGuffin, P. (1997) Association studies in psychiatric genetics. *Mol. Psychiat.*, **2**, 270-273.
32. Lander, E.S. and Kruglyak, L. (1995) Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature Genet.*, **11**, 241-247.
33. Pericak-Vance, M.A., Bass, M.P., Yamaoka, L.H., Gaskell, P.C., Scott, W.K., Terwedow, H.A., Menold, M.M., Conneally, P.M., Small, G.W., Vance, J.M., Saunders, A.M., Roses, A.D. and Haines, J.L. (1997) Complete genomic screen in late-onset familial Alzheimer disease—evidence for a new locus on chromosome 12. *J. Am. Med. Assoc.*, **278**, 1237-1241.
34. Pericak-Vance, M.A., Bass, M.L., Yamaoka, L.H., Gaskell, P.C., Scott, W.K., Terwedow, H.A., Menold, M.M., Conneally, P.M., Small, G.W., Saunders, A.M., Roses, A.D. and Haines, J.L. (1998) Complete genomic screen in late-onset familial Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, **19**, S39-S42.
35. Wu, B., Holmans, P., Wavrant-De Vrieze, F., Shears, S., Kehoe, P., Crook, R., Booth, J., Williams, N., Perez-Tur, J., Roehl, K., Fenton, I., Chartier-Harlin, M.C., Lovestone, S., Williams, J., Hutton, M., Hardy, J., Owen, M.J. and Goate, A.M. (1998) Genetic studies on chromosome 12p11-12 in late onset AD. *J. Am. Med. Assoc.*, **280**, 619-622.
36. Zubenko, G.S., Stiffler, J.S., Hughes, H.B., Hurtt, M.R. and Kaplan, B.B. (1998) Initial results of a genome survey for a novel Alzheimer's disease risk: association with a locus on the X chromosome. *Am. J. Med. Genet. Neuropsychiat. Genet.*, **81**, 98-107.
37. Liddell, M.B., Bayer, A.J. and Owen, M.J. (1995) No evidence that common allelic variation in the amyloid precursor protein (APP) gene confers susceptibility to Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.*, **4**, 853-858.
38. Rooke, K., Goate, A., Fidani, L., Mullan, M., Roques, P., Rossor, M., Hardy, J. and Chartier-Harlin, M.C. (1993) Screening of the promoter and the b-amyloid sequence of the APP gene for polymorphism in families with late onset Alzheimer's disease. *Neurodegeneration*, **1**, 237-240.
39. Pericak-Vance, M., Bebout, J.L., Gaskell, P.C., Yamaoka, L.H., Hung, W.Y., Alberts, M.J., Walker, A.P., Barlett, R.J., Haynes, C.A., Welsh, K.A., Earl, N.L., Heyman, A., Clark, C.M. and Roses, A.D. (1991) Linkage studies in familial Alzheimer's disease. Evidence for chromosome 19 linkage. *Am. J. Hum. Genet.*, **48**, 1034-1050.
40. Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T.D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levey-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D. and Younkin, S. (1996) Secreted amyloid b-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased *in vivo* by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Med.*, **2**, 864-870.
41. Prasher, V.P., Farrer, M.J., Kessling, A.M., Fisher, E.M.C., West, R.J., Barber, P.C. and Utler, A.C. (1998) Molecular mapping of Alzheimer's-type dementia in Down's syndrome. *Ann. Neurol.*, **43**, 380-383.
42. Du, Y.S., Ni, B.H., Glinn, M., Dodel, R.C., Bales, K.R., Zhang, Z.Y., Hyndy, P.A. and Paul, S.M. (1997) Alpha(2)-macroglobulin as a beta-amyloid peptide-binding plasma protein. *J. Neurochem.*, **69**, 299-305.
43. Hughes, S.R., Khorkova, O., Goyal, S., Knaeblein, J., Heroux, J., Riedel, N.G. and Sahasrabudhe, S. (1998) Alpha(2)-macroglobulin associates with beta-amyloid peptide and prevents fibril formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 3275-3280.
44. Rebeck, G.W., Harr, S.D., Strickland, D.K. and Hyman, B.T. (1995) Multiple, diverse senile plaque-associated proteins are ligands of an apolipoprotein E receptor, the a2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor related protein. *Ann. Neurol.*, **37**, 211-217.
45. Hauser, E.R., Boehnke, M., Guo, S.W. and Risch, N. (1996) Affected-sib-pair interval mapping and exclusion for complex genetic traits—sampling considerations. *Genet. Epidemiol.*, **13**, 117-137.
46. Blacker, D., Haines, J., Rodes, L., Terwedow, H., Go, R.C.P., Harrell, L.E., Perry, R.T., Bassett, S.S., Chase, G., Meyers, D., Albert, M.S. and Tanzi, R.E. (1997) ApoE 4 and age at onset of Alzheimer's disease: the NIMH Genetics Initiative. *Neurology*, **48**, 139-147.
47. McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D. and Stadlan, E.M. (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology*, **34**, 939-944.
48. Fenton, I. and Sandkuijl, L.A. (1992) MEGABASE-PKD: a genetic database for polycystic kidney disease. *Contrib. Nephrol.*, **97**, 118-127.
49. Holmans, P. and Clayton, D. (1995) Efficiency of typing unaffected relatives in an affected-sib-pair linkage study with single-locus and multiple tightly linked markers. *Am. J. Hum. Genet.*, **57**, 1221-1232.
50. Holmans, P. (1993) Asymptotic properties of affected-sib-pair linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.*, **52**, 362-374.
51. Risch, N. (1990) Genetic-linkage and complex diseases, with special reference to psychiatric-disorders. *Genet. Epidemiol.*, **7**, 3-16.

Présentation du travail

Cette étude a été réalisée sur une population composée des 292 fratries affectées, présentée dans l'article et déjà étudiée dans les articles précédents. Chacun des individus inclus dans cette étude a été génotypé pour des marqueurs génétiques, séparés en moyenne de 20cM et répartis à travers le génome complet. Ce projet représentant une tâche considérable, nous avons partagé ce travail avec deux autres groupes collaborateurs. Notre part de l'étude s'est donc ainsi "réduite" à génotyper 76 marqueurs génétiques dispersés sur les chromosomes 2, 5, 7, 13, 15, 16 et 18.

Présentation des résultats

Les résultats des différentes analyses statistiques, ainsi que les graphes d'interprétation sont présentés au niveau de l'article.

Pour chaque chromosome, le lods score de chacun des marqueurs est calculé en prenant en compte les marqueurs avoisinants et donne la valeur dite MLS (multipoint lods scores) qui est commentée en prenant en compte la valeur de l'exclusion (avec $\lambda_s=1,4$). En effet, si cette dernière est <-2 , la région d'intérêt est considérée comme négative et est éliminée de l'étude.

Sur la population totale, 5 pics possédant un $MLS>1$ (1 étant considéré comme le seuil de significativité) sont observés au niveau de régions des chromosomes 1, 5, 9, 10 et 19. Lorsque les analyses statistiques sont réalisées en fonction du génotype *ApoE* des paires de germains, 4 nouveaux pics apparaissent au niveau du groupe positif pour

l'allèle ϵ_4 (chromosomes 2, 6, 13 et 14), plus 7 autres dans le groupe négatif pour l'allèle ϵ_4 (chromosomes 1, 9, 10, 12, 21, X).

Discussion des résultats

Nous observons un total de **16 régions chromosomiques liées à la MA**, ce qui est supérieur au nombre de pics estimé obtenir par chance (12,5 faux positif attendus avec un $MLS > 1$); la possibilité qu'il **existe des gènes potentiels au niveau de certains de ces locus** est donc importante.

Lorsqu'un effet important est suggéré pour les locus étudiés ($\lambda_s = 2,0$), les résultats des MLS, basés sur les graphes d'exclusion, permettent d'exclure jusqu'à 80% du génome. Par contre, si l'effet génétique est supposé être modéré ($\lambda_s = 1,4$), seulement 28% du génome peut être éliminé de l'étude.

Il est intéressant de noter que les résultats observés sur notre recherche génomique recourent ceux obtenus à la suite de l'étude de liaison génétique avec les gènes de susceptibilité de la MA.

II.4.4 Conclusion sur les études de liaison génétique

La stratégie que nous avons choisie pour l'identification de nouveaux locus dans la MA est pleinement satisfaisante pour la détection d'un effet génétique même modéré. Elle peut ainsi être utilisée pour la compréhension des maladies dites complexes ou multifactorielles, dans lesquelles plusieurs facteurs génétiques sont supposés intervenir dans le développement de la pathologie.

II.5 Problèmes liés à ces études

Les études d'association et de liaison génétiques possèdent chacune des avantages et des limites. En effet, l'étude d'association est considérablement puissante lorsque la population étudiée est de taille satisfaisante et permet ainsi de détecter l'implication de gènes à faible effet; ce qui n'est pas si évident pour l'étude de liaison. Par contre, cette dernière couvre des distances chromosomiques importantes, permettant ainsi la sélection de nombreux locus potentiels. Ces méthodes possèdent cependant aussi leurs inconvénients.

En effet, les méthodes de recrutement pouvant causer une distorsion des fréquences alléliques (c'est-à-dire qu'elles ne représentent pas vraiment celles de la population générale) et les populations étudiées possédant des origines ethniques différentes, les études d'association peuvent être biaisées, ce qui pourrait expliquer la divergence des résultats souvent observée. Il existe donc toujours la possibilité que les résultats des

études réalisées soit des erreurs de type I, pour les fausses associations positives, ou des erreurs de type II, pour les fausses associations négatives.

De plus, lorsqu'un gène ne possède qu'une implication génétique faible dans le développement de la maladie étudiée, la puissance du résultat dépendra de la taille de la population étudiée, en plus de l'influence d'autres facteurs génétiques.

En ce qui concerne les études de liaison génétique, leur plus grand désavantage est celui d'être un projet qui consomme beaucoup de temps et de matériel. De plus, elles nécessitent un très grand nombre de sujets affiliés, même si un minimum de deux germains est suffisant pour la sélection des familles étudiées.

L'évaluation de la véritable signification des résultats obtenus après une recherche génomique est aussi problématique, surtout dans le cas de l'étude de maladies multigéniques. En effet, les analyses statistiques dépendent de plusieurs variables, telles que le mode de transmission et la pénétrance de la maladie, ou l'interaction de certains locus entre eux. L'identification de locus potentiels est donc encore plus difficile dans ce cas.

II.6 Conclusion générale

Au terme de notre thèse, nous avons donc abouti à plusieurs conclusions:

- Les gènes *LRP* et *A2M*, ou des gènes proches de ces derniers, pourraient être associés à la forme tardive de la MA. Cet effet génétique serait cependant faible.
- L'étude des paires de germains est une méthode fiable pour la détection de locus à effet modéré dans la MA.
- Les facteurs de risque *PS-I* et *PS-II* des formes familiales à début précoce ne sont pas impliqués dans le développement des formes tardives. Le gène *APP* semble être, quant à lui, un facteur de susceptibilité.
- Le chromosome 12 contient au moins un locus avec un effet génétique modéré dans le développement de la MA.
- Les chromosomes 3, 4, 7, 8, 11, 15, 16, 17, 18, 20 et 22 ne semblent pas contenir de gènes impliqués dans l'apparition de la MA à début tardif. Les douze autres chromosomes possèdent cependant seize régions potentielles.

DISCUSSION

La forme d'apparition la plus courante de la maladie d'Alzheimer affecte les personnes âgées de plus de 65 ans. L'étiologie de ces formes tardives est peu connue, mais elle serait certainement la résultante de l'interaction de facteurs génétiques et environnementaux. Actuellement, l'allèle $\epsilon 4$ de l'*ApoE* est le seul facteur de risque génétique reconnu. Cependant, il n'est ni nécessaire, ni suffisant pour conduire à l'apparition de la pathologie.

En revanche, l'étiologie des formes familiales précoces de la maladie est plus détaillée et l'intervention de facteurs génétiques a été clairement déterminée par la mise en évidence de mutations pathogènes dans les gènes *APP*, *PS-I* et *PS-III*. L'observation des changements biochimiques et cellulaires qu'entraînent ces mutations a permis d'émettre des hypothèses sur les mécanismes du développement de la pathologie. Cependant, cette forme ne représente qu'un faible pourcentage de la population atteinte de la MA. L'existence d'autres gènes susceptibles de jouer un rôle dans le développement de la maladie est donc supposée.

En effet, les études de population montrent une association génétique pour certains gènes, tels que le *LRP* et l'*A2M*, avec la maladie. Toutefois, ces résultats sont controversés, ce qui met en doute l'implication véritable de ces gènes candidats dans la MA.

Dans le cadre de notre thèse, nous avons entrepris l'identification de nouveaux locus intervenant dans le développement de la forme tardive de cette maladie. C'est donc dans ce but que nous avons utilisé deux stratégies différentes. L'une est l'étude des gènes candidats potentiellement impliqués dans l'apparition des formes familiales à début

précoce et des formes sporadiques tardives. L'autre approche consiste à la réalisation d'une recherche génomique dans une population importante de paires de germains, afin de localiser de nouvelles régions chromosomiques susceptibles de contenir des gènes d'intérêt.

Nos résultats sur les études de population montrent une association génétique des polymorphismes présents au niveau des gènes *LRP* et *A2M* avec la forme tardive de la MA. En effet, des variants spécifiques de ces gènes semblent être liés à l'apparition de la maladie, plus précisément à la forme sporadique dans le cas du *LRP*, alors que la forme familiale semble plutôt sous l'influence de l'*A2M*.

De même, nos études de liaison génétique semblent indiquer l'existence d'une liaison des marqueurs du chromosome 12 avec la forme familiale de la MA à début tardif. Le gène *A2M* se localise dans cette région. Toutefois, d'autres équipes montrent une liaison génétique dans un autre locus au niveau du gène *LRP*. Les gènes *LRP* et *A2M* pourraient donc jouer un rôle dans le développement de la MA.

En effet, ces deux gènes codent des protéines qui interviendraient dans des mécanismes mettant en jeu le peptide amyloïde et qui sont retrouvées dans les plaques séniles. Les protéines du *LRP* et de l'*A2M* pourraient être impliquées dans la formation des plaques amyloïdes, soit en augmentant la production du peptide amyloïde, soit en favorisant son agrégation, ou encore en inhibant son élimination.

Cependant, cette hypothèse n'est pas soutenue par les travaux d'autres équipes qui n'observent pas d'association génétique des gènes *LRP* et *A2M* avec la MA. Il est donc possible que ces polymorphismes soient associés avec d'autres polymorphismes

présents au niveau des régions régulatrices de ces gènes ou au niveau de gènes avoisinants. Les polymorphismes étudiés auraient alors une distribution différente en fonction des populations.

Le séquençage des régions régulatrices des gènes *LRP* et *A2M* est donc un projet intéressant qui pourrait déboucher sur la détection de nouveaux polymorphismes influençant la transcription de ces gènes.

En ce qui concerne les gènes de susceptibilité identifiés initialement dans la forme familiale de la MA à début précoce, nos études ont montré que les gènes *PS-I* et *PS-II* ne possèdent pas de rôle majeur dans le développement des formes tardives de la maladie. Par contre, nos données indiquent une liaison du locus *APP* avec la maladie, dans le sous-groupe des personnes ne possédant pas d'allèle $\epsilon 4$. Cette ségrégation des malades en fonction du génotype *ApoE* suggère que le gène *APP* ne joue pas de rôle majeur dans le développement de la forme familiale à début tardif. Les mécanismes de prise en charge de l'*APP* et non pas l'augmentation de la production de peptide $A\beta$, comme il semble être le cas dans les formes précoces, pourraient être impliqués dans la formation des dépôts de substance amyloïde. L'impact de ces mécanismes serait plus faible par rapport à celui de l'*ApoE*. Par contre, en absence de l'allèle $\epsilon 4$, le gène *APP* pourrait moduler la susceptibilité de développer la MA. Deux mécanismes impliqués dans le développement de la forme familiale tardive de la maladie pourraient donc exister, l'un mettant en jeu l'*ApoE* et l'autre l'*APP*.

Il est alors possible que des polymorphismes au niveau des régions régulatrices de l'*APP* soient associés à une augmentation de sa production, ce qui justifierait ainsi nos

résultats. Le séquençage des régions régulatrices de l'APP pourrait donc être une étude intéressante à réaliser.

Dans le cadre de notre recherche génomique, d'autres régions chromosomiques, différentes de celle du chromosome 21, suggèrent aussi une liaison génétique avec la forme familiale à début tardif de la MA. En effet, après cette première étape, les chromosomes 1, 2^{*}, 5^{*}, 6, 9, 10, 12, 13^{*}, 14, 19 et X (^{*}chromosomes étudiés par notre groupe) ont été sélectionnés pour la poursuite de notre projet.

A ce niveau, aucune hypothèse ne peut être établie quant à l'implication de ces régions chromosomiques dans le développement de la MA. La seconde étape est actuellement en cours de réalisation, ce qui nous permettra d'éliminer les régions chromosomiques qui correspondent à de faux positifs. Toutefois, il est intéressant de noter l'existence de gènes candidats identifiés au niveau de ces régions chromosomiques. Par exemple, dans la région du chromosome 2 liée à la forme familiale de la MA à début tardif, se trouvent, entre autres, les locus des gènes *Syndécane I* et *ApoB*. Ces gènes sont intéressants car ils pourraient jouer un rôle dans la formation des dépôts amyloïdes. En effet, la Syndécane I appartient à une famille de protéoglycannes membranaires de type héparane sulfate qui se lient aux éléments de la matrice extracellulaire (Bernfield & Sanderson, 1990; Carey, 1997). Elle pourrait donc avoir un rôle dans le métabolisme de l'APP qui possède une affinité pour l'héparine, ou encore dans la neurodégénérescence. De même, l'apoB est une lipoprotéine qui, comme l'ApoE, intervient dans l'élimination des lipoprotéines de basse densité (Lestavel &

Fruchart, 1994). Or, elle est retrouvée dans les plaques amyloïdes et les lésions de type dégénérescence neurofibrillaire dans le cerveau des patients atteints de la MA (**Namba et al, 1992**). Il est ainsi possible que cette molécule soit impliquée dans le développement de cette pathologie.

Au niveau du chromosome 5, parmi les gènes contenus dans la région montrant une liaison avec la maladie, se trouvent le locus du *LDL-r*, celui du *facteur C9* du complément, celui de la protéine inhibitrice de l'apoptose neuronale (acronyme anglais: *NAIP* pour Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein), et aussi celui de la $\delta 2$ -caténine (*CTNND2*). Alors que le *LDL-r* et le complément joueraient un rôle dans la formation des plaques amyloïdes (voir généralités sur la MA), la $\delta 2$ -caténine et la *NAIP* pourraient, quant à elles, être plutôt impliquées au niveau de la dégénérescence neurofibrillaire. En effet, la $\delta 2$ -caténine est une molécule qui interviendrait dans le mécanisme de l'apoptose, car elle se complexe avec la β -caténine (**Lu et al, 1999**). De plus, elle peut se fixer à la boucle hydrophile de PS-I (**Tanahashi & Tabira, 1999**). Tandis que *NAIP* est capable d'inhiber les caspases (**Hara, 1999**).

Un dernier exemple: la *Glypicane 5* et l'*UCHL3* (Ubiquitin carboxyl-terminal esterase 3) pourraient aussi être des gènes de susceptibilité potentiels de la MA, puisque ces locus se trouvent dans la région d'intérêt du chromosome 13, et qu'ils codent des protéines pouvant intervenir dans les différents mécanismes mis en jeu dans le développement de la maladie. En effet, la *Glypicane 5* appartient à une autre famille de protéoglycannes de type héparane sulfate (**Bernfield & Sanderson, 1990**) et est capable de

se fixer fortement à l'APP (Williamson *et al*, 1996). La Glypicane 5 pourrait donc jouer un rôle dans la formation des plaques amyloïdes. De même, UCHL3 pourrait être impliquée dans le développement de la MA, car elle est retrouvée au niveau des plaques neuritiques (Pirim, 1998). Cette enzyme, localisée au niveau des neurones, hydrolyse la partie C-terminale de l'ubiquitine, molécule de stress retrouvée en abondance dans les lésions.

A ce stade de la recherche génomique, aucune hypothèse ne peut être émise quant à l'implication de ces gènes dans le développement de la MA. Ceci n'est qu'une liste non exhaustive de gènes candidats localisés dans les régions chromosomiques suggérant une liaison avec la maladie. Cependant, cette étude nous apporte la certitude du caractère multigénétique de la MA. Cette complexité génétique existe entre les différentes formes de la maladie, que ce soit au niveau de l'APP, PS-I et PS-II impliqués dans les formes familiales précoces, ou de l'ApoE dans les formes tardives, mais aussi entre les populations puisque, par exemple, les gènes LRP et A2M présentent une susceptibilité qui n'est pas retrouvée dans toutes les études d'association génétique.

L'étude de gènes candidats nécessite donc de définir précisément les populations étudiées afin de pouvoir travailler sur des groupes homogènes, aussi bien au niveau des caractéristiques cliniques qu'au niveau des antécédents familiaux des sujets sélectionnés.

L'identification de nouveaux gènes impliqués dans la MA permettra de comprendre les différents mécanismes impliqués dans le développement de la pathologie. Une meilleure connaissance de ces mécanismes devrait permettre le développement de nouvelles cibles thérapeutiques. Dans ce cadre, il est intéressant de noter que la réponse à certains traitements est actuellement en étude en fonction du génotypage *ApoE* permettant ainsi de distinguer les bons répondeurs aux traitements, des mauvais. Aussi, l'identification des gènes de susceptibilité devrait permettre le développement d'études pharmaco-génétiques qui, à long terme, pourraient déboucher sur des stratégies thérapeutiques adaptées.

PERSPECTIVES DE TRAVAIL

Comme nous l'avons suggéré dans la discussion, le séquençage des régions régulatrices des gènes de susceptibilité étudiés (*LRP*, *A2M* et *APP*) serait une première étape vers la compréhension de leur implication dans la MA. Aussi, notre équipe, en collaboration avec celle du Professeur John Hardy, s'est déjà orientée vers ce type d'étude. Les nouveaux polymorphismes découverts devront, bien sûr, être ensuite testés sur différentes populations afin d'observer s'ils sont associés avec la MA.

Le deuxième projet en perspective est, de toute évidence, la poursuite de la recherche génomique dans le but de découvrir de nouveaux gènes impliqués dans la MA. La deuxième étape de cette étude est déjà en cours et devrait bientôt nous permettre de savoir si les régions chromosomiques qui ont été sélectionnées sont en effet liées à l'apparition de la forme familiale de la MA à début tardif.

L'identification des gènes présents dans ces locus constituera l'étape suivante, l'objectif à long terme étant la caractérisation fonctionnelle des produits de ces gènes et aussi l'étude de leur implication dans la maladie.

C'est dans un souci d'améliorer les conditions de vie des personnes souffrant de la maladie d'Alzheimer, mais aussi celles des personnes qui consacrent leur temps et leur énergie à s'occuper de ces malades, que la recherche des causes de cette maladie doit persévérer.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abraham, C., Selkoe, D. & 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.
- Afagh, A., Cummings, B., Cribbs, D., et al** (1996) Localization and cell association of C1q in Alzheimer's disease brain. *Exp Neurol*, **138**, 22-32.
- Ahmed, A., MacGowan, S., Culpan, D., et al** (1999) The -491A/T polymorphism of the Apolipoprotein E gene is associated with the ApoE epsilon4 allele and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, **263**, 217-9.
- Aisen, P. & Davis, K.** (1994) Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: implications for therapy. *Am J Psychiatry*, **151**, 1105-13.
- Alberts, M., Graffagnino, C., McClenny, C., et al** (1995) ApoE genotype and survival from intracerebral haemorrhage [letter]. *Lancet*, **346**, 575.
- Aleshkov, S., Abraham, C. & Zannis, V.** (1997) Interaction of nascent ApoE2, ApoE3, and ApoE4 isoforms expressed in mammalian cells with amyloid peptide beta (1-40). Relevance to Alzheimer's disease. *Biochemistry*, **36**, 10571-80.
- Al-Haideri, M., Goldberg, I., Galeano, N., et al** (1997) Heparan sulfate proteoglycan-mediated uptake of apolipoprotein E- triglyceride-rich lipoprotein particles: a major pathway at physiological particle concentrations. *Biochemistry*, **36**, 12766-72.
- Alonso, A., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K.** (1996) Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med*, **2**, 783-7.
- Ancolio, K., Dumanchin, C., Barelli, H., et al** (1999) Unusual phenotypic alteration of beta amyloid precursor protein (betaAPP) maturation by a new Val-715 --> Met betaAPP-770 mutation responsible for probable early-onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 4119-24.
- Ando, K., Oishi, M., Takeda, S., et al** (1999) Role of phosphorylation of Alzheimer's amyloid precursor protein during neuronal differentiation. *J Neurosci*, **19**, 4421-7.
- Andreadis, A., Brown, W. & Kosik, K.** (1992) Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry*, **31**, 10626-33.
- Arendt, T., Holzer, M., Fruth, R., et al** (1995) Paired helical filament-like phosphorylation of tau, deposition of beta/A4-amyloid and memory impairment in rat induced by chronic inhibition of phosphatase 1 and 2A. *Neuroscience*, **69**, 691-8.
- Arriagada, P., Growdon, J., Hedley-Whyte, E., et al** (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*, **42**, 631-9.
- Artiga, M., Bullido, M., Sastre, I., et al** (1997) Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of apolipoprotein E gene. *FEBS Lett*, **421**, 105-108.
- Artiga, M., Bullido, M., Frank, A., et al** (1998) Risk for Alzheimer's disease correlates with transcriptional activity of the APOE gene. *Hum Mol Genet*, **7**, 1887-92.
- Ashcom, J., Tiller, S., Dickerson, K., et al** (1990) The human alpha 2-macroglobulin receptor: identification of a 420-kD cell surface glycoprotein specific for the activated conformation of alpha 2-macroglobulin. *J Cell Biol*, **110**, 1041-8.

- Backstrom, J.,** Lim, G., Cullen, M., *et al* (1996) Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1-40). *J Neurosci*, **16**, 7910-9.
- Bakker, E.,** van Broeckhoven, C., Haan, J., *et al* (1991) DNA diagnosis for hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch type). *Am J Hum Genet*, **49**, 518-21.
- Bales, K.,** Verina, T., Dodel, R., *et al* (1997) Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid-beta peptide deposition. *Nat Genet*, **17**, 263-264.
- Ballerini, C.,** Nacmias, B., Rombola, G., *et al* (1999) HLA A2 allele is associated with age at onset of Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, **45**, 397-400.
- Baskin, F.,** Rosenberg, R. & Davis, R. (1992) Morphological differentiation and proteoglycan synthesis regulate Alzheimer amyloid precursor protein processing in PC-12 and human astrocyte cultures. *J Neurosci Res*, **32**, 274-9.
- Bauer, J.,** Strauss, S., Schreiter-Gasser, U., *et al* (1991) Interleukin-6 and alpha-2-macroglobulin indicate an acute-phase state in Alzheimer's disease cortices. *FEBS Lett*, **285**, 111-4.
- Baum, L.,** Hansen, L., Masliah, E., *et al* (1996) Glycogen synthase kinase 3 alteration in Alzheimer disease is related to neurofibrillary tangle formation. *Mol Chem Neuropathol*, **29**, 253-61.
- Baum, L.,** Chen, L., Ng, H. K., *et al* (1998) Low density lipoprotein receptor related protein gene exon 3 polymorphism association with Alzheimer's disease in Chinese. *Neurosci Lett*, **247**, 33-6.
- Beffert, U.,** Aumont, N., Dea, D., *et al* (1999) Apolipoprotein E isoform-specific reduction of extracellular amyloid in neuronal cultures. *Brain Res Mol Brain Res*, **68**, 181-5.
- Bell, G.,** Rall, L., Sanchez-Pescador, R., *et al* (1985) Human alpha 2-macroglobulin gene is located on chromosome 12. *Somat Cell Mol Genet*, **11**, 285-9.
- Benkovic, S.,** McGowan, E., Rothwell, N., *et al* (1997) Regional and cellular localization of presenilin-2 RNA in rat and human brain. *Exp Neurol*, **145**, 555-64.
- Bernfield, M. &** Sanderson, R. D. (1990) Syndecan, a developmentally regulated cell surface proteoglycan that binds extracellular matrix and growth factors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **327**, 171-86.
- Biernat, J.,** Gustke, N., Drewes, G., *et al* (1993) Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron*, **11**, 153-63.
- Birge, S.** (1996) Is there a role for estrogen replacement therapy in the prevention and treatment of dementia?. *J Am Geriatr Soc*, **44**, 865-70.
- Blacker, D.,** Wilcox, M., Laird, N., *et al* (1998) Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet*, **19**, 357-360.
- Blackley, H.,** Patel, N., Davies, M., *et al* (1999) Morphological Development of beta(1-40) Amyloid Fibrils. *Exp Neurol*, **158**, 437-443.
- Blain, H.,** Jeandel, C., Merched, A., *et al* (1997) Apolipoprotein E level in cerebrospinal fluid increases with aging [letter]. *J Am Geriatr Soc*, **45**, 1536.
- Borchelt, D.,** Thinakaran, G., Eckman, C., *et al* (1996) Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron*, **17**, 1005-13.

- Borg, J., Ooi, J., Levy, E., et al** (1996) The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein. *Mol Cell Biol*, **16**, 6229-41.
- Boyles, J., Pitas, R., Wilson, E., et al** (1985) Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J Clin Invest*, **76**, 1501-13.
- Braak, H. & Braak, E.** (1997a) Aspects of Cortical Destruction in Alzheimer's Disease. In *connections, Cognition, and Alzheimer's Disease* (eds B. T. Hyman, C. Duyckaerts, & Y. Christen), pp. 1-16. berlin: Springer.
- Braak, H. & Braak, E.** (1997b) Pattern of Cortical Lesions in Alzheimer's Disease. In *Alzheimer's Disease: Biology, Diagnosis and Therapeutics*, pp. 228-237: John Wiley and Sons Ltd.
- Braak, H. & Braak, E.** (1997c) Staging of Alzheimer-related cortical destruction. *Int Psychogeriatr*, **9**, 257-61; discussion 269-72.
- Bramblett, G., Goedert, M., Jakes, R., et al** (1993) Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron*, **10**, 1089-99.
- Breitner, J., Silverman, J., Mohs, R., et al** (1988) Familial aggregation in Alzheimer's disease: comparison of risk among relatives of early-and late-onset cases, and among male and female relatives in successive generations. *Neurology*, **38**, 207-12.
- Breitner, J., Gatz, M., Bergem, A., et al** (1993) Use of twin cohorts for research in Alzheimer's disease. *Neurology*, **43**, 261-7.
- Bressler, S., Gray, M., Sopher, B., et al** (1996) cDNA cloning and chromosome mapping of the human Fe65 gene: interaction of the conserved cytoplasmic domains of the human beta-amyloid precursor protein and its homologues with the mouse Fe65 protein. *Hum Mol Genet*, **5**, 1589-98.
- Breteler, M., Claus, J., van Duijn, C., et al** (1992a) Epidemiology of Alzheimer's disease. *Epidemiol Rev*, **14**, 59-82.
- Breteler, M., van den Ouweland, F., Grobbee, D., et al** (1992b) A community-based study of dementia: the Rotterdam Elderly Study. *Neuroepidemiology*, **11**, 23-8.
- Brindle, N., Song, Y., Rogaeva, E., et al** (1998) Analysis of the butyrylcholinesterase gene and nearby chromosome 3 markers in Alzheimer disease. *Hum Mol Genet*, **7**, 933-5.
- Brion, J., Passareiro, H., Nunez, J., et al** (1985) Mise en évidence immunologique de la protéine tau au niveau des lésions de dégénérescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer. *Arch Biol*, **95**, 229-35.
- Brookes, A., Howell, W., Woodburn, K., et al** (1997) Presenilin-I, presenilin-II, and VLDL-R associations in early onset Alzheimer's disease [letter]. *Lancet*, **350**, 336-7.
- Brousseau, T., Legrain, S., Berr, C., et al** (1994) Confirmation of the epsilon 4 allele of the apolipoprotein E gene as a risk factor for late-onset Alzheimer's disease. *Neurology*, **44**, 342-4.
- Brugg, B. & Matus, A.** (1991) Phosphorylation determines the binding of microtubule-associated protein 2 (MAP2) to microtubules in living cells. *J Cell Biol*, **114**, 735-43.
- Buée, L., Ding, W., Delacourte, A., et al** (1993a) Binding of secreted human neuroblastoma proteoglycans to the Alzheimer's amyloid A4 peptide. *Brain Res*, **601**, 154-63.

- Buée, L., Ding, W., Anderson, J., et al** (1993b) 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 Res*, **627**, 199-204.
- Bullido, M., Artiga, M., Recuero, M., et al** (1998) A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nat Genet*, **18**, 69-71.
- Burdick, D., Soreghan, B., Kwon, M., et al** (1992) Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem*, **267**, 546-54.
- Burns, A., Luthert, P., Levy, R., et al** (1990) Accuracy of clinical diagnosis of Alzheimer's disease. *BMJ*, **301**, 1026.
- Busciglio, J., Gabuzda, D., Matsudaira, P., et al** (1993) Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 2092-6.
- Busciglio, J., Lorenzo, A., Yeh, J., et al** (1995) beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron*, **14**, 879-88.
- Buttini, M., Orth, M., Bellosta, S., et al** (1999) Expression of human apolipoprotein E3 or E4 in the brains of apoe^{-/-} mice: isoform-specific effects on neurodegeneration. *J Neurosci*, **19**, 4867-80.
- Cai, X., Golde, T. & Younkin, S.** (1993) Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. *Science*, **259**, 514-6.
- Cai, X., Stanton, J., Fallin, D., et al** (1997) No association between the intronic presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease in clinic and population-based samples. *Am J Med Genet*, **74**, 202-3.
- Campbell, I., Abraham, C., Masliah, E., et al** (1993) Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10061-5.
- Campion, D., Flaman, J., Brice, A., et al** (1995) Mutations of the presenilin I gene in families with early-onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, **4**, 2373-7.
- Carey, D.** (1997) Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J*, **327**, 1-16.
- Carroll, J., Toral-Barza, L. & Gibson, G.** (1992) Cytosolic free calcium and gene expression during chemical hypoxia. *J Neurochem*, **59**, 1836-43.
- Carroll, R., Lust, M. & Emmerling, M.** (1999) Beta-amyloid levels predict cholinesterase activity in human cerebrospinal fluid. *NeuroReport*, **10**, 127-30.
- Castano, E., Prelli, F., Wisniewski, T., et al** (1995) Fibrillogenesis in Alzheimer's disease of amyloid beta peptides and apolipoprotein E. *Biochem J*, **306**, 599-604.
- Castillo, G., Ngo, C., Cummings, J., et al** (1997) Perlecan binds to the beta-amyloid proteins (A beta) of Alzheimer's disease, accelerates A beta fibril formation, and maintains A beta fibril stability. *J Neurochem*, **69**, 2452-65.
- Chandra, V., Ganguli, M., Pandav, R., et al** (1998) Prevalence of Alzheimer's disease and other dementias in rural India: the Indo-US study. *Neurology*, **51**, 1000-8.
- Chao, C., Hu, H. & Peterson, P.** (1998) b-Amyloid Protein-induced Microglial Cell Activation. *Alzheimer's Disease Review*, **3**, 87-90.
- Chapman, J., Wang, N., Treves, T., et al** (1998) ACE, MTHFR, factor V Leiden, and APOE polymorphisms in patients with vascular and Alzheimer's dementia. *Stroke*, **29**, 1401-4.

- Chartier-Harlin, M.-C., Crawford, F., Houlden, H., et al** (1991) Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the β -amyloid precursor protein gene. *Nature*, **353**, 844-846.
- Chartier-Harlin, M.-C., Parfitt, M., Legrain, S., et al** (1994) Apolipoprotein E, epsilon 4 allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset forms of Alzheimer's disease: analysis of the 19q13.2 chromosomal region. *Hum Mol Genet*, **3**, 569-574.
- Chen, L., Baum, L., Ng, H., et al** (1998) No association detected between very-low-density lipoprotein receptor (VLDL-R) and late-onset Alzheimer's disease in Hong Kong Chinese. *Neurosci Lett*, **241**, 33-6.
- Chong, Y.** (1997) Effect of a carboxy-terminal fragment of the Alzheimer's amyloid precursor protein on expression of proinflammatory cytokines in rat glial cells. *Life Sci*, **61**, 2323-33.
- Christie, R., Chung, H., Rebeck, G., et al** (1996) Expression of the very low-density lipoprotein receptor (VLDL-r), an apolipoprotein-E receptor, in the central nervous system and in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, **55**, 491-8.
- Chui, D., Tanahashi, H., Ozawa, K., et al** (1999) Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. *Nat Med*, **5**, 560-4.
- Chung, H., Roberts, C., Greenberg, S., et al** (1996) Lack of Association of Trinucleotide Repeat Polymorphisms in the Very-Low-Density Lipoprotein Receptor Gene with Alzheimer's Disease. *Ann Neurol*, **39**, 800-803.
- Citron, M., Diehl, T., Gordon, G., et al** (1996) Evidence that the 42- and 40-amino acid forms of amyloid beta protein are generated from the beta-amyloid precursor protein by different protease activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13170-5.
- Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., et al** (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature*, **360**, 672-4.
- Clatworthy, A., Gomez-Isla, T., Rebeck, G., et al** (1997) Lack of association of a polymorphism in the low-density lipoprotein receptor-related protein gene with Alzheimer disease. *Arch Neurol*, **54**, 1289-92.
- Cleveland, D., Hwo, S. & Kirschner, M.** (1977a) Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol*, **116**, 227-47.
- Cleveland, D., Hwo, S. & Kirschner, M.** (1977b) Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol*, **116**, 207-25.
- Combarros, O., Escribano, J., Sanchez-Velasco, P., et al** (1998) Association of the HLA-A2 allele with an earlier age of onset of Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand*, **98**, 140-1.
- Cook, D., Sung, J., Golde, T., et al** (1996) Expression and analysis of presenilin 1 in a human neuronal system: localization in cell bodies and dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 9223-8.
- Corder, E., Saunders, A., Strittmatter, W., et al** (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, **261**, 921-3.
- Corder, E., Saunders, A., Risch, N., et al** (1994) Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet*, **7**, 180-4.

- Corder, E., Jelic, V., Basun, H., et al** (1997) No difference in cerebral glucose metabolism in patients with Alzheimer disease and differing apolipoprotein E genotypes. *Arch Neurol*, **54**, 273-7.
- Cotman, C., Tenner, A. & Cummings, B.** (1996) beta-Amyloid converts an acute phase injury response to chronic injury responses. *Neurobiol Aging*, **17**, 723-31.
- Crawford, F., Fallin, D., Suo, Z., et al** (1998) The butyrylcholinesterase gene is neither independently nor synergistically associated with late-onset AD in clinic- and community- based populations. *Neurosci Lett*, **249**, 115-8.
- Crawford, F., Town, T., Freeman, M., et al** (1999) The alpha-2 macroglobulin gene is not associated with Alzheimer's disease in a case-control sample. *Neurosci Lett*, **270**, 133-6.
- Cruts, M., Hendriks, L. & Van Broeckhoven, C.** (1996) The presenilin genes: a new gene family involved in Alzheimer disease pathology. *Hum Mol Genet*, **5**, 1449-55.
- Cruts, M. & Van Broeckhoven, C.** (1998) Presenilin mutations in Alzheimer's disease. *Hum Mutat*, **11**, 183-90.
- Cruts, M., van Duijn, C. M., Backhovens, H., et al** (1998) Estimation of the genetic contribution of presenilin-1 and -2 mutations in a population-based study of presenile Alzheimer disease. *Hum Mol Genet*, **7**, 43-51.
- Crystal, H., Dickson, D., Fuld, P., et al** (1988) Clinico-pathologic studies in dementia: nondemented subjects with pathologically confirmed Alzheimer's disease. *Neurology*, **38**, 1682-7.
- Das, S. & Potter, H.** (1995) Expression of the Alzheimer amyloid-promoting factor antichymotrypsin is induced in human astrocytes by IL-1. *Neuron*, **14**, 447-56.
- David, F., Kan, C. & Lucotte, G.** (1987) Two Taq I RFLPs for human alpha-2 macroglobulin (alpha 2M) using a full length cDNA probe. *Nucleic Acids Res*, **15**, 374.
- Davies, P.** (1978) Loss of choline acetyltransferase activity in normal aging and in senile dementia. *Adv Exp Med Biol*, **113**, 251-6.
- Davies, P.** (1986) The genetics of Alzheimer's disease: a review and a discussion of the implications. *Neurobiol Aging*, **7**, 459-66.
- Davignon, J., Gregg, R. & Sing, C.** (1988) Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis*, **8**, 1-21.
- De Strooper, B. & Van Leuven, F.** (1993) Alpha 2-macroglobulin and subacute-phase responses in Alzheimer's disease [letter]. *Immunol Today*, **14**, 143-4.
- De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., et al** (1998) Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*, **391**, 387-90.
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., et al** (1999) A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*, **398**, 518-22.
- Delacourte, A., Sergeant, N., Wattez, A., et al** (1998) Vulnerable neuronal subsets in Alzheimer's and Pick's disease are distinguished by their tau isoform distribution and phosphorylation. *Ann Neurol*, **43**, 193-204.
- DeMattos, R., Thorngate, F. & Williams, D.** (1999) A test of the cytosolic apolipoprotein E hypothesis fails to detect the escape of apolipoprotein E from the endocytic pathway into the cytosol and shows that direct expression of apolipoprotein E in the cytosol is cytotoxic. *J Neurosci*, **19**, 2464-73.
- Dickson, D., Sinicropi, S., Yen, S., et al** (1996) Glycation and microglial reaction in lesions of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, **17**, 733-43.

- Dickson, D.** (1997) The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol*, **56**, 321-39.
- Diedrich, J., Minnigan, H., Carp, R., et al** (1991) Neuropathological changes in scrapie and Alzheimer's disease are associated with increased expression of apolipoprotein E and cathepsin D in astrocytes. *J Virol*, **65**, 4759-68.
- DiPatre, P. & Gelman, B.** (1997) Microglial cell activation in aging and Alzheimer disease: partial linkage with neurofibrillary tangle burden in the hippocampus. *J Neuropathol Exp Neurol*, **56**, 143-9.
- Donnelly, R., Friedhoff, A., Beer, B., et al** (1990) Interleukin-1 stimulates the beta-amyloid precursor protein promoter. *Cell Mol Neurobiol*, **10**, 485-95.
- Dow, K., Riopelle, R. & Kisilevsky, R.** (1991) Domains of neuronal heparan sulphate proteoglycans involved in neurite growth on laminin. *Cell Tissue Res*, **265**, 345-51.
- Dow, D., Lindsey, N., Cairns, N., et al** (1999) Alpha-2 macroglobulin polymorphism and Alzheimer disease risk in the UK [letter]. *Nat Genet*, **22**, 16-7; discussion 21-2.
- Du, Y., Glinn, M., Dodel, R., et al** (1997) α 2-Macroglobulin as a amyloid peptide-binding plasma protein. *J Neurochem*, **69**, 299-305.
- Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., et al** (1996) Increased amyloid-beta₄₂(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature*, **383**, 710-713.
- Eckman, C., Mehta, N., Crook, R., et al** (1997) A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of A beta 42(43). *Hum Mol Genet*, **6**, 2087-9.
- Ellis, R., Olichney, J., Thal, L., et al** (1996) Cerebral amyloid angiopathy in the brains of patients with Alzheimer's disease: the CERAD experience, Part XV. *Neurology*, **46**, 1592-6.
- Eriksson, S., Janciauskiene, S. & Lannfelt, L.** (1995) Alpha 1-antichymotrypsin regulates Alzheimer beta-amyloid peptide fibril formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 2313-7.
- Evans, D., Funkenstein, H., Albert, M., et al** (1989) Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *JAMA*, **262**, 2551-6.
- Ezquerro, M., Blesa, R., Tolosa, E., et al** (1997) The genotype 2/2 of the presenilin-1 polymorphism is decreased in Spanish early-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, **227**, 201-4.
- Fagan, A., Bu, G., Sun, Y., et al** (1996) Apolipoprotein E-containing high density lipoprotein promotes neurite outgrowth and is a ligand for the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem*, **271**, 30121-5.
- Fallin, D., Reading, S., Schinka, J., et al** (1997a) No interaction between the APOE and the alpha-1-antichymotrypsin genes on risk for Alzheimer's disease. *Am J Med Genet*, **74**, 192-4.
- Fallin, D., Gauntlett, A. C., Scibelli, P., et al** (1997b) No association between the very low density lipoprotein receptor gene and late-onset Alzheimer's disease nor interaction with the apolipoprotein E gene in population-based and clinic samples. *Genet Epidemiol*, **14**, 299-305.
- Fallin, D., Kundtz, A., Town, T., et al** (1997c) No association between the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) gene and late-onset Alzheimer's disease in a community-based sample. *Neurosci Lett*, **233**, 145-7.

- Farrer, L., O'Sullivan, D., Cupples, L., et al** (1989) Assessment of genetic risk for Alzheimer's disease among first-degree relatives. *Ann Neurol*, **25**, 485-93.
- Feingold, N.** (1972) Association phenomena in a population. *Nouv Rev Fr Hematol*, **12**, 471-5.
- Felsenstein, K., Hunihan, L. & Roberts, S.** (1994) Altered cleavage and secretion of a recombinant beta-APP bearing the Swedish familial Alzheimer's disease mutation. *Nat Genet*, **6**, 251-6.
- Fiore, F., Zambrano, N., Minopoli, G., et al** (1995) The regions of the Fe65 protein homologous to the phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding domain of Shc bind the intracellular domain of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *J Biol Chem*, **270**, 30853-6.
- Fitch, N., Becker, R. & Heller, A.** (1988) The inheritance of Alzheimer's disease: a new interpretation. *Ann Neurol*, **23**, 14-9.
- Flament, S. & Delacourte, A.** (1989) Abnormal tau species are produced during Alzheimer's disease neurodegenerating process. *FEBS Lett*, **247**, 213-6.
- Flament, S., Delacourte, A., Hemon, B., et al** (1989) Characterization of two pathological tau protein, variants in Alzheimer brain cortices. *J Neurol Sci*, **92**, 133-41.
- Flament, S., Delacourte, A. & Mann, D.** (1990) Phosphorylation of Tau proteins: a major event during the process of neurofibrillary degeneration. A comparative study between Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Brain Res*, **516**, 15-9.
- Fleming, L., Weisgraber, K., Strittmatter, W., et al** (1996) Differential binding of apolipoprotein E isoforms to tau and other cytoskeletal proteins. *Exp Neurol*, **138**, 252-60.
- Folstein, M., Folstein, S. & McHugh, P.** (1975) "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*, **12**, 189-98.
- Francis, P., Palmer, A., Sims, N., et al** (1985) Neurochemical studies of early-onset Alzheimer's disease. Possible influence on treatment. *N Engl J Med*, **313**, 7-11.
- Fraser, P., Nguyen, J., McLachlan, D., et al** (1993) Alpha 1-antichymotrypsin binding to Alzheimer A beta peptides is sequence specific and induces fibril disaggregation in vitro. *J Neurochem*, **61**, 298-305.
- Frucht, S. & Koo, E.** (1993) beta-Amyloid protein is higher in Alzheimer's disease brains: description of a quantitative biochemical assay. *J Neuropathol Exp Neurol*, **52**, 640-7.
- Fukushima, Y., Bell, G. & Shows, T.** (1988) The polymorphic human alpha 2-macroglobulin gene (A2M) is located in chromosome region 12p12.3----p13.3. *Cytogenet Cell Genet*, **48**, 58-9.
- Galinsky, D., Tysoe, C., Brayne, C., et al** (1997) Analysis of the apo E/apo C-I, angiotensin converting enzyme and methylenetetrahydrofolate reductase genes as candidates affecting human longevity. *Atherosclerosis*, **129**, 177-83.
- Ganter, U., Strauss, S., Jonas, U., et al** (1991) Alpha 2-macroglobulin synthesis in interleukin-6-stimulated human neuronal (SH-SY5Y neuroblastoma) cells. Potential significance for the processing of Alzheimer beta-amyloid precursor protein. *FEBS Lett*, **282**, 127-31.
- Garver, T., Lehman, R. & Billingsley, M.** (1996) Microtubule assembly competence analysis of freshly-biopsied human tau, dephosphorylated tau, and Alzheimer tau. *J Neurosci Res*, **44**, 12-20.

- Garzon-Rodriguez, W., Sepulveda-Becerra, M., Milton, S., et al** (1997) Soluble amyloid Ab(1-40) exists as a stable dimer at low concentrations. *J Biol Chem*, **272**, 21037-21044.
- Geddes, J., Vowles, G., Nicoll, J., et al** (1999) Neuronal cytoskeletal changes are an early consequence of repetitive head injury. *Acta Neuropathol*, **98**, 171-8.
- Genis, I., Gordon, I., Sehayek, E., et al** (1995) Phosphorylation of tau in apolipoprotein E-deficient mice. *Neurosci Lett*, **199**, 5-8.
- Geula, C., Wu, C., Saroff, D., et al** (1998) Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. *Nat Med*, **4**, 827-31.
- Ghiso, J., Tagliavini, F., Timmers, W., et al** (1989) Alzheimer's disease amyloid precursor protein is present in senile plaques and cerebrospinal fluid: immunohistochemical and biochemical characterization. *Biochem Biophys Res Commun*, **163**, 430-7.
- Gibson, G., Peterson, C. & Freeman, G.** (1987) Alterations in neurotransmitter metabolism and calcium homeostasis during aging and Alzheimer's disease. In *Molecular neuropathology of aging*, vol. 27 (ed. C. E. F. edited by Peter Davies), pp. 85-94.
- Gibson, G., Toral-Barza, L., Manger, T., et al** (1989) Neurotransmitters and calcium during hypoxia. In *Cerebral Ischemia and Calcium* (eds A. Hartman & W. Kuschinsky), pp. 215-22. New York: Springer-Verlag.
- Giulian, D.** (1999) Microglia and the immune pathology of Alzheimer disease. *Am J Hum Genet*, **65**, 13-8.
- Glener, G., Henry, J. & Fujihara, S.** (1981) Congophilic angiopathy in the pathogenesis of Alzheimer's degeneration. *Ann Pathol*, **1**, 120-9.
- Glener, G. & Wong, C.** (1984a) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **120**, 885-90.
- Glener, G. & Wong, C.** (1984b) Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **122**, 1131-5.
- Gmitrowicz, A.; Kucharska, A.** (1994) Developmental disorders in the fourth edition of the American classification: diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM IV - optional book). *Psychiatr Pol*, **28**, 509-21.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M.-C., Mullan, M., et al** (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, **349**, 704-706.
- Goedert, M., Spillantini, M., Potier, M., et al** (1989a) 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 J*, **8**, 393-9.
- Goedert, M., Spillantini, M., Jakes, R., et al** (1989b) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*, **3**, 519-26.
- Goedert, M. & Jakes, R.** (1990) Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J*, **9**, 4225-30.

- Goedert, M., Spillantini, M., Cairns, N., et al** (1992) Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron*, **8**, 159-68.
- Goedert, M., Jakes, R., Spillantini, M., et al** (1996) Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature*, **383**, 550-3.
- Goedert, M., Wischik, C., Crowther, R., et al** (1988) Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 4051-5.
- Golde, T., Estus, S., Usiak, M., et al** (1990) Expression of beta amyloid protein precursor mRNAs: recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in Alzheimer's disease using PCR. *Neuron*, **4**, 253-67.
- Goldgaber, D., Lerman, M., McBride, O., et al** (1987) Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science*, **235**, 877-80.
- Gomez-Isla, T., Hollister, R., West, H., et al** (1997) Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, **41**, 17-24.
- Gong, C., Singh, T., Grundke-Iqbal, I., et al** (1993) Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J Neurochem*, **61**, 921-7.
- Gong, C., Shaikh, S., Wang, J., et al** (1995) Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. *J Neurochem*, **65**, 732-8.
- Graves, A., van Duijn, C., Chandra, V., et al** (1991) Alcohol and tobacco consumption as risk factors for Alzheimer's disease: a collaborative re-analysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group. *Int J Epidemiol*, **20**, S48-57.
- Graves, A., Mortimer, J., Larson, E., et al** (1996) Head circumference as a measure of cognitive reserve. Association with severity of impairment in Alzheimer's disease. *Br J Psychiatry*, **169**, 86-92.
- Gravina, S., Ho, L., Eckman, C., et al** (1995) Amyloid beta protein (A beta) in Alzheimer's disease brain. Biochemical and immunocytochemical analysis with antibodies specific for forms ending at A beta 40 or A beta 42(43). *J Biol Chem*, **270**, 7013-6.
- Griffin, W., Stanley, L., Ling, C., et al** (1989) Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 7611-5.
- Grubber, J., Saunders, A., Crane-Gatherum, A., et al** (1999) Analysis of association between Alzheimer disease and the K variant of butyrylcholinesterase (BCHE-K). *Neurosci Lett*, **269**, 115-9.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., et al** (1986) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem*, **261**, 6084-9.
- Gsell, W., Strein, I. & Riederer, P.** (1996) The neurochemistry of Alzheimer type, vascular type and mixed type dementias compared. *J Neural Transm Suppl*, **47**, 73-101.
- Guenette, S., Chen, J., Jondro, P., et al** (1996) Association of a novel human FE65-like protein with the cytoplasmic domain of the beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10832-7.

- Guillaume, D.,** Bertrand, P., Dea, D., *et al* (1996) Apolipoprotein E and low-density lipoprotein binding and internalization in primary cultures of rat astrocytes: isoform-specific alterations. *J Neurochem*, **66**, 2410-8.
- Guo, Q.,** Sopher, B., Furukawa, K., *et al* (1997) Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid beta-peptide: involvement of calcium and oxyradicals. *J Neurosci*, **17**, 4212-22.
- Guttman, R.,** Erickson, A. & Johnson, G. (1995) Tau self-association: stabilization with a chemical cross-linker and modulation by phosphorylation and oxidation state. *J Neurochem*, **64**, 1209-15.
- Haass, C.,** Koo, E., Mellon, A., *et al* (1992a) Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature*, **357**, 500-3.
- Haass, C.,** Schlossmacher, M., Hung, A., *et al* (1992b) Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*, **359**, 322-5.
- Haass, C.,** Hung, A., Selkoe, D., *et al* (1994) Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor. *J Biol Chem*, **269**, 17741-8.
- Haines, J.,** Pritchard, M., Saunders, A., *et al* (1996) No genetic effect of alpha1-antichymotrypsin in Alzheimer disease. *Genomics*, **33**, 53-6.
- Hallman, D.,** Boerwinkle, E., Saha, N., *et al* (1991) The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations. *Am J Hum Genet*, **49**, 338-49.
- Hara, H.** (1999) Involvement of caspase on apoptosis in ischemia-induced neuronal cell death: usefulness of caspase inhibitors for stroke therapy. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **113**, 97-111.
- Hardy, J.** (1997) Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*, **20**, 154-159.
- Harris, M.,** Sanghera, D. & Kamboh, M. (1996) Short report on DNA marker at candidate locus. Two new alleles in the tetranucleotide repeat polymorphism in the LDL-receptor-related protein (LRP) gene. *Clin Genet*, **50**, 54-55.
- Harris, M.,** Bunker, C., Hamman, R., *et al* (1998) Racial differences in the distribution of a low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) polymorphism and its association with serum lipoprotein, lipid and apolipoprotein levels. *Atherosclerosis*, **137**, 187-95.
- Hartigan, J. &** Johnson, G. (1999) Transient increases in intracellular calcium result in prolonged site- selective increases in tau phosphorylation through a glycogen synthase kinase 3beta-dependent pathway. *J Biol Chem*, **274**, 21395-401.
- Hartmann, H.,** Busciglio, J., Baumann, K., *et al* (1997a) Developmental regulation of presenilin-1 processing in the brain suggests a role in neuronal differentiation. *J Biol Chem*, **272**, 14505-14508.
- Hartmann, T.,** Bieger, S., Bruhl, B., *et al* (1997b) Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nat Med*, **3**, 1016-20.
- Hasegawa, M.,** Crowther, R., Jakes, R., *et al* (1997) Alzheimer-like changes in microtubule-associated protein Tau induced by sulfated glycosaminoglycans. Inhibition of microtubule binding, stimulation of phosphorylation, and filament assembly depend on the degree of sulfation. *J Biol Chem*, **272**, 33118-24.

- Helbecque, N., Cottel, D., Hermann, S., et al** (1998a) The butyrylcholinesterase K variant is not associated with AD. *Alzheimer's Report*, **5**, 305-9.
- Helbecque, N., Richard, F., Cottel, D., et al** (1998b) The very low density lipoprotein (VLDL) receptor is a genetic susceptibility factor for Alzheimer disease in a European Caucasian population. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, **12**, 368-71.
- Henderson, V., Paganini-Hill, A., Emanuel, C., et al** (1994) Estrogen replacement therapy in older women. Comparisons between Alzheimer's disease cases and nondemented control subjects. *Arch Neurol*, **51**, 896-900.
- Hendriks, L., van Duijn, C., Cras, P., et al** (1992) Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nat Genet*, **1**, 218-21.
- Hendriks, L., Thinakaran, G., Harris, C., et al** (1997) Processing of presenilin 1 in brains of patients with Alzheimer's disease and controls. *NeuroReport*, **8**, 1717-21.
- Herz, J., Kowal, R., Goldstein, J., et al** (1990) Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment. *EMBO J*, **9**, 1769-76.
- Heston, L., Mastri, A., Anderson, V., et al** (1981) Dementia of the Alzheimer type. Clinical genetics, natural history, and associated conditions. *Arch Gen Psychiatry*, **38**, 1085-90.
- Hibberd, M., Millward, B. & Demaine, A.** (1997) The angiotensin I-converting enzyme (ACE) locus is strongly associated with age and duration of diabetes in patients with type I diabetes. *J Diabetes Complications*, **11**, 2-8.
- Hollenbach, E., Ackermann, S., Hyman, B., et al** (1998) Confirmation of an association between a polymorphism in exon 3 of the low-density lipoprotein receptor-related protein gene and Alzheimer's disease. *Neurology*, **50**, 1905-7.
- Holtzman, D., Pitas, R., Kilbridge, J., et al** (1995) Low density lipoprotein receptor-related protein mediates apolipoprotein E-dependent neurite outgrowth in a central nervous system-derived neuronal cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9480-4.
- Holtzman, D., Bales, K., Wu, S., et al** (1999) Expression of human apolipoprotein E reduces amyloid-beta deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Clin Invest*, **103**, R15-R21.
- Hong, C., Caromile, L., Nomata, Y., et al** (1999) Contrasting role of presenilin-1 and presenilin-2 in neuronal differentiation in vitro. *J Neurosci*, **19**, 637-43.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., et al** (1996) Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*, **274**, 99-102.
- Hu, C., Sung, S., Liu, H., et al** (1998a) Association of apolipoprotein E genotype and intronic polymorphism of the presenilin-1 gene with Alzheimer's disease in elderly Taiwan Chinese. *J Neurol Sci*, **157**, 158-61.
- Hu, C., Sung, S., Liu, H., et al** (1999) No association of alpha-2 macroglobulin gene five-nucleotide deletion with AD in Taiwan Chinese. *Neurology*, **53**, 642-3.
- Hu, Q., Kukull, W., Bressler, S., et al** (1998b) The human FE65 gene: genomic structure and an intronic biallelic polymorphism associated with sporadic dementia of the Alzheimer type. *Hum Genet*, **103**, 295-303.
- Huang, D., Weisgraber, K., Goedert, M., et al** (1995) ApoE3 binding to tau tandem repeat I is abolished by tau serine262 phosphorylation. *Neurosci Lett*, **192**, 209-12.

- Huell, M.,** Strauss, S., Volk, B., *et al* (1995) Interleukin-6 is present in early stages of plaque formation and is restricted to the brains of Alzheimer's disease patients. *Acta Neuropathol*, **89**, 544-51.
- Hughes, S.,** Khorkova, O., Goyal, S., *et al* (1998) α 2-macroglobulin associates with β -amyloid peptide and prevents fibril formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 3275-3280.
- Hulstaert, F.,** Blennow, K., Ivanoiu, A., *et al* (1999) Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid(1-42) and tau levels in CSF. *Neurology*, **52**, 1555-62.
- Hussain, M.,** Strickland, D. & Bakillah, A. (1999) The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annu Rev Nutr*, **19**, 141-72.
- Hutton, M.,** Busfield, F., Wragg, M., *et al* (1996) Complete analysis of the presenilin 1 gene in early onset Alzheimer's disease. *NeuroReport*, **7**, 801-805.
- Ikeda, K.,** Akiyama, H., Haga, C., *et al* (1992) Evidence that neurofibrillary tangles undergo glial modification. *Acta Neuropathol*, **85**, 101-4.
- Ikeda, K.,** Aizawa, T., Haga, S., *et al* (1996) Very Low Density Lipoprotein Receptor and Alzheimer's Disease. In *Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease* (ed. A. Roses), Berlin: Springer-Verlag. p. 74-96.
- Ishiguro, M.,** Imai, Y. & Kohsaka, S. (1995) Expression and distribution of low density lipoprotein receptor-related protein mRNA in the rat central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res*, **33**, 37-46.
- Isoe, K.,** Urakami, K., Ji, Y., *et al* (1996) Presenilin-1 polymorphism in patients with Alzheimer's disease, vascular dementia and alcohol-associated dementia in Japanese population. *Acta Neurol Scand*, **94**, 326-8.
- Itagaki, S.,** McGeer, P. L., Akiyama, H., *et al* (1989) Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Neuroimmunol*, **24**, 173-82.
- Iwatsubo, T.,** Odaka, A., Suzuki, N., *et al* (1994) Visualization of A β 42(43) and A β 40 in senile plaques with end-specific A β monoclonals: evidence that an initially deposited species is A β 42(43). *Neuron*, **13**, 45-53.
- Jarrett, J. &** Lansbury, P., Jr. (1993) Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell*, **73**, 1055-8.
- Jarrett, J.,** Berger, E. & Lansbury, P., Jr. (1993) The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*, **32**, 4693-7.
- Jensen, M.,** Schroder, J., Blomberg, M., *et al* (1999) Cerebrospinal fluid A β 42 is increased early in sporadic Alzheimer's disease and declines with disease progression. *Ann Neurol*, **45**, 504-11.
- Ji, Z.,** Brecht, W., Miranda, R., *et al* (1993) Role of heparan sulfate proteoglycans in the binding and uptake of apolipoprotein E-enriched remnant lipoproteins by cultured cells. *J Biol Chem*, **268**, 10160-7.
- Ji, Z.,** Fazio, S., Lee, Y., *et al* (1994) Secretion-capture role for apolipoprotein E in remnant lipoprotein metabolism involving cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem*, **269**, 2764-72.
- Jiang, H.,** Burdick, D., Glabe, C., *et al* (1994) beta-Amyloid activates complement by binding to a specific region of the collagen-like domain of the C1q A chain. *J Immunol*, **152**, 5050-9.
- Joachim, C.,** Morris, J. & Selkoe, D. (1988) Clinically diagnosed Alzheimer's disease: autopsy results in 150 cases. *Ann Neurol*, **24**, 50-6.

- Johnson, G. & Jenkins, S.** (1996) Tau Protein in Normal and Alzheimer's Disease Brain. *Alzheimer's Disease Review*, **1**, 38-54.
- Johnson, G. & Hartigan, J.** (1998) Tau Protein in Normal and Alzheimer's Disease Brain: An Update. *Alzheimer's Disease Review*, **3**, 125-141.
- Jokinen, E., Sakai, J., Yamamoto, T., et al** (1994) CGG triple repeat polymorphism in VLDL receptor (VLDL-R) gene. *Hum Mol Genet*, **3**, 521.
- Jordan, B., Relkin, N., Ravdin, L., et al** (1997) Apolipoprotein E epsilon4 associated with chronic traumatic brain injury in boxing. *JAMA*, **278**, 136-40.
- Jorm, A., Korten, A. & Henderson, A.** (1987) The prevalence of dementia: a quantitative integration of the literature. *Acta Psychiatr Scand*, **76**, 465-79.
- Kamboh, M., Sanghera, D., Ferrell, R., et al** (1995) APOE*4-associated Alzheimer's disease risk is modified by alpha 1- antichymotrypsin polymorphism [published erratum appears in Nat Genet 1995 Sep;11(1):104]. *Nat Genet*, **10**, 486-8.
- Kamboh, M., Aston, C., Ferrell, R., et al** (1997) Re: Genetic effect of alpha 1- antichymotrypsin on the risk of Alzheimer disease [letter]. *Genomics*, **40**, 382-5.
- Kamboh, M., Ferrell, R. & DeKosky, S.** (1998) Genetic association studies between Alzheimer's disease and two polymorphisms in the low density lipoprotein receptor-related protein gene. *Neurosci Lett*, **244**, 65-8.
- Kamboh, M., Aston, C., Pérez-Tur, J., et al** (1999) A novel mutation in the apolipoprotein E gene (APOE*4 Pittsburgh) is associated with the risk of late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, **263**, 129-32.
- Kan, C., Solomon, E., Belt, K., et al** (1985) Nucleotide sequence of cDNA encoding human alpha 2-macroglobulin and assignment of the chromosomal locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 2282-6.
- Kang, D., Saitoh, T., Chen, X., et al** (1997) Genetic association of the low-density lipoprotein receptor-related protein gene (LRP), an apolipoprotein E receptor, with late-onset Alzheimer's disease. *Neurology*, **49**, 56-61.
- Kang, J., Lemaire, H., Unterbeck, A., et al** (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, **325**, 733-6.
- Katzman, R.** (1993) Education and the prevalence of dementia and Alzheimer's disease. *Neurology*, **43**, 13-20.
- Kehoe, P., Williams, J., Holmans, P., et al** (1996) Association between a PS-1 intronic polymorphism and late onset Alzheimer's disease. *NeuroReport*, **7**, 2155-8.
- Kehoe, P., Williams, H., Holmans, P., et al** (1998) The butyrylcholinesterase K variant and susceptibility to Alzheimer's disease. *J Med Genet*, **35**, 1034-5.
- Kennedy, A., Frackowiak, R., Newman, S., et al** (1995) Deficits in cerebral glucose metabolism demonstrated by positron emission tomography in individuals at risk of familial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, **186**, 17-20.
- Ki, C., Na, D., Kim, J., et al** (1999) No association between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset Alzheimer's disease. *Am J Med Genet*, **88**, 113-5.
- Kidd, M.** (1963) Paired Helical Filaments in Electron Microscopy of AD. *Nature*, **197**, 192-3.
- Kim, D., Iijima, H., Goto, K., et al** (1996) Human apolipoprotein E receptor 2. A novel lipoprotein receptor of the low density lipoprotein receptor family predominantly expressed in brain. *J Biol Chem*, **271**, 8373-80.

- Kim, T., Pettingell, W., Hallmark, O., et al** (1997a) Endoproteolytic cleavage and proteasomal degradation of presenilin 2 in transfected cells. *J Biol Chem*, **272**, 11006-10.
- Kim, T., Pettingell, W., Jung, Y., et al** (1997b) Alternative cleavage of Alzheimer-associated presenilins during apoptosis by a caspase-3 family protease. *Science*, **277**, 373-6.
- Kitaguchi, N., Takahashi, Y., Tokushima, Y., et al** (1988) Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature*, **331**, 530-2.
- Klafki, H., Abramowski, D., Swoboda, R., et al** (1996) The carboxyl termini of beta-amyloid peptides 1-40 and 1-42 are generated by distinct gamma-secretase activities. *J Biol Chem*, **271**, 28655-9.
- Knauer, M., Orlando, R. & Glabe, C.** (1996) Cell surface APP751 forms complexes with protease nexin 2 ligands and is internalized via the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *Brain Res*, **740**, 6-14.
- Kobayashi, K., Muramori, F., Aoki, T., et al** (1998) KP-1 is a marker for extraneuronal neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer diseased brains. *Dement Geriatr Cogn Disord*, **9**, 13-9.
- Kokmen, E., Beard, C., O'Brien, P., et al** (1996) Epidemiology of dementia in Rochester, Minnesota. *Mayo Clin Proc*, **71**, 275-82.
- Konig, G., Monning, U., Czech, C., et al** (1992) Identification and differential expression of a novel alternative splice isoform of the beta A4 amyloid precursor protein (APP) mRNA in leukocytes and brain microglial cells. *J Biol Chem*, **267**, 10804-9.
- Koo, E. & Squazzo, S.** (1994) Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem*, **269**, 17386-9.
- Kosik, K., Joachim, C. & Selkoe, D.** (1986) Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 4044-8.
- Kounnas, M., Moir, R., Rebeck, G., et al** (1995) LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation. *Cell*, **82**, 331-40.
- Kovacs, D., Fausett, H., Page, K., et al** (1996) Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nat Med*, **2**, 224-9.
- Kovacs T., Cairns, N. & Lantos, P.** (1999) Alpha-2-macroglobulin intronic polymorphism is not associated with autopsy-confirmed late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, **273**, 61-3.
- Kowal, R., Herz, J., Goldstein, J., et al** (1989) Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 5810-5814.
- Kowalska, A., Wender, M. & Lannfelt, L.** (1998) Lack of association between an intronic polymorphism in the presenilin- 1 gene and sporadic late-onset Alzheimer disease in Polish patients. *Dement Geriatr Cogn Disord*, **9**, 137-9.
- Ksiazak-Reding, H., Liu, W. & Yen, S.** (1992) Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain Res*, **597**, 209-19.
- Kuhl, D., Koeppe, R., Minoshima, S., et al** (1999) In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease. *Neurology*, **52**, 691-9.

- Kutt, H., Herz, J. & Stanley, K.** (1989) Structure of the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) promoter. *Biochim Biophys Acta*, **1009**, 229-36.
- LaDu, M., Falduto, M., Manelli, A., et al** (1994) Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid. *J Biol Chem*, **269**, 23403-6.
- Lambert, J.-C., Pérez-Tur, J., Dupire, M.-J., et al** (1996) Analysis of the APOE alleles impact in Down's syndrome. *Neurosci Lett*, **220**, 57-60.
- Lambert, J.-C., Pérez-Tur, J., Dupire, M.-J., et al** (1997) Distortion of allelic expression of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, **6**, 2151-2154.
- Lambert, J.-C., Pasquier, F., Cotel, D., et al** (1998a) A new polymorphism in the APOE promoter associated with risk of developing Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, **7**, 533-540.
- Lambert, J.-C., Berr, C., Pasquier, F., et al** (1998b) Pronounced impact of Th1/E47cs mutation compared with -491 AT mutation on neural APOE gene expression and risk of developing Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, **7**, 1511-6.
- Lambert, J.-C., Chartier-Harlin, M.-C., Cotel, D., et al** (1999) Is the LDL receptor-related protein involved in Alzheimer's disease. *Neurogenetics*, **2**, 109-13.
- Landen, M., Hesse, C., Fredman, P., et al** (1996) Apolipoprotein E in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease and other forms of dementia is reduced but without any correlation to the apoE4 isoform. *Dementia*, **7**, 273-8.
- Lander, A., Fujii, D., Gospodarowicz, D., et al** (1982) Characterization of a factor that promotes neurite outgrowth: evidence linking activity to a heparan sulfate proteoglycan. *J Cell Biol*, **94**, 574-85.
- Launer, L., Andersen, K., Dewey, M., et al** (1999) Rates and risk factors for dementia and Alzheimer's disease: results from EURODEM pooled analyses. EURODEM Incidence Research Group and Work Groups. European Studies of Dementia. *Neurology*, **52**, 78-84.
- Laws, S., Taddei, K., Martins, G., et al** (1999) The -491AA polymorphism in the APOE gene is associated with increased plasma apoE levels in Alzheimer's disease. *NeuroReport*, **10**, 879-82.
- LeBlanc, A., Liu, H., Goodyer, C., et al** (1999) Caspase-6 role in apoptosis of human neurons, amyloidogenesis, and Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, **274**, 23426-36.
- Ledesma, M., Bonay, P., Colaco, C., et al** (1994) Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments. *J Biol Chem*, **269**, 21614-9.
- Ledesma, M., Bonay, P. & Avila, J.** (1995) Tau protein from Alzheimer's disease patients is glycated at its tubulin-binding domain. *J Neurochem*, **65**, 1658-64.
- Ledesma, M., Pérez, M., Colaco, C., et al** (1998) Tau glycation is involved in aggregation of the protein but not in the formation of filaments. *Cell Mol Biol*, **44**, 1111-6.
- Lee, M., Slunt, H., Martin, L., et al** (1996) Expression of presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) in human and murine tissues. *J Neurosci*, **16**, 7513-25.
- Lee, V., Balin, B., Otvos, L., Jr., et al** (1991) A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science*, **251**, 675-8.
- Lefranc, D., Vermersch, P., Dallongeville, J., et al** (1996) Relevance of the quantification of apolipoprotein E in the cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, **212**, 91-4.

- Lehmann, D., Johnston, C. & Smith, A. (1997)** Synergy between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset confirmed Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, **6**, 1933-6.
- Lemaire, H., Salbaum, J., Multhaup, G., et al (1989)** The PreA4(695) precursor protein of Alzheimer's disease A4 amyloid is encoded by 16 exons. *Nucleic Acids Res*, **17**, 517-22.
- Lendon, C., Talbot, C., Craddock, N., et al (1997)** Genetic association studies between dementia of the Alzheimer's type and three receptors for apolipoprotein E in a Caucasian population. *Neurosci Lett*, **222**, 187-90.
- Lestavel, S. & Fruchart, J. C. (1994)** Lipoprotein receptors. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **40**, 461-81.
- Leveugle, B., Ding, W., Durkin, J., et al (1997)** Heparin promotes beta-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *Neurochem Int*, **30**, 543-8.
- Levy, E., Carman, M., Fernandez-Madrid, I., et al (1990)** Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science*, **248**, 1124-6.
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., et al (1995)** Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*, **269**, 973-7.
- Liao, A., Nitsch, R., Greenberg, S., et al (1998)** Genetic association of an alpha2-macroglobulin (Val1000Ile) polymorphism and Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, **7**, 1953-6.
- Liao, A., Gomez-Isla, T., Clatworthy, A., et al (1999)** Lack of association of presenilin-1 intron-8 polymorphism with neuropathological features of Alzheimer's disease. *Brain Res*, **816**, 295-8.
- Licastro, F., Morini, M., Polazzi, E., et al (1995a)** Increased serum alpha 1-antichymotrypsin in patients with probable Alzheimer's disease: an acute phase reactant without the peripheral acute phase response. *J Neuroimmunol*, **57**, 71-5.
- Licastro, F., Parnetti, L., Morini, M., et al (1995b)** Acute phase reactant alpha 1-antichymotrypsin is increased in cerebrospinal fluid and serum of patients with probable Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, **9**, 112-8.
- Licastro F., Pedrini, S., Govoni, M., et al (1999)** Apolipoprotein E and alpha-1-antichymotrypsin allele polymorphism in sporadic and familial Alzheimer's disease [In Process Citation]. *Neurosci Lett*, **270**, 129-32.
- Lichtenthaler, S., Wang, R., Grimm, H., et al (1999)** Mechanism of the cleavage specificity of Alzheimer's disease gamma-secretase identified by phenylalanine-scanning mutagenesis of the transmembrane domain of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3053-8.
- Lieberman, J., Schleissner, L., Tachiki, K., et al (1995)** Serum alpha 1-antichymotrypsin level as a marker for Alzheimer-type dementia. *Neurobiol Aging*, **16**, 747-53.
- Lindwall, G. & Cole, R. (1984a)** The purification of tau protein and the occurrence of two phosphorylation states of tau in brain. *J Biol Chem*, **259**, 12241-5.
- Lindwall, G. & Cole, R. (1984b)** Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem*, **259**, 5301-5.
- Liu, H., Fuh, J., Wang, S., et al (1998)** Prevalence and subtypes of dementia in a rural Chinese population. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, **12**, 127-34.

- Liu, W. & Yen, S.** (1996) The state of phosphorylation of normal adult brain tau, fetal tau, and tau from Alzheimer paired helical filaments at amino acid residue Ser262. *J Neurochem*, **66**, 1131-9.
- Lopes, M., Bogaev, C., Gonias, S., et al** (1994) Expression of alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein is increased in reactive and neoplastic glial cells. *FEBS Lett*, **338**, 301-305.
- Lorenzo, A. & Yankner, B.** (1994) Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 12243-7.
- Lu, K., Hanes, S. & Hunter, T.** (1996) A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature*, **380**, 544-7.
- Lu, P., Wulf, G., Zhou, X., et al** (1999) The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature*, **399**, 784-8.
- Lu, Q. & Wood, J.** (1993) Functional Studies of Alzheimer's Disease Tau Protein. *J Neurosci*, **13**, 508-15.
- Lu, Q., Paredes, M., Medina, M., et al** (1999) delta-catenin, an adhesive junction-associated protein which promotes cell scattering. *J Cell Biol*, **144**, 519-32.
- Lucas** (1999) Nuclear localization of beta-catenin in adult mouse thalamus correlates with low levels of GSK-3beta. *NeuroReport*, **10**, 2699-703.
- Lucotte, G., Aouizerate, A., Gerard, N., et al** (1995) Allele doses of apolipoprotein E type epsilon 4 in sporadic late-onset Alzheimer's disease. *Am J Med Genet*, **60**, 566-9.
- Luft, F.** (1999) Bad genes, good people, association, linkage, longevity and the prevention of cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **26**, 576-9.
- Luine, V.** (1985) Estradiol increases choline acetyltransferase activity in specific basal forebrain nuclei and projection areas of female rats. *Exp Neurol*, **89**, 484-90.
- Ma, J., Yee, A., Brewer, H., Jr., et al** (1994) Amyloid-associated proteins alpha 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta-protein into filaments. *Nature*, **372**, 92-4.
- Ma, J., Brewer, H., Jr. & Potter, H.** (1996) Alzheimer A beta neurotoxicity: promotion by antichymotrypsin, ApoE4; inhibition by A beta-related peptides. *Neurobiol Aging*, **17**, 773-80.
- Mahley, R.** (1988) Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, **240**, 622-30.
- Mahley, R.** (1996) Heparan sulfate proteoglycan/low density lipoprotein receptor-related protein pathway involved in type III hyperlipoproteinemia and Alzheimer's disease. *Isr J Med Sci*, **32**, 414-29.
- Mandelkow, E.-M., Biernat, J., Lichtenberg-Kraag, B., et al** (1995) Phosphorylation of Tau and Its Relationship with Alzheimer Paired Helical Filaments. In *Alzheimer's Disease: Lessons from Cell Biology* (eds K. Kosik, Y. Christen, & D. Selkoe), pp. 103-120. Berlin: Springer-Verlag.
- Mandybur, T. & Chuirazzi, C.** (1990) Astrocytes and the plaques of Alzheimer's disease. *Neurology*, **40**, 635-9.
- Mann, D. & Yates, P.** (1986) Neurotransmitter deficits in Alzheimer's disease and in other dementing disorders. *Hum Neurobiol*, **5**, 147-58.
- Marynen, P., Bell, G. & Cavalli-Sforza, L.** (1985) Three RFLPs associated with the human alpha 2-macroglobulin gene (A2M). *Nucleic Acids Res*, **13**, 8287.

- Marynen, P., Zhang, J., Devriendt, K., et al** (1989) Alpha-2-macroglobulin, pregnancy zone protein and an alpha-2-macroglobulin pseudogene map to chromosome 12p12.2-p13. *Cytogenet Cell Genet*, **51**, 1040.
- Masters, C., Simms, G., Weinman, N., et al** (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 4245-9.
- Matsubara, E., Ghiso, J., Frangione, B., et al** (1999) Lipoprotein-free amyloidogenic peptides in plasma are elevated in patients with sporadic Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Ann Neurol*, **45**, 537-41.
- Matsuo, E., Shin, R., Billingsley, M., et al** (1994) Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron*, **13**, 989-1002.
- Matsushita, S., Arai, H., Muramatsu, T., et al** (1997) Presenilin-1 polymorphism in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Exp Neurol*, **146**, 567-9.
- Matthews, R. & Beal, M.** (1996) Increased 3-nitrotyrosine in brains of Apo E-deficient mice. *Brain Res*, **718**, 181-4.
- Matthijs, G. & Marynen, P.** (1991) A deletion polymorphism in the human alpha-2-macroglobulin (A2M) gene. *Nucl Acids Res*, **19**, 5102.
- Matthijs, G., Devriendt, K., Cassiman, J., et al** (1992) Structure of the human alpha-2-macroglobulin gene and its promoter. *Biochem Biophys Res Comm*, **184**, 596-603.
- Mattson, M., Cheng, B., Davis, D., et al** (1992) beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci*, **12**, 376-89.
- Mattson, M.** (1997) Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev*, **77**, 1081-132.
- Mayeux, R., Ottman, R., Tang, M., et al** (1993) Genetic susceptibility and head injury as risk factors for Alzheimer's disease among community-dwelling elderly persons and their first-degree relatives. *Ann Neurol*, **33**, 494-501.
- Mayeux, R., Ottman, R., Maestre, G., et al** (1995) Synergistic effects of traumatic head injury and apolipoprotein-epsilon 4 in patients with Alzheimer's disease. *Neurology*, **45**, 555-7.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., et al** (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, **34**, 939-944.
- McGeer, P., Kawamata, T., Walker, D., et al** (1993) Microglia in degenerative neurological disease. *Glia*, **7**, 84-92.
- McGeer, P., Rogers, J. & McGeer, E.** (1994a) Neuroimmune mechanisms in Alzheimer disease pathogenesis. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, **8**, 149-58.
- McGeer, P., Klegeris, A., Walker, D., et al** (1994b) Pathological proteins in senile plaques. *Tohoku J Exp Med*, **174**, 269-77.
- McIlroy, S., Vahidassr, M., Savage, D., et al** (1999) Risk of Alzheimer's disease is associated with a very low-density lipoprotein receptor genotype in Northern Ireland. *Am J Med Genet*, **88**, 140-4.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., et al** (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department

- of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, **34**, 939-944.
- Meda, L., Cassatella, M., Szendrei, G., et al** (1995) Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon- gamma. *Nature*, **374**, 647-50.
- Mentlein, R., Ludwig, R. & Martensen, I.** (1998) Proteolytic degradation of Alzheimer's disease amyloid beta-peptide by a metalloproteinase from microglia cells. *J Neurochem*, **70**, 721-6.
- Merchant, C., Tang, M., Albert, S., et al** (1999) The influence of smoking on the risk of Alzheimer's disease. *Neurology*, **52**, 1408-12.
- Merched, A., Blain, H., Visvikis, S., et al** (1997) Cerebrospinal fluid apolipoprotein E level is increased in late-onset Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*, **145**, 33-9.
- Mesulam, M. & Geula, C.** (1994) Butyrylcholinesterase reactivity differentiates the amyloid plaques of aging from those of dementia. *Ann Neurol*, **36**, 722-7.
- Mirra, S., Heyman, A. & McKeel, D.** (1991) The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology*, **41**, 479-486.
- Miyata, M. & Smith, J.** (1996) Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nat Genet*, **14**, 55-61.
- Miyazaki, K., Hasegawa, M., Funahashi, K., et al** (1993) A metalloproteinase inhibitor domain in Alzheimer amyloid protein precursor. *Nature*, **362**, 839-41.
- Moechars, D., Dewachter, I., Lorent, K., et al** (1999) Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J Biol Chem*, **274**, 6483-92.
- Moran, M., Mufson, E. & Gomez-Ramos, P.** (1993) Colocalization of cholinesterases with beta amyloid protein in aged and Alzheimer's brains. *Acta Neuropathol*, **85**, 362-9.
- Morris, J., McKeel, D., Jr., Fulling, K., et al** (1988) Validation of clinical diagnostic criteria for Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, **24**, 17-22.
- Motoi, Y., Iwasaki, T., Hattori, H., et al** (1999) Neuronal Apolipoprotein E Receptor 2 Immunoreactivity in Alzheimer's Disease. *Alzheimer's Reports*, **2**, 87-91.
- Motter, R., Vigo-Pelfrey, C., Kholodenko, D., et al** (1995) Reduction of beta-amyloid peptide42 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, **38**, 643-8.
- Mouchel, Y., Lefrancois, T., Fages, C., et al** (1995) Apolipoprotein E gene expression in astrocytes: developmental pattern and regulation. *NeuroReport*, **7**, 205-8.
- Mui, S., Briggs, M., Chung, H., et al** (1996) A newly identified polymorphism in the apolipoprotein E enhancer gene region is associated with Alzheimer's disease and strongly with the epsilon 4 allele. *Neurology*, **47**, 196-201.
- Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., et al** (1992a) A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet*, **1**, 345-7.
- Mullan, M., Houlden, H., Windelspecht, M., et al** (1992b) A locus for familial early-onset Alzheimer's disease on the long arm of chromosome 14, proximal to the alpha 1-antichymotrypsin gene. *Nat Genet*, **2**, 340-342.
- Mulot, S., Hughes, K., Woodgett, J., et al** (1994) PHF-tau from Alzheimer's brain comprises four species on SDS-PAGE which can be mimicked by in vitro

- phosphorylation of human brain tau by glycogen synthase kinase-3 beta. *FEBS Lett*, **349**, 359-64.
- Murphy, M.**, Hickman, L., Eckman, C., *et al* (1999) gamma-Secretase, evidence for multiple proteolytic activities and influence of membrane positioning of substrate on generation of amyloid beta peptides of varying length. *J Biol Chem*, **274**, 11914-23.
- Murrell, J.**, Farlow, M., Ghetti, B., *et al* (1991) A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science*, **254**, 97-9.
- Myklebost, O.**, Arheden, K., Rogne, S., *et al* (1989) The gene for the human putative apoE receptor is on chromosome 12 in the segment q13-14. *Genomics*, **5**, 65-9.
- Myllykangas, L.**, Polvikoski, T., Sulkava, R., *et al* (1999) Genetic Association of a2-macroglobulin with Alzheimer's Disease in a Finnish Elderly Population. *Ann Neurol*, **46**, 382-90.
- Nakai, T.**, Yamasaki, A., Sakaguchi, M., *et al* (1999) Membrane topology of Alzheimer's disease-related presenilin 1. Evidence for the existence of a molecular species with a seven membrane-spanning and one membrane-embedded structure. *J Biol Chem*, **274**, 23647-58.
- Namba, Y.**, Tomonaga, M., Kawasaki, H., *et al* (1991) Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res*, **541**, 163-6.
- Namba, Y.**, Tsuchiya, H. & Ikeda, K. (1992) Apolipoprotein B immunoreactivity in senile plaque and vascular amyloids and neurofibrillary tangles in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, **134**, 264-6.
- Narindrasorasak, S.**, Altman, R., Gonzalez-DeWhitt, P., *et al* (1995) An interaction between basement membrane and Alzheimer amyloid precursor proteins suggests a role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Lab Invest*, **72**, 272-82.
- Narita, M.**, Holtzman, D., Schwartz, A., *et al* (1997) Alpha2-macroglobulin complexes with and mediates the endocytosis of beta-amyloid peptide via cell surface low-density lipoprotein receptor-related protein. *J Neurochem*, **69**, 1904-1911.
- Naruse, S.**, Igarashi, S., Kobayashi, H., *et al* (1991) Mis-sense mutation Val---Ile in exon 17 of amyloid precursor protein gene in Japanese familial Alzheimer's disease [letter]. *Lancet*, **337**, 978-9.
- Nathan, B.**, Bellosta, S., Sanan, D., *et al* (1994) Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science*, **264**, 850-2.
- Neve, R.**, Harris, P., Kosik, K., *et al* (1986) Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res*, **387**, 271-80.
- Nicoll, J.**, Roberts, G. & Graham, D. (1995) Apolipoprotein E epsilon 4 allele is associated with deposition of amyloid beta-protein following head injury. *Nat Med*, **1**, 135-7.
- Nilsson, L.**, Rogers, J. & Potter, H. (1998) The essential role of inflammation and induced gene expression in the pathogenic pathway of Alzheimer's disease. *Front Biosci*, **3**, d436-46.
- Nishimoto, I.**, Okamoto, T., Matsuura, Y., *et al* (1993) Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature*, **362**, 75-9.
- Nishimura, M.**, Yu, G. & St George-Hyslop, P. (1999) Biology of presenilins as causative molecules for Alzheimer disease. *Clin Genet*, **55**, 219-25.

- Nishiwaki, Y., Kamino, K., Yoshiiwa, A., et al** (1997) T/G polymorphism at intron 9 of presenilin 1 gene is associated with, but not responsible for sporadic late-onset Alzheimer's disease in Japanese population. *Neurosci Lett*, **227**, 123-6.
- Norrman, J., Brookes, A., Yates, C., et al** (1995) Apolipoprotein E genotype and its effect on duration and severity of early and late onset Alzheimer's disease. *Br J Psychiatry*, **167**, 533-6.
- Northemann, W., Andus, T., Gross, V., et al** (1983) Cell-free synthesis of rat alpha 2-macroglobulin and induction of its mRNA during experimental inflammation. *Eur J Biochem*, **137**, 257-262.
- Ohkura, T., Isse, K., Akazawa, K., et al** (1995) Long-term estrogen replacement therapy in female patients with dementia of the Alzheimer type: 7 case reports. *Dementia*, **6**, 99-107.
- Ohm, T., Kirca, M., Bohl, J., et al** (1995) Apolipoprotein E polymorphism influences not only cerebral senile plaque load but also Alzheimer-type neurofibrillary tangle formation. *Neuroscience*, **66**, 583-7.
- Ohm, T., Scharnagl, H., März, W., et al** (1999) Apolipoprotein E isoforms and the development of low and high Braak stages of Alzheimer's disease-related lesions. *Acta Neuropathol*, **98**, 273-80.
- Oishi, M., Mochizuki, Y., Yoshihashi, H., et al** (1996) Laboratory examinations correlated with severity of dementia. *Ann Clin Lab Sci*, **26**, 340-5.
- Okuizumi, K., Onodera, O., Namba, Y., et al** (1995) Genetic association of the very low density lipoprotein (VLDL) receptor gene with sporadic Alzheimer's disease. *Nat Genet*, **11**, 207-9.
- Okuizumi, K., Onodera, O., Seki, K., et al** (1996) Lack of association of very low density lipoprotein receptor gene polymorphism with Caucasian Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, **40**, 251-4.
- Oliver, C. & Holland, A.** (1986) Down's syndrome and Alzheimer's disease: a review. *Psychol Med*, **16**, 307-22.
- Ott, A., Slioter, A., Hofman, A., et al** (1998) Smoking and risk of dementia and Alzheimer's disease in a population-based cohort study: the Rotterdam Study. *Lancet*, **351**, 1840-3.
- Oyama, F., Shimada, H., Oyama, R., et al** (1995) Apolipoprotein E genotype, Alzheimer's pathologies and related gene expression in the aged population. *Brain Res Mol Brain Res*, **29**, 92-8.
- Pablos-Mendez, A., Mayeux, R., Ngai, C., et al** (1997) Association of apo E polymorphism with plasma lipid levels in a multiethnic elderly population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**, 3534-41.
- Paganini-Hill, A. & Henderson, V.** (1994) Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women. *Am J Epidemiol*, **140**, 256-61.
- Paganini-Hill, A. & Henderson, V.** (1996) Estrogen replacement therapy and risk of Alzheimer disease. *Arch Intern Med*, **156**, 2213-7.
- Palinski, W., Ord, V., Plump, A., et al** (1994) ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arterioscler Thromb*, **14**, 605-16.

- Palmer, A.,** Stratmann, G., Procter, A., *et al* (1988) Possible neurotransmitter basis of behavioral changes in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, **23**, 616-20.
- Panegyres, P.,** Mamotte, C., Vasikaran, S., *et al* (1999) Butyrylcholinesterase K variant and Alzheimer's disease. *J Neurol*, **246**, 369-70.
- Papassotiropoulos, A.,** Bagli, M., Jessen, F., *et al* (1999) A genetic variation of the inflammatory cytokine interleukin-6 delays the initial onset and reduces the risk for sporadic Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, **45**, 666-8.
- Paresce, D.,** Chung, H. & Maxfield, F. (1997) Slow degradation of aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta- protein by microglial cells. *J Biol Chem*, **272**, 29390-7.
- Parvathy, S.,** Hussain, I., Karran, E., *et al* (1999) Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by alpha-Secretase Occurs at the Surface of Neuronal Cells. *Biochemistry*, **38**, 9728-9734.
- Pasinetti, G.** (1996) Inflammatory mechanisms in neurodegeneration and Alzheimer's disease: the role of the complement system. *Neurobiol Aging*, **17**, 707-16.
- Payami, H.,** Kaye, J., Becker, W., *et al* (1991) HLA-A2, or a closely linked gene, confers susceptibility to early-onset sporadic Alzheimer's disease in men. *Neurology*, **41**, 1544-8.
- Payami, H.,** Montee, K., Grimslid, H., *et al* (1996) Increased risk of familial late-onset Alzheimer's disease in women. *Neurology*, **46**, 126-9.
- Paykel, E.,** Brayne, C., Huppert, F., *et al* (1994) Incidence of dementia in a population older than 75 years in the United Kingdom. *Arch Gen Psychiatry*, **51**, 325-32.
- Pei, J.,** Tanaka, T., Tung, Y., *et al* (1997) Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol*, **56**, 70-8.
- Pellegrini, L.,** Passer, B., Tabaton, M., *et al* (1999) Alternative, non-secretase processing of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein during apoptosis by caspase-6 and -8. *J Biol Chem*, **274**, 21011-6.
- Pérez, R.,** Soriano, S., Hayes, J., *et al* (1999) Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including abeta42. *J Biol Chem*, **274**, 18851-6.
- Pérez-Tur, J.,** Campion, D., Martinez, M., *et al* (1995) Evidence for apolipoprotein E epsilon 4 association in early-onset Alzheimer's patients with late-onset relatives. *Am J Med Genet*, **60**, 550-553.
- Pérez-Tur, J.,** Wavrant-De Vrièze, F., Lambert, J.-C., *et al* (1996) Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease. The Alzheimer's Study Group [letter; comment]. *The Lancet*, **347**, 1560-1561.
- Pericak-Vance, M.,** Bass, M., Yamaoka, L., *et al* (1997) Complete genomic screen in late-onset familial Alzheimer disease: Evidence for a locus on chromosome 12. *JAMA*, **278**, 1237-1241.
- Perlmutter, L.,** Scott, S., Barron, E., *et al* (1992) MHC class II-positive microglia in human brain: association with Alzheimer lesions [published erratum appears in *J Neurosci Res* 1993 Jun 15;35(3):346]. *J Neurosci Res*, **33**, 549-58.
- Perry, G.,** Siedlak, S., Richey, P., *et al* (1991) Association of heparan sulfate proteoglycan with the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, **11**, 3679-83.
- Pike, C.,** Walencewicz, A., Glabe, C., *et al* (1991) In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res*, **563**, 311-4.

- Pike, C., Burdick, D., Walencewicz, A., et al** (1993) Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci*, **13**, 1676-87.
- Pike, C., Cummings, B., Monzavi, R., et al** (1994) Beta-amyloid-induced changes in cultured astrocytes parallel reactive astrocytosis associated with senile plaques in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, **63**, 517-31.
- Pirim, I.** (1998) Production of anti-polyubiquitin and anti-ubiquitin carboxyl terminal hydrolase antibodies and immunohistochemically assessment of them on brain sections of Alzheimer's disease and Lewy body disease. *Int J Neurosci*, **95**, 33-42.
- Pirttila, T., Soininen, H., Heinonen, O., et al** (1996) Apolipoprotein E (apoE) levels in brains from Alzheimer disease patients and controls. *Brain Res*, **722**, 71-7.
- Pirttila, T., Soininen, H., Mehta, P., et al** (1997) Apolipoprotein E genotype and amyloid load in Alzheimer disease and control brains. *Neurobiol Aging*, **18**, 121-7.
- Pitas, R., Boyles, J., Lee, S., et al** (1987) Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E- containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*, **917**, 148-61.
- Podlisny, M., Mammen, A., Schlossmacher, M., et al** (1990) Detection of soluble forms of the beta-amyloid precursor protein in human plasma. *Biochem Biophys Res Commun*, **167**, 1094-101.
- Poirier, J., Hess, M., May, P., et al** (1991) Astrocytic apolipoprotein E mRNA and GFAP mRNA in hippocampus after entorhinal cortex lesioning. *Brain Res Mol Brain Res*, **11**, 97-106.
- Poller, W., Faber, J. & Olek, K.** (1991) Sequence polymorphism in the human alpha-2-macroglobulin (A2M) gene. *Nucleic Acids Res*, **19**, 198.
- Poller, W., Faber, J.-P., Klobeck, G., et al** (1992) Cloning of the human alpha-2-macroglobulin gene and detection of mutations in two functional domains: the bait region and the thiolester site. *Hum Genet*, **88**, 313-319.
- Ponte, P., Gonzalez-DeWhitt, P., Schilling, J., et al** (1988) A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. *Nature*, **331**, 525-7.
- Price, D. & Sisodia, S.** (1998) Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. *Annu Rev Neurosci*, **21**, 479-505.
- Price, J., Davis, P., Morris, J., et al** (1991) The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, **12**, 295-312.
- Pritchard, M., Saunders, A., Gaskell, P., et al** (1996) No association between very low density lipoprotein receptor (VLDL-R) and Alzheimer disease in American Caucasians. *Neurosci Lett*, **209**, 105-8.
- Probst, A., Langui, D., Ipsen, S., et al** (1991) Deposition of beta/A4 protein along neuronal plasma membranes in diffuse senile plaques. *Acta Neuropathol*, **83**, 21-9.
- Qiu, W., Borth, W., Ye, Z., et al** (1996) Degradation of amyloid b-protein by a serine protease-alpha-2-macroglobulin complex. *J Biol Chem*, **271**, 8443-8451.
- Rabin, M., Watson, M., Kidd, V., et al** (1986) Regional location of alpha 1-antichymotrypsin and alpha 1-antitrypsin genes on human chromosome 14. *Somat Cell Mol Genet*, **12**, 209-14.
- Rao, V., Cupples, A., van Duijn, C., et al** (1996) Evidence for major gene inheritance of Alzheimer disease in families of patients with and without apolipoprotein E epsilon 4. *Am J Hum Genet*, **59**, 664-75.

- Rebeck, G.,** Harr, S., Strickland, D., *et al* (1995) Multiple, diverse senile plaque-associated proteins are ligands of an apolipoprotein E receptor, the α 2-macroglobulin receptor/low-density-lipoprotein receptor-related protein. *Ann Neurol*, **37**, 211-217.
- Rebeck, W.,** Reiter, J., Strickland, D., *et al* (1993) Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron*, **11**, 575-580.
- Reiman, E.,** Caselli, R., Yun, L., *et al* (1996) Preclinical evidence of Alzheimer's disease in persons homozygous for the epsilon 4 allele for apolipoprotein E. *N Engl J Med*, **334**, 752-8.
- Robakis, N.,** Ramakrishna, N., Wolfe, G., *et al* (1987) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1987 Oct;84(20):7221]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 4190-4.
- Roberts, G.,** Gentleman, S., Lynch, A., *et al* (1994) Beta amyloid protein deposition in the brain after severe head injury: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **57**, 419-25.
- Rocca, W.,** Hofman, A., Brayne, C., *et al* (1991) Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe: a collaborative study of 1980-1990 prevalence findings. The EURODEM- Prevalence Research Group. *Ann Neurol*, **30**, 381-90.
- Rogaeva, E.,** Premkumar, S., Song, Y., *et al* (1998) Evidence for an Alzheimer disease susceptibility locus on chromosome 12 and for further locus heterogeneity. *JAMA*, **280**, 614-618.
- Rogers, J.,** Cooper, N., Webster, S., *et al* (1992) Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 10016-20.
- Rogers, J.,** Leiter, L., McPhee, J., *et al* (1999) Translation of the alzheimer amyloid precursor protein mRNA is up-regulated by interleukin-1 through 5'-untranslated region sequences. *J Biol Chem*, **274**, 6421-31.
- Roher, A.,** Kasunic, T., Woods, A., *et al* (1994) Proteolysis of A beta peptide from Alzheimer disease brain by gelatinase A. *Biochem Biophys Res Commun*, **205**, 1755-61.
- Roks, G.,** Cruts, M., Bullido, M., *et al* (1998) The -491 A/T polymorphism in the regulatory region of the apolipoprotein E gene and early-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, **258**, 65-8.
- Rooke, K.,** Goate, A., Fidani, L., *et al* (1992) Screening of the promoter and the beta-amyloid sequence of the APP gene polymorphism in families with late onset alzheimer's disease. *Neurodegeneration*, **1**, 237-240.
- Roses, A.** (1996) Apolipoprotein E in neurology. *Curr Opin Neurol*, **9**, 265-70.
- Rudelli, R.,** Strom, J., Welch, P., *et al* (1982) Posttraumatic premature Alzheimer's disease. Neuropathologic findings and pathogenetic considerations. *Arch Neurol*, **39**, 570-5.
- Rumble, B.,** Retallack, R., Hilbich, C., *et al* (1989) Amyloid A4 protein and its precursor in Down's syndrome and Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, **320**, 1446-52.
- Ruoslahti, E.** & Yamaguchi, Y. (1991) Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell*, **64**, 867-9.
- Sabbagh, M.,** Galasko, D. & Thal, L. (1997) β -Amyloid and Treatment Opportunities for Alzheimer's Disease. *Alzheimer's Disease Review*, **3**, 1-19.
- Saitoh, T.** & Mook-Jung, I. (1996) Is understanding the biological function of APP important in understanding Alzheimer's disease. *Alzheimer's Disease Review*, **1**, 30-36.

- Sanan, D.,** Weisgraber, K., Russell, S., *et al* (1994) Apolipoprotein E associates with beta amyloid peptide of Alzheimer's disease to form novel monofibrils. Isoform apoE4 associates more efficiently than apoE3. *J Clin Invest*, **94**, 860-9.
- Sandbrink, R.,** Masters, C. & Beyreuther, K. (1994a) Beta A4-amyloid protein precursor mRNA isoforms without exon 15 are ubiquitously expressed in rat tissues including brain, but not in neurons. *J Biol Chem*, **269**, 1510-7.
- Sandbrink, R.,** Masters, C. & Beyreuther, K. (1994b) APP gene family: unique age-associated changes in splicing of Alzheimer's betaA4-amyloid protein precursor. *Neurobiol Dis*, **1**, 13-24.
- Sasaki, A.,** Yamaguchi, H., Ogawa, A., *et al* (1997) Microglial activation in early stages of amyloid beta protein deposition. *Acta Neuropathol*, **94**, 316-22.
- Sato-Harada, R.,** Okabe, S., Umeyama, T., *et al* (1996) Microtubule-associated proteins regulate microtubule function as the track for intracellular membrane organelle transports. *Cell Struct Funct*, **21**, 283-95.
- Saunders, A.,** Strittmatter, W., Schmechel, D., *et al* (1993) Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*, **43**, 1467-72.
- Sberna, G.,** Saez-Valero, J., Beyreuther, K., *et al* (1997) The amyloid beta-protein of Alzheimer's disease increases acetylcholinesterase expression by increasing intracellular calcium in embryonal carcinoma P19 cells. *J Neurochem*, **69**, 1177-84.
- Sberna, G.,** Saez-Valero, J., Li, Q., *et al* (1998) Acetylcholinesterase is increased in the brains of transgenic mice expressing the C-terminal fragment (CT100) of the beta-amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, **71**, 723-31.
- Scali, C.,** Prosperi, C., Giovannelli, L., *et al* (1999) Beta(1-40) amyloid peptide injection into the nucleus basalis of rats induces microglia reaction and enhances cortical gamma-aminobutyric acid release in vivo. *Brain Res*, **831**, 319-21.
- Scambler, P.,** Lord, R., Bell, G., *et al* (1985) Two RFLPs for human alpha-2 macroglobulin (A2M). *Nucleic Acids Res*, **13**, 6787.
- Schachter, F.,** Faure-Delanef, L., Guenot, F., *et al* (1994) Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci. *Nat Genet*, **6**, 29-32.
- Schellenberg, G.,** Bird, T., Wijsman, E., *et al* (1992) Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science*, **258**, 668-671.
- Schenk, D.,** Masliah, E., Lee, M., *et al* (1997) The PDAPP Transgenic Mouse as an Animal Model for A β -Induced Amyloidosis and Neuropathology. *Alzheimer's Disease Review*, **2**, 20-27.
- Schmechel, D.,** Saunders, A., Strittmatter, W., *et al* (1993) Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9649-9653.
- Schneider, A.,** Biernat, J., von Bergen, M., *et al* (1999) Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry*, **38**, 3549-58.
- Schoenberg, B.,** Kokmen, E. & Okazaki, H. (1987) Alzheimer's disease and other dementing illnesses in a defined United States population: incidence rates and clinical features. *Ann Neurol*, **22**, 724-9.

- Schofield, P., Logroschino, G., Andrews, H., et al** (1997) An association between head circumference and Alzheimer's disease in a population-based study of aging and dementia. *Neurology*, **49**, 30-7.
- Scott, W., Yamaoka, L., Locke, P., et al** (1997) No association or linkage between an intronic polymorphism of presenilin-1 and sporadic or late-onset familial Alzheimer disease. *Genet Epidemiol*, **14**, 307-15.
- Scott, W., Yamaoka, L., Bass, M., et al** (1998) No genetic association between the LRP receptor and sporadic or late-onset familial Alzheimer disease. *Neurogenetics*, **1**, 179-183.
- Scott, W., Grubber, J., Abou-Donia, S., et al** (1999) Further evidence linking late-onset Alzheimer disease with chromosome 12. *JAMA*, **281**, 513-4.
- Selkoe, D.** (1996) Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, **271**, 18295-18298.
- Sergeant, N., Bussiere, T., Vermersch, P., et al** (1995) Isoelectric point differentiates PHF-tau from biopsy-derived human brain tau proteins. *Neuroreport*, **6**, 2217-20.
- Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., et al** (1992) Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature*, **359**, 325-7.
- Shen, Z., Ding, Q., Wei, C., et al** (1993) CSF cholinesterase in early-onset and late-onset Alzheimer's disease and multi-infarct dementia of Chinese patients. *Acta Neurol Scand*, **87**, 19-24.
- Sheng, J., Ito, K., Skinner, R., et al** (1996) In vivo and in vitro evidence supporting a role for the inflammatory cytokine interleukin-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis. *Neurobiol Aging*, **17**, 761-6.
- Sherrington, R., Rogaev, E., Liang, Y., et al** (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, **375**, 754-760.
- Sherrington, R., Froelich, S., Sorbi, S., et al** (1996) Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant. *Hum Mol Genet*, **5**, 985-8.
- Singleton, A., Lamb, H., Leake, A., et al** (1997) No association between an intronic polymorphism in the presenilin-1 gene and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, **234**, 19-22.
- Singleton, A., Smith, G., Gibson, A., et al** (1998) No association between the K variant of the butyrylcholinesterase gene and pathologically confirmed Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, **7**, 937-9.
- Singleton, A., Gibson, A., McKeith, I., et al** (1999) α 2-Macroglobulin polymorphisms in Alzheimer's Disease and dementia with Lewy bodies. *NeuroReport*, **10**, 1507-10.
- Skoog, I., Hesse, C., Fredman, P., et al** (1997) Apolipoprotein E in cerebrospinal fluid in 85-year-old subjects. Relation to dementia, apolipoprotein E polymorphism, cerebral atrophy, and white matter lesions. *Arch Neurol*, **54**, 267-72.
- Small, D., Clarris, H., Williamson, T., et al** (1996) Neurite-outgrowth regulating functions of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Disease Review*, **1**, 21-29.
- Small, D.** (1998) The role of the amyloid protein precursor (APP) in Alzheimer's disease: does the normal function of APP explain the topography of neurodegeneration? *Neurochem Res*, **23**, 795-806.
- Small, G., Ebeling, S., Matsuyama, S., et al** (1991) Variable association of HLA-A2 in men with early-onset Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*, **12**, 375-7.

- Small, G.,** Mazziotta, J., Collins, M., *et al* (1995) Apolipoprotein E type 4 allele and cerebral glucose metabolism in relatives at risk for familial Alzheimer disease. *JAMA*, **273**, 942-7.
- Smith-Swintosky, V.,** Pettigrew, L., Craddock, S., *et al* (1994) Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect against ischemic brain injury [published erratum appears in *J Neurochem* 1994 Oct;63(4):1585]. *J Neurochem*, **63**, 781-4.
- Snow, A.,** Mar, H., Nochlin, D., *et al* (1988) The presence of heparan sulfate proteoglycans in the neuritic plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, **133**, 456-63.
- Snow, A.,** Mar, H., Nochlin, D., *et al* (1990) Early accumulation of heparan sulfate in neurons and in the beta-amyloid protein-containing lesions of Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Am J Pathol*, **137**, 1253-70.
- Snow, A.,** Sekiguchi, R., Nochlin, D., *et al* (1994) An important role of heparan sulfate proteoglycan (Perlecan) in a model system for the deposition and persistence of fibrillar A beta-amyloid in rat brain. *Neuron*, **12**, 219-34.
- Sodeyama, N.,** Yamada, M., Itoh, Y., *et al* (1999) Lack of Genetic Associations of Alpha-1-Antichymotrypsin Polymorphism with Alzheimer-Type Neuropathological Changes or Sporadic Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*, **10**, 221-225.
- Song, J. & Yang, S.** (1995) Tau protein kinase I/GSK-3 beta/kinase FA in heparin phosphorylates tau on Ser199, Thr231, Ser235, Ser262, Ser369, and Ser400 sites phosphorylated in Alzheimer disease brain. *J Protein Chem*, **14**, 95-105.
- Song, Y.,** Rogaeva, E., Premkumar, S., *et al* (1998) Absence of association between Alzheimer disease and the -491 regulatory region polymorphism of APOE. *Neurosci Lett*, **250**, 189-92.
- Sorbi, S.,** Nacmias, B., Tedde, A., *et al* (1997) Presenilin-1 gene intronic polymorphism in sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, **222**, 132-4.
- Sottrup-Jensen, L.,** Stepanik, T., Kristensen, T., *et al* (1984) Primary structure of human alpha 2-macroglobulin. V. The complete structure. *J Biol Chem*, **259**, 8318-27.
- St George-Hyslop, P.,** Myers, R., Haines, J., *et al* (1989) Familial Alzheimer's disease: progress and problems. *Neurobiol Aging*, **10**, 417-25.
- Stern, Y.,** Gurland, B., Tatemichi, T., *et al* (1994) Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease. *JAMA*, **271**, 1004-10.
- Sternberger, N.,** Sternberger, L. & Ulrich, J. (1985) Aberrant neurofilament phosphorylation in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 4274-6.
- Strauss, S.,** Bauer, J., Ganter, U., *et al* (1992) Detection of interleukin-6 and alpha 2-macroglobulin immunoreactivity in cortex and hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Lab Invest*, **66**, 223-230.
- Strittmatter, W.,** Weisgraber, K., Huang, D., *et al* (1993) Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8098-102.
- Strittmatter, W.,** Weisgraber, K., Goedert, M., *et al* (1994a) Hypothesis: microtubule instability and paired helical filament formation in the Alzheimer disease brain are related to apolipoprotein E genotype. *Exp Neurol*, **125**, 163-71; discussion 172-4.
- Strittmatter, W.,** Saunders, A., Goedert, M., *et al* (1994b) Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 11183-6.

- Struhl, G.** & Greenwald, I. (1999) Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature*, **398**, 522-5.
- Su, J., Cummings, B. & Cotman, C.** (1992) Localization of heparan sulfate glycosaminoglycan and proteoglycan core protein in aged brain and Alzheimer's disease. *Neuroscience*, **51**, 801-13.
- Suzuki, A., Takashima, S., Mizuguchi, M., et al** (1994a) High expression on Kunitz-type protease inhibitor-containing substances in the cerebral vessels of patients with Down syndrome. *Tohoku J Exp Med*, **174**, 181-7.
- Suzuki, N., Cheung, T., Cai, X., et al** (1994b) An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science*, **264**, 1336-40.
- Taddei, K., Yang, D., Fisher, C., et al** (1998) No association of presenilin-1 intronic polymorphism and Alzheimer's disease in Australia. *Neurosci Lett*, **246**, 178-80.
- Takahashi, M., Tsujioka, Y., Yamada, T., et al** (1999) Glycosylation of microtubule-associated protein tau in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol*, **97**, 635-41.
- Takashima, A., Honda, T., Yasutake, K., et al** (1998a) Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta by amyloid beta peptide (25-35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons. *Neurosci Res*, **31**, 317-23.
- Takashima, A., Murayama, M., Murayama, O., et al** (1998b) Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 9637-41.
- Talbot, C., Houlden, H., Craddock, N., et al** (1996) Polymorphism in AACT gene may lower age of onset of Alzheimer's disease. *NeuroReport*, **7**, 534-6.
- Tamaoka, A., Odaka, A., Ishibashi, Y., et al** (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. *J Biol Chem*, **269**, 32721-4.
- Tanahashi, H. & Tabira, T.** (1999) Isolation of human delta-catenin and its binding specificity with presenilin 1. *Neuroreport*, **10**, 563-8.
- Tanzi, R., Gusella, J., Watkins, P., et al** (1987) Amyloid β -protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science*, **235**, 880-884.
- Tanzi, R., McClatchey, A., Lamperti, E., et al** (1988a) Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature*, **331**, 528-30.
- Tanzi, R., Haines, J., Watkins, P., et al** (1988b) Genetic linkage map of human chromosome 21. *Genomics*, **3**, 129-36.
- Terry, R.** (1963) The Fine Structure of Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, **22**, 629-42.
- Terry, R.** (1997) The pathology of Alzheimer's disease: numbers count [editorial]. *Ann Neurol*, **41**, 7.
- Thinakaran, G., Borchelt, D., Lee, M., et al** (1996) Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron*, **17**, 181-190.
- Toji, H., Maruyama, H., Sasaki, K., et al** (1999) Apolipoprotein E promoter polymorphism and sporadic Alzheimer's disease in a Japanese population. *Neurosci Lett*, **259**, 56-8.
- Tomita, T., Tokuhiko, S., Hashimoto, T., et al** (1998) Molecular dissection of domains in mutant presenilin 2 that mediate overproduction of amyloidogenic forms of amyloid

- beta peptides. Inability of truncated forms of PS2 with familial Alzheimer's disease mutation to increase secretion of Abeta42. *J Biol Chem*, **273**, 21153-60.
- Tooyama, I., Kawamata, T., Akiyama, H., et al** (1993) Immunohistochemical study of alpha 2 macroglobulin receptor in Alzheimer and control postmortem human brain. *Mol Chem Neuropathol*, **18**, 153-60.
- Town, T., Paris, D., Fallin, D., et al** (1998) The -491A/T apolipoprotein E promoter polymorphism association with Alzheimer's disease: independent risk and linkage disequilibrium with the known APOE polymorphism. *Neurosci Lett*, **252**, 95-8.
- Travis, J. & Salvesen, G.** (1983) Human plasma proteinase inhibitors. *Annu Rev Biochem*, **52**, 655-709.
- Trojanowski, J., Clark, C., Arai, H., et al** (1996) Elevated Levels of Tau in Cerebrospinal Fluid: Implications for the Antemortem Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Alzheimer's Disease Review*, **1**, 77-83.
- Tseng H., Lu, Q., Henderson, E., et al** (1999) Phosphorylated Tau can promote tubulin assembly. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 9503-8.
- Tyrrell, J., Cosgrave, M., Hawi, Z., et al** (1998) A protective effect of apolipoprotein E e2 allele on dementia in Down's syndrome. *Biol Psychiatry*, **43**, 397-400.
- Tysoe, C., Whittaker, J., Cairns, N., et al** (1997a) Presenilin-1 intron 8 polymorphism is not associated with autopsy- confirmed late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, **222**, 68-9.
- Tysoe, C., Galinsky, D., Robinson, D., et al** (1997b) Analysis of alpha-1 antichymotrypsin, presenilin-1, angiotensin- converting enzyme, and methylenetetrahydrofolate reductase loci as candidates for dementia. *Am J Med Genet*, **74**, 207-12.
- Uchihara, T., Duyckaerts, C., He, Y., et al** (1995) ApoE immunoreactivity and microglial cells in Alzheimer's disease brain. *Neurosci Lett*, **195**, 5-8.
- Ulrich, J., Meier-Ruge, W., Probst, A., et al** (1990) Senile plaques: staining for acetylcholinesterase and A4 protein: a comparative study in the hippocampus and entorhinal cortex. *Acta Neuropathol*, **80**, 624-8.
- Van Broeckhoven, C.** (1995a) Presenilins and Alzheimer disease [news]. *Nat Genet*, **11**, 230-2.
- Van Broeckhoven, C.** (1995b) Molecular genetics of Alzheimer disease: identification of genes and gene mutations. *Eur Neurol*, **35**, 8-19.
- van Duijn, C. & Hofman, A.** (1991) Relation between nicotine intake and Alzheimer's disease. *BMJ*, **302**, 1491-4.
- van Duijn, C., Stijnen, T. & Hofman, A.** (1991) Risk factors for Alzheimer's disease: overview of the EURODEM collaborative re-analysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group. *Int J Epidemiol*, **20**, S4-12.
- van Duijn, C., de Knijff, P., Cruts, M., et al** (1994) Apolipoprotein E4 allele in a population-based study of early-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet*, **7**, 74-8.
- Van Gool, D., De Strooper, B., Van Leuven, F., et al** (1993) alpha 2-Macroglobulin expression in neuritic-type plaques in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, **14**, 233-7.
- Van Leuven, F., Stas, L., Hilliker, C., et al** (1994) Structure of the gene (LRP1) coding for the human alpha2-macroglobulin receptor lipoprotein receptor-related protein. *Genomics*, **24**, 78-89.

- Van Leuven, F., Stas, L., Thiry, E., et al** (1998) Strategy to sequence the 89 exons of the human LRP1 gene coding for the lipoprotein receptor related protein: identification of one expressed mutation among 48 polymorphisms. *Genomics*, **52**, 138-44.
- Vitek, M., Bhattacharya, K., Glendening, J., et al** (1994) Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 4766-70.
- Vito, P., Wolozin, B., Ganjei, J., et al** (1996) Requirement of the familial Alzheimer's disease gene PS2 for apoptosis. Opposing effect of ALG-3. *J Biol Chem*, **271**, 31025-8.
- Vito, P., Ghayur, T. & D'Adamio, L.** (1997) Generation of anti-apoptotic presenilin-2 polypeptides by alternative transcription, proteolysis, and caspase-3 cleavage. *J Biol Chem*, **272**, 28315-20.
- Wade, J., Mirsen, T., Hachinski, V., et al** (1987) The clinical diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Neurol*, **44**, 24-9.
- Walsh, D., Lomakin, A., Benedek, G., et al** (1997) Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J Biol Chem*, **272**, 22364-72.
- Walsh, D., Hartley, D., Kusumoto, Y., et al** (1999) Amyloid beta-Protein Fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J Biol Chem*, **274**, 25945-25952.
- Walter, J., Schindzielorz, A., Grunberg, J., et al** (1999) Phosphorylation of presenilin-2 regulates its cleavage by caspases and retards progression of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1391-6.
- Wang, J., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K.** (1996) Glycosylation of microtubule-associated protein tau: an abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease. *Nat Med*, **2**, 871-5.
- Wang, J., Dickson, D., Trojanowski, J., et al** (1999) The levels of soluble versus insoluble brain A β distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Exp Neurol*, **158**, 328-37.
- Wang, X., Luebbe, P., Gruenstein, E., et al** (1998a) Apolipoprotein E (ApoE) peptide regulates tau phosphorylation via two different signaling pathways. *J Neurosci Res*, **51**, 658-65.
- Wang, X., DeKosky, S., Wisniewski, S., et al** (1998b) Genetic association of two chromosome 14 genes (presenilin 1 and alpha 1-antichymotrypsin) with Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, **44**, 387-90.
- Ward, R., Davis, J., Gray, C., et al** (1996) Presenilin-1 is processed into two major cleavage products in neuronal cell lines. *Neurodegeneration*, **5**, 293-8.
- Webster, S., Glabe, C. & Rogers, J.** (1995) Multivalent binding of complement protein C1Q to the amyloid beta-peptide (A β) promotes the nucleation phase of A β aggregation. *Biochem Biophys Res Commun*, **217**, 869-75.
- Webster, S. & Rogers, J.** (1996) Relative efficacies of amyloid beta peptide (A β) binding proteins in A β aggregation. *J Neurosci Res*, **46**, 58-66.
- Weidemann, A., Paliga, K., Durrwang, U., et al** (1997) Formation of stable complexes between two Alzheimer's disease gene products: Presenilin-2 and b-amyloid precursor protein. *Nat Med*, **3**, 328-332.
- Weidemann, A., Paliga, K., Durrwang, U., et al** (1999) Proteolytic processing of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein within its cytoplasmic domain by caspase-like proteases. *J Biol Chem*, **274**, 5823-9.

- Weihl, C., Ghadge, G., Kennedy, S., et al** (1999) Mutant presenilin-1 induces apoptosis and downregulates Akt/PKB. *J Neurosci*, **19**, 5360-9.
- Weingarten, M., Lockwood, A., Hwo, S., et al** (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**, 1858-62.
- Weisgraber, K., Rall, S., Jr. & Mahley, R.** (1981) Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *J Biol Chem*, **256**, 9077-83.
- Weisgraber, K., Innerarity, T. & Mahley, R.** (1982) Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *J Biol Chem*, **257**, 2518-21.
- Werb, Z. & Chin, J.** (1983a) Endotoxin suppresses expression of apoprotein E by mouse macrophages in vivo and in culture. A biochemical and genetic study. *J Biol Chem*, **258**, 10642-8.
- Werb, Z. & Chin, J.** (1983b) Apoprotein E is synthesized and secreted by resident and thioglycollate- elicited macrophages but not by pyran copolymer- or bacillus Calmette-Guerin-activated macrophages. *J Exp Med*, **158**, 1272-93.
- West, H., Rebeck, G. & Hyman, B.** (1994) Frequency of the apolipoprotein E epsilon 2 allele is diminished in sporadic Alzheimer disease. *Neurosci Lett*, **175**, 46-8.
- Wiebusch, H., Poirier, J., Sevigny, P., et al** (1999) Further evidence for a synergistic association between APOE epsilon4 and BCHE-K in confirmed Alzheimer's disease. *Hum Genet*, **104**, 158-63.
- Wilcock, G., Esiri, M., Bowen, D., et al** (1982) Alzheimer's disease. Correlation of cortical choline acetyltransferase activity with the severity of dementia and histological abnormalities. *J Neurol Sci*, **57**, 407-17.
- Williamson, T., Mok, S., Henry, A., et al** (1996) Secreted glypican binds to the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease (APP) and inhibits APP-induced neurite outgrowth. *J Biol Chem*, **271**, 31215-21.
- Willnow, T.** (1999) The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism. *J Mol Med*, **77**, 306-15.
- Winkler, K., Scharnagl, H., Tislijar, U., et al** (1999) Competition of Abeta amyloid peptide and apolipoprotein E for receptor- mediated endocytosis. *J Lipid Res*, **40**, 447-55.
- Wisniewski, T., Ghiso, J. & Frangione, B.** (1991) Peptides homologous to the amyloid protein of Alzheimer's disease containing a glutamine for glutamic acid substitution have accelerated amyloid fibril formation [published erratum appears in *Biochem Biophys Res Commun* 1991 Nov 14;180(3):1528]. *Biochem Biophys Res Commun*, **179**, 1247-54.
- Wisniewski, T. & Frangione, B.** (1992) Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci Lett*, **135**, 235-8.
- Wisniewski, T., Castano, E., Golabek, A., et al** (1994) Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro. *Am J Pathol*, **145**, 1030-5.
- Wolfe, M., Xia, W., Ostaszewski, B., et al** (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature*, **398**, 513-7.
- Wolozin, B., Iwasaki, K., Vito, P., et al** (1996) Participation of presenilin 2 in apoptosis: enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation. *Science*, **274**, 1710-3.

- Wood, J., Wood, P., Ryan, R., et al** (1993) Cytokine indices in Alzheimer's temporal cortex: no changes in mature IL-1 beta or IL-1RA but increases in the associated acute phase proteins IL-6, alpha 2-macroglobulin and C-reactive protein. *Brain Res*, **629**, 245-52.
- Woodward, R., Singleton, A., Gibson, A., et al** (1998) LRP gene and late-onset Alzheimer's disease. *Lancet*, **352**, 239-40.
- Wragg, M., Hutton, M. & Talbot, C.** (1996) Genetic association between intronic polymorphism in presenilin-1 gene and late-onset Alzheimer's disease. Alzheimer's Disease Collaborative Group. *Lancet*, **347**, 509-12.
- Wright, C., Geula, C. & Mesulam, M.** (1993) Neurological cholinesterases in the normal brain and in Alzheimer's disease: relationship to plaques, tangles, and patterns of selective vulnerability. *Ann Neurol*, **34**, 373-84.
- Wu, X., Jiang, S., Lin, S., et al** (1999) No association between the intronic presenilin 1 polymorphism and Alzheimer's disease in the Chinese population. *Am J Med Genet*, **88**, 1-3.
- Xia, W., Zhang, J., Pérez, R., et al** (1997) Interaction between amyloid precursor protein and presenilins in mammalian cells: implications for the pathogenesis of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8208-13.
- Xia, W., Zhang, J., Ostaszewski, B., et al** (1998) Presenilin 1 regulates the processing of beta-amyloid precursor protein C-terminal fragments and the generation of amyloid beta-protein in endoplasmic reticulum and Golgi. *Biochemistry*, **37**, 16465-71.
- Yamada, T., Kondo, A., Takamatsu, J., et al** (1995) Apolipoprotein E mRNA in the brains of patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*, **129**, 56-61.
- Yamaguchi, H., Ishiguro, K., Uchida, T., et al** (1996) Preferential labeling of Alzheimer neurofibrillary tangles with antisera for tau protein kinase (TPK) I/glycogen synthase kinase-3 beta and cyclin-dependent kinase 5, a component of TPK II. *Acta Neuropathol*, **92**, 232-41.
- Yamaguchi, H., Hirai, S., Morimatsu, M., et al** (1988) Diffuse type of senile plaques in the brains of Alzheimer-type dementia. *Acta Neuropathol*, **77**, 113-9.
- Yamamoto, Y., Yasuda, M., Mori, E., et al** (1999) Failure to confirm a synergistic effect between the K-variant of the butyrylcholinesterase gene and the epsilon4 allele of the apolipoprotein gene in Japanese patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **67**, 94-6.
- Yamanaka, H., Kamimura, K., Tanahashi, H., et al** (1998) Genetic risk factors in Japanese Alzheimer's disease patients: alpha1- ACT, VLDLR, and ApoE. *Neurobiol Aging*, **19**, S43-6.
- Yang, D., Smith, J., Zhou, Z., et al** (1997) Characterization of the binding of amyloid-beta peptide to cell culture- derived native apolipoprotein E2, E3, and E4 isoforms and to isoforms from human plasma. *J Neurochem*, **68**, 721-5.
- Yang, S., Yu, J., Shiah, S., et al** (1994) Protein kinase FA/glycogen synthase kinase-3 alpha after heparin potentiation phosphorylates tau on sites abnormally phosphorylated in Alzheimer's disease brain. *J Neurochem*, **63**, 1416-25.
- Yankner, B., Duffy, L. & Kirschner, D.** (1990) Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science*, **250**, 279-82.

- Yasojima, K.**, Schwab, C., McGeer, E., *et al* (1999) Up-regulated production and activation of the complement system in Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol*, **154**, 927-36.
- Ye, Y.**, Lukinova, N. & Fortini, M. (1999) Neurogenic phenotypes and altered Notch processing in Drosophila Presenilin mutants. *Nature*, **398**, 525-9.
- Yoshikai, S.**, Sasaki, H., Doh-ura, K., *et al* (1990) Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene [published erratum appears in Gene 1991 Jun 30;102(2):291-2]. *Gene*, **87**, 257-63.
- Zambrano, N.**, Buxbaum, J., Minopoli, G., *et al* (1997) Interaction of the phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding- related domains of Fe65 with wild-type and mutant Alzheimer's beta- amyloid precursor proteins. *J Biol Chem*, **272**, 6399-405.
- Zhang, Z.**, Hartmann, H., Do, V., *et al* (1998) Destabilization of beta-catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis. *Nature*, **395**, 698-702.
- Zheng-Fischhofer, Q.**, Biernat, J., Mandelkow, E., *et al* (1998) Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3beta and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation. *Eur J Biochem*, **252**, 542-52.
- Zhou, Z.**, Smith, J., Greengard, P., *et al* (1996) Alzheimer amyloid-beta peptide forms denaturant-resistant complex with type epsilon 3 but not type epsilon 4 isoform of native apolipoprotein E. *Mol Med*, **2**, 175-80.
- Zubenko, G.**, Hughes, H., 3rd & Stiffler, J. (1999) Neurobiological correlates of a putative risk allele for Alzheimer's disease on chromosome 12q. *Neurology*, **52**, 725-32.
- Zuliani, G.** & Hobbs, H. (1994) Tetranucleotide length polymorphism 5' of the alpha2-macroglobulin receptor (A2MR)/ LDL receptor-related protein (LRP) gene. *Hum Mol Genet*, **3**, 215.

(nombre total de 579 citations)

ANNEXE

Critères pour le diagnostic clinique de la maladie d'Alzheimer

(d'après le NINCDS-ADRDA work group, McKhan et al, 1984)

Critères pour le diagnostic clinique de maladie d'Alzheimer probable

- Démence établie à l'examen clinique (MMS par exemple).
- Déficit dans au moins deux domaines des fonctions cognitives.
- Aggravation progressive de la mémoire et d'autres fonctions cognitives.
- Pas d'altération de la conscience.
- Début entre 40 et 90 ans, le plus souvent après 65 ans.
- Absence de cause systémique ou d'autres affections cérébrales pouvant être rendues responsables des troubles.

Éléments en faveur du diagnostic de maladie d'Alzheimer probable

- Détérioration progressive des fonctions spécifiques: langage (aphasie), habilités motrices (apraxie), perception (agnosie).
- Perturbations des activités quotidiennes et du comportement.
- Notion familiale de troubles similaires.
- Normalité des examens paracliniques.

Autres aspects cliniques compatibles avec le diagnostic de maladie d'Alzheimer probable

- Plateaux dans la progression de la maladie.
- Association de symptômes de dépression, insomnie, incontinence, hallucinations, accès d'agitation verbale ou comportementale, troubles sexuels, perte de poids.
- Autres symptômes neurologiques chez certains patients, en particulier en phase évoluée de la maladie (hypertonie, myoclonies, troubles de la marche).
- Crises comitiales tardives.
- Scanner du cerveau normal.

Aspects rendant improbable le diagnostic de maladie d'Alzheimer

- Début soudain.
- Signes neurologiques focaux, survenant en début d'évolution, tels que : hémiplégie, déficit sensitif, altération du champ visuel, incoordination.
- Crises comitiales et troubles de la marche survenant très tôt dans l'évolution de la maladie.

Diagnostic clinique de maladie d'Alzheimer possible

- Sur la base d'un syndrome démentiel et en l'absence d'autres troubles neurologiques, psychiatriques ou systémiques suffisants pour causer la démence, lorsque le mode de début, la présentation et l'aspect évolutif sont atypiques.
- En présence d'une autre affection systémique ou neurologique suffisante pour causer la démence, mais considérée comme n'étant pas la cause de la démence.
- Lorsqu'un déficit cognitif isolé et sévère s'aggrave progressivement en l'absence d'une autre cause identifiable.

Critères diagnostiques de maladie d'Alzheimer certaine

- Les critères de maladie d'Alzheimer probable et,
- La preuve histopathologique obtenue par biopsie ou autopsie.

